DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo

Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade celular de *Leishmania*
braziliensis e *Leishmania amazonensis*

Orientador:

Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Camargo, Luiz Henrique Moraes Caetano de
Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a
viabilidade celular de *Leishmania braziliensis* e
Leishmania amazonensis / Luiz Henrique Moraes
Caetano de Camargo. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Fotoquimioterapia 2.Azul de
metileno 3.*Leishmania* 4.Leishmaniose 5.Leishmaniose
cutânea 6.Doenças negligenciadas

USP/FM/DBD-210/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo

**Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade celular de *Leishmania*
braziliensis e *Leishmania amazonensis***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador:

Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

São Paulo

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Silvia Moraes Caetano de Camargo, minha amada mãe, que sempre se dedicou e me apoiou a cada passo dado e quando eu caía estava lá para me levantar.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DMIP) e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) pela oportunidade de realizar minha tese.

À FAPESP pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

À Fundação de Medicina Tropical do São Paulo (IMT), pelo apoio e uso de equipamentos destinados a esta pesquisa.

Ao laboratório de Protozoologia e todos da sua equipe, pelo apoio e uso dos equipamentos destinados a esta pesquisa.

Ao laboratório de Imunologia e todos da sua equipe, pelo apoio e uso dos equipamentos destinados a esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado sabedoria, paciência, força e garra para chegar até aqui, e a mim mesmo por toda dedicação, animo e paciência. Pois muitas das vezes não foi fácil, mas tive determinação e segui.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso, pela oportunidade de desenvolver meu projeto, pelas horas de apoio, ensinamentos, simplicidade e parceria ao longo deste projeto.

À Profa. e pesquisadora Lucia Maria Almeida Bras, pelos conselhos, pela coorientação, pelas horas de cafezinho e desabafo, pela humildade e empatia não só comigo, mas com todos os alunos do grupo e pela ajuda essencial prestada durante todo o processo.

À equipe de pesquisa: Renata Ellen Costa Silva, Jaqueline Alvez Del Prete, Joedh dos Santos, Vinicius Alves de Lima e Sandra, pelas horas de conversa e descontração, aprendizagem, momentos de felicidade, apoio e nossos coffe que sem vocês não seriam os mesmos.

À Dra. Noemi pelo apoio e expertise no experimento de MET, para que pudéssemos ter as imagens do presente projeto.

À coordenação do curso que me deu todo suporte e recursos necessários em cada etapa de desenvolvimento do projeto, em especial à dra. Silvia Costa e as secretarias do programa Luiza e Vânia obrigado por todo apoio.

A todos os funcionários da FM-USP e do IMT que diretamente ou indiretamente me auxiliaram até aqui.

Aos colegas de outros departamentos em especial, Emilly Henrique dos Santos , Mahyumi Fujimori e Fernanda Narangeira, que me apoiaram em todos os momentos, ouviram meu desabafo, e me proporcionar momentos e ensinamentos incríveis e que ouviram minhas apresentações testes diversas vezes, muito obrigado.

Aos meus amigos que entenderam meus momentos de ausência em festas, confraternizações e reuniões em grupo e que sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar mesmo perante a tantas dificuldades, em especial Paloma Oliveira, que até em experimento me acompanhou, mesmo sem entender nada, serei eternamente grato.

À minha família, que mais do que ninguém me apoio em toda minha trajetória, que me deu todo suporte possível e que lutaram junto em cada etapa da minha formação, que comemoraram e celebraram comigo cada vitória, e quando não dava certo, me incentivavam a continuar pois sempre acreditaram em mim, que em ensinaram a ter a paciência e acreditar que tudo tem seu tempo,

e que acima de tudo em deram amor e carinho, Mãe e Eder Jr. Eu amo vocês, e serei por toda minha vida grato a tudo que fizeram por mim.

À Renata Ellen da Silva, mencionada aqui pela segunda vez, mas que foi peça fundamental em todo meu aprendizado na área de parasitologia, pelas manhas de risadas, conhecimento, lanches, desabafos e por compartilhar tantos momentos juntos e que prestou todo seu apoio ao longo deste projeto, amiga obrigado por tudo.

Ao Dr. Prof. Pesquisador e com o título mais importante de meu companheiro Lucas Andreo Dias dos Santos, que sempre digo que foi meu segundo orientador, que me ajudou em cada passo deste projeto, que passou noites em claro comigo tentando entender protocolo, montando apresentações e assistindo minhas apresentações, me ajudando com as estáticas, que ouviu meu desabafos, me amparou nos momentos de desespero, que me deu seu ombro para chorar e compartilhou comigo todo seu vasto conhecimento, e que foi o grande incentivador do meu sucesso e da minha permanência na área da pesquisa, mesmo quando eu pensei em desistir ele me mostrou que eu era capaz. AMOR não tenho palavras para expressar o quão agradecido sou, mas posso dizer que te amo. OBRIGADO!

E a todos aqueles que torceram pelo meu sucesso e me incentivaram até aqui.

Muito obrigado.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

Introdução: A leishmaniose pode se apresentar sobre diferentes formas clínicas e causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. A terapia fotodinâmica (PDT) têm demonstrado efeitos promissores no tratamento da leishmaniose, porém há necessidade de entender melhor os mecanismos de ação sobre diferentes espécies de *Leishmania*. **Objetivo:** Analisar os efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno e LED (light-emitting diode) vermelho em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Metodologia:** Foram utilizadas formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* para avaliação do efeito da PDT. macrófagos J774 infectados com promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania* foram submetidos à PDT. A viabilidade celular foi analisada por atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT e citometria de fluxo. A expressão gênica de citocinas anti e pró-inflamatórias foi analisada por PCR. **Resultados:** As promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* apresentaram diminuição na viabilidade celular quando submetidas à PDT, porém na análise por citometria de fluxo não apresentaram diferença estatística. A expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias apresentou um aumento nos macrófagos infectados submetidos à PDT e uma diminuição na expressão de citocinas anti-inflamatórias. **Conclusão:** A PDT provocou inativação do parasito, apresentando resultados mais satisfatórios nas maiores concentrações do fotossensibilizador e na maior potência independente da espécie.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Azul de Metileno, Leishmania, Leishmaniose, Leishmaniose Cutânea, Doenças Negligenciadas.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis can be present under different clinical manifestations and caused by different species of *Leishmania*. Photodynamic therapy (PDT) has demonstrated promising effects on leishmaniasis treatment, but it is necessary to investigate the mechanisms of action of this therapy on different *Leishmania* species. **Objective:** To analyze the effects of PDT with methylene blue and red LED (light-emitting diode) on *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Methods:** *L. amazonensis* and *L. braziliensis* were used to evaluate the effects of PDT in promastigotes. J774 macrophages were infected with both species and submitted to PDT. The cell viability was analyzed with MTT and flow cytometry. Gene expression of pro and anti-inflammatory cytokines were analyzed with qPCR. **Results:** *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes demonstrated decrease in cell viability when submitted to PDT, but on flow cytometry analysis this difference was not significant. With PDT, the gene expression of pro-inflammatory cytokines were increased and regarding anti-inflammatory cytokines, PDT has shown an increase on gene expression. **Conclusion:** PDT caused parasite inactivation, with best results in the highest concentration and power density independent of the species.

Keywords: Photodynamic therapy, Methylene blue, Leishmania, Leishmaniasis, Cutaneous leishmaniasis, Neglected diseases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Polarização de macrófagos na Leishmaniose.....	2
1.2	Manifestações clínicas	3
1.3	Tratamentos medicamentosos	5
1.4	Terapia fotodinâmica (PDT)	7
1.5	Justificativa.....	9
2	OBJETIVO.....	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Parasitas	11
a)	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> promastigotas.....	11
b)	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> promastigotas.....	11
3.2	PDT	11
3.3	Viabilidade celular – MTT	12
3.4	Viabilidade celular – Azul de Tripán	13
3.5	Células J774	13
3.6	Procedimento de infecção de macrófagos	14
3.7	Método de Griess.....	15
3.8	RT-qPCR.....	16
3.9	Análise ultraestrutural	18
3.10	Avaliação de apoptose e necrose	19
3.11	Avaliação do potencial de membrana da mitocôndria.....	19
3.12	Análise dos resultados	19
4	RESULTADOS	21

4.1	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por atividade mitocondrial de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	21
4.2	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por contagem por exclusão de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> coradas com azul de Tripan.....	24
4.3	Padronização da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	31
4.4	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por atividade mitocondrial de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> .	32
4.5	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	35
4.6	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a morfologia de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	60
4.7	Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> avaliada por citometria de fluxo.....	65
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8	ANEXOS.....	79
8.1	ANEXO 1 – Dados do processo FAPESP – 2018/12426-6....	79
8.2	ANEXO 2 – Comprovante de apresentação em congresso ...	80
8.3	ANEXO 3 – Comprovante de submissão em periódico.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose cutânea (adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde).

Figura 2: Fluxograma dos experimentos realizados em promastigotas de *Leishmania spp.*

Figura 3: Fluxograma dos experimentos realizados em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania spp.*

Figura 4: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de MTT. * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 5: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de MTT. * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 6: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 7: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 8: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 9: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 10: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 11: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 12: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 13: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 14: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 15: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 16: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 17: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 18: Porcentagem da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes proporções (2:1, 4:1 e 8:1) em diferentes tempos de infecção (24h, 48h e 72h).

Figura 19: Porcentagem da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de *L. braziliensis* em diferentes proporções (2:1, 4:1 e 8:1) em diferentes tempos de infecção (24h, 48h e 72h).

Figura 20: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre amastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 21: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre amastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 22: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 23: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 24: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-6 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 25: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TLR4 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 26: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TNF- α em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 27: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD80 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 28: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-1 β em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle.

Figura 29: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-4 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 30: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-10 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 31: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD86 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 32: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD206 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 33: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-6 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle.

Figura 34: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 35: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de Arginase em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 36: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TLR4 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 37: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-1 β em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 38: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TNF- α em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 39: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD80 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 40: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD206 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle.

Figura 41: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD86 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 42: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-10 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 43: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-4 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 44: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B). Legenda: * núcleo celular, # kinetoplasto e + flagelo.

Figura 45: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B) expostos ao fotossensibilizador AM. Legenda: * núcleo celular, # kinetoplasto e + flagelo.

Figura 46: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B). Note a formação de bleb na membrana plasmática do parasito (**seta**), a mudança no comprimento (**seta**

dupla), formação de vacúolos ($\neq$), condensação da cromatina ($\approx$) e dilatação mitocondrial ($\equiv$).

Figura 47: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. braziliensis* submetidos à PDT com AM e OLED. Note a formação de bleb na membrana plasmática do parasito (**seta**), a mudança no comprimento (**seta dupla**), formação de vacúolos ($\neq$) e condensação da cromatina ($\approx$).

Figura 48: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* submetidos à PDT com AM e OLED. Note a formação de vacúolos ($\neq$) e dilatação mitocondrial ($\equiv$).

Figura 49: Citometria de fluxo de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sobre a viabilidade celular (avaliado por dupla marcação com Anexina V e PI).

Figura 50: Citometria de fluxo de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sobre o potencial de membrana (marcação com JC-1).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos parâmetros utilizados para irradiação.

Tabela 2: Lista dos primers utilizados para os marcadores de M1 e M2 na técnica qPCR.

LISTA DE ABREVIações

AM	Azul de metileno
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CD206	Cluster of differentiation 206
CD4	Cluster of differentiation 4
CD64	Cluster of differentiation 64
CD80	Cluster of differentiation 80
CD86	Cluster of differentiation 86
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC	Fluoresceína-isoticianato
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4

IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
JC-1	5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3 tetraetilbenzimidazolicarbocianina
LED	Luz por emissão de diodo
M-CSF	Fator estimulante de macrófagos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Óxido nítrico
OLED	Luz orgânica por emissão de diodo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDT	Terapia fotodinâmica
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribunuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sb⁺⁵	Antimoniais pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
Th1	Type 1 T helper
Th2	Type 2 T helper
TLR4	Toll like receptor 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
λ	Comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical e subtropical causada pelo parasita intracelular obrigatório *Leishmania* sendo transmitida aos humanos principalmente pelos insetos vetores *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Vera-Izaguirre et al. 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma das sete doenças tropicais mais importantes, representando um problema de saúde mundial com várias manifestações clínicas podendo evoluir a óbito (Torres-Guerrero et al. 2017). Nas Américas são reconhecidas 11 espécies do parasita causador da Leishmaniose em humanos, sendo sete identificadas no Brasil: *L. braziliensis*, *L. guayanensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi*, estando distribuída em todos os estados do país conforme demonstrado na figura 1 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

Figura 1: Distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose cutânea (adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde).

1.1 Polarização de macrófagos na Leishmaniose

Os parasitas do gênero *Leishmania* são patógenos intracelulares obrigatórios, tendo por afinidade os macrófagos onde se replicam, dependendo da interação macrófago-*Leishmania spp.* o paciente pode apresentar manifestações diferentes. Os macrófagos são células do sistema imune que podem ser polarizados para os fenótipos M1 e M2, sendo classicamente designados como um macrófago pró-inflamatório e anti-inflamatório respectivamente. Os macrófagos M1 seriam a primeira linha de defesa contra infecções e promovem a polarização Th1 de linfócitos TCD4, sendo ativados através de sinalização mediada por interferon gama (IFN- γ), receptor do tipo toll – *Toll like receptor 4* (TLR4) e fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), exibindo um aumento da atividade fagocítica e marcadores de superfície (CD64 e CD80), além de expressar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da síntese de óxido nítrico (NO), mediada nos macrófagos pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que promove um aumento da atividade microbicida (Martinez & Gordon, 2014; Atri, Guerfali e Laouini, 2018).

A população de macrófagos do fenótipo M2 pode ser estimulada pela resposta Th2, como pelas citocinas: interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) e fator estimulante de macrófagos (M-CSF), sendo envolvida em infecções parasitárias, fúngicas e helmínticas, podendo expressar IL-4 e IL-10 que promovem o recrutamento de mais macrófagos M2 e seus subtipos (Atri, Guerfali e Laouini, 2018; Martinez & Gordon, 2014).

Estudos demonstram que a resposta Th1 induz a morte do parasita e por consequência ao não estabelecimento da doença, enquanto a resposta do perfil Th2 leva a suscetibilidade da doença, e replicação do parasita e persistência de manifestações clínicas. Por consequência, a polarização para o fenótipo M1 induz ao aumento da atividade leishmanicida e para o perfil M2 aumenta a atividade anti-inflamatória e favorece a sobrevivência do parasita. Durante uma infecção parasitária por *Leishmania spp.* Há polarização tanto para o perfil M1 quanto para o perfil M2 e este processo é regulado principalmente pela iNOS e TLR4 para perfil M1, e arginase-1 e receptores de manose (CD206) para o perfil M2 (Atri, Guerfali e Laouini, 2018).

Souza et al. (2018) demonstraram os efeitos fotobiomodulatórios sobre a polarização de macrófagos no reparo tecidual, porém ainda não há relatos sobre os efeitos deste recurso na polarização de macrófagos do estabelecimento da leishmaniose.

1.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas dependem do tipo de parasita e dos aspectos genéticos que determinam a efetividade da resposta imune do hospedeiro, sendo dividida em cutânea (localizada ou disseminada), muco-cutânea e visceral (Vargas-Martínez et al. 2010).

Especificamente, o parasita causador da leishmaniose cutânea localizada tem um período de incubação de 1 a 4 semanas, podendo se estender por anos (Vargas-Martínez et al. 2010). Se manifesta primeiramente por um aumento de temperatura local e edema, posteriormente há o aparecimento de uma pápula eritematosa assintomática de 1 a 10mm de diâmetro no local da picada, podendo

ser acompanhada de prurido. Após 2 dias, a pápula se torna uma vesícula e posteriormente em uma pústula que quando se rompe se torna uma úlcera arredondada com borda grossa ou nodular podendo permanecer de 3-5 meses a 15-20 anos. Caso não tenha uma infecção secundária, a úlcera não é acompanhada de dor, o paciente pode apresentar úlceras isoladas ou múltiplas (Vera-Izaguirre et al. 2006; Seidelin, 2016). Há casos em que a úlcera se cura espontaneamente, de acordo com o parasita pode se ter uma noção do tempo de cura espontânea: 3-9 meses nas úlceras causadas por *L. mexicana*, 2-6 meses nas causadas por *L. major* e 6-15 meses por *L. braziliensis*, *L. tropica* ou *L. panamensis* (Reithinger et al. 2007; Dowlati, 1996; Soto et al. 2002).

Com relação a leishmaniose cutânea difusa, sua característica principal é a anergia, ou seja, a incapacidade de resposta celular aos antígenos parasitários, resultando em uma disseminação através dos tecidos, linfa e sangue, levando a lesões em várias partes da pele, podendo ou não ter um envolvimento de membranas mucosas. Inicialmente começa com um nódulo eritematoso e uma camada marrom avermelhada infiltrativa ou lesões verrugosas, podendo ou não ser ulcerativa. Pode ser acompanhada de febre e linfedema que pode evoluir para linfadenopatia. Em casos com envolvimento da orofaringe e nasofaringe nódulos dolorosos podem levar a obstrução das vias aéreas dos pacientes, não havendo melhora espontânea e com tratamento mais difícil, podendo apresentar evolução acima de 20 anos (Vera-Izaguirre et al. 2006; Reithinger et al. 2007; Bravo & Sanchez, 2003).

A forma de leishmaniose muco-cutânea ou tegumentar americana é resultante na evolução da leishmaniose cutânea localizada em 1-10% dos pacientes após 5 anos de cura da lesão. Os casos reportados no Brasil, Peru e

Bolívia representam 90% do número total de pacientes com leishmaniose mucocutânea. É causada principalmente pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* que causam lesões necróticas na mucosa nasofaríngea (Davies et al. 2000). Este tipo se inicia primeiramente na mucosa nasal, infectando mucosa oral e faríngea, laringe, pele dos lábios e nariz. Inicialmente há presença de dor na região das úlceras, podendo evoluir para rouquidão, disfagia, lesões graves na úvula, palato mole, tonsilas, linfonodos, septo nasal, perda do olfato e em casos extremos óbito (Reithinger et al. 2007; Torres-Guerrero et al. 2017).

1.3 Tratamentos medicamentosos

O tratamento de primeira escolha para a leishmaniose são os antimoniais pentavalente (Sb^{+5}) por serem leishmanicidas por causarem a inibição da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos e redução do ATP e GTP. Porém este medicamento só é eficaz para a forma amastigota do parasita, apresentando pouco efeito sobre a forma promastigota (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010; Torres-Guerrero et al. 2017).

Após a administração, o medicamento fica retido no organismo, sendo parte convertido em antimônio trivalente se concentrando principalmente no fígado e baço. Pelo fato dos Sb^{+5} não se ligarem aos eritrócitos possuem concentração mais elevada do que compostos trivalentes e são eliminados mais rapidamente pelos rins pelo processo de filtração glomerular. Porém a sua forma trivalente por ligarem-se mais aos tecidos, tem sua toxicidade bem maior por se ligarem a eritrócitos e por isso sua utilização é realizada com prescrição de altas doses desde o início do tratamento da leishmaniose (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010; Torres-Guerrero et al. 2017).

Os efeitos adversos do tratamento com antimônios são frequentes, sendo, por ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Além disso, alterações eletrocardiológicas, como inversão da onda T, prolongamento do segmento Q-T, depressão do segmento S-T ou bradicardia sinusal, podendo ser suspenso o tratamento (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

A anfotericina-B e as pentamidinas são o tratamento de segunda escolha para a Leishmaniose, sendo indicado na insuficiência do tratamento com antimônios e em casos de gestantes por antimônios ultrapassarem a barreira placentária (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

A anfotericina B atua nas formas amastigota e promastigota do parasita apresentando toxicidade seletiva na membrana citoplasmática de *Leishmania*, sendo extremamente efetivo, porém tóxico, apresentando efeitos adversos mais frequentes como febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia, flebite, anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

As pentamidinas agem sobre o metabolismo da glicose, podendo haver hiperglicemia ou hipoglicemia, podendo ser resultante de uma citólise das células beta pancreáticas e por consequência *diabetes* insulino-dependente, esse efeito pode ser cumulativo e dose dependente (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

Essas limitações levaram a pesquisa de tratamentos alternativos que tivessem menores efeitos sistêmicos, sendo a terapia fotodinâmica (PDT) um destes recursos.

1.4 Terapia fotodinâmica (PDT)

A PDT é realizada a partir da associação da presença de oxigênio, um fotossensibilizador e uma fonte de luz podendo ser proveniente de luz laser ou de um diodo emissor de luz (LED), liberando espécies reativas de oxigênio (EROs) que são capazes de levar a morte celular de microorganismos (Castano, Demidova e Hamblin, 2004).

Com relação aos fotossensibilizadores utilizados para o tratamento de leishmaniose, há diferentes substâncias com resultados promissores como o azul de metileno (Pinto et al. 2017, Sbeghen et al. 2015), ácido 5-aminolevunico (Fink et al. 2016; Souza et al. 2016), curcumina (Pinto et al. 2016), hipericina (Montoya et al. 2015), clorina (Pinto et al. 2016), porfirina (Mateus et al. 2014) e nanopartículas (Nadhman et al. 2014).

Especificamente, com o uso de azul de metileno, Pinto et al. (2017) demonstrou que o fotossensibilizador é internalizado pelas espécies *L. braziliensis* e *L. major* em estudos *in vitro*, a substância não apresentou toxicidade no escuro, porém com associação da luz (LED 660 nm, 10 J/cm²) foi capaz de diminuir a viabilidade e promover alterações morfológicas.

Peloi et al. (2011) demonstraram que o uso de PDT (LED 663 nm), com azul de metileno *in vivo* em modelo experimental reduziu a largura do membro afetado e redução da carga parasitária nos linfonodos.

Sbeghe et al (2015) demonstraram que o uso de PDT (LED 655 nm, 60min) com azul de metileno aplicado intradérmico ou tópico tem diferença, sendo a aplicação tópica com efeitos positivos, resultando em uma reconstituição do epitélio, formação de fibras de colágeno e organização da epiderme.

Song et al. (2011) demonstraram uma diminuição na viabilidade celular de *L. amazonensis in vitro* através do uso de PDT com azul de metileno e LED (650 nm, 9 J/cm², 5 mw/cm², 30 min) e melhora no aspecto da ferida de um paciente com o uso da PDT e antimônio pentavalente.

Estudos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram resultados promissores no tratamento PDT na forma promastigotas de *L. amazonensis in-vitro*, em que a terapia atenuou a atividade metabólica do parasito em cerca de 80% na menor concentração de AM na potência de 100 mW e tempo de 300 s. Com isso concluímos que as promastigotas de *L. amazonensis* sofrem detrimento celular causado pelo estresse oxidativo. As análises de microscopias feitas demostram que há deterioramento em sua morfologia, como encolhimento celular, arredondamentos, perda de integridade do flagelo e migração da cromatina nuclear para a periferia da membrana do núcleo do parasito. Com estes resultados damos continuidade afim de elucidar as vias de ativação e morte do parasito tanto na forma promastigotas como na amastigota nas principais espécies causadoras de leishamiose tegumentar, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

1.5 Justificativa

Partindo da necessidade de um tratamento mais eficaz e sem efeitos sistêmicos, faz-se necessária maior investigação sobre terapias alternativas. A PDT é um recurso promissor e o nosso grupo tem realizado estudos acerca dos efeitos deste recurso terapêutico sobre o parasita (Aureliano et al. 2015, Song et al. 2011, Aureliano et al. 2014), sendo necessário maiores investigações acerca dos mecanismos de ação desta terapia e dos diferentes parâmetros de irradiação e concentração do fotossensibilizador. Este projeto está em desenvolvimento em parceria com a Universidade de St. Andrews (St. Andrews, Escócia) onde a fonte transmissora de luz foi idealizada pelo grupo de pesquisa.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Determinar o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (PDT), utilizando azul de metileno com fotossensibilizador e LED, sobre promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno e LED vermelho em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, avaliando os seguintes pontos:

- Viabilidade celular por MTT;
- Viabilidade celular por citometria de fluxo;
- Potencial de membrana por citometria de fluxo;
- Morfologia celular por microscopia eletrônica.

- Analisar os efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno e LED vermelho em macrófagos J774 infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, avaliando os seguintes pontos:

- Produção de óxido nítrico por método de Griess;
- Viabilidade celular por MTT;
- Expressão gênica de citocinas por PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitas

a) *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis* (Strain MHO/BR/73/M2269) foram cultivados em meio M199 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino (SFB), HEPES, penicilina e estreptomicina a 26°C por 4-7 dias. Para os experimentos foram usados 10^7 parasitas/mL.

b) *Leishmania (V.) braziliensis* promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis braziliensis* (Strain MHO/BR/75/M2903) foram cultivadas em meio M199 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com SFB, HEPES, penicilina e estreptomicina a 26°C por 4-7 dias. Para os experimentos foram usados 10^7 parasitas/mL.

3.2 PDT

Inicialmente foi prepara uma solução estoque de azul de metileno (AM) em água destilada na concentração de 10 mM. Essa solução foi diluída em PBS e usada em concentrações de 50, 100, 200 e 500 μ M.

Para irradiação, foi usado o equipamento LED (LED 660, St Andrews University) com parâmetros descritos na tabela 1 e o fluxograma dos experimentos estão especificados nas figuras 2 e 3.

Tabela 1 Descrição dos parâmetros utilizados para irradiação.

Comprimento de onda (nm)	660±10					
Diâmetro (cm)	0.6					
Densidade de Potência (mW/cm ²)	12.5	25	50			
Tempo de exposição (s)	60	300	60	300	60	300
Densidade de Energia (J/cm ²)	0.75	3.75	1.5	7.5	3	15

Figura 2: Fluxograma dos experimentos realizados em promastigotas de *Leishmania* spp.

3.3 Viabilidade celular – MTT

Após a aplicação da PDT, 25 µl de solução de MTT (5mg/mL em PBS) foram adicionados em cada poço e incubado a 26°C por 3h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (3600 rpm, 10 min, 22°C) e o sobrenadante

removido. Após, 100 µl de DMSO foram adicionados para homogeneização e solubilização dos cristais de formazan. Após agitação de 15 min, as leituras foram realizadas em absorbância de 570 nm (filtro de referência de 630 nm) em um leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, USA). Como controle, foram usadas promastigotas não submetidas à PDT.

O número relativo de viabilidade de promastigotas foi determinado pela absorbância óptica usando a equação:

$$Viabilidade\ celular = (OD_t - OD_b) \div (OD_c - OD_b) \times 100$$

Sendo:

OD_t amostra tratada;

OD_c amostra controle;

OD_b amostra em branco.

3.4 Viabilidade celular – Azul de Tripan

Após a PDT, os parasitos foram transferidos para microtubos e foi adicionado 20 µl de azul de Tripan (0.4%) e 20 µl de Paraformaldeído. Parasitos marcados serão considerados células mortas e os não corados serão considerados células viáveis.

3.5 Células J774

Macrófagos J774 (J774 A.1 American Type Culture Collection - ATCC) foram cultivados em meio RPMI 1640 inicialmente com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca dos meios para estes macrófagos foram realizadas a cada dois dias e as condições

de SFB modificadas para 5% e posteriormente mantida a 1%, até se processarem os experimentos.

Figura 3: Fluxograma dos experimentos realizados em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania* spp.

3.6 Procedimento de infecção de macrófagos

Células J774 foram cultivadas em frascos de cultura (Corning Costar-Cambridge, MA, EUA) foram desprendidas com “cell scrapper”, (Corning Incorporated, NY, made in México) e as células lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 a 250 g por 10 minutos. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640 com 1% de SFB e acertada a concentração para 10^6 células/mL. As células J774 foram colocados sobre lamínulas em placa de cultura (Corning Costar, EUA) de 24 poços e incubadas overnight a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Posteriormente os macrófagos foram lavados com RPMI 1640 incompleto e infectados com

promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* ou *Leishmania (V.) braziliensis* em diferentes proporções de parasito/macrófago (2:1, 4:1 e 8:1) sem nenhum tipo de tratamento por 24, 48 e 72 horas com meio RPMI acrescido de 5% de SFB. Após os períodos experimentais as lâminas foram coradas com Giemsa por 30 minutos e o grau de infecção foi avaliado sob microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), contando-se o número de parasitas em cem células,

Após a padronização da infecção as células receberam o tratamento com a PDT nos mesmos parâmetros citados anteriormente (AM em 50, 100, 200 e 500 μ M, LED 600 nm, 60 e 300 s, 12.5, 25 e 50 mW/cm², conforme figura 3) para ser realizado a análise da atividade mitocondrial por MTT. Amostras adicionais foram incubadas para realização de dosagem de nitrato e nitrito, além de análise da expressão gênica e determinação da carga parasitária.

3.7 Método de Griess

A determinação da concentração plasmática de óxido nítrico (NO) foi realizada pela redução enzimática de nitrito para nitrato pela enzima nitrato redutase, conforme descrito por Granger et al. As amostras foram incubadas a 37°C por 2h. Após, o sobrenadante foi misturado com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0.1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água) para a leitura das placas que foram realizadas na absorbância de 540 nm.

3.8 RT-qPCR

Será realizado a extração de RNA através da lavagem das placas com 1ml do reagente TRIzol (Life Technologies, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Na sequência, será realizada a centrifugação das amostras e será feita a transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Serão adicionados 200µl de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e transferência da fase aquosa superior contendo o RNA total para um novo microtubo. Por fim, serão adicionados 500µl de isopropanol para precipitação do RNA total. A ressuspensão do RNA total precipitado será feita utilizando água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a -80° C. Para verificação do sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total serão analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. O RNA total será quantificado por espectrometria em 260nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e todas as amostras serão tratadas com DNase (Life Technologies) para evitar contaminação com DNA genômico. O RNA total será submetido à reação com a enzima transcriptase reversa utilizando o Kit High Capacity (Life Technologies) para a obtenção do cDNA e este será utilizado para a reação de PCR em tempo real utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems, EUA). Para este procedimento as amostras serão analisadas em duplicata. O software usado será o “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystem, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) serão usados para a realização deste procedimento (Tabela 2). Para normalização dos dados foram utilizados primers para GAPDH e actina para a comparação entre os

dados e entre os grupos (controle e tratado), unidades arbitrárias serão calculadas da seguinte forma:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ controle}$$

$$\text{Unidade arbitrária} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Sendo:

CT: threshold cycle.

Tabela 2: Lista dos primers utilizados para os marcadores de M1 e M2 na técnica qPCR.

Gene	Sequência	Nº amplicon	Nº acesso (Primer Blast)
TLR4	F: 5'-TGTCATCAGGGACTTTGCTG-3' R: 5'-GGACTCTGATCATGGCACTG-3'	126	NM_021297.3
IL-1 β	F: 5'-CTGGTGTGTGACGTTCCCATTA-3' R: 5'-CCGACAGCACGAGGCTTT-3'	76	NM_008361.4
iNOS	F: 5'-CAGAGGACCCAGAGACAAGC-3' R: 5'-TGCTGAAACATTTCTGTGC-3'	300	NM_010927.4
IL-6	F: 5'-CCAGTTGCCTTCTTGGGACT-3' R: 5'-GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC-3'	101	NM_001314054.1
TNF- α	F: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' R: 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'	175	NM_013693.3
CD86	F: 5'-TCTCCACGGAAACAGCATCT-3' R: 5'-CTTACGGAAGCACCCACGAT-3'	100	NM_019388.3
CD80	F: 5'-GGCAAGGCAGCAATACCTTA-3' R: 5'-CTCTTTGTGCTGCTGATTGCG-3'	94	NM_001359898.1
Arginase	F: 5'-AGGAACTGGCTGAAGTGGTTA-3' R: 5'-GATGAGAAAGGAAAGTGGCTGT-3'	215	NM_009705.3
CD206	F: 5'-CAGGTGTGGGCTCAGGTAGT-3' R: 5'-TGTGGTGAGCTGAAAGGTGA-3'	118	NM_008625.2
IL-4	F: 5'-CTGACGGCACAGAGCTATTGA-3' R: 5'-TATGCGAAGCACCTTGGAAGC-3'	216	NM_021283.2
IL-10	F: 5'-CAATAACTGCACCCACTTCCC-3' R: 5'-GAGAAATCGATGACAGCGCCT -3'	310	NM_010548.2
β -actina	F: 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' R: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349	NM_007393.5
GAPDH	F: 5'-GCATCTTGGGCTACACTGA-3' R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	162	NM_001289726.1

3.9 Análise ultraestrutural

Alterações na ultraestrutura dos parasitas serão analisadas por microscopia de transmissão eletrônica (TEM). Primeiramente, promastigotas de *L. amazonensis* serão lavadas cinco vezes com PBS em 4°C por 30 min. As amostras serão fixadas em solução de glutaraldeído (3% glutaraldeído em 0.1 M de cacodilato de sódio contendo 0.1 M de sucrose, pH 7.4). Após a fixação o material será lavado em tampão cacodilato (cacodilato 0,1M acrescido de sacarose pH 7.4) durante 3 min a 5000 RPM. As amostras serão fixadas em um mix de 1% fosfato-buffered tetróxido de ósmio e 1.5% de ferrocianida de potássio por 1h. Então, as amostras serão lavadas duas vezes com tampão cacodilato, no mesmo protocolo de centrifugação descrito anteriormente, e contrastadas com acetato de uracila a 2,5% em álcool 50% durante 5 minutos. Finalizado o processo de contrastação, será realizada a desidratação, lavando-se 3 vezes a amostra com etanol a 70%. Em seguida será adicionado ao material 2-2-dimetoxipropano P.A. durante 5 min. Logo após o sobrenadante será descartado e será adicionado acetona P.A. por 2 min.

Ao término do processo de desidratação, as amostras serão embebidas em resina (araldite 502/ EMBED 812/ DDSA/ DMP 30) com adição de acetona P.A na proporção 1:1 durante 30 min. Em seguida, será adicionada a resina pura e o material será acondicionado em estufa a 100°C, por 24 h. Terminada a completa polimerização da resina, cortes de 80 nm de espessuras serão obtidos usando uma lâmina de ultramicrotomo (Reichert Ultracut UCT, Leica, Germany). As micrografias eletrônicas serão obtidas usando um microscópio JEM1010 (Jeol, USA) e será analisado alterações nas estruturas internas dos parasitas, como morfologia nuclear, distribuição da cromatina e morfologia mitocondrial.

3.10 Avaliação de apoptose e necrose

Parasitas serão incubados com Anexina V conjugado com fluoresceína-isoticianato (FITC) e iodeto de propídio (PI) por 15 min, protegido da luz de acordo com informações do kit (annexin V for FITC apoptosis detection, eBioscience, USA). As amostras serão ativadas em $\lambda = 488$ nm e a fluorescência será detectada em $\lambda = 525$ nm (emissão do FITC) e $\lambda = 575$ nm (emissão do PI). Dez mil eventos independentes serão gravados para análise aleatória de todos os testes.

3.11 Avaliação do potencial de membrana da mitocôndria

Para a análise da despolarização da membrana mitocondrial, os parasitas serão lavados com PBS gelado (0.1 M, pH 7.2, suspensos em 0.5 mL de reagente JC-1 (5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3-tetraetilbenzimidazolicarbocianina e incubados a 37°C por 15 min. Após, as células serão centrifugadas por 10 min em 2100 g e o sobrenadante será removido. O pellet será ressuspensionado em 2 ml de buffer (1X, JC-1 kit), centrifugado duas vezes, o sobrenadante será descartado e ressuspensionado novamente em 0.5 ml de buffer (1X, JC-1 kit). A detecção do potencial elétrico da membrana mitocondrial será analisada em 10 mil eventos independentes.

3.12 Análise dos resultados

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software San Diego, California, USA). A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram

expressos em média e erro padrão da média, sendo submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os níveis de confiança serão ajustados para 95% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por atividade mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram diminuição na atividade mitocondrial na presença do fotossensibilizador nas concentrações de 100 e 200 μM principalmente, e quando irradiados (12.5, 25 e 50 mW/cm^2) o efeito foi potencializado, sendo melhor observado nos grupos irradiados com maiores concentrações do fotossensibilizador independentemente do tempo de irradiação, sendo mais evidente a diminuição na atividade mitocondrial nos grupos irradiados na maior densidade de potência (50 mW/cm^2), no maior tempo (300 s) e nas maiores concentrações do fotossensibilizador (100, 200 e 500 μM) (Figura 4).

Figura 4: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de MTT. * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

As amostras de *L. braziliensis* apresentaram diminuição da atividade mitocondrial nas concentrações de 100, 250 e 500 μM e quando irradiadas (12.5, 25 e 50 mW/cm^2) o efeito foi potencializado. Os grupos experimentais submetidos à PDT apresentaram menor atividade mitocondrial independentemente do tempo de irradiação, sendo esta modulação bem similar nestes grupos, inclusive na menor concentração (50 μM) do fotossensibilizador (Figura 5).

Figura 5: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de MTT. * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

4.2 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por contagem por exclusão de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* coradas com azul de Tripan.

Promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram diminuição no número de parasitos viáveis quando expostos ao AM nas concentrações de 100, 200 e 500 μM e irradiados nas três densidades de potências (12.5, 25 e 50 mW/cm^2). Nas maiores concentrações (200 e 500 μM) e no maior tempo de exposição ao LED o efeito foi mais positivo.

Figura 6: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 7: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 8: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 9: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 10: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 11: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Os parasitos de *L. braziliensis* (promastigotas) também apresentaram diminuição no número de parasitos viáveis quando expostos ao AM nas concentrações de 100, 200 e 500 µM e irradiados nas três densidades de potências (12.5, 25 e 50 mW/cm²). Diferente da outra espécie, foi demonstrado uma otimização da morte dos parasitos na concentração de 50 µM e com o maior tempo de irradiação (300 s).

Figura 12: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **p<0.01 vs Grupo Controle, **** p<0.0001 vs. Grupo Controle.

Figura 13: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripán. **p<0.01 vs Grupo Controle, **** p<0.0001 vs. Grupo Controle.

Figura 14: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 15: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 16: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

Figura 17: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey), medida pelo método de exclusão com azul de Tripan. ** $p < 0.01$ vs Grupo Controle, **** $p < 0.0001$ vs. Grupo Controle.

4.3 Padronização da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Para os experimentos realizados com a forma amastigota do parasita foi realizado a padronização da infecção em macrófagos J774 com as duas espécies de *Leishmania*, sendo a melhor proporção parasito/macrófago para *L. amazonensis* a de 2:1 e para *L. braziliensis* a de 4:1, sendo o melhor período de incubação para ambas de 48 h (figuras 18 e 19).

Figura 18: Porcentagem da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes proporções (2:1, 4:1 e 8:1) em diferentes tempos de infecção (24h, 48h e 72h).

Figura 19: Porcentagem da infecção da linhagem de macrófagos J774 com promastigotas de *L. braziliensis* em diferentes proporções (2:1, 4:1 e 8:1) em diferentes tempos de infecção (24h, 48h e 72h).

4.4 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade avaliada por atividade mitocondrial de amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

As amastigotas de *L. amazonensis* irradiadas na presença do azul de metileno apresentaram diminuição na atividade mitocondrial, sendo este efeito potencializado nas maiores concentrações e no maior tempo de exposição (Figura 20).

Figura 20: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre amastigotas de *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

As amastigotas de *L. braziliensis* também apresentaram diminuição na atividade mitocondrial em todas as concentrações de azul de metileno sendo maior em 500 µM, e quando irradiadas na presença de azul de metileno apresentam uma diminuição maior em sua atividade nas maiores concentrações (200 e 500 µM) no maior tempo de exposição (300 s) principalmente nas maiores densidades de potências (25 e 50 mW/cm²) (Figura 21).

Figura 21: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre amastigotas de *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

4.5 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Os macrófagos J774 infectados por *L. amazonensis* não apresentaram alterações na expressão gênica de citocina do perfil M1 na presença dos fotossensibilizadores de 250 e 500 μM , porém quando expostos ao LED foi demonstrado um aumento na expressão gênica de citocinas do perfil M1, principalmente nas citocinas: iNOS e Arginase (figuras 22 e 23).

Com relação à expressão gênica das citocinas IL-6 e TLR-4, foi demonstrado um aumento, na maior densidade de potência (50 mW/cm^2) e no menor tempo de exposição (60 s) (figuras 24 e 25). A citocina TNF- α teve o aumento de sua expressão gênica em 250 μM na densidade de potência de 25 mW/cm^2 e no menor tempo de exposição (60 s). Entretanto, quando exposto a maior densidade de potência houve o aumento de sua expressão em ambos os tempos e concentrações de AM (figura 26). Em relação ao CD80 houve um aumento de sua expressão gênica em 250 e 500 μM na maior potência (50 mW/cm^2) em ambos os tempos de exposição (60 e 300 s) (figura 27). e em relação à citocina IL1- β foi observado um aumento de sua expressão nas duas concentrações de AM (250 e 500 μM) na densidade de potência de 25 mW/cm^2 e no menor tempo de exposição (60 s) e em 500 μM na maior densidade de potência (50 mW/cm^2) no maior tempo de exposição (300 s) (figura 28).

Não houve modulações nas expressões gênicas das citocinas do perfil M2 em nenhuma das condições experimentais (figuras 29, 30, 31 e 32).

Figura 22: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle, ***p<0.001 vs. Grupo Controle.

Figura 23: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 24: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-6 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 25: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TLR4 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 26: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TNF- α em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle, *** $p < 0.001$ vs. Grupo Controle.

Figura 27: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD80 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle.

Figura 28: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-1β em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle.

Figura 29: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-4 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 30: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-10 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 31: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD86 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 32: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD206 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (ANOVA/Tukey).

As amostras infectadas por *L. braziliensis* não apresentaram aumento em sua expressão gênica na presença dos fotossensibilizadores de 250 e 500 μM , mas quando expostas ao LED foi observado um aumento nesta expressão de citocinas do perfil M1.

Em relação à citocina IL-6 foi observado um aumento em 250 μM na maior densidade de potência (50 mW/cm^2) e no menor tempo de exposição a luz (60 s) (figura 33). Com relação à citocina iNOS foi observado um aumento em sua expressão em 250 e 500 μM na densidade de potência de 25 mW/cm^2 em ambos os tempos de exposição (60 e 300 s) e na maior densidade de potência (50 mW/cm^2) foi observado um aumento de sua expressão em 500 μM em ambos os tempos de exposição a luz (60 e 300 s) (figura 34). Relacionado à arginase, foi observado um aumento em sua expressão gênica nas concentrações de 250 e 500 μM na densidade de potência de 25 mW/cm^2 e no menor tempo de exposição (60 s) e na maior densidade de potência (50 mW/cm^2) houve o aumento de sua expressão em 500 μM em ambos os tempos de exposição (60 e 300 s) (figura 35). Com relação ao TLR4 o aumento de sua expressão foi observado quando expostos ao AM (250 e 500 μM) na densidade de potência de 25 mW/cm^2 em ambos os tempos de exposição a luz (60 e 300 s) (figura 36). Em relação à IL-1 β foi observado um aumento de sua expressão em 250 e 500 μM em ambos os tempos (60 e 300 s) e potências (25 e 50 mW/cm^2) (figura 37). As citocinas TNF- α e CD80 não apresentaram modulações em sua expressão gênica (figuras 38 e 39).

Com relação às citocinas perfil M2 os macrófagos infectados por *L. braziliensis* demonstraram um aumento na expressão de CD206 e CD86 (figuras 40 e 41).

Em específico, o CD206 apresentou um aumento na expressão gênica quando expostos à PDT com a densidade de potência de 25 mW/cm² no maior tempo de exposição à luz (300 s) (figura 40), e em relação ao CD86 houve o aumento de sua expressão em 250 e 500 µM em ambos os tempos (60 e 300 s) e densidades de potências (25 e 50 mW/cm²) (figura 41). As citocinas IL-10 e IL-4 não apresentaram modulação em sua expressão gênica em nenhum dos parâmetros avaliados (figuras 42 e 43).

Figura 33: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-6 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle.

Figura 34: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de iNOS em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle.

Figura 35: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de Arginase em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). * $p < 0.05$ vs. Grupo Controle, ** $p < 0.01$ vs. Grupo Controle.

Figura 36: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TLR4 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle.

Figura 37: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-1β em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle.

Figura 38: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de TNF- α em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 39: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD80 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 40: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD206 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle.

Figura 41: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de CD86 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey). *p<0.05 vs. Grupo Controle, **p<0.01 vs. Grupo Controle.

Figura 42: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-10 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

Figura 43: Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a expressão gênica de IL-4 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (ANOVA/Tukey).

4.6 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a morfologia de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Os parasitos do grupo Controle apresentaram morfologia filiforme como habitual e integridade das organelas, sendo possível identificar o complexo de Golgi, flagelo, núcleo e mitocôndria (figura 44).

Figura 44: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B). Legenda: * núcleo celular, # kinetoplasto e + flagelo.

Quando expostos ao fotossensibilizador não foram observadas alterações na morfologia celular dos parasitos, mantendo o volume celular, aspecto alongado, mitocôndria e flagelo íntegros e não foram observados formação de blebs ou condensação da cromatina (figura 45).

Figura 45: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B) expostos ao fotossensibilizador AM. Legenda: * núcleo celular, # kinetoplasto e + flagelo.

Os parasitos submetidos à PDT apresentaram diminuição do volume celular, alterando de uma morfologia filiforme para ovoide, formação de blebs, condensação da cromatina, dilatação mitocondrial e vacúolos citoplasmáticos, sendo estas alterações mais acentuadas na espécie *L. braziliensis* em comparação com os parasitos *L. amazonensis* (figuras 46, 47 e 48).

Figura 46: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* (A) e *L. braziliensis* (B). Note a formação de bleb na membrana plasmática do parasito (**seta**), a mudança no comprimento (**seta dupla**), formação de vacúolos (**#**), condensação da cromatina (**≈**) e dilatação mitocondrial (**≡**).

Figura 47: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. braziliensis* submetidos à PDT com AM e OLED. Note a formação de bleb na membrana plasmática do parasito (**seta**), a mudança no comprimento (**seta dupla**), formação de vacúolos (≠) e condensação da cromatina (≈).

Figura 48: Micrografia eletrônica de transmissão demonstrando morfologia dos parasitos *L. amazonensis* submetidos à PDT com AM e OLED. Note a formação de vacúolos (≠) e dilatação mitocondrial (≡).

4.7 Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* avaliada por citometria de fluxo

Com relação à análise de viabilidade das promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* não foram observadas diferenças entre os grupos Controle, expostos ao azul de metileno em 500 μ M e expostos à PDT (figura 49).

Figura 49: Citometria de fluxo de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sobre a viabilidade celular (avaliado por dupla marcação com Anexina V e PI).

Figura 50: Citometria de fluxo de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sobre o potencial de membrana (marcação com JC-1).

5 DISCUSSÃO

Segundo a classificação da OMS, a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, sendo estas doenças de caráter infeccioso com a prevalência em populações de baixa renda, com condições sociais precárias, como acesso a água encanada e condições sanitárias inadequadas que contribuem para a incidência de doenças infectocontagiosas.

Neste estudo foram demonstrados os efeitos positivos da PDT sobre os parasitos promastigotas e amastigotas, sendo importante salientar que em uma maior concentração de fotossensibilizador e maior tempo de exposição os parasitos demonstraram menor viabilidade, menor atividade mitocondrial, alterações morfológicas e melhor resposta do sistema imune. Como foram testados duas espécies de dois gêneros diferentes de parasito, é notável a diferença na resposta dos parasitos, sendo estes efeitos modulatórios importantes no estabelecimento de protocolos que visam o tratamento dos pacientes, sendo o intuito deste trabalho evidenciar os efeitos para eleger o melhor protocolo de aplicação com os parâmetros testados do fotossensibilizador e da fonte emissora de luz. Neste estudo foi optado pelo uso do OLED que é uma fonte emissora de luz em que foi possível definir um comprimento de onda específico (com uma faixa de variação) em uma densidade de potência específica, sendo este um recurso de menor valor em comparação com o laser, sendo este um fator importante por se tratar de uma doença que atinge mais uma população de pobreza.

Na literatura científica há diversos artigos originais publicados, porém sem a descrição completa dos parâmetros, o que dificulta a elaboração de uma revisão ou até mesmo reprodutibilidade dos protocolos. Em alguns artigos a

ausência da área da fonte emissora de luz, densidade de potência, potência ou outro parâmetro que não possa ser calculado não nos permitiu a comparação com estudos que usassem a mesma densidade de potência no mesmo tempo de aplicação, para a padronização, estudos prévios foram realizados para que estes parâmetros fossem utilizados (Aureliano et. al, 2018).

O presente estudo demonstrou que os parasitos apresentaram uma diminuição da atividade mitocondrial em todos os parasitos de *L.amazonensis* e *L. braziliensis* tratados com PDT, sendo que esta última espécie apresentou esta diminuição nos grupos expostos ao fotossensibilizador na ausência da fonte emissora de luz. Na literatura há descrição de que os diferentes parasitos respondem de maneira diferente, como demonstrado por Pinto et. al (2016), Pinto et. al (2016) e Pinto et. al (2017) que avaliaram os efeitos da PDT em *L. major* e *L. braziliensis*, nestes estudos os autores demonstraram que em alguns experimentos a *L. braziliensis* apresentou um aumento ou uma diminuição da atividade mitocondrial, mostrando um efeito modulatório da PDT sobre esta atividade, isto pode ser decorrente de que em um processo de apoptose as células podem variar a atividade metabólica ou das características dos fotossensibilizadores utilizados (curcumina, clorina E6 e azul de metileno). No presente estudo foram encontradas diminuições no que se refere a atividade mitocondrial e viabilidade celular em todos os grupos submetidos à PDT, corroborando com os resultados obtidos por Pinto et. al (2017), em que estas diminuições foram obtidas nos grupos com maiores concentrações do AM em um único parâmetro de irradiação (LED 660 nm, 10 J/cm²).

Em relação à viabilidade de *L. amazonensis*, Cabral et. al (2020) também observaram uma diminuição desta em promastigotas utilizando PDT com AM

(100 μM) e LED (660 nm, 100 mW/cm^2 , 12.5, 25, 37.5 e 50 J/cm^2), sendo o grupo irradiado com a maior densidade de energia o que demonstrou a maior letalidade sobre os parasitos, corroborando com os dados do presente estudo. Aureliano et. al (2018) demonstraram uma redução na atividade mitocondrial e viabilidade celular de *L. amazonensis* utilizando AM (50, 100 e 250 μM) e LED (645 nm, 100 e 250 mW , 60 e 300 s). Assim como no presente estudo, a maior eficiência do tratamento foi obtida nos grupos irradiados por 300 s, porém diferente dos atuais resultados, o melhor resultado foi obtido nos grupos sensibilizados nas menores concentrações. Porém são diferentes fontes emissoras de luz em diferentes comprimentos de onda e parâmetros de irradiação, no presente estudo a potência e energia foram muito menores aos utilizados por Aureliano et. al (2018), este fator pode levar a estas diferentes respostas nos grupos experimentais.

Andrade et. al (2018) avaliaram os efeitos da PDT sobre promastigotas de *L. braziliensis*, demonstrando uma redução na viabilidade celular destes com o uso da PDT com zinco porfirina (5 e 10 μM) e LED (455 nm, 300 mW/cm^2 , 5 e 10 min, 90 e 180 J), e sobre as formas amastigotas demonstraram que os macrófagos J774 infectados diminuíram sua viabilidade e taxa de amastigotas por macrófagos, assim como demonstrado por Oliveira et. al (2017) que utilizaram PDT com AM (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e laser em baixa intensidade (660 nm, 40 mW , 8.4 J/cm^2) sobre amastigotas de *L. braziliensis* em J774, sendo observada uma redução na infectividade e carga parasitária dos grupos tratados com PDT. No presente estudo foi observada uma redução na viabilidade dos macrófagos infectados, além de uma alteração no fenótipo destes, sendo este um fator importante para o desencadeamento das manifestações clínicas da doença.

Estudos prévios analisando as influências da PDT sobre a polarização de macrófagos ainda não foram realizados. No presente estudo foi observado um aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias que caracterizam uma polarização para o perfil M1 (iNOS, arginase, TNF- α , CD80, IL-1 β) e uma redução para o perfil M2 (IL-4, CD206 e CD86). O aumento na expressão gênica do perfil M1 seria um importante mecanismo de ação contra o desencadeamento da doença, pois este fenótipo possui uma atividade microbicida importante, sendo uma célula chave na sinalização para que o recrutamento de outras células do sistema imune. A diminuição para o perfil M2 também é relevante para o desencadeamento da doença, uma vez que neste perfil a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbicidas estaria diminuída facilitando o processo infeccioso destas populações celulares, pois as *Leishmania spp.* possuem uma maior sobrevivência e proliferação na forma amastigota, sendo esta modulação na polarização de macrófagos importante para o processo de saúde e doença e para o tratamento do doente com objetivo de diminuir os efeitos adversos e custos medicamentosos. (Tomiotto-Pellissier et. al 2018).

Os resultados do presente estudo demonstraram efeitos positivos da PDT com AM e OLED vermelho, através da redução da atividade mitocondrial, viabilidade celular de promastigotas e amastigotas, alterações na morfologia celular e aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e redução na expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias. Diversos estudos já foram realizados previamente, porém o ineditismo foi a avaliação da polarização de macrófagos através da análise de expressão gênica. Estes estudos demonstram diferentes efeitos sobre diferentes espécies com o uso da PDT através de

diferentes fotossensibilizadores associados à diferentes fontes emissoras de luz em diferentes parâmetros, a publicação com a descrição inadequada ou incompleta dos parâmetros leva à dificuldade na elucidação e comprovação dos mecanismos de ação desta terapia que demonstra efeitos positivos sobre a leishmaniose. A necessidade de maiores investigações acerca dos mecanismos de ação destes recursos sobre o grau de infectividade e respostas imune para o estabelecimento de um protocolo seguro e eficaz como tratamento adjuvante à terapia medicamentosa com objetivo de diminuição das manifestações clínicas e aceleração do processo de reparo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que a PDT tem ação contra formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, através de mudanças na morfologia e atividade mitocondrial. Neste estudo foram demonstrados os efeitos da PDT com AM e OLED vermelho, através da redução da atividade mitocondrial, viabilidade celular de promastigotas e amastigotas, alterações na morfologia celular e aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e redução na expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Aagaard-Hansen J, Chaignat CL. 2010. Neglected tropical diseases: equity and social determinants. Blas E, Kurup AS, eds. Equity, Social Determinants and Public Health Programmes. Geneva: WHO, 135–157.
- [2]. Andrade CG, Figueiredo RCBQ, Ribeiro KRC, Souza LIO, Sarmiento-Neto JF, Rebouças JS, Santos BS, Ribeiro MS, Carvalho LB, Fontes A. 2018. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. *Photochem Photobiol Sci*. 17(4):482-490.
- [3]. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 1801.
- [4]. Aureliano DB, Lindoso JAL, Soares SRG, Ribeiro MS. Cell death of *Leishmania amazonensis* promastigotes induced by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (Print)*, v. 12, p. 337, 2015.
- [5]. Aureliano DP, Ribeiro MS, Lindoso JAL, Pogliani FC, Sellera FP, Song D, Baptista MS. Treatment and Control of Leishmaniasis Using Photodynamic Therapy. In: David M. Claborn. (Org.). *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. 1ed.: InTech, 2014, v. , p. 393-412.
- [6]. Bravo F, Sanchez MR: New and re-emerging cutaneous infectious diseases in Latin America and other geographic areas. *Dermatol Clin*. 2003; 21(4): 655–68, viii.
- [7]. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 1(4):279-93.

- [8]. Cabral FV, Sabino CP, Dimmer JA, Sauter IP, Cortez MJ, Ribeiro MS. 2020. Preclinical Investigation of Methylene Blue-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Leishmania Parasites Using Real-Time Bioluminescence. *Photochem Photobiol.* 96(3):604-610.
- [9]. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, et al.: The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica.* 2000; 16(4): 925–50.
- [10]. Dowlati Y: Cutaneous leishmaniasis: clinical aspects. *Clin Dermatol.* 1996; 14(5): 425–31.
- [11]. Fink C, Toberer F, Enk A, Gholam P. Effective treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* with topical photodynamic therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2016; 14(8): 836-8.
- [12]. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs Jr JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* 1996; 268, 142–51.
- [13]. Hong G, Gan X, Leonhardt C, Zhang Z, Seibert J, Busch JM, Bräse S. 2021. A Brief History of OLEDs-Emitter Development and Industry Milestones. *Adv Mater.* 33(9):e2005630.
- [14]. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana da secretaria de vigilância em saúde.: Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília- DF 2010.

- [15]. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 13.
- [16]. Mateus JE, Valdivieso W, Hernández IP, Martínez F, Páez E, Escobar P. Cell accumulation and antileishmanial effect of exogenous and endogenous protoporphyrin IX after photodynamic treatment. 2014; 34: 589-97.
- [17]. Montoya A, Daza A, Muñoz D, Ríos K, Taylor V, Cedeño D, Vélez ID, Echeverri F, Robledo SM. Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(9): 5804-13.
- [18]. Nadhman A, Nazir S, Khan MI, Arooj S, Bakhtiar M, Shahnaz G, Yasinzai M. PEGylated silver doped zinc oxide nanoparticles as novel photosensitizers for Photodynamic therapy against Leishmania. *Free Radic Biol Med.* 2014; 77: 230-8.
- [19]. Peloi LS, Biondo CE, Kimura E, Politi MJ, Lonardoni MV, Aristides SM, Dorea RC, Hioka N, Silveira TG. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2011; 128(4): 353-6.
- [20]. Pinto JG, Fontana LC, de Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 883-90.
- [21]. Pinto JG, Pereira AHC, Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. 2016. Chlorin E6 phototoxicity in *L. major* and *L. braziliensis*

promastigotes in vitro study. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (Print), 15: 19-24.

[22]. Pinto JG, Fagundes J, Pereira AHC, Mittman J, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017; 18: 325-30.

[23]. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, et al.: Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007; 7(9): 581–96.

[24]. Roatt BM, Cardoso JMO, Brito RCF, Coura-Vital W, Aguiar-Soares RDO, Reis AB. 2020. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Appl Microbiol Biotechnol. 104(21):8965-8977.

[25]. Sbeghen MR, Voltarelli EM, Campois TG, Kimura E, Aristides SM, Hernandez L, Caetano W, Hioka N, Lonardoni MV, Silveira TG. Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. J Lasers Med Sci. 2015; 6(3): 106-11.

[26]. Seidelin H: Leishmaniasis and Babesiasis in Yucatan. Ann Trop Med Parasit. 2016; 6(2): 295–300.

[27]. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF, Tardivo JP, Baptista MS. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. Photomed Laser Surg. 2011; 29(10): 711-5

- [28]. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Silva DFT, Ribeiro BG, Neves AA, Garcia M, Nunes FD, Silva Junior EM, França CM, Bussadori SK, Fernandes KPS. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J of Cellular and Molecular Med.* 2018; 22: 4922-43.
- [29]. Soto JM, Toledo JT, Gutierrez P, et al.: Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(2): 147–51.
- [30]. Souza DM, Alves PM, Silva ML, Paulino TP, Coraspe HO, Mendonça MM, Ribeiro BM, da Silva MV, Rodrigues Júnior V, Rodrigues DB. 5-ALA-mediated photodynamic therapy reduces the parasite load in mice infected with *Leishmania braziliensis*. *Parasite Immunol.* 2017; 39(3).
- [31]. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo M R, Ruiz-Esmenjaud J, et al.: Leishmaniasis: a review *F1000Research* 2017, 6 (F1000 Faculty Rev):750.
- [32]. Vargas-Martínez F, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, et al.: Leishmaniasis en México. Academia Mexicana de Dermatología, Colegio de Dermatólogos de Yucatán A. C., Fundación Mexicana para la Dermatología, Universidad Autónoma de Campeche y Secretaría de Salud, México. 2013.
- [33]. Vera-Izaguirre D, Vega-Memije E, Quintanilla Cedillo M, et al.: Leishmaniasis revisión. *DCMQ.* 2006; 4(4): 252–260.
- [34]. Xu W, Zhao J, Qian L, et al. 2014. Sorting of large-diameter semiconducting carbon nanotube and printed flexible driving circuit for organic light emitting diode (OLED). *Nanoscale.* 6(3):1589-95.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – Dados do processo FAPESP – 2018/12426-6

Processo

Identificação do Processo

Número do Processo	2018/12426-6 - Mestrado
Situação	Em Execução
Grupo de Financiamento	Bolsa no País
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Mestrado - Fluxo Contínuo
Beneficiário	Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo
Responsável	José Angelo Lauletta Lindoso
Data Início	01/04/2019
Duração	21 mês(es)
Período Total Usufruído	21 mês(es)
Período Total Interrompido	-
Instituição de Pesquisa/Empresa	Faculdade de Medicina/FM/USP
Departamento	Instituto de Medicina Tropical
Data de Abertura	21/06/2018
Processo Vinculado	
Nenhum processo vinculado	

Projeto - Identificação

Título em Português	
Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade celular de <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>	
Título em Inglês	
Effects of photodynamic therapy on the cell viability of <i>Leishmania braziliensis</i> and <i>Leishmania amazonensis</i>	
Classificação	
Grande Área	Ciências da Saúde
Área	Medicina
Sub-área	Outra Subárea Medicina
Especialidade	Moléstias Infecciosas e Parasitárias
Palavras-chave	azul de metileno, <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , LED, Leishmaniose, Terapia Fotodinâmica

Projeto - Instituições

Instituição de Pesquisa/Empresa Principal	
Nome	Faculdade de Medicina/FM/USP

Projeto - Pessoas Envolvidas

Participantes			
Nome	Horas Semanais Dedicadas ao Projeto	Função	Vínculo Principal
José Angelo Lauletta Lindoso	8	Orientador	Faculdade de Medicina/FM/USP
Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo	-	Bolsista	

8.2 ANEXO 2 – Comprovante de apresentação em congresso

8.3 ANEXO 3 – Comprovante de submissão em periódico

**AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY**

PUBLICATIONS EVENTS SCIENCE SKILLS CAREERS MEMBERSHIP PUBLIC POLICY

Antimicrobial Agents and Chemotherapy®
Manuscript Submission and Peer Review System

Home Help for Authors Help for Reviewers Contact Us Logout

ASM is committed to [early sharing](#) of research relevant to the SARS-CoV-2 outbreak, and to making published content [accessible and reusable](#). All published papers relevant to SARS-CoV-2 will be free to read and available for text and data mining via PubMed Central. Our global scientific community is impacted daily by the pandemic and this may lead to some delays in editorial decisions. Please contact the journal office if you have questions.

Detailed Status Information

Manuscript #	AAC01428-21
Current Revision #	0
Submission Date	2021-07-18 22:26:07
Current Stage	Initial QC
Title	Effects of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Organic Light-Emitting Diode on <i>L. amazonensis</i> and <i>L. braziliensis</i> promastigotes
Running Title	Photodynamic Therapy on <i>Leishmania</i> spp promastigotes
Manuscript Type	Full-Length Text
Special Section	N/A
Journal Section	Experimental Therapeutics
Corresponding Author	Ms. Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo (São Paulo University)
Contributing Authors	Ms. Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo (corr-auth) , Dr. Lucas Andreo , Dr. Lúcia Maria Almeida Braz , Dr. Noemi Nosomi Taniwaki , Dr. Saydulla Persheyev , Dr. Ifor David William Samuel , Dr. José Angelo Lauletta Lindoso
Abstract	Introduction: Leishmaniasis can be present under different clinical manifestations and caused by different species of <i>Leishmania</i> . Photodynamic therapy (PDT) has demonstrated promising effects on leishmaniasis treatment, but it is necessary to investigate the mechanisms of action of this therapy on different <i>Leishmania</i> species. Methods: <i>L. amazonensis</i> and <i>L. braziliensis</i> promastigotes were used to evaluate the effects of PDT with methylene blue (MB) and red organic light-emitting diode (OLED, 660 nm, 25 and 50 mW/cm², 60 and 300 s). The cell viability was analyzed with MTT and Trypan blue live/dead count and the morphology was analyzed with transmission electron microscopy (TEM). Results: <i>L. amazonensis</i> and <i>L. braziliensis</i> promastigotes demonstrated decrease in cell viability with PDT and a decrease in cell volume, bleb formation, chromatin condensation, mitochondrial dilation and cytoplasmic vacuoles. Conclusion: PDT caused parasite inactivation, with best results in the highest concentration and power density independent of the species.
Editor	Not Assigned
Suggested Reviewers to Include	Martha Ribeiro (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Juliana Ferreira-Strixino (Universidade do Vale do Paraíba), Débora Aureliano (Universidade Paulista)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	Photodynamic therapy, Organic Light-Emitting Diode, Light-Emitting Diode, <i>Leishmania</i> , Leishmaniasis, Methylene Blue
Research Areas	Parasitology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Preprint Server	No
Biorxiv Preprint	No
Funding Sources	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ✓ : Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo 2018/12426-6
Data Citation	Are the data sets and/or code used in the experiments and studies described in this submission identified and cited in the manuscript and reference list in accord with ASM's Data Citation Policy ?
Data Availability	Yes
Electronic Forms	1 of 1 forms complete - View Electronic Forms Status

Stage	Start Date
Initial QC	2021-07-18 22:26:09
Manuscript Submission Incomplete	2021-07-18 20:47:08