



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

EVARISTO JOÃO ORDEM TRAHAMANE

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIPARASITÁRIA EM *Leishmania
braziliensis* E NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS**

Salvador
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EVARISTO JOÃO ORDEM TRAHAMANE

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIPARASITÁRIA EM *Leishmania*
braziliensis E NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Terapia Fotodinâmica Antiparasitária

Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro
Co-orientador: Prof. Dr. Susana Carla Pires Sampaio de Oliveira

Salvador
2015

EVARISTO JOAO ORDEM TRAHAMANE

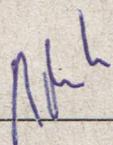
**Efeitos da terapia fotodinâmica antiparasitária em
Leishmania braziliensis e na interação com macrófagos**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 10 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Antônio Luiz Barbosa Pinheiro – Orientador _____
Doutor em Clinical Dentistry pela University of Birmingham,
Reino Unido.
Universidade Federal da Bahia.



Susana Carla Pires Sampaio de Oliveira Susane P. P. S. de Oliveira
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Juliana Santos de Carvalho Monteiro Juliana Santos de Carvalho Monteiro
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Estadual de Feira de Santana.

T765 Trahamane, Evaristo João Ordem
Efeitos da terapia fotodinâmica antiparasitária em
Leishmania braziliensis e na interação com macrófago / Evaristo
João Ordem Trahamane – Salvador, 2015.

51 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro
Co-orientadora: Prof. Dr. Susana Carla Pires Sampaio de
Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciência da Saúde, 2015.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose. 3. Fototerapia.
4. Saúde. I. Pinheiro, Antônio Luiz Barbosa. II. Universidade
Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos colegas e professores do Centro de Biofotônica da Universidade Federal da Bahia e a equipe do Laboratório de Imunoparasitologia, da FIOCRUZ BAHIA, que se manifestaram constantemente oferecendo espaço, tempo e recursos para que esta pesquisa fosse um sucesso.

AGRADECIMENTOS

É difícil escrever um agradecimento para uma sucessão de eventos inimagináveis por que passei, desde a minha aceitação na Universidade, passando pelo período das maravilhosas aulas, da minha pesquisa e de lazer com colegas, professores e esse sempre sorridente povo brasileiro. Muitas personalidades nômimas e anônimas participando consciente e inconscientemente nesse processo. Seria necessária uma obra inteira de tamanho maior desta dissertação, apenas para agradecer toda essa agente mesmo sabendo que parte delas poderia ainda ficar definitivamente esquecidas e por essa razão, não ser mencionados. Para cumprir este dever neste trabalho arrisco-me a fazê-lo de seguinte forma :

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), por me ter selecionado e financiado sem omissão nem interrupção, os meus estudos durante todo o período previsto.

À Universidade Federal da Bahia, principalmente ao seu Programa de Pos-Graduação em Biotecnologia, por me ter aceite a fazer parte do seu grupo de discentes e me ter ensinado muito sobre o maravilhoso mar da ciência e da Biotecnologia. Por me ter acompanhado e ajudado em tudo quanto solicitei durante a minha estadia no Brasil.

Particular agradecimento vai para os professores Paulo Almeida, outrora Coordenador do Mestrado em Biotecnologia e Lilia F. Moura, a atual Coordenadora do mesmo, que sempre assumiram o risco de conviver com estudante estrangeiro e desconhecido que eu era, e estiveram sempre prontos em dar respostas imediatas para todas as dificuldades por que fui enfrentando.

Um outro muito e especial agradecimento vai para Jessica Santos e sua colega Vanessa Brasil, por terem colaborado imenso no meu ingresso ao programa do colegiado, pois sem elas jamais eu poderia estar no Brasil, muito menos ser conhecido pelos que me conheceram no Brasil.

À todos professores dos cursos do colegiado de Biotecnologia, pela forma paciente, sabia e inspiradora com que lecionaram as aulas durante o curso.

Ao centro de Biofotônica da Universidade Federal da Bahia, na pessoa do seu representante e ao meu orientador Professor Antônio Luiz Barbosa Pinheiro que

desde os primeiros momentos sempre esteve ao meu lado, me orientado, me inspirando e me ensinando a tecnologia do LASER em suas variadíssimas aplicações, benefício, pesquisa e seus muitos e inúmeros aspetos.

Por ter me acompanhado, ajudando em tudo quando precisei para o decurso da minha pesquisa e pela forma imediata e adequada com que soube responder as necessidades da mesma.

À todos colegas e professores do Centro de LASER, principalmente a professora Susana Carla Pires Sampaio de Oliveira e ao Gustavo Pires Santos, que sempre estiveram ao meu lado durante todas etapas da minha pesquisa, sacrificando refeições, noites e períodos regularmente de descanso e lazer para dar resposta pronta e atempada a minha pesquisa. À professora Aparecida Marques, também vai o meu especial obrigado.

A FIOCRUZ BAHIA particularmente à equipe do Laboratório de Imunoparasitologia, por me ter aceite usar seus recursos, pela vontade e paciência demonstrada durante todo o período da minha estadia na sua instituição e pelas aprendizagens que deles obtive.

À todos colegas de turma, pelo acolhimento, incentivo ao trabalho, paciência, prontidão com que atenderem minhas preocupações e ensinamentos que os tornaram autênticos professores para mim.

TRAHAMANE, E. Efeitos da Terapia fotodinâmica Antiparasitária em *Leishmania braziliensis* e na interação com macrófago. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença de grande relevância à saúde pública em que a *Leishmania braziliensis* é um dos agentes etiológicos. Seu tratamento é realizado através da administração de medicamentos considerados tóxicos às células humanas, caros e ineficientes às diversas espécies de *Leishmania*, podendo resultar em cepas resistentes e por essas razões, estudos que abordem novas terapias com vista a reduzir os efeitos indesejados são de suma importância. A terapia fotodinâmica (TFD), é uma das técnicas ditas como sendo promissoras no tratamento de inúmeras doenças parasitárias. Portanto, foi proposto este trabalho com o objectivo de avaliar os efeitos da TFD na *L. braziliensis*, bem como a interação deste parasito com macrófagos J774, utilizando como fotossensibilizador, o azul de metileno na concentração de 12,5 µg/mL associado ao LASER vermelho de baixa potência com $\lambda = 660$ nm; 40 mW; 8,4J /cm². Os testes foram realizados em triplicata, e as amostras foram distribuídas em quatro grupos: Grupo Controle, Grupo Fotossensibilizador, Grupo LASER, Grupo TFD. Como métodos avaliativos da morfologia e ultraestrutura das promastigotas face aos efeitos da TFD sobre a *Leishmania*, foram utilizadas as microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão. Para a avaliação da interação, foi utilizada a microscopia ótica. Nela, foram realizadas contagens de macrófagos infetados e não infetados. Como resultado, foi observado que a TFD foi capaz de criar deformações morfológicas e estruturais compatíveis com alterações promovidas por 'stress' oxidativo. Após a análise dos ensaios de interação foi observado que a infecção de macrófagos no grupo TFD apresentou taxa de infecção menor que no controle com uma significância de $p=0.0339$ e $p=0.0181$ nos períodos respetivos de 24 e 48 horas. A avaliação estatística foi realizada através do teste ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Assim, conclui-se que a TFD além de ser eficaz em causar danos potencialmente letais à promastigotas de *Leishmania braziliensis* ela também, é capaz de estimular a resposta do sistema imune, desempenhando um papel sinérgico.

Palavras chave: TFD; *Leishmania braziliensis*; Azul de Metileno.

TRAHAMANE, E. Effects of antiparasitic photodynamic therapy in *Leishmania braziliensis* and interaction with macrophage. Dissertation (Master) - Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease of great importance to public health in what *Leishmania braziliensis* is one of the etiological agents. The treatment is performed by administering drugs considered toxic to human cells, expensive and inefficient to several species of *Leishmania* and can result in resistant strains and for these reasons, studies that address new therapies to reduce the unwanted effects are of paramount importance. Photodynamic therapy (PDT) is a technique said to be promising in the treatment of many parasitic diseases. Therefore, we proposed this work aimed to evaluate the effects of PDT in *L. braziliensis* and the interaction of this parasite with J774 macrophages, using as a photosensitizer, methylene blue at a concentration of 12.5 µg/mL associated with red Low power LASER with $\lambda = 660$ nm; 40 mW; 8,4 J/cm². The tests were performed in triplicate, and the samples were divided into four groups: control Group, photosensitizer Group, LASER Group and TFD Group. As evaluative methods of morphology and structure, promastigotes against the effects of PDT on *Leishmania*, electronic microscopy scanning and transmission were used. For the evaluation of the interaction, the optical microscope was used. Here, infected macrophage counts were performed and uninfected. As a result, it was found that PDT was able to create morphological and structural deformation compatible with alterations resulting Oxidative stress. After the analysis of the interaction tests was observed that infection of macrophages in the PDT group showed lower infection rate than the control with a significance of $p = 0.0339$ and $p = 0.0181$ in the respective periods of 24 and 48 hours. Statistical analysis was performed using ANOVA with Tukey's post-test, $p < 0.05$. Thus, the conclusion is that PDT is effective in causing potentially lethal damage to *Leishmania braziliensis* promastigotes it is able to stimulate the immune system response and plays a synergistic role.

Keywords: TFD; *Leishmania braziliensis*; Methylene Blue.

LISTA DE FIGURAS ETABELAS

Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	8
Figura 2: Mecanismo de ação da Terapia fotodinâmica.	16
Figura 3: Micrografia eletrônica de <i>Leishmania braziliensis</i> na forma promastigota, mostrando a morfologia do parasito no seu estado normal, sem efeitos da TFD (TRAHAMANE, 2015).....	21
Figura 4: Micrografia de um macrófago (área vermelha) infectado por amastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> (áreas vermelhas mais carregadas) (TRAHAMANE, 2015).....	21
Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>Leishmania</i> mostrando alterações do parasito devido a terapia fotodinâmica: (A) Celula de <i>Leishmania</i> com sua morfologia normal (B) células deformadas; (C) células com volume reduzido (C e D); célula com membrana flagelar afrouxada (TRAHAMANE, 2015).....	22
Figura 6: Micrografia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> , mostrando o efeito dos tratamentos sobre a ultraestrutura. A) e B) Celulas do Grupo Controle e Grupo LASER respectivamente, sem alteração apreciável. C) Grupo Fotossensibilizador com mitocôndrias fenestradas. D) Vacuolo autofágico formado no Grupo TFD (TRAHAMANE, 2015).....	23
Figura 7: Micrografias eletrônica de transmissão mostrando diferentes alterações celulares geradas, em promastigotas, pela TFD. A) Vacúolo autofágico formado. B) Membrana flagelar alterada e projetada para fora do eixo do flagelo. C) mitocôndria tornada hipodensa, fenestrada e com cristas desorganizadas. D) Mitocôndria tornada hipodensa e fenestrada apresentando o kDNA (TRAHAMANE, 2015).....	24
Figura 8: Grafico de taxa de infecção avaliada nos diferentes grupos experimentais no período de avaliação de 24 hora (TRAHAMANE, 2015).....	25
Figura 9: Grafico de taxa de infecção avaliada nos diferentes grupos experimentais no período de avaliação de 48 horas (TRAHAMANE, 2015).....	25
Tabela 1: Nova nomenclatura da <i>leishmania</i> proposta com base na sequência do gene da proteína 70 (hsp70).....	6
Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no estudo.....	18
Tabela 3: Distribuição dos macrófagos infectados e não infectados nos diferentes grupos experimentais nos períodos de avaliação de 24 e 48 horas.	24

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

λ	Comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
ATP	Trifosfato de adenosina
CW	(Do inglês) onda continua
DNA	(Do inglês) Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
LASER	(Do inglês) Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação
LPS	Lipopolissacarídeos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mW	Miliwatt
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	(Do inglês) Solução Salina Tamponada com Fosfato
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. A LEISHMANIOSE.....	3
2.1.1. Generalidades e Pequeno Histórico sobre a leishmaniose	3
2.1.2. Agentes e Formas clínicas da leishmaniose.....	4
2.1.3. Agentes da leishmaniose	5
2.1.4. Formas clínicas da leishmaniose.....	7
2.1.5. Transmissão e ciclo de vida da leishmania.....	8
2.2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	10
2.3. TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	13
2.3.1. Generalidades e breve histórico sobre a TFD	13
2.3.2. Mecanismo de ação da TFD.....	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVOS GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. CULTIVO DO PARASITO	18
4.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774	18
4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	18
4.4. TERAPIA FOTODINÂMICA	18
4.5. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO PARASITO	19
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	19
4.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	19
4.6. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARASITO – MACRÓFAGO	20
5. RESULTADOS	21
5.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA	21
5.2. AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. RECOMENDAÇÕES	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica antiga transmitida por fêmeas de insetos hematófagos e causada por 21 espécies de *Leishmania*, pertencente à família *Trypanosomatidae* (BASTOS et al., 2012). As *leishmania* spp. infectam uma variedade de animais desde répteis, cães, raposas e até seres humanos (GOMES-SILVA et al., 2008) provocando problemas de saúde em mais de 70 países (RUMER et al., 2011).

No homem, a leishmaniose tipicamente pode ser dividida em cutânea mucocutânea e visceral de acordo com a parte do corpo afetada. A forma mais frequente e inicial da doença é a cutânea afetando a pele e mucosa, provocando úlceras na face, braços e pernas, tendo como consequência, lesões destrutivas de boca e nariz. Quando as lesões cicatrizam, deixam marcas permanentes, sendo este o maior prejuízo social desta doença (CALVO-ÁLVAREZ et al., 2012).

As primeiras formas de tratamento da leishmaniose cutânea foram apenas baseadas na administração oral, tópica ou sistêmica de drogas a base de Antimonio. Durante décadas, o estibogluconato de sodio foi considerado padrão ouro para tratamento de leishmaniose cutânea. Devido a *L. braziliensis*, pouco tempo depois essa droga foi relatada como sendo bastante tóxicas a seres humanos, caras e ineficientes às diversas espécies de *Leishmania* (NAKAYAMA et al., 2007).

Devido a esses relatos e pela necessidade de melhorar cada vez mais o tratamento da doença, iniciaram os estudos alternativos, um dos quais, a Terapia Fotodinâmica Antiparasitária, uma técnica que combina a utilização de um fotossensibilizador não tóxico a uma luz visível não ionizante, com comprimento de onda capaz de excitar o fotossensibilizador a um estado de tripleto reativo. Esta reação irá gerar oxigênio atômico e superóxido, que são espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicos para os parasitas (CASTANO et al., 2004).

Ao contrário dos medicamentos convencionais que atuam apenas sobre um alvo, os fotossensibilizadores agem via produção de oxigênio singleto ou espécies reativas de oxigênio (RAGÀS et al., 2013), os quais não apresentam uma especificidade com relação ao alvo biomolecular, reagindo rapidamente com uma

variedade de substratos incluindo o colesterol, ácidos graxos insaturados das camadas lipídicas das membranas, resíduos de aminoácidos tais como cisteína, histidina e triptofano das proteínas, bem como bases de ácidos nucleicos (TESSAROLLI, 2010), particularmente a guanina e timina. Desta forma, a terapia fotodinâmica poderá induzir danos nas biomoléculas que conduzirá à perda da funcionalidade biológica apropriada, levando a inativação da célula do parasito.

Estudos em terapia fotodinâmica têm sido efetuados com diferentes cepas de *Leishmania spp.*, usando diferentes fotossensibilizadores (PELOI et al., 2011). Os agentes patogênicos, incluindo a *Leishmania spp.*, são anatomicamente, fisiologicamente e bioquimicamente diferentes uns dos outros, sendo assim, é preciso descobrir as condições adequadas de luz e fotossensibilizadores específicos para a formulação da terapia em cada espécie.

Baseado nas informações existentes sobre a eficácia da TFD contra vírus, fungos, bactérias e protozoários (KHARKWAL et al., 2011), agindo principalmente sobre suas membranas ou estruturas internas, associado à atuação química que estes fotossensibilizadores possuem pelos Tripanossomatídeos, acredita-se que esta nova abordagem, também seja eficaz contra a *Leishmania braziliensis*.

Portanto, o objetivo deste estudo foi de estudar, *in vitro*, os efeitos da Terapia fotodinâmica antiparasitária na *Leishmania braziliensis*, utilizando como fotossensibilizador o azul de metileno (12,5 µg/mL) associado ao LASER de baixa potência ($\lambda = 660 \text{ nm}$; 40 mW; 8,4 J/cm²; CW).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A LEISHMANIOSE

2.1.1. Generalidades e Pequeno Histórico sobre a leishmaniose

Leishmaniose é uma zoonose infecciosa e parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* (COSTA et al., 2011). É uma doença antiga, multilante e considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como sendo uma doença negligenciada devido a carência de tratamentos e pelos poucos financiamentos de pesquisas para diagnóstico e tratamento (WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2011).

É uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C. (OLIVEIRA et al., 2013). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose mucocutânea (CACERES et al., 2004). Na América, algumas causas de morbi-mortalidade entre os povos, devido a leishmaniose, já ocorriam antes do contato com os europeus e com africanos. Através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003).

No entanto, segundo BASANO, (2004), a primeira referência sobre a leishmaniose no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado "Antiguidad de la Syphilis en el Peru", onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas e Quiros de Tabatinga até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônicos.

No Brasil, Cerqueira, em 1855, observou a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra (GONTIJO, 2003). Em 1895, na Itália, Breda, descreveu a moléstia em italianos provenientes de São Paulo (GRADONI et al., 2003).

Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por Lindenbergl, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* da leishmaniose em

lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo (PANIZ MONDOLFI et al., 2011).

Segundo BASANO e CAMARGO (2004), Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da úlcera de Bauru, "ferida brava" ou "nariz de tapir". E daí, no Brasil, até a década de setenta, todos os casos de leishmaniose eram atribuídos a *L. braziliensis*; mas com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram sendo descritas.

A leishmaniose visceral americana foi registrada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro em 1977, no município do Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1985). Em São Paulo, o primeiro relato da doença aconteceu em Diadema, em uma criança de 10 meses (IVERSSON et al., 1979). No ano de 1998, foram registrados os primeiros casos caninos na região de Araçatuba e em 1999 casos humanos da doença na mesma região (GALIMBERTTI et al., 1999). Em 2010 foram notificados 21.981 casos confirmados do agravo, dos quais 2428 foram procedentes da região Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Estudos recentes sugerem que a leishmaniose surgiu na Amazônia e depois nas regiões de florestas altas e região Andina, devido ao fluxo humano durante o Império Inca e à colonização espanhola (SOUSA; PEARSON, 2009). A doença expandiu-se às demais regiões por meio de imigrantes que, após o declínio da extração do látex na Amazônia, retornaram às suas origens, na região Nordeste, ou se dirigiram para a região Sudeste, principalmente Minas Gerais e São Paulo, atraídos pelo desenvolvimento gerado pelo cultivo do café (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003).

2.1.2. Agentes e Formas clínicas da leishmaniose

A manutenção de parasitos em sítios na derme ou uma posterior dispersão para órgãos internos contribuem para a progressão da doença, resultando em patologias distintas, tais como acontece com a leishmaniose (REITHINGER et al., 2007). Esta doença é frequentemente associada à espécies distintas de parasitos, sendo, por exemplo, *L. infantum* e *L. major* responsáveis por causar a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea respectivamente, enquanto *L. braziliensis*, usada neste estudo, é o principal agente causador da leishmaniose mucocutânea (BRITO et

al., 2009). A leishmaniose cutânea pode ser limitada a uma única parte da pele (leishmaniose cutânea localizada) ou pode produzir um grande número de lesões (leishmaniose cutânea difusa) (SHARMA et al., 2005).

Algumas espécies de *Leishmania* como a *L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi* podem também causar a leishmaniose visceral ou calazar (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011).

2.1.3. Agentes da leishmaniose

Existem muitas espécies de *Leishmania spp.* que podem causar leishmaniose cutânea em seres humanos, embora a maioria das infecções provavelmente possam permanecer assintomáticas (REITHINGER et al., 2007). As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam morfologia idêntica quando são usados métodos diagnósticos clássicos, como o exame microscópico ou cultivo do parasito (ANTINORI et al., 2012), no entanto, outros métodos como o amplificação genômica por meio da reação em cadeia da polimerase, podem revelar diferenças consideráveis. Assim, a classificação de *Leishmania* foi historicamente baseada em critérios como distribuição geográfica (DEACON, 2013), vetor, tropismo, e manifestação clínica (OLIVEIRA, DE; BRODSKYN, 2012). A nomenclatura mais recente da *leishmania* foi proposta por Fraga et al, (Tabela 1) com base no sequenciamento do gene da proteína 70 (*hsp70*), através do choque térmico (ANTINORI et al., 2012).

Tabela 1: Nova nomenclatura da leishmania proposta com base na sequência do gene da proteína 70 (hsp70).

Gênero	Complexo	Espécies	Distribuição Geográfica	Espécies de acordo com análises de hsp70
<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	China, Subcontinente indiano, Etiópia, Sudão, Quênia, Irã, Arábia Saudita, Iemen	<i>L. donovani</i>
		<i>L. infantum</i>	Albânia, Argeria, França, Grécia, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha, Síria, Tunísia, Turquia, Líbano	
		<i>L. chagasi</i>	Albânia, Argélia, França, Grécia, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha, Síria, Tunísia, Turquia, Líbano	
	<i>L. tropica</i>	<i>L. archibaldi</i>	Índia, Sudão, Etiópia, Líbano, Israel	
		<i>L. tropica</i>	Afganistão, Argélia, Azerbaijão, Grécia, Irã, Iraque, Israel, Marrocos, Tunísia, Turquia, Líbano	<i>L. tropica</i>
		<i>L. aethiopica</i>	Etiópia, Quênia	
		<i>L. major</i>	Afganistão, Argélia, Chade, Irã, Iraque, Israel, Líbia, Mauritânia, Marrocos, Síria, Sudão	<i>L. major</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	Belize, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela	<i>L. mexicana</i>
		<i>L. amazonensis</i>	Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Panamá, Peru, Venezuela	
		<i>L. garnhami</i>	Venezuela	
<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>	Belize, Colômbia, Costa Rica, Equador, Honduras, Nicarágua, Panamá, Venezuela	
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. naiffi</i>	Brasil, Guiana Francesa, Equador, Peru	<i>L. naiffi</i>
		<i>L. braziliensis</i>	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, Nicarágua	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. peruviana</i>	Peru	
	<i>L. lainsoni</i>	Brasil, Bolívia, Peru	<i>L. lainsoni</i>	

(ANTINORI et al., 2012).

2.1.4. Formas clínicas da leishmaniose

As lesões de leishmaniose cutânea variam em gravidade, aparência clínica e tempo para cura (DAMANTE et al., 2004). O primeiro sinal de infecção por *leishmania*, é tipicamente um pequeno eritema (CALVOPINA et al., 2005) que se desenvolve após um período variável, no local onde o flebótomo infectado picou o hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2013). O eritema evolui para um nódulo, que em seguida, ulcera progressivamente ao longo de um período de duas semanas a seis meses e se torna uma ulceração (REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose cutânea localizada causada por *L. infantum* é observada com menos frequência. No Novo Mundo, a leishmaniose cutânea localizada é causada principalmente pela *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* ou *L. mexicana* (GRISARD et al., 2000).

A leishmaniose cutânea difusa é uma infecção causada por *L. aethiopica* na África, e *L. amazonensis* na América do Sul (RAMIREZ et al., 2014). No entanto, leishmaniose cutânea difusa é também observada em doentes imunodeprimidos infectados com espécies isoladas geralmente em formas localizadas. É causada por *L. braziliensis* e, menos frequentemente, por *L. panamensis* ou *L. guyanensis* (SILVEIRA et al., 2009).

A leishmaniose cutânea difusa, que era raramente vista em partes da América do Sul e Central, Etiópia e Quênia, produz, nódulos não ulcerativos disseminados a partir do local inicial da infecção e pode cobrir o corpo inteiro. Comparado com a leishmaniose cutânea localizada, a leishmaniose cutânea difusa é difícil de tratar e não tem auto cura (EICKHOFF et al., 2012).

A leishmaniose mucocutânea é caracterizada pela capacidade do parasito em se metastizar para os tecidos da mucosa por disseminação linfática ou hematológica (HARALDSDÓTTIR et al., 2011). Em geral, ela começa com a inflamação nasal e congestão (isto é, leve leishmaniose mucocutânea), seguido de ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo (REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose mucocutânea, pode conduzir à destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em alguns

casos, os lábios, bochechas, palato mole, faringe ou laringe também estão envolvidos. A leishmaniose da mucocutânea nunca cicatriza espontaneamente, é muito difícil de tratar, e é potencialmente fatal (OLIVEIRA et al., 2012).

Apesar de leishmaniose mucocutânea poder ser causada por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, e *L. infantum*, ela é mais comumente associada a espécie *L. braziliensis* (MINODIER; PAROLA, 2007).

2.1.5. Transmissão e ciclo de vida da leishmania

Infecções por *Leishmania* spp. normalmente se originam através da picada de fêmeas de flebotomíneos (DINIZ et al., 2014), pertencentes a *Phlebotomus* spp, (na Europa, Norte da África, o Oriente Médio e Ásia) ou *Lutzomyia* spp, conhecidos popularmente como mosquito-palha (do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina) (MIRANDA et al., 2002). O ciclo de vida do protozoário inicia-se com a picada da fêmea do inseto vetor no hospedeiro vertebrado infectado e com a ingestão de sangue contendo formas amastigotas (Figura 1).

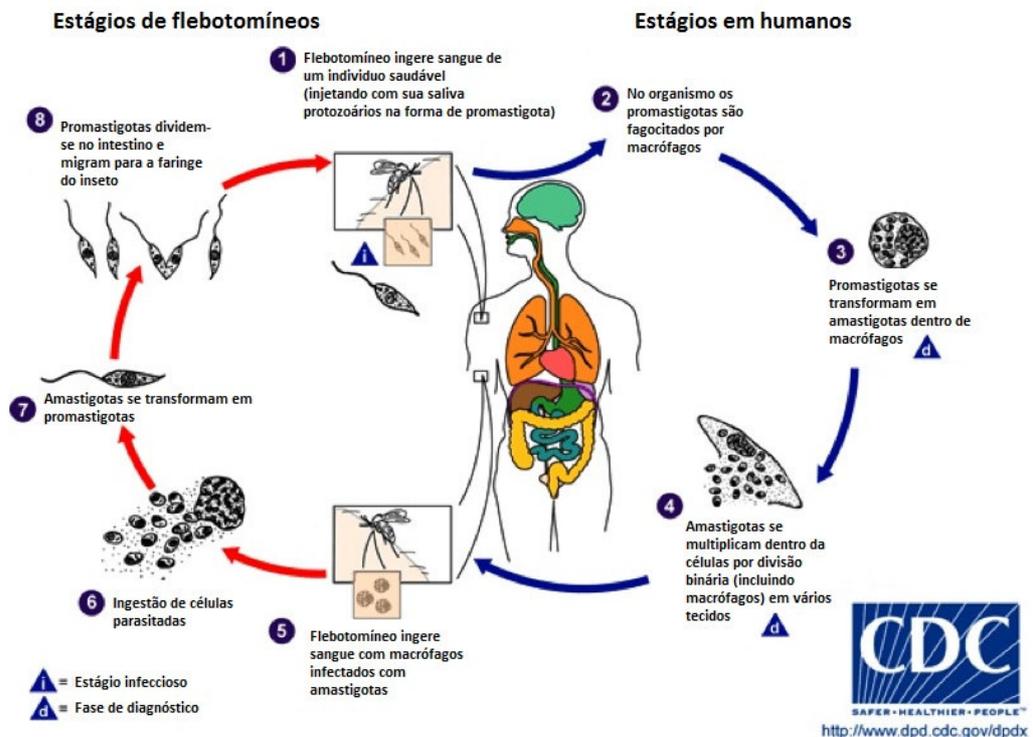


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania* sp (<http://goo.gl/C8JXI>)

Quando o mosquito pica um ser humano, injeta um pequeno número de parasitos que se for examinado rapidamente, podem ser detectados nas células sanguíneas no estágio promastigota que depois é seguido do estágio amastigota em que começa a se multiplicar e a infectar outras células e tecidos (RASMUSSEN; DESCOTEAUX, 2004).

Assim, *Leishmania spp.* podem assumir duas formas morfológicas distintas principais, uma forma amastigota, forma intracelular, com configuração arredondada ou oval, observável nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrados e outra promastigota, extracelular e flagelada e com um aspeto fusiforme que ocorre no intestino dos insetos vetores (IBRAIM et al., 2013). Seis a dez dias após a picada, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado e são inoculadas com a saliva aquando da picada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Numa primeira fase após a ingestão, na membrana peritrófica localizada no intestino médio do inseto, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos (SHAHA, 2006); Esta membrana peritrófica não celular constituída por quitina, proteínas e proteoglicanos, separa fisicamente o lumén do epitélio intestinal e é sintetizada por este, como resposta à distensão abdominal após a picada de sangue e tem como função a proteção do epitélio contra agentes patogênicos e contra o efeito abrasivo das partículas alimentares (IBRAIM et al., 2013).

Após o primeiro ciclo de replicação dos promastigotas procíclicos 48-72h e depois da picada, estes promastigotas procíclicos originam os promastigotas nectomonas (MARTINY; SOUZA, 2004). Estas formas iniciam a migração do intestino posterior para uma parte mais anterior do intestino médio (PEREIRA; ALVES, 2008). Por ação de quitinases segregadas pelo vetor e pelo parasito, a membrana peritrófica é desintegrada e absorvida e os nectomonas aderem através do flagelo à parede intestinal de forma a impedir a sua expulsão com as fezes (JAIN; GEORGE, 2007). Esta adesão é promovida por um glicocálix protetor constituído por lipofosfoglicanos que envolve toda a célula incluindo o flagelo. Polimorfismos neste glicocálix ditam também diferenças na adesão e a exclusividade na relação vetor e espécies de *Leishmania* que a alberga (FARIAS et al., 2013). Adicionalmente, proteínas específicas também estão na origem desta adesão em vetores das espécies

Lutzomyia intermedia e *Lutzomyia whitmeni* na transmissão da espécie *Leishmania braziliensis* (ZAULI et al., 2012).

Entre quatro a sete dias após a ingestão desenvolvem-se as formas leptomonas, mais curtas. Ocorre então diferenciação em duas diferentes formas: as formas haptomonas e promastigotas metacíclicos. Os haptomonas fixam-se à válvula estemodeal (JAIN; GEORGE, 2007). Sete a dez dias após a picada provocam a degeneração desta, promovendo a migração dos promastigotas metacíclicos para a cavidade oral do inseto (FARIAS et al., 2013).

Os promastigotas metacíclicos, as formas infectantes, após a inoculação são posteriormente fagocitadas pelas células dendríticas, neutrófilos e pelos macrófagos da pele do hospedeiro vertebrado e diferenciam-se em amastigotas após a internalização (SAHA et al., 2011). Os macrófagos são as células hospedeiras definitivas e responsáveis pela replicação e disseminação do parasito. É nestas células que os amastigotas se replicam e saem por exocitose ou lise celular para o exterior, infectando outros macrófagos (PEREIRA; ALVES, 2008). O ciclo recomeça, quando o mamífero é novamente picado por um mosquito saudável.

2.2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Embora não seja fatal, a leishmaniose cutânea é tratada para acelerar a cura e reduzir a formação de cicatrizes, e para evitar a disseminação do parasito (isto é, para evitar que a leishmaniose cutânea se transforme em mucocutânea) ou recaída (REITHINGER et al., 2007). À medida que o prognóstico da doença varia de acordo com as espécies, a escolha do tratamento depende igualmente da espécie da *Leishmania* (MINODIER; PAROLA, 2007).

Excetuando a política de imunoterapia na Venezuela, e as políticas de tratamento com pentamidina na Guiana Francesa e Suriname, a OMS recomenda o tratamento de leishmaniose cutânea com drogas antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio ou antimoniato de megluminae, glucantime) a 20 mg/kg por dia durante 20-28 dias consecutivos (ARMIJOS et al., 2004).

A pesquisa bibliográfica realizada por ALMEIDA e SANTOS (2011), com o tema: “Avanços no tratamento da leishmaniose cutânea no novo mundo nos últimos

dez anos”, consultando cerca de 108 obras entre artigos e outros, revela que apesar de a leishmaniose cutânea ser um importante problema de saúde pública, os dados já publicados sobre o uso de novas drogas para o tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil e na América ainda são bastante limitados. A mesma menciona um conjunto de drogas desenvolvidas desde o ano 2001, contra a doença, tais como: diversas drogas Pentavalentes antimoniais, Miltefosina, Pentoxifillina, Imiquimode e Paromomicina, cada uma delas com pelo menos um aspecto indesejado ao tratamento. E, sugere que sejam desenvolvidas drogas mais efetivas, sem ou com baixa toxicidade, de fácil administração e de baixo custo e que necessitam de curto tempo para o tratamento (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

No entanto, Anfotericina B lipossomal é atualmente considerada de forma inequívoca, como sendo a droga de escolha para o tratamento da leishmaniose em países de alta renda, mas o seu custo é considerado alto, impedindo seu uso generalizado nos países de baixa renda que coincidentemente são os de alta endemicidade (GONÇALVES et al., 2005).

Os principais problemas no tratamento da leishmaniose cutânea são o diagnóstico clínico que é difícil na ausência de microscopia do nível de cuidados de saúde básicos (MINODIER; PAROLA, 2007), graves efeitos colaterais de drogas de antimônio pentavalente, embora geralmente reversíveis (por exemplo, dores ósseas, musculares insuficiência renal, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade) (SEIFERT, 2011), e variabilidade da eficácia contra as diferentes formas de *Leishmania* (GRIMALDI et al., 2010), fazendo com que as drogas e atenção médica por causa dos efeitos colaterais tornem o tratamento caro (SANTOS, DOS et al., 2011), havendo relatos de pacientes não-responsivos às drogas, por causa de linhagens do parasito resistentes aos medicamentos ou aumento de imunossupressão (por exemplo, causada por HIV) (KULHALLI et al., 2014), além disso, o não cumprimento do protocolo de tratamento padrão, devido a esses efeitos (ou seja, um longo curso de injeções intramusculares ou intravenosas) fazem com que muitos pacientes não completem o seu ciclo de tratamento (BERMAN, 2003).

Regimes de tratamento alternativos incluem o uso da anfotericina B, especialmente para a leishmaniose mucocutânea, e pentamidina (NEVES et al., 2011). Vários estudos têm demonstrado a eficácia da miltefosina, termoterapia e

fototerapia, também devem ser considerados como tratamentos alternativos, dependendo da espécie causadora da doença e sua manifestação clínica.

Falhas no tratamento com essas drogas estão se tornando um problema comum em áreas endêmicas, com o surgimento de resistência aos medicamentos (PUJALS et al., 2008). Para além disso, estes compostos são referenciados como sendo altamente tóxicos e a sua eficácia altamente variável (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010).

Uma análise sistemática recente de estudos publicados incluídos em duas revisões evidenciaram-se várias falhas nos critérios de randomização, a identificação das espécies causadoras da doença, critério de cura adotados, e tempo de acompanhamento, o que torna difícil tirar qualquer indicação conclusiva (ANTINORI et al., 2012). A melhor forma de tratamento para a leishmaniose cutânea é, no momento ainda uma questão de debate (ANTINORI et al., 2012), porque, o arsenal terapêutico rotineiramente empregado para tratar pacientes com leishmaniose é limitado e insatisfatório (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). A Gestão de pacientes com a doença depende da utilização de drogas antimoniais pentavalentes, meglumina e estibogluconato de sódio, havendo portanto uma grande necessidade de terapias alternativas (KROLEWIECKI et al., 2007).

Na maioria dos países a leishmaniose é endêmica e a política do Ministério da Saúde deveria ser de fornecer tratamento gratuito a todos os pacientes. Isso muitas vezes não é viável na prática, porque as drogas podem estar em quantidade limitada, particularmente nas áreas rurais, onde ocorre a maior parte de casos (SEIFERT, 2011).

Devido aos efeitos indesejáveis das drogas utilizadas em tratamento contra a leishmaniose, os estudos com vista a descoberta de melhores alternativas continuam. A terapia fotodinâmica é uma delas, havendo atualmente alguns estudos sobre seu efeito contra a leishmaniose provocada por *L. donovani*, *L. major*, *L. tarentolae* e por *L. panamensis*, *L. amazonenses* (PELOI et al., 2011) e *L. brasiliensis* (BARBOSA et al., 2012).

2.3. TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

2.3.1. Generalidades e breve histórico sobre a TFD

2.3.1.1 Generalidades sobre a TFD

Terapia fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento de doenças que consiste na associação de um corante fotossensibilizador e a luz (AKILOV et al., 2007). É uma técnica potencialmente aplicável, econômica e segura, que vem sendo utilizada no tratamento de diversos problemas de saúde como, câncer (MROZ et al., 2010) e contra alguns microorganismos patogênicos como fungos, bactérias e protozoários. Ela parte do princípio de que a interação da luz, de comprimento de onda adequado, com um composto fotossensibilizante e o oxigênio resultam em espécies reativas de oxigênio, capazes de diminuir a viabilidade celular (ROLDÃO; SERRA VAZ, 2011).

A técnica, em geral, consiste de duas etapas. Na primeira, o fotossensibilizador é administrado na forma tópica ou injetado no organismo (BASTOS et al., 2012) ou sobre as células de microorganismo ou parasito e em seguida, espera-se por um tempo, chamado de tempo de pré-irradiação, para que o fotossensibilizador possa se distribuir e em seguida, procede-se a segunda etapa, que é a da irradiação do local (SILVA et al., 2009).

As vantagens evidentes da terapia fotodinâmica em relação aos outros tratamentos convencionais como a quimioterapia são, a seletividade do alvo, a redução da toxicidade (PELOI et al., 2011), poucos efeitos adversos, altas taxas de cura e excelentes resultados estéticos das áreas afetadas (SILVA et al., 2009) e a não criação de resistência pelo patógeno a ser combatido (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2011). O tratamento não é invasivo já que usualmente precisa incidir exatamente no local e por poder ser repetido quando necessário sem prejuízos na saúde do paciente (SCHIAVON et al., 2013).

Embora haja divergência em diversos autores, sobre quando é que realmente iniciou a terapia com luz, tudo indica que é uma prática antiga, que os antigos egípcios, usavam para tratar vitiligo combinando a ingestão de plantas, *Amni majus* e a exposição à luz solar (BASTOS et al., 2012), e os gregos, indianos também utilizaram as sementes de *Psoralea corylifolia* para o tratamento de psoríase e vitiligo. Embora

não se saiba com certeza se foi uma importação da técnica, existem informações segundo as quais, também os hindus e os povos do Oriente Médio (FOLEY et al., 2011), há 1400 anos, empregavam plantas medicinais associando à exposição ao sol para tratamento de vitiligo (DUARTE et al., 2006).

Com o passar do tempo, as informações sobre a prática desta terapia foram sendo perdidas durante séculos (BASTOS et al., 2012). Devido a uma série de fatores, como o desenvolvimento de terapias antimicrobianas inovadoras, mas os conhecimentos sobre esta prática mantiveram-se sempre uma simples curiosidade (FOLEY et al., 2011), fazendo com que a fotomedicina ficasse novamente estagnada até 1960, quando devido ao surgimento de cepas resistentes aos antibióticos e ao trabalho de Dougherty e colaboradores, os estudos sobre o efeito fotodinâmico foram retomados (BASTOS et al., 2012).

Estudos sistemáticos das reações de fotossensibilização são atribuídos a Oscar Raab (1900), (HAMBLIN, 2014) que investigou o efeito dos corantes eosina e acridina, ambos fotossensibilizantes, sobre uma cultura de paramécios, percebendo que, em presença de luz, os microrganismos eram inativados (BASTOS et al., 2012), porém foi a partir de 1903, quando Niels Finsen recebeu o prêmio Nobel pelo sucesso do tratamento de lúpus vulgar com a radiação ultravioleta, que a fototerapia começou a ser realmente estudada e praticada para tratamento de várias dermatoses (RAJESH et al., 2011).

Em 1903, Tappeiner empregou uma solução de eosina e luz para tratar câncer de pele e observou uma redução no tamanho do tumor (SILVA et al., 2009); durante a Primeira Guerra Mundial iniciou-se o tratamento de úlceras traumáticas com o uso de fototerapia e luz solar, observando-se bons resultados (DUARTE et al., 2006) e, antes da Segunda Guerra Mundial, vários autores já tinham demonstrado a susceptibilidade de uma variedade de vírus, bactérias e protozoários em abordagens terapêuticas (WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2011). Em 1925, Goeckerman introduziu a combinação do fotossensibilizador (coaltar) e irradiação ultravioleta para tratamento da psoríase, que foi utilizada por muito tempo (DUARTE et al., 2006), no entanto, o uso de agentes na desinfecção de sangue não foi sugerida até 1955; pois, embora em trabalhos realizados no Instituto Walter Reed, ela já tivesse sido comprovada, não foi tornada pública por várias décadas (WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2011).

Em 1974, alguns autores (PARRISH, FITZPATRICK, TANNENBAUM e colaboradores) relataram os efeitos benéficos dessa modalidade terapêutica na psoríase; desde então, surgiu outra série de doenças descritas como responsivas à terapia com radiação ultravioleta (DUARTE et al., 2006).

Nos anos 1960 e 1970, os ensaios clínicos de fotossensibilizadores antivirais, demonstraram sua utilidade e promoveram sua utilização como solução aos problemas mais recentes com a resistência dos microrganismos aos medicamentos (WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2011).

Em 1993 uma formulação contendo derivados diméricos e oligoméricos de hematoporfirina (Photofrin®), teve aprovação clínica e vem sendo utilizada em TFD, na oncologia e dermatologia (BASTOS et al., 2012) e desde então, um aumento no interesse da ação fotodinâmica surgiu em todo o mundo.

2.3.2. Mecanismo de ação da TFD

Numerosos estudos têm demonstrado que a TFD é altamente efetiva na destruição de vírus (DAI et al., 2010), de fungos (KHARKWAL et al., 2011), de bactérias (HUANG et al., 2013) e também de protozoários (WAINWRIGHT, 2011).

Durante a TFD, o agente fotossensibilizante ligado à célula é ativado na presença de luz. Essa ativação leva-o do estado de repouso ao estado de ativação chamado singleto, de meia vida curta. Nessa etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso, emitindo energia em forma de fluorescência por meio da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas, até atingir o estado tripleto de meia vida mais longa (KHAN et al., 2012).

A partir deste estado, a reação pode ser de dois tipos que são: Tipo I, em que o fotossensibilizador excitado transfere elétrons para biomoléculas ou para o O_2 dando origem às espécies reativas de oxigênio (EROs), como, o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), (HUANG et al., 2013). E, reação do Tipo II, em que o fotossensibilizador no estado tripleto transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singleto (1O_2), altamente reativo, de meia vida curta (SHARMA et al., 2012). Ambas reações têm como resultado, a morte celular (Figura 2).

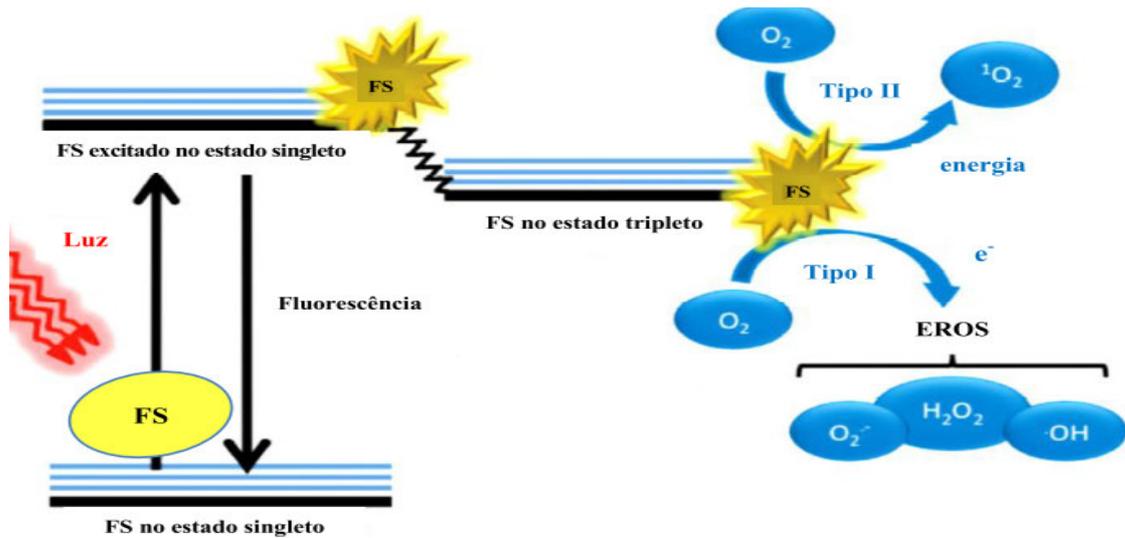


Figura 2: Mecanismo de ação da Terapia fotodinâmica. (PELOI et al., 2011)

Em consequência da ação do $^1\text{O}_2$, a célula passa a apresentar falhas na integridade da membrana, o que acarreta alterações na permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelulares (PERUSSI, 2007). Alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem (CHIU et al., 2011). Estudos utilizando microscopia de fluorescência sugerem que a fototoxicidade mitocondrial é a principal causa da morte celular induzida pela TFD (AKILOV et al., 2006). Apesar da exata localização do efeito citotóxico, a consequência é a perda da integridade celular, havendo a liberação de fatores inflamatórios e ativação da cascata do complemento (TESSAROLLI, 2010).

Segundo EMBLETON, (2002), apesar de tudo isso, pode haver problemas potenciais associados com a TFD de doenças infecciosas, um dos quais é poder existir uma falta de especificidade como foi observado em *Staphylococcus aureus* (KASHIWABUCHI et al., 2012); por outro lado, o fotossensibilizador pode ligar-se a células de outros microrganismos não patogênicos ou células hospedeiras (KRÜGER et al., 2011) e, a irradiação subsequente dessas células pode conduzir à sua destruição. É desejável dirigir a atividade fotodinâmica para a célula-alvo, o que pode ser conseguido através da ligação da molécula de fotossensibilizador apenas a superfície do organismo alvo (especificidade) (SMIJS et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar, *in vitro*, os efeitos da Terapia fotodinâmica antiparasitária na *Leishmania braziliensis*, utilizando como fotossensibilizador o azul de metileno (12,5 µg/mL) associado ao LASER de baixa potência ($\lambda = 660 \text{ nm}$; 40 mW; 8,4 J/cm²; CW).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar alterações morfológicas do parasito através do Microscopia eletrônica de Varredura;
2. Avaliar alterações ultraestruturais do parasito através do Microscopia eletrônica de Transmissão;
3. Avaliar a taxa de infecção da *Leishmania braziliensis* após Terapia fotodinâmica, nos testes de interação entre amastigotas e macrófagos.

4. METODOLOGIA

4.1. CULTIVO DO PARASITO

A cepa de *Leishmania braziliensis*, (MHOM/BR/01BA788) obtida do laboratório de Imunoparasitologia da FIOCRUZ-BAHIA, foi cultivada em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cripion, Brasil), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 I/mL (Sigma, Estados Unidos da América) a 23°C.

4.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774

Os macrófagos J774 foram cultivados em meio de cultura DMEM (Sigma, Estados Unidos da América), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma, Estados Unidos da América), em estufa de CO₂, com 5% de CO₂, à 37°C. As passagens foram realizadas a cada 72 horas.

4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento deste estudo foram criados quatro grupos experimentais: Grupo controle negativo (onde a interação macrófago/*Leishmania* foi isento de qualquer tratamento); Grupo fotossensibilizador (foi tratado apenas com o azul de metileno); Grupo LASER (foi tratado apenas com a luz); Grupo TFD (onde foi realizada a terapia fotodinâmica) de acordo com a tabela abaixo. Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no estudo.

	Grupo Controle	Grupo LASER	Grupo Fotossensibilizador	Grupo TFD
Composto	-	-	+	+
Luz	-	+	-	+

(TRAHAMANE, 2015).

4.4. TERAPIA FOTODINÂMICA

Foi utilizado LASER vermelho com os parâmetros: ($\lambda = 660 \text{ nm}$; 40 mW; 8,4 J/cm²; CW, TwinFlex®, MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brazil), com tempo de pré-irradiação de cinco minutos.

Para o presente estudo o composto utilizado foi o Azul de Metileno na concentração de 12,5 µg/mL (Laboratório Fórmula, Salvador, Bahia, Brasil), sendo armazenado à 4°C e protegido da luz.

4.5. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO PARASITO

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura, foi utilizada para observar as alterações externas do parasito. No tempo de 72 horas os poços contendo parasitos foram lavados e os mesmos foram fixados em 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 5% sacarose em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, em pH 7,2 por uma hora. Após este tempo, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas por 40 minutos com tetróxido de ósmio e ferricianeto.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, de 30% até 100%, por cinco minutos em cada. Posteriormente, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico para retirar a acetona da amostra e, posteriormente, metalizadas com ouro. Para a observação do parasito e avaliação da ultraestrutura os mesmos foram aplicados em lamínulas redondas. Por fim, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura, JSM-6522 (Jeol, Tóquio, Japão)

4.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Depois de observada a estrutura externa, a Microscopia Eletrônica de Transmissão, serviu para observar alterações nas estruturas internas das promastigotas. Nela, células pré-tratadas com os compostos supracitados foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). A seguir, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por 60 minutos à temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão utilizado na solução fixadora, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%.

Em seguida foram desidratadas em série crescente de acetona, infiltradas e incluídas em resina epóxi Polybed (Merck® Darmstadt, Hessen, Germany). Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 3% ao

abrigo da luz e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 (Axio Observer; Carl Zeiss, Jena, Germany).

4.6. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARASITO – MACRÓFAGO

A concentração de macrófagos utilizadas nos experimentos foi 3×10^5 células/poço, que foram cultivados em meio DMEM completo. Após duas horas de incubação, foram adicionadas promastigotas de *L. braziliensis* na concentração 3×10^6 , portanto a proporção de parasitos/macrófago foi de 10:1. O tempo de infecção entre parasitos e macrófago foi de 24 horas.

O tratamento foi realizado e avaliado nos tempos de 24 e 48 horas. A avaliação foi realizada por meio de contagem dos macrófagos infectados e não infectados pela *Leishmania braziliensis* em cinco campos determinados de maneira aleatória. A taxa de infecção é calculada tomando como numerador o número de macrófagos infectados e como denominador o número total de macrófagos infectados.

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism® versão 5.0 utilizando Anova com pós teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente significantes valores de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA

A *Leishmania braziliensis* é um parasito unicelular que apresenta características morfológicas específicas, sendo as promastigotas fusiformes apresentando um flagelo na porção anterior (Figura 3). Enquanto, as amastigotas, a forma evolutiva encontrada dentro dos macrófagos, apresenta morfologia esférica com ausência de flagelo (Figura 4).

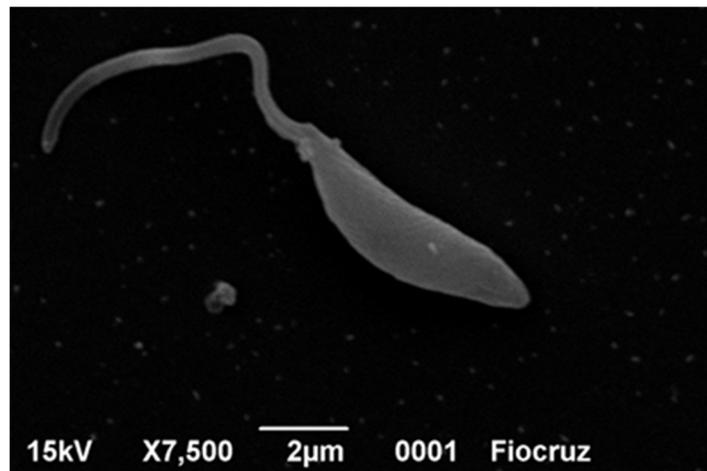


Figura 3: Micrografia eletrônica de *Leishmania braziliensis* na forma promastigota, mostrando a morfologia do parasito no seu estado normal, sem efeitos da TFD (TRAHAMANE, 2015).

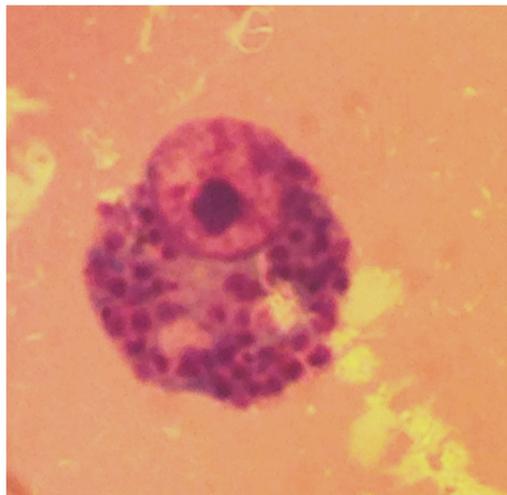


Figura 4: Micrografia de um macrófago (área vermelha) infectado por amastigotas de *Leishmania braziliensis* (áreas vermelhas mais carregadas) (TRAHAMANE, 2015).

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a morfologia celular dos parasitos do grupo controle (Figura 5A), não apresentou nenhuma alteração; Alterações significantes foram observadas no grupo da Terapia fotodinâmica, em que se apresentaram com deformação (Figura 5B) e no volume celular (Figura 5C) para além de se apresentarem afrouxamento da membrana flagelar (Figura 5C e 5D).

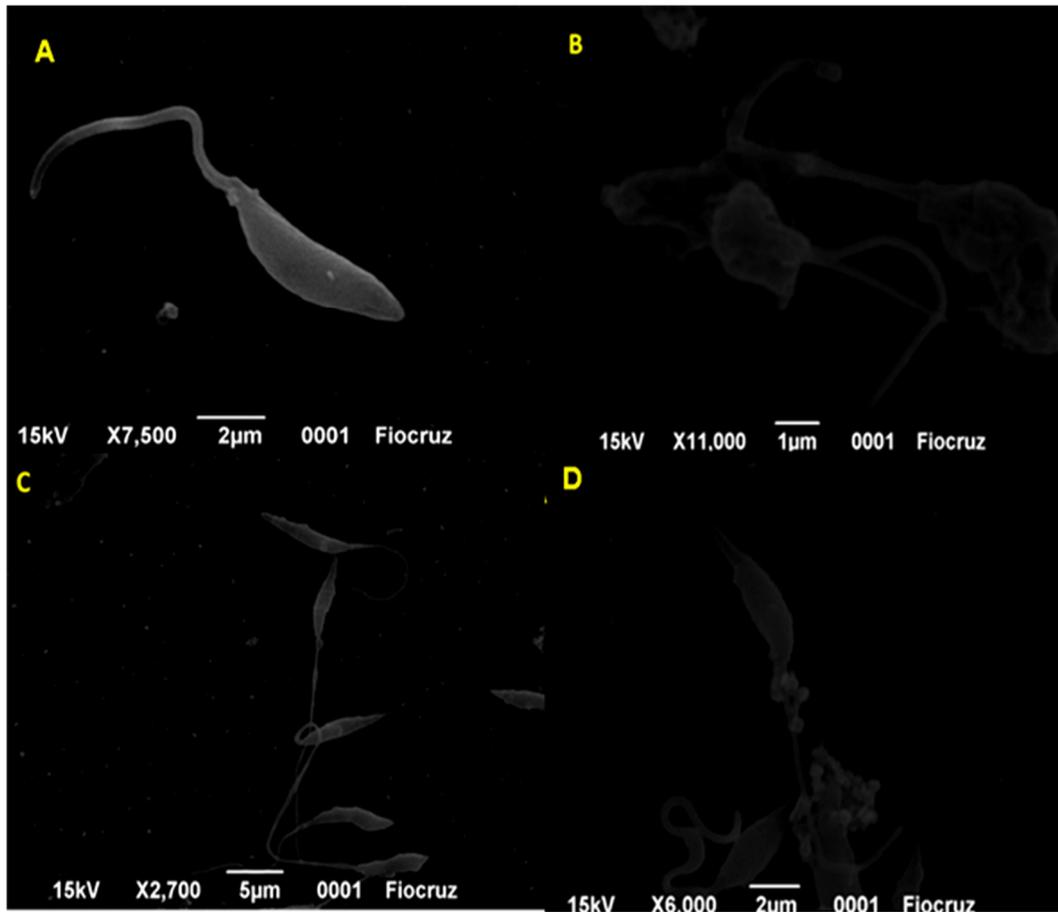


Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania* mostrando alterações do parasito devido a terapia fotodinâmica: (A) Celula de *Leishmania* com sua morfologia normal (B) células deformadas; (C) células com volume reduzido (C e D); célula com membrana flagelar afrouxada (TRAHAMANE, 2015).

Para observação das alterações na estrutura interna do parasito, as células foram observadas na microscopia eletrônica de transmissão, onde pode-se constatar que não houve alteração, caracterizada pelo núcleo arredondado com distribuição de delgada camada de cromatina periférica no núcleo e mitocôndria típica apresentando-se alongada e com cristas, bolsa flagelar e cinetoplasto, além dos microtúbulos subpeliculares típicos de promastigotas (Figura 6A) não foi visualizada nenhuma alteração também no grupo LASER (Figura 6B).

No grupo fotossensibilizador, os parasitos apresentaram alteração, pois as mitocôndrias apresentaram-se fenestradas, isto é com aberturas em forma de canais, (Figura 6C, seta), fato esperado uma vez que compostos fenotiazínicos possuem afinidade pelas proteínas da cadeia respiratória (MATSUBARA e HAGIARA, 1968).

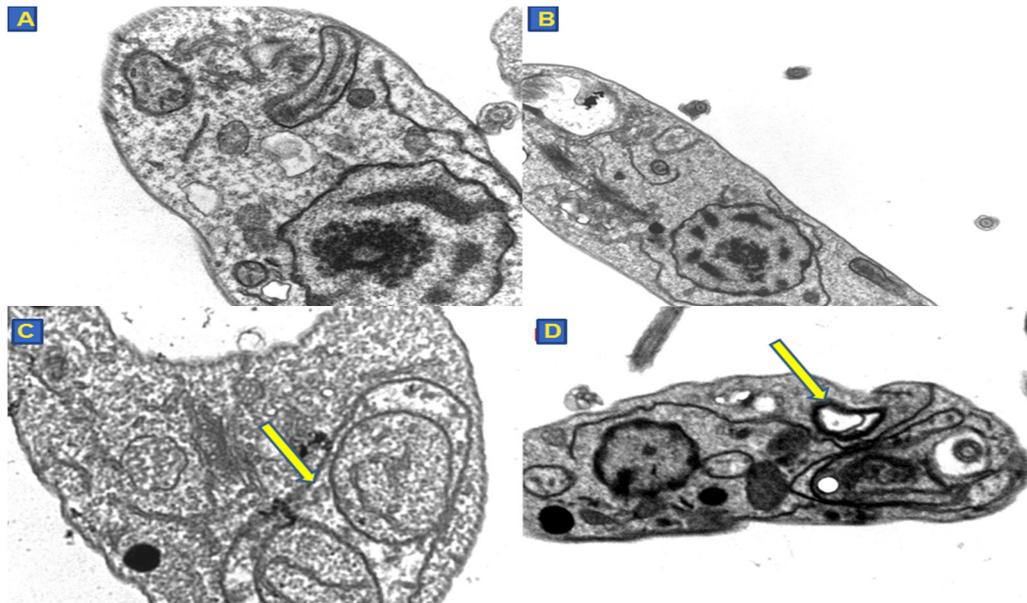


Figura 6: Micrografia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. braziliensis*, mostrando o efeito dos tratamentos sobre a ultraestrutura. A) e B) Celulas do Grupo Controle e Grupo LASER respectivamente, sem alteração apreciável. C) Grupo Fotossensibilizador com mitocôndrias fenestradas. D) Vacuolo autofágico formado no Grupo TFD (TRAHAMANE, 2015).

Promastigotas tratadas pela TFD, apresentaram-se deformadas mostrando porções de membranas não ajustadas em áreas do corpo celular e flagelar, bem como deformações nas cristas e na estrutura geral das mitôcondrias. Também foram observados vacúolos autofágicos, que são arranjos concêntricos de membranas, formando estruturas similares à figura de mielina (Figura 6D, 7A e 7D, seta).

Confirmando as constatações da microscopia de varredura (Figura 5A, 5C), na microscopia de transmissão, foram observadas deformações na membrana do flagelo (Figura 7B, seta). Estas alterações podem ter ocorrido em função de alterações mitocondriais e desequilíbrios no balanço “redox” da célula. Foi observada também, uma certa hipodensidade das mitocôndrias fenestradas que apresentavam-se dilatadas e com desorganização e redução do número de suas cristas (Figura 7C e 7D, seta).

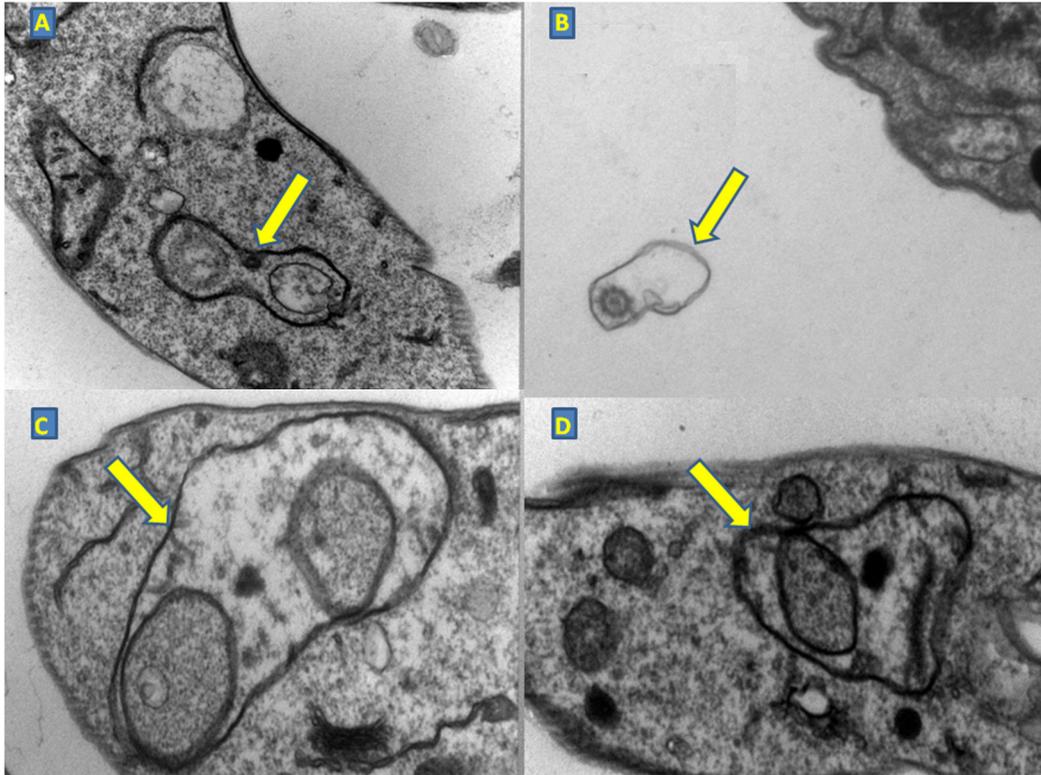


Figura 7: Micrografias eletrônica de transmissão mostrando diferentes alterações celulares geradas, em promastigotas, pela TFD. A) Vacúolo autofágico formado. B) Membrana flagelar alterada e projetada para fora do eixo do flagelo. C) mitocôndria tornada hipodensa, fenestrada e com cristas desorganizadas. D) Mitocôndria tornada hipodensa e fenestrada apresentando o kDNA (TRAHAMANE, 2015).

5.2. AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO

Os resultados encontrados na avaliação da taxa de infecção da *Leishmania braziliensis*, são demonstrados na Tabela 3, nos períodos de 24 e 48 horas respectivamente, bem como nos gráficos 8 e 9, com a distribuição dos macrófagos infectados e não infectados nos mesmos períodos.

Tabela 3: Distribuição dos macrófagos infectados e não infectados nos diferentes grupos experimentais nos períodos de avaliação de 24 e 48 horas (TRAHAMANE, 2015).

	Macrófagos infectados			Macrófagos não infectados		
	24 Horas	48 Horas	Total	24 Horas	48 Horas	Total
Controle	84,75	54,5	139,25	28,25	45	73,25
LASER	53	66,3	119,3	23,3	80,3	103,6
Corante	87,7	80,5	168,2	90,7	105	195,7
TFD	78	75	153	174	162	336

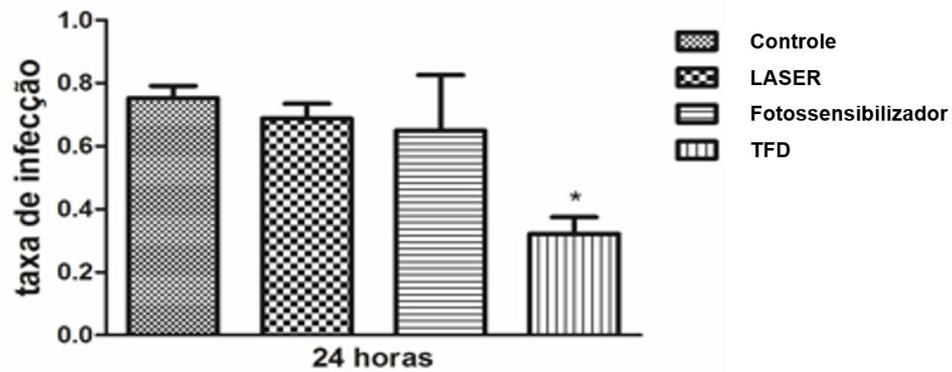


Figura 8: Grafico de taxa de infecção avaliada nos diferentes grupos experimentais no período de avaliação de 24 hora (TRAHAMANE, 2015).

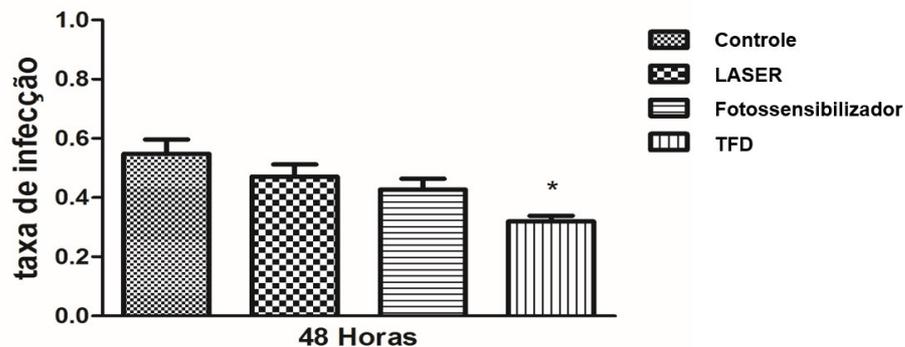


Figura 9: Grafico de taxa de infecção avaliada nos diferentes grupos experimentais no período de avaliação de 48 horas (TRAHAMANE, 2015).

A respeito desses resultados no período de 24 horas, percebe-se uma redução na taxa de infecção nos grupos Fotossensibilizador e LASER quando comparados ao grupo Controle, no entanto esta redução não foi estatisticamente significante.

O grupo Fotossensibilizador em comparação com o grupo Controle não apresentou diferença estatisticamente significante no número de macrófagos infectados e não infectados pela *Leishmania braziliensis*. Também não foram encontradas diferenças significativas na comparação do mesmo grupo Fotossensibilizador, com o grupo LASER, ou com o grupo TFD.

O grupo LASER em comparação com os outros grupos a seguir (grupo controle, grupo fotossensibilizador e TFD, não demonstrou diferenças estatisticamente significantes na taxa de infecção *Leishmania braziliensis*. Contudo, quando o grupo TFD é comparado com o grupo Controle, demonstra redução na taxa de infecção,

onde o grupo TFD apresentou maior número de macrófagos não infectados, com diferença estatisticamente significativa ($p=0.0339$).

Em relação ao período em análise de 48 horas observou-se uma confirmação dos resultados encontrados no período de 24 horas. Apesar de redução na taxa de infecção nos grupos Fotossensibilizador e LASER quando comparados ao grupo Controle, esta redução também não demonstrou significância estatística. Diferença estatisticamente significativa apenas foi observada na comparação do grupo TFD com o grupo Controle, neste caso, o grupo TFD demonstrou menor taxa de infecção ($p=0.0181$).

6. DISCUSSÃO

O uso de corantes fenotiazínicos para atuar como fotossensibilizadores após a irradiação com luz visível, tem sido demonstrada em vários estudos, mas os resultados da terapia fotodinâmica antiparasitária são diferentes de acordo com as condições da célula (densidade, meio de cultura, tipo de parasito, espécie, estado fisiológico), fotossensibilizador (concentração, período de incubação, tempo de exposição) e luz (densidade de energia, comprimento de onda, densidade de potência e outros parâmetros) (YAO, 2013).

De acordo com CHAN e LAI (2003), é óbvio que o efeito antimicrobiano seja dependente também do comprimento de onda. Em relação aos fenotiazinas ou porfirinas, ainda há uma absorção eficaz de luz para comprimentos de onda superiores a 600 nm (MAISCH, 2007), portanto, no presente estudo, utilizou-se como fonte de luz um LASER de diodo emissor de luz a 660 nm (vermelho visível), uma vez que o comprimento de onda do LASER corresponde à absorção máxima do corante utilizado.

Nos resultados do presente estudo, percebe-se uma redução no número de macrófagos infectados pela *Leishmania braziliensis* no grupo LASER quando comparado ao grupo Controle, tanto no período de 24 horas como no de 48 horas. No entanto esta redução não foi estatisticamente significativa. Estudo prévio (OLIVEIRA et al, 2015) demonstra que ocorre um aumento da atividade dos macrófagos com a ação do LASER, sendo o mecanismo de fotobiomodulação atribuído à ativação de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. O citocromo c-oxidase é um fotorreceptor primário de luz na região do vermelho ao infravermelho próximo do espectro, resultando na iniciação de uma cascata de sinalização, com aumento na produção de ATP (KARU, 1999). No presente estudo os macrófagos, parecem reagir a um aumento do nível de ATP resultante da irradiação do LASER, com aumento de sua atividade fagocítica.

Sobre o fotossensibilizador utilizado no presente estudo, o azul de metileno, apresenta alta absorção de luz na região do vermelho, característica necessária a compostos eficientes na terapia fotodinâmica devido a maior penetração dessa radiação através de tecidos biológicos. São aceitos na prática médica, com capacidade antimicrobiana contra diferentes microorganismos incluindo vírus,

bactérias e fungos (PERUSSI, 2007). É relativamente barato, amplamente disponível, bem tolerados, e não-tóxicos (BARBOSA et al., 2012). Além disso, é bem sabido que a combinação de azul de metileno e diferentes fontes de luz, como Diodos Emissores de Luz (LED) ou LASERs de baixa potência são eficazes contra as células procariotas e eucariotas (PELOI et al, 2008).

No presente estudo, o grupo Fotossensibilizador, demonstrou que o azul de metileno na concentração estudada, reduz a quantidade de macrófagos infectados, com relação ao grupo Controle, apesar de não ter significância estatística, tanto no período de 24 horas como no de 48 horas. Isto pode estar relacionado com a redução do ATP promovidas por mudanças geradas pela membrana celular. Estas mudanças e reduções na síntese de ATP, provavelmente envolvem proteínas da cadeia aceptora de elétrons (MATSUBARA e HAGIARA, 1968).

O azul de metileno associado à luz no grupo TFD comparado com o grupo Controle, demonstrou redução na taxa de infecção, onde o grupo TFD apresentou maior número de macrófagos não infectados, com diferença estatisticamente significativa tanto nos períodos de 24 horas ($p=0.0339$), como 48 horas ($p=0.0181$). Foi observado que com a adição da luz este efeito na capacidade de inibição da infecção das células é ainda mais acentuado, em relação ao controle.

A associação do LASER ao azul de metileno, mostrou-se efetiva na redução do número de parasitos em cultura por causar danos na ultraestrutura celular. Dentre as principais alterações encontradas podem ser citadas: o afrouxamento da membrana do flagelo; autofagia. Além disso, foi possível observar deformações mitocondriais, que podem estar envolvidas nos processos de morte celular. Assim como esperado a TFD se mostrou eficaz e os danos celulares encontrados podem ser fortemente associados aos efeitos do aumento da produção de EROs ou à exposição às mesmas.

Muitos tratamentos descritos na literatura trazem como mecanismos de inibição da proliferação destes parasitos, a ação de compostos sobre às mitocôndrias, o aumento na produção de EROs, o bloqueio na divisão celular devido a ação sobre o citoesqueleto, dentre outros mecanismos, tendo em vista que o azul de metileno quando fotoativado torna-se lipossolúvel e libera EROs e, este, pode atuar dentro ou fora dos parasitos (TUIE e KELLY, 1993). A forma lipossolúvel do azul de metileno

pode penetrar no parasito e interagir com estruturas e/ou moléculas internas causando alterações, que por sua vez podem gerar três vias simultâneas e distintas de ação capazes de induzir a morte do parasito, são elas: toxicidade do próprio fotossensibilizador, ação tóxica de EROs liberados após a fotoativação e a ação do composto alterado pela fotoativação.

As alterações supracitadas estão ligadas as ações deflagradas por radicais livres como os liberados pelo fotossensibilizador, após a fotoativação. Portanto é possível associar a deformação da membrana à uma peroxidação lipídica desencadeada pela liberação de radicais livres. Estas deformações membranares pode também estar relacionadas à uma perda de função mitocondrial, que encontra-se na base do flagelo do parasito, o que pode ocorrer quando moléculas responsáveis por detoxificação são saturadas. Outro efeito dos radicais livre é sobre o citoesqueleto, que em alguns casos pode perder sua conformação fisiológica tornando a célula afetada a ficar pleomórfica, além de promover células truncadas, isto é, células que apresentam dificuldades na sua divisão.

Desse modo, no presente estudo foi demonstrado que a ação fotodinâmica aumentou a resistência dos macrófagos ao processo infeccioso, ou seja, em uma futura aplicação da TFD em lesões de leishmania este efeito seria benéfico ao paciente.

7. CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica antiparasitária é capaz de promover alterações irreversíveis na morfologia e ultraestrutura do parasito, e de aumentar a resistência dos macrófagos ao processo infeccioso, observado pelas alterações na taxa de infecção.

8. RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados e conclusões deste estudo, recomenda-se que:

1. Estudos de terapia fotodinâmica quer antiparasitaria como antimicrobiana *in vivo*, sejam antecedidos de estudos de interação com os macrófagos para que se tenha um conhecimento mais real sobre os fenômenos de interação específica com o agente em estudo.
2. Haja mais estudos com a cepa de *Leishmania braziliensis*, utilizando outros parametros e tipos de laser e fotossensibilizador, para que estes fenômenos sejam melhor percebidos bem como para a descoberta de outros relacionados.

REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, S. M.; SCHMID, D.; DEACON, J. Geographical distribution of leishmania species of human cutaneous leishmaniasis in fars province, southern iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 85–91, 2013.
- AKILOV, O. E. et al. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 8, p. 651–60, 2007.
- AKILOV, O. E. et al. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 6, n. 10, p. 1067–75, 2007b.
- AKILOV, O. E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. **Chemistry & Biology**, v. 13, n. 8, p. 839–47, 2006.
- ALMEIDA, A. et al. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. **Marine Drugs**, v. 7, n. 3, p. 268–313, 2009.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853–882, 2003.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 2012.
- ARMIJOS, R. X. et al. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 91, n. 2, p. 153–60, 2004.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2011.
- BARBOSA, A. F. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 10, p. 850–5, 2012.
- BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana : histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- BASTOS, M. M. et al. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2012.

- BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 397–401, 2003.
- BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 10, p. 1278–86, 2009.
- CACERES, A. G. et al. Epidemiology of Andean cutaneous leishmaniasis: incrimination of *Lutzomyia ayacuchensis* (Diptera: psychodidae) as a vector of *Leishmania* in geographically isolated, upland valleys of Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 607–12, 2004.
- CALVO-ÁLVAREZ, E. et al. Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. **PLOS One**, v. 6, n. 11, p. e1927, 2012.
- CALVOPINA, M.; GOMEZ, E. A; UEZATO, H. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 281–4, 2005.
- CHAN, Y., LAI, C. “Bactericidal effects of different LASER wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy.” **Lasers in Medical Science**, v18, 51-55, 2003.
- CHIU, S.; XUE, L.; LAM, M. A requirement for bid for incution of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. **NIH Public Access**, v. 86, n. 5, p. 1161–1173, 2011.
- COSTA, C. H. N. et al. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. **PLOS One**, v. 5, n. 3, p. e943, 2011.
- DAI, T. et al. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3929–34, 2009.
- DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. **NIH Public Access**, v. 6, n. 617, p. 170–188, 2010.
- DAMANTE, C. A. et al. Clinical evaluation of the effects of low-intensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. **Journal of Applied Oral Science**, v. 12, n. 2, p. 133–6, 2004.
- DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–54, 2011.
- DENIS, T. G. S. et al. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease: All you need is light. **NIH Public Access**. Dezembro, p. 509–520, 2011.
- DENIS, T. G. S.; HUANG, L.; DAI, T. Analysis of the bacterial heat shock response to photodynamic. **Photochem Photobiol**, v. 87, n. 3, p. 707–713, 2012.

- DENIS, T. GS.; HAMBLIN, M. R. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy Tyler. **NIH Public Access**, v. 5, n. 9, p. 1099–1114, 2014.
- DINIZ, M. M. C. D. S. L. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 139, 2014.
- DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. Fototerapia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 1, p. 74–82, 2006.
- EICKHOFF, R. et al. Scanning laser optical tomography resolves structural plasticity during regeneration in an insect brain. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e41236, 2012.
- EMBLETON, M. L. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 857–864, 2002.
- FARIAS, L. H. S. et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 3, p. 537–43, 2013.
- FOLEY, J. W. et al. Synthesis and properties of benzo[a]phenoxazinium chalcogen analogues as novel broad-spectrum antimicrobial photosensitizers. **NIH Public Access**, v. 49, n. 17, p. 5291–5299, 2011.
- FU, X.-J.; FANG, Y.; YAO, M. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 159157, 2013.
- GOMES-SILVA, A. et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 135–141, 2008.
- GONÇALVES, G. S. et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 93, n. 2, p. 161–7, 2005.
- GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.
- GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; SCALONE, A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 2001–2004, 2003.
- GRIMALDI, G. et al. Comparative efficacies of two antimony regimens to treat *Leishmania braziliensis*-induced cutaneous Leishmaniasis in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 502–5, 2010.
- GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta tropica**, v. 74, n. 1, p. 89–93, 2000.

- HARALDSDÓTTIR, K. H. et al. Changes in immunocompetent cells after interstitial laser thermotherapy of breast cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 6, p. 847–56, 2011.
- HASAN, T. Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using *L. major* expressing GFP. **NIH Public Access**, v. 3, p. 328–335, 2010.
- HENDRICKX, N. et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52231–9, 2003.
- HUANG, L. et al. Photodynamic inactivation of bacteria using polyethylenimine–chlorin(e6) conjugates: Effect of polymer molecular weight, substitution ratio of chlorin(e6) and pH. **NIH Public Access**, v. 43, n. 4, p. 313–323, 2012.
- HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **NIH Public Access**, v. 44, n. 6, p. 490–499, 2013.
- HUANG, Y. et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. **NIH Public Access**, v. 8, n. 5, p. 479–494, 2013.
- IBRAIM, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 54, 2013.
- JAIN, A.; GEORGE, K. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, taqman assay for swedish chlamydia trachomatis variant. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1431–1432, 2007b.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. J. Photochem. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 49, 1–17, 1999.
- KASHIWABUCHI, R. T. et al. Antimicrobial susceptibility of photodynamic therapy (UVA/riboflavin) against *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 75, n. 6, p. 423–6, 2012.
- KATO, H. et al. Photodynamic therapy with yag-opo laser for early stage lung cancer. **Diagnostic and Therapeutic Endoscopy**, v. 4, n. 2, p. 75–81, 1997.
- KHAN, S. et al. Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3245–57, 2012.
- KHARKWAL, G. B. et al. HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–67, 2011.
- KOSAKA, S. et al. A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 6, p. 1546–9, 2007.
- KROLEWIECKI, A. J. et al. A randomized clinical trial comparing oral azithromycin and meglumine antimoniate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis

caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 640–6, 2007.

KRÜGER, A. et al. Combined nonlinear and femtosecond confocal laser-scanning microscopy of rabbit corneas after photochemical cross-linking. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 7, p. 4247–55, 2011.

KUKIDOME, N. et al. Bactericidal effects of 2.94 μm and 1.67 μm laser. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 51, n. 4, p. 185–92, 2010.

KULHALLI, P. et al. MULGAONKAR, N. Comparative potency of formulations of mometasone furoate in terms of inhibition of “PIRHR” in the forearm skin of normal human subjects measured with laser doppler velocimetry. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 71, n. 3, p. 170–4, 2014.

MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v.22, 83- 91, 2007.

MAISCH, T. et al. Photodynamic effects of novel x¹ porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1542–1552, 2005.

SANTOS, V.; MARTINY, A.; SOUZA, W. DE. Cell Biology of *Leishmania* spp .: Invading and Evading. **Current Pharmaceutical Design**, p. 297–318, 2002.

MATSUBARA, T., HAGIHARA, B. Action mechanism of phenothiazine derivatives on mitochondrial respiration, **The Journal of Biochemistry.**, v, 63, No. 2, 1968.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Editorial MS**; Brasília. 2007.

MIMURAA, S. et al. Cooperative clinical trial of photodynamic therapy for early gastric cancer with photofrin Infection (R) and YAG-OPO Laser. **Diagnostic and Therapeutic Endoscopy**, v. 4, n. C, p. 165–171, 1998.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 150–8, 2007.

MIRANDA, J. C. et al. Frequency of infection of Lutzomyia phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 185–8, 2002.

MROZ, P. et al. Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e15194, 2010.

NAKAYAMA, H. et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2-3, p. 186–8, 2007.

NEVES, L. O. et al. da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

OLIVEIRA, C. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of

Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 60–66, 2013.

OLIVEIRA, C. F. et al. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 865708, 2012.

OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. June, p. 145, 2012.

OLIVEIRA, S. et al. Evaluation of the efficacy of photodynamic antimicrobial therapy using a phenothiazine compound and laser ($\lambda = 660$ nm) on the interface: macrophage vs *S. aureus*. **Proceedings of Spie.**, v.9309, 1-7, 2015.

PANIZ MONDOLFI, A E. et al. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* with posaconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1774–6, 2011.

PATIENTS, S. et al. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 12, p. 891–895, 2002.

PELOI, L. S. et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 353–6, 2011.

PELOI, L.S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v. 33, 231–237, 2008.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 239–55, 2008.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PUJALS, G. et al. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1243–7, 2008.

RAGÀS, X. et al. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 384–90, 2010.

RAGÀS, X. et al. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2712–25, 2013.

RAJESH, S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 4, p. 323–7, 2011.

RAMIREZ, L. et al. Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania major* ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 3, 2014.

- RASMUSSEN, B.; DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and Confocal Microscopy in the Study of Leishmania – Macrophage Interactions. **Microscopy and Microanalysis**, p. 656–661, 2004.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7. p. 581–596, 2007.
- RUMER, L. et al. Rickettsia aeschlimannii in Hyalomma marginatum ticks, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 325–6, 2011.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–79, 2011.
- SANTOS, A. O. et al. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145–51, 2011.
- SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 55–9, 2011.
- SCHIAVON, M. et al. Experimental evaluation of a new system for laser tissue welding applied on damaged lungs. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 16, n. 5, p. 577–82, 2013.
- SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–9, 2011.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v.1, n. 123, p. 233–244, 2006.
- SHARMA, N. L. et al. Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in himachal pradesh, India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 819–24, 2005.
- SHARMA, S. K.; DAI, T.; KHARKWAL, G. B.; et al. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. **NIH Public Access**, v. 17, n. 13, p. 1303–1319, 2012.
- SILVA, E. R. et al. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 211–217, 2009.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–31, 2009.
- SMIJS, T. G. M. et al. Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 750–9, 2007.

SOUSA, A. Q.; PEARSON, R. Drought, smallpox, and emergence of *Leishmania braziliensis* in northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 916–21, 2009.

TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 196–203, 2006.

TUITE, E.M. KELLY, J.M. “Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates”, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Vol. 21, 103-124, 1993.

WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 3, p. 240–8, 2011.

ZAULI, R. C. et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 11, 2012.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine & International Health Journal**, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.