AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Estudo da Terapia Fotodinâmica no Tratamento de Leishmaniose Cutânea em
Modelo Murino**

Fernanda Viana Cabral

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2017**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo da Terapia Fotodinâmica no Tratamento de Leishmaniose Cutânea em
Modelo Murino**

Fernanda Viana Cabral

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

#

Versão Corrigida
#

São Paulo
2017

A Deus, pela oportunidade da vida e por transmitir a sua paz em todo tempo. Por me conceder pessoas incríveis em meu caminho durante toda a vida que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização desse trabalho.

Aos meus pais, Olavo e Sylma pelo amor, carinho, dedicação, educação, apoio e compreensão. Sou grata pelo exemplo de força, amizade e caráter que vocês me proporcionaram.

Ao meu irmão, pela amizade e parceria.

A minha avó, Cleusa por ser uma mulher de grande sabedoria e paciência que com as experiências da vida me transmitiu seu vasto conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, por me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho e permitir que eu fizesse parte de seu grupo. Aos momentos de aprendizado e conversas. Sou grata pela amizade, carinho, atenção, paciência, apoio, bom humor e sua luz! Você é maravilhosa!!

Ao Prof. Dr. Mauro Javier Cortez, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, disponibilizar o seu tempo e conhecimento para me auxiliar. Obrigada pelos momentos de descontração e carinho. Agradeço por me ceder as primeiras cepas dos parasitos com as quais trabalhei.

À Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana, pela generosidade em me conceder as cepas das leishmanias transfectadas. Agradeço pelo exemplo de educadora e pela atenção em sua disciplina na qual eu aprendi muito sobre o universo das leishmanias. Agradeço pela presença em minha banca na disciplina de Tópicos e por toda a colaboração durante esse trabalho.

À Profa. Dra. Amedea Barozzi Seabra, pela colaboração com o trabalho, idéias e por fornecer as nanopartículas doadoras de óxido nítrico.

À Cristiana Trinconi por me auxiliar com as leishmanias transfectadas e treinamento do equipamento IVIS no CEFAP. Obrigada pela paciência, atenção e por disponibilizar seu tempo para me ajudar.

À Jenicer Kazumi Umada Yokoyama Yasunaka, técnica do laboratório de leishmaniose da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana, pelo auxílio com o meio de cultura.

Aos meus amigos do laboratório, Camila, Tania, Ale, Claudinei, Carol, Caetano, Lucas, Diego e Maitê. Vocês foram essenciais nesse processo e na colaboração desse trabalho. Companheiros dos momentos de exaustão e descontração.

Ao Ismael Sauter, um grande amigo que ganhei nessa jornada. Um exemplo de amizade e parceria. Sou grata a você por me ensinar desde o início a trabalhar no laboratório. Grande parte do que aprendi se deve à sua dedicação e paciência. Obrigada pelos ensinamentos, risadas, palhaçadas e desabafos. Você tem a minha amizade eterna.

A Jéssica Dimmer, amiga que ganhei nesse período. Você veio para aprender e acabou me ensinando muito mais. Te agradeço pela companhia, conversas, pela troca de experiências e por toda a ajuda com meus animais nos meus experimentos.

Ao Adriano Morales e Priscila Souza por todos os anos de amizade. Obrigada pela compreensão. Vocês são como irmãos.

Ao CEFAP, pela estrutura e disponibilidade para o desenvolvimento das imagens de bioluminescência dessa pesquisa.

Ao biotério do IPEN, pela estrutura oferecida e suporte com os animais durante esse período.

Agradeço aos colegas do Centro de Lasers e Aplicações pela ajuda e colaboração.

Aos funcionários do Centro de Lasers e Aplicações pela atenção.

Agradeço ao IPEN pela infraestrutura que possibilitou a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e à FAPESP pelo auxílio financeiro para execução desse trabalho.

A todos os meus queridos amigos, muito obrigada!

ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM MODELO MURINO

FERNANDA VIANA CABRAL

RESUMO

Leishmaniose é uma zoonose desenvolvida por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença se manifesta sob a forma visceral e cutânea cujo tratamento apresenta diversas limitações como alto custo, elevada toxicidade dos fármacos e altos índices de recidiva. A leishmaniose cutânea abrange lesões destrutivas e ulceradas que podem evoluir para condições mais graves culminando em óbito dos hospedeiros acometidos. Tratamentos alternativos tem sido implementados com a finalidade de proporcionar acessibilidade financeira e menores efeitos colaterais aos pacientes. A terapia fotodinâmica se insere nesse contexto devido à praticidade, custo reduzido, mínima toxicidade e sem relatos de resistência descritos na literatura. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica em leishmaniose cutânea induzida em camundongos BALB/c infectados com leishmaniose cutânea. A otimização da PDT também foi avaliada pela administração de doadores de óxido nítrico (S-nitroso-MSA) encapsulados em nanopartículas de quitosana (CSNPs), já que esse composto é altamente reativo e potencialmente tóxico para o parasito. Camundongos BALB/c foram infectados no membro posterior esquerdo com 1.10^6 promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* que expressam o gene da luciferase e acompanhados por 4 semanas até o surgimento da lesão. Após esse período, os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=4): Controle (não tratado), PDT1 (submetidos à uma sessão de PDT), PDT2 (duas sessões), PDT1NPNO e PDT2NPNO (uma sessão e duas sessões de PDT em associação com S-nitroso-MSA-CPNPS, respectivamente), e NPNO (somente S-nitroso-MSA-CP NPS). A segunda sessão foi realizada 24 h após a primeira. A PDT foi efetuada usando um diodo emissor de luz (LED, $\lambda=660 \pm 22$ nm) e azul de metileno (100 μ M), com densidade de energia de 150 J/cm². O progresso da doença foi avaliado por meio do tamanho da lesão e escala de dor utilizando um paquímetro e filamentos von Frey, respectivamente. A carga parasitária foi quantificada por intermédio do bioimageamento nas primeiras 96 h após o tratamento e nas 4 semanas seguintes. Os resultados obtidos demonstraram redução na carga parasitária durante o período experimental, com exceção do grupo PDT1NPNO. Houve redução parasitária significativa em 72 h e 96 h para os grupos PDT2, PDT2NPNO e NPNO. A maior redução da lesão foi observada para o grupo PDT2 bem como menor sensibilidade ao estímulo doloroso. Nossos resultados indicam efeitos benéficos da PDT em duas sessões, sugerindo que pode ter ocorrido modulação do processo inflamatório. Entretanto, o uso das nanopartículas nas condições utilizadas nesse experimento não foi capaz de otimizar a eficiência da PDT nos animais infectados com *Leishmania (L) amazonensis*.

EVALUATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN A MURINE MODEL

FERNANDA VIANA CABRAL

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease developed by protozoa of genus *leishmania*. There are two dominant forms including visceral and cutaneous manifestations in which treatments are limited because of price, toxicity and resistance. Cutaneous leishmaniasis (CL) promotes destructive and ulcerated lesions that might intensify to a more severe symptom that could lead to patient death. Alternative treatments have been studied to promote reduction of side effects, cost and higher efficacy for the hosts. Photodynamic therapy has been introduced once the technic is practical, less expensive and with no resistance described in literature. Additionally, several studies indicate that the administration of exogenous NO donors represents an interesting strategy against cutaneous leishmaniasis. The aim of this work was to evaluate the effects of photodynamic therapy on cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. Besides, the optimization of PDT was evaluated through its association with encapsulated NO donors (S-nitroso-MSA) in chitosan nanoparticles (CSNPs) on CL in BALB/c mice using real time bioluminescence. In addition, we monitored lesion size progression and hyperalgesia. Promastigotes of *L. (L) amazonensis* transgenic line expressing luciferase were used. BALB/c mice were infected in the left footpad with 1.10^6 promastigotes. After 4 weeks, mice were randomly assigned to 6 experimental groups ($n=4$): Control (non-treated), PDT1 (submitted to one PDT session) PDT2 (submitted to two PDT sessions), (PDT1NPNO and PDT2NPNO (submitted to one and two PDT sessions following S-nitroso-MSA-CSNPs, respectively) and NPNO (treated only with S-nitroso-MSA-CSNPs). The second PDT session was performed 24 h after the first. PDT was performed using a red LED ($\lambda= 660\pm 22$ nm), MB (100 μ M) and fluence of 150 J/cm². Disease progression was evaluated once a week for 4 weeks by measuring lesion size with a caliper and hyperalgesia with von Frey filaments. Parasite burden was analyzed through luciferase detection by bioimaging, every day, in the first 96 h and then for the next 4 weeks. Test groups presented significant reduction in parasite load compared to control during all experimental period except for PDT2NPNO. Our results indicate that two PDT sessions were more efficient suggesting a modulation of the inflammatory process. However, under these conditions, our results demonstrate that CSNPs were not able to enhance MB-mediated PDT efficiency on parasite burden on *L. (L) amazonensis*-induced CL in mice.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 METAS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 DEFINIÇÃO	21
3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	21
3.3 LEISHMANIOSE NO BRASIL.....	23
3.4 AGENTE ETIOLÓGICO	24
3.5 VETORES.....	27
3.6 CICLO BIOLÓGICO.....	27
3.7 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS	30
3.8 DIAGNÓSTICO	32
3.9 POSSIBILIDADE TERAPÊUTICAS.....	33
3.9.1 <i>Fármacos Administrados</i>	33
3.9.2 <i>Terapia Fotodinâmica</i>	35
3.10 TERAPIA FOTODINÂMICA E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	38
3.11 A IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NA LEISHMANIOSE.....	39
3.11.1 <i>Nanopartículas doadoras de óxido nítrico</i>	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 INOCULAÇÃO DO PARASITA.....	50
4.2 TAMANHO DA LESÃO	50
4.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	50
4.4 FILAMENTOS VON FREY PARA AVALIAÇÃO DA DOR	51
4.5 ETAPA I.....	53
4.5.1 <i>Cultivo de Leishmania</i>	53
4.5.2 <i>Piloto: Culturas de L.(L.)amazonensis (IFLA/BR/67/PH8)</i>	53
4.5.3 <i>Quantificação de Carga Parasitária por Diluição Limitante</i>	54
4.6 ETAPA II - ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA UTILIZANDO O BIOIMAGEAMENTO COM 150 J/cm ²	54
4.6.1 <i>Cultivo de Leishmania Culturas de L.(L.)amazonensis (La-Luc2)</i>	55
4.6.2 <i>Quantificação de Carga Parasitária por Bioimageamento</i>	55
4.6.3 <i>Etapa III - Administração de uma e duas sessões de PDT (150 J/cm²)</i>	55
4.7 ETAPA IV - NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DOADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO (S-NITROSO-MSA-CS NPs)	56
4.7.1 <i>Ensaio in vitro</i>	56
4.7.2 <i>Ensaio in vivo</i>	58
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5 RESULTADOS	60
5.1 ETAPA I.....	60
5.1.1 <i>Carga Parasitária</i>	60
5.1.2 <i>Tamanho da Lesão</i>	61
5.1.3 <i>Escala de dor</i>	63
5.2 ETAPA II	63
5.2.1 <i>Quantificação de Carga Parasitária por Bioimageamento</i>	63
5.3 ETAPA III.....	65
5.3.1 <i>Carga parasitária</i>	65

5.3.2	<i>Escala de dor</i>	69
5.3.3	<i>Tamanho da Lesão</i>	69
5.4	ETAPA IV.....	71
5.4.1	<i>Ensaio in vitro com S-nitroso-MSA-CS NPs</i>	71
5.4.2	<i>Ensaio in vivo com S-nitroso-MSA-CS NPs</i>	73
5.5	ANÁLISE DE TODOS OS GRUPOS.....	77
5.5.1	<i>Carga Parasitária</i>	77
5.5.2	<i>Tamanho da Lesão</i>	78
5.5.3	<i>Escala de Dor</i>	79
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	ANEXO I –CEUA-IPEN/SP	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Escala de dor e suas representações utilizando o método von Frey _____	52
TABELA 2 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na PDT no grupo 1. _____	53
TABELA 3 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na PDT no grupo 2. _____	53
TABELA 4 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na etapa III.. _____	56
TABELA 5 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na etapa IV.. _____	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Mapa de casos reportados de leishmaniose cutânea durante o ano de 2013	22
FIGURA 2 Endemicidade da leishmaniose cutânea durante o ano de 2015	23
FIGURA 3 Classificação das espécies de <i>Leishmania</i>	26
FIGURA 4 Diagrama do trato alimentar de flebotomíneos contendo o bolo alimentar infectado	28
FIGURA 5 Ciclo Biológico do parasito do gênero <i>Leishmania</i> demonstrando as duas fases do ciclo	29
FIGURA 6 Lesões típicas de leishmaniose cutânea localizada. A: LCL promovida pela espécie <i>L. (L.) amazonensis</i> . B: LCL desenvolvida pela espécie <i>L. (V.) braziliensis</i>	30
FIGURA 7 Lesões típicas de leishmaniose cutânea difusa (LCD)	31
FIGURA 8 Lesões típicas de leishmaniose cutânea disseminada	31
FIGURA 9 Lesões típicas de leishmaniose mucocutânea (LM)	32
FIGURA 10 Diagrama de Jablonski indicando as reações fotoquímicas da fotoinativação microbiana	36
FIGURA 11 Representação esquemática da arginase-1 e óxido nítrico sintase II e suas vias metabólicas	44
FIGURA 12 Equilíbrio entre NOS II e arginase na multiplicação e morte em tripanossomatídeos	45
FIGURA 13 Representação esquemática da nitrosação de MSA para obtenção de S-nitroso-MSA	46
FIGURA 14 Curva cinética da liberação de NO das nanopartículas de quitosana com S-nitroso-MSA a 28 e 37°C durante 24 h	47
FIGURA 15 Curva cinética de NO. (i) Cinética da liberação de NO de S-nitroso-MSA livre. (ii) S-nitroso-MSA-CSNPs (concentração inicial de S-nitroso-MSA de 1000 µM em ambas as curvas) (iii) MSA-CSNPs, como controle negativo. Temperatura ambiente por 12 h.	48

FIGURA 16 Terapia Fotodinâmica em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis PH8</i> .	51
FIGURA 17 Método von Frey	52
FIGURA 18 MSA-CS NPs	57
FIGURA 19 S-nitroso-MSA-CS NPs após a nitroação.	57
FIGURA 20 Avaliação da carga parasitária pelo método de diluição limitante de camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.)amazonensis PH8</i> , imediatamente após a PDT no grupo 1	60
FIGURA 21 Avaliação da carga parasitária pelo método de diluição limitante de camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis PH8</i> , 3 semanas após a PDT no grupo 2	61
FIGURA 22 Avaliação do progresso da lesão 3 semanas após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis PH8</i>	62
FIGURA 23 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis PH8</i>	62
FIGURA 24 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis PH8</i>	63
FIGURA 25 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> em 96h com PDT na dose de $150\text{J}/\text{cm}^2$	64
FIGURA 26 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT	64
FIGURA 27 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> durante as primeiras 96h	65
FIGURA 28 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT.	66
FIGURA 29 Bioluminescência em camundongos BALB/c 48h após o tratamento com PDT.	66
FIGURA 30 Bioluminescência em camundongos BALB/c 72h após o tratamento com PDT.	67
FIGURA 31 Bioluminescência em camundongos BALB/c 96h após o tratamento com PDT.	67
FIGURA 32 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> após 30 dias	68

FIGURA 33 Bioluminescência em camundongos BALB/c 30 dias após o tratamento com PDT.	68
FIGURA 34 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT	69
FIGURA 35 Avaliação do progresso da lesão 30 dias após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.)amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT..	70
FIGURA 36 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c com isolados de <i>L. (L.) amazonensis Luc2</i> 30 dias após o tratamento com PDT	70
FIGURA 37 Atividade antiparasitária das S-nitroso-MSA-CSNPs em diferentes concentrações	71
FIGURA 38 Atividade antiparasitária das MSA-CS NPs em diferentes concentração	72
FIGURA 39 Curva de dose resposta das S-nitroso-MSA-CS em e <i>L.(L.) amazonensis</i>	72
FIGURA 40 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs durante as primeiras 96h.	73
FIGURA 41 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.	73
FIGURA 42 Bioluminescência em camundongos BALB/c 48h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.	74
FIGURA 43 Bioluminescência em camundongos BALB/c 72h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.	75
FIGURA 44 Bioluminescência em camundongos BALB/c 96h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.	75
FIGURA 45 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.)amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs durante 30 dias	76
FIGURA 46 Bioluminescência em camundongos BALB/c 30 dias após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs	76
FIGURA 47 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs isoladamente e associadas durante as primeiras 96 h	77
FIGURA 48 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis Luc2</i> e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs isoladamente e associadas durante 30 dias.	78
FIGURA 49 Avaliação do progresso da lesão 30 dias após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.)amazonensis Luc2</i> em todos os grupos tratados	79

FIGURA 50 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis Luc2* em todos os grupos tratados _____ 80

FIGURA 51 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis Luc2* 30 dias após o tratamento com PDT, S-nitroso-MSA-CS NPs e associação de ambas _____ 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto

ALA – Ácido aminolevulínico

AM – Azul de Metileno

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

cm – Centímetro

cm^2 - Centímetro quadrado

cNOS – Oxido Nitrico Sintase Constitutiva

CS NPs – Chitosan Nanoparticles (nanopartículas de quitosana)

Cu - Cobre

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - do inglês, Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

Fe - Ferro

Fs - Fotossensibilizador

GMPC - monofosfato cíclico de guanosina

GPI - glicosilfosfatidilinositol

GR-Glutationa Redutase

GSH - Glutationa

GSSH – Glutationa Oxidada

GTP - guanosina trifosfato

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio

IFN - γ - Interferon gama

IL 1 β - Interleucina 1 –beta

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

J – Joule

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada
LD - Leishmaniose Cutânea Disseminada
LED - Light Emmiting Diode (Diodo Emissor de Luz)
LM - Leishmaniose Mucocutânea
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
mM - Milimolar
mm – Milímetro
Mn – Manganês
mW – Miliwatts
NADH - Nicotinamida adenina Dinucleotídeo
NaNO₂- Nitrito de sódio
NAPDH – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
nm – Nanometros
NO – Óxido Nítrico
O₂ – Oxigênio Molecular
OH⁻ - Radical Hidroxila
ONOO - Peroxinitrito
PBS – *Phosphate Buffer Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)
PCR – do inglês, Polymerase Chain Reaction
PDT - Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
PIT – Pre Irradiation Time (Tempo de pré-irradiação)
RNA – Ácido ribonucléico
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS – Reactive OxygenSpecies (Espécies Reativas de Oxigênio)
RSNOs- S-nitrosotiol
s- Segundos
S-nitroso-MSA - acido S-nitroso-mercaptosuccinico
SNP- nitroprussiato de sódio
SOD – Superóxido Dismutase
T - Tripanotiona
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TR – Tripanotiona Redutase
W - Watts
Zn - Zinco

λ – Comprimento de Onda

μM – Micromolar

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses consistem em doenças negligenciadas presentes em 98 países ao redor do mundo, atingindo aproximadamente 12 milhões de seres humanos.^{1; 2} Essa enfermidade se caracteriza por duas manifestações clínicas distintas: leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea são relatados anualmente no mundo.^{1; 3} A grande maioria dos casos reportados ocorrem no Brasil, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Índia, Irã, Nepal, Peru, Sudão e Síria.⁴ Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, provavelmente esses números estão subestimados devido à debilidade no diagnóstico correto e divergências nos guias de vigilância epidemiológica.^{1; 4}

A forma visceral desenvolve alterações sistêmicas nos hospedeiros acometidos, uma vez que o parasito possui tropismo por órgãos como fígado, baço e medula óssea. Os portadores dessa afecção apresentam um quadro avançado e em poucos meses manifestam hepatoesplenomegalia e aplasia medular, que geralmente levam ao óbito. A leishmaniose cutânea (LC) abrange quatro quadros distintos (cutânea, difusa, disseminada e mucocutânea) e são dependentes da espécie do protozoário e resposta imunológica do hospedeiro. É uma doença importante, não só pelas deformidades físicas que pode acarretar, como também pelas dificuldades terapêuticas existentes. Trata-se de um problema de saúde pública que abrange lesões destrutivas, ulceradas, desfigurantes e com grande repercussão no campo psicossocial quando acomete seres humanos.³

Os fármacos disponíveis atualmente demonstram diversas limitações como alto custo, tempo prolongado de tratamento, baixa aderência do paciente ao tratamento, dependência de múltiplas injeções (geralmente intravenosas), alto grau de toxicidade e aparecimento de resistências.⁵ A resposta terapêutica também pode variar de acordo com fatores como a espécie do parasito, resposta imunológica do paciente e manifestação clínica da doença.^{6; 7}

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas e técnicas inovadoras a fim de garantir a segurança e efetividade no tratamento desta enfermidade.⁸ Não é por acaso que a infecção por parasitos do gênero *Leishmania* encontra-se na lista das doenças negligenciadas. Existem poucos recursos acessíveis para a pesquisa clínica e expansão de tratamentos alternativos. Contudo, a elevada incidência de falha terapêutica e aumento do número de casos reportados desperta uma necessidade urgente de aprofundar as investigações para novos fármacos e terapias que possibilitem melhor eficácia e reduzidos índices de efeitos colaterais.

Dessa forma, considerando a importância do tema, propusemos estudar os efeitos da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *Photodynamic Therapy*) no tratamento de leishmaniose cutânea em modelo murino. A PDT proporciona diversas vantagens em relação ao uso de fármacos, uma vez que, quando o fotossensibilizador interage com a luz nos parâmetros adequados, a dose citotóxica utilizada para a inativação microbiana é normalmente mais baixa daquela necessária para promover efeitos nocivos às células epiteliais (fibroblastos e queratinócitos, por exemplo) do hospedeiro.^{9; 10}

Outro aspecto importante relaciona-se com o aparecimento de resistência do parasito aos fármacos atuais, sendo significativamente relevante o aprofundamento de estudos nessa área, pois até o momento não existem relatos de resistência de micro-organismos à terapia.¹⁰

Assim, em virtude da alta prevalência de infecções por *Leishmania*, não somente no Brasil como em diversos outros países, o aprofundamento dos estudos torna-se fundamental, objetivando proporcionar um tratamento alternativo utilizando a PDT, o qual é minimamente invasivo, para que seja possível desenvolver os adequados parâmetros de irradiação possibilitando processos menos dolorosos e mais eficazes aos pacientes acometidos pela enfermidade.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica no tratamento de leishmaniose cutânea em modelo murino.

2.2 Metas

- a) Implementar um modelo *in vivo* para a leishmaniose tegumentar americana em camundongos.
- b) Avaliar e padronizar os parâmetros da terapia fotodinâmica *in vivo* para que apresente efetividade antimicrobiana em modelo animal.
- c) Avaliar a associação da terapia fotodinâmica e administração subcutânea de nanopartículas de quitosana como doadoras de óxido nítrico (NO) para a otimização da terapia fotodinâmica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definição

As leishmanioses são afecções infecto-parasitárias, não contagiosas, de evolução crônica, causadas por diferentes espécies de protozoários que pertencem ao Reino Protista, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*.¹¹ Entre os protozoários parasitas do ser humano, o gênero *Leishmania* compreende o maior número de espécies patogênicas.^{12; 13}

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* se determinam pelo desenvolvimento anatômico distinto no trato digestório dos insetos vetores. O subgênero *Viannia* se restringe ao Novo Mundo (Américas), enquanto *Leishmania* (*Leishmania*) propaga-se tanto no Novo Mundo quanto no Velho Mundo (Europa, Ásia África).¹⁴

Apresentam duas formas principais denominadas promastigota (flagelada) e amastigota (flagelo interiorizado) com um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, os quais são responsáveis pela transmissão da doença de um mamífero a outro.^{11; 14; 15}

A doença se manifesta sob duas formas: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Esta última encontra-se sob diferentes apresentações (cutânea, mucosa, cutânea difusa e cutânea disseminada).^{2; 16} Na forma visceral, o parasito possui tropismo por órgãos como baço, fígado e medula óssea, desenvolvendo sintomatologia sistêmica bastante grave, podendo ser fatal. As manifestações clínicas ocorrem de acordo com a espécie do protozoário envolvida, tipo de hospedeiro e sua resposta imunológica.^{1; 11}

3.2 Aspectos Epidemiológicos

Trata-se de uma enfermidade caracterizada como antroponose de ampla distribuição geográfica sendo considerada portanto, um problema de saúde pública em diversos países distribuídos em quatro continentes (Américas, África, Ásia e Europa).

Em 2014, mais de 90% dos casos reportados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul.¹

As características epidemiológicas da leishmaniose cutânea na região das Américas são bastante complexas pois envolvem variabilidade intra e interespecíficas, com ampla

diversidade no ciclo de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores, manifestações clínicas, propagação e circulação de múltiplas espécies do protozoário na mesma localização geográfica. Além disso, a endemicidade da afecção está associada também com a distribuição das espécies dos vetores nas regiões exploradas.¹

De acordo com a OMS, a leishmaniose tegumentar americana enquadra-se entre as seis doenças infecciosas mais importantes da atualidade, não somente pela sua elevada incidência, como também pelas alterações dermatológicas desenvolvidas, que acarretam processos inflamatórios graves, desencadeando lesões ulcerativas profundas, comprometendo a cicatrização e favorecendo o crescimento de bactérias oportunistas, ocasionando infecções secundárias de estágio avançado.^{1; 7} (Figuras 1 e 2)

FIGURA 1 Mapa de casos reportados de leishmaniose cutânea durante o ano de 2013. Figura adaptada de OMS, 2013.¹

FIGURA 2 Endemicidade da leishmaniose cutânea durante o ano de 2015. Figura adaptada de OMS, 2015.¹

3.3 Leishmaniose no Brasil

No Brasil, o índice de ocorrência da doença tem aumentado em quase todos os estados nos últimos 20 anos, incluindo surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Nos últimos anos o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 mil novos casos no país.^{3; 7} Aproximadamente 90% das manifestações clínicas de uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar, a muco-cutânea, são predominantes no Brasil, Bolívia e Peru.¹

Entre os países da América do Sul, o Brasil é o país com maior número de relatos de casos de leishmaniose cutânea. Aproximadamente 90% da forma tegumentar prevalece na regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país.¹

Muitos animais domésticos, especialmente cães, estão envolvidos nas manifestações da forma visceral da doença, entretanto esses animais atuam como hospedeiros reservatórios e implicam também na epidemiologia da doença. Antigamente, as leishmanioses eram consideradas afecções cujos reservatórios eram exclusivamente animais silvestres havendo maior número de relatos em regiões rurais. Contudo, devido aos processos de urbanização e desmatamento, houve migração dos vetores para as áreas urbanas, promovendo a infecção de animais domésticos e disseminação da doença para essas regiões.¹⁷

As manifestações clínicas dependem das espécies envolvidas. No Brasil, as espécies responsáveis pela LV e LC estão presentes. A LV é ocasionada principalmente pela espécie *L. infantum chagasi*, enquanto que a forma cutânea é desenvolvida predominantemente por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.^{18; 19} Ambas as espécies são causadoras da forma cutânea localizada, entretanto também podem promover formas mais graves da doença. A *L. (V.) braziliensis* está relacionada com a leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) e disseminada (LD) enquanto que a espécie *L. (L.) amazonensis* associa-se com a forma difusa (LCD) da enfermidade.²⁰

3.4 Agente Etiológico

Atualmente, existem ao menos vinte e uma espécies de *Leishmania* que acometem seres humanos e oito espécies descritas em animais, na forma cutânea, distribuídas nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina com maior prevalência principalmente nos países da América do Sul e Central.^{3; 21}

Os parasitos do gênero *Leishmania* são distribuídos e classificados em complexos dentro de cada subgênero. O subgênero *Leishmania* apresenta: **(1) Complexo *L. donovani***, que inclui *L. (L.) donovani*, *L. (L.) archibaldi* e *L. (L.) infantum* (syn. *L. (L.) chagasi*); **(2) Complexo *L. tropica***, que abrange *L. (L.) tropica*, *L. (L.) killicki* e *L. (L.) aethiopica*; **(3) Complexo *L. (L.) major***, que engloba *L. (L.) major*, *L. (L.) gerbilli*, *L. (L.) arábica* e *L. (L.) turanica*; e **(4) Complexo *L. (L.) mexicana***, incluindo *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) aristidesi*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) forattinii*. O subgênero *Viannia* compõe dois complexos: **(1) Complexo *L. braziliensis***, com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana* e **(2) Complexo *L. guyanensis***, o qual incorpora *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) shawi*. Além disso, podem ser descritas as espécies *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) utingensis* não pertencentes a estes complexos. As espécies *L. colombiensis*, *L. equatorensis*, *L. hertigi*, *L. herreri* e *L. deanei*, não se classificam em nenhum complexo.^{11; 21} (Figura 3)

No Brasil, foram descritas sete espécies do parasita responsável pela forma cutânea da doença, sendo seis do subgênero *Viannia* e um do subgênero *Leishmania*. Entre as três principais espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, encontram-se *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Recentemente as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste.^{7; 22}

A *L. (L.) amazonensis* é responsável por causar a doença com lesões localizadas, porém, em alguns casos pode evoluir para a forma cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais. A *L. (V.) braziliensis* é a espécie predominante no homem. No Brasil apresenta distribuição em todo o território nacional, além de diversos países da América Latina.²³ É responsável pela leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa, cuja maior complicação ocorre através da disseminação por via hematógena, atingindo regiões de nasofaringe com destruição desses tecidos.¹⁹ Conhecida popularmente como úlcera de Bauru, espúndia ou ferida brava, frequentemente está associada à presença de animais domésticos, os quais se apresentam também como hospedeiros do parasita.^{7; 12}

Concentração Geográfica	Subgênero	Complexo	Espécie
Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania donovani</i>	<i>L. donovani</i>
			<i>L. archibaldi</i>
			<i>L. infantum</i>
			<i>L. chagasi</i>
		<i>Leishmania tropica</i>	<i>L. tropica</i>
			<i>L. killicki</i>
			<i>L. aethiopica</i>
		<i>Leishmania major</i>	<i>L. major</i>
			<i>L. gerbilli</i>
			<i>L. arabica</i>
			<i>L. turanica</i>
		<i>Leishmania mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>
			<i>L. amazonensis</i>
			<i>L. venezuelensis</i>
			<i>L. pifanoi</i>
			<i>L. ganhami</i>
			<i>L. aristidesi</i>
			<i>L. forattinii</i>
Novo Mundo	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. peruviana</i>
		<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
			<i>L. panamensis</i>
			<i>L. shawi</i>
		<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>
			<i>L. naiffi</i>
			<i>L. lindenbergi</i>
			<i>L. utingensis</i>

FIGURA 3 Classificação das espécies de *Leishmania*. Figura adaptada de Borghi, S. M.et al. 2016.²⁴

3.5 Vetores

Os vetores são insetos hematófagos, flebotomíneos, da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (novo mundo) e *Phlebotomus* (velho mundo).²⁵ No Brasil, são popularmente conhecidos como mosquito-palha, cangalhinha ou birigui. Existem aproximadamente 350 espécies desses vetores descritas entre o sul dos Estados Unidos e norte da Argentina, sendo que, o gênero *Lutzomyia* é o principal responsável pela transmissão da leishmaniose nas Américas.

A probabilidade de um flebotomíneo intervir como vetor relaciona-se com a eficiência do parasito sobreviver, se multiplicar e diferenciar nos tubos digestórios do inseto.^{26; 27} Apenas as fêmeas transmitem a doença por serem hematófagas e apresentarem as adaptações necessárias no aparelho bucal para a inoculação do parasito.²⁶

Particularmente no Novo Mundo, o *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor responsável pela transmissão da doença. Relatos da literatura mencionam, entre diversos fatores, um peptídeo na saliva do flebotomíneo que atua como potente agente vasodilatador conhecido por maxadilán. Essa substância causa lesões eritematosas durante o repasto sanguíneo e pode inclusive contribuir na modulação da resposta imune e inflamatória durante a inoculação do parasito, favorecendo a instalação da infecção.²⁸

3.6 Ciclo Biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida cujo comportamento caracteriza-se pelo dimorfismo. São heteroxenos possuindo uma fase extracelular, com formas promastigotas que se desenvolvem e multiplicam no trato digestório dos insetos vetores. A fase intracelular compreende as formas amastigotas do protozoário, cuja reprodução assexuada ocorre em células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente no interior dos vacúolos parasitóforos de macrófagos.^{13; 29}

O desenvolvimento do parasito nos vetores apresenta 3 estágios: (1) O primeiro estágio consiste na ingestão das formas amastigotas adquiridas do hospedeiro infectado, durante o repasto sanguíneo. O conteúdo é direcionado ao intestino médio do vetor onde a porção aquosa é removida e o sangue é retido na matriz peritrófica, uma membrana quitinosa semipermeável que permite a ação enzimática e transferência de nutrientes. O desenvolvimento de amastigotas para promastigotas procíclicas ocorre em aproximadamente 18-24 h. (2) A segunda fase compreende as primeiras 72 h em que há

ruptura da membrana peritrófica com evasão dos parasitos para o intestino médio de forma que eles não sejam excretados. Uma numerosa quantidade de promastigotas denominadas nectomônadas são aglomeradas na porção anterior do intestino médio e seus flagelos ficam aderidos as microvilosidades intestinais. (3) A partir do sétimo dia, os parasitas começam a entrar no terceiro estágio dentro do vetor. Ocorre migração dos parasitos para a válvula estomodeal acompanhada da transformação das nectomônadas para a forma infectiva, caracterizada pelas promastigotas metacíclicas com forma alongada e um flagelo livre. Gradativamente há o deslocamento desses protozoários para esôfago, faringe e principalmente probóscide, onde se acumulam e serão posteriormente inoculados na derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo.^{13; 25; 30} (Figura 4)

FIGURA 4 Diagrama do trato alimentar de flebotomíneos contendo o bolo alimentar infectado. A figura retrata o desenvolvimento de promastigotas e as regiões do intestino onde as diferentes formas são encontradas. Figura adaptada de Sacks, D. 2001.²⁵

Nos tecidos dos hospedeiros vertebrados encontra-se a forma amastigota, cujas estruturas ovaladas, imóveis, com flagelos interiorizados, são fagocitadas por células do sistema imune inato. O parasito destina-se para o sistema linfomonocitário no interior de

monócitos, neutrófilos, histiócitos e especialmente macrófagos.^{8,9} O interior dos macrófagos abrange a associação de fagossomas com lisossomos desencadeando a formação do vacúolo digestivo, denominado fagolisossomo. No interior dessa organela as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas onde se multiplicam^{14;}
22.

A multiplicação ocorre obrigatoriamente no interior das células desse sistema (fase intracelular), por divisão binária simples até que ocorra o rompimento de macrófagos e disseminação do parasita no meio intercelular, com a subsequente infecção de novas células. A disseminação pode ocorrer pela via hematogena e linfática, promovendo uma resposta inflamatória com liberação de citocinas e atraindo outros macrófagos para o local de infecção, os quais fagocitam os parasitas liberados, gerando portanto, um ciclo vicioso.^{12; 13} (Figura 5)

FIGURA 5 Ciclo Biológico do parasito do gênero *Leishmania* demonstrando as duas fases do ciclo. Figura adaptada de Kaye, P. et al. 2011.²⁹

3.7 Apresentações Clínicas

As manifestações clínicas da LC podem variar de acordo com a espécie do protozoário e resposta imunológica do hospedeiro. São classificadas em virtude dos aspectos clínicos e evolutivos da enfermidade:

(1) Leishmaniose Cutânea Localizada: Caracterizam-se por lesões únicas ou múltiplas próximas ao sítio de infecção. Iniciam-se como uma pápula eritematosa com alguns milímetros de diâmetro que evoluem para úlceras profundas e bordas proeminentes, geralmente granulomatosas, com presença de infiltrado inflamatório e pontos de necrose. Conhecida como “úlcer de Bauru” foi descrita em 1901 por Lindenberg como ulceração de borda saliente em moldura e lesão satélite.^{11; 31} As espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* são principais responsáveis pelo desenvolvimento da forma localizada nas Américas.³¹ (Figura 8)

FIGURA 6 Lesões típicas de leishmaniose cutânea localizada. A: LCL promovida pela espécie *L. (L.) amazonensis*. B: LCL desenvolvida pela espécie *L. (V.) braziliensis*. Figura adaptada de Silveira, F.T. et al. 2004³¹

(2) Leishmaniose Cutânea Difusa: Relatada por Convit e Lapenta em 1948, essa forma clínica também é conhecida como LCD anérgica que consiste em lesões nodulares distribuídas pelo corpo e sem ulcerações, porém, com abundante existência da formas amastigotas na lesão.³² A disseminação ocorre pela via hematógica que progride para uma elevada quantidade de nódulos, inclusive na face, afetando seres humanos da convivência social.²⁰ A LCD é uma manifestação clínica bastante grave e pouco responsiva aos

tratamentos convencionais. Nas Américas, as principais espécies causadoras dessa forma estão dentro do complexo *mexicana*, incluindo *L.(L.) mexicana*, *L.(L.) amazonensis* e *L.(L.) venezuelensis*. (Figura 7)

FIGURA 7 Lesões típicas de leishmaniose cutânea difusa (LCD). Figura adaptada de Hashiguchi, Y. et al. 2004²⁰

(3) Leishmaniose Cutânea Disseminada: Consiste em múltiplas lesões dispersas pelo corpo que podem chegar a centenas associadas à infecção por *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(V.) panamensis*. Além dos locais convencionais, as lesões podem se encontrar na região periungueal, genitália e couro cabeludo. São semelhantes à apresentação clínica de LCL com ulcerações, necrose, crostas, exsudatos e placas.^{20; 31} (Figura 8)

FIGURA 8 Lesões típicas de leishmaniose cutânea disseminada. Figura adaptada de Hashiguchi, Y. et al. 2016.²⁰

(4) Leishmaniose Mucosa/Mucocutânea: Dentre todas as manifestações clínicas possíveis na LC esta é considerada a mais grave, cuja principal espécie responsável pelo curso da doença é a *L.(V.) braziliensis*. Inicialmente, a enfermidade ocorre com uma lesão cutânea e mesmo após a cura clínica, pode ocorrer o desenvolvimento da forma mucosa nos anos ou décadas subsequentes.³¹ A evolução é crônica e se difunde para áreas mucóides, como nasoesofágica, nasofaríngea, septo nasal e palato com possível destruição dessas regiões. A LM é pouco responsiva aos tratamentos atualmente disponíveis.³³ (Figura 9)

FIGURA 9 Lesões típicas de leishmaniose mucocutânea (LM). Figura adaptada de Hashiguchi, Y. et al.2004.²⁰

3.8 Diagnóstico

Os métodos diagnósticos da leishmaniose cutânea podem ser clínicos, e/ou laboratoriais, abrangendo também os aspectos epidemiológicos. Clinicamente, observam-se lesões ulceradas, exsudativas, arredondadas, eritematosas e base granulomatosa, com consistência firme, bordas elevadas e bem delimitadas.³⁴ As formações são originárias da região de inoculação das promastigotas na forma infectiva, através do vetor, e podem ser únicas ou disseminadas. O período de incubação varia de semanas a meses e portanto, como auxílio no diagnóstico, deve-se considerar se o indivíduo acometido procede de áreas endêmicas ou visitou a região recentemente.³⁵

O diagnóstico laboratorial inclui exames parasitológicos (raspado ou punção aspirativa), teste intradérmico (baseado na resposta de hipersensibilidade celular retardada), testes sorológicos (imunofluorescência indireta e ELISA) e exames moleculares (PCR).^{13; 35}

3.9 Possibilidade Terapêuticas

3.9.1 Fármacos Administrados

O fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença no Brasil é o antimonial, que atua na forma bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*, sendo considerado um agente leishmanicida.^{1; 34} É encontrado na forma de antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio sendo que este último é comercializado somente nos Estados Unidos e Europa.

Para que a ação antiparasitária ocorra o antimônio deve ultrapassar a membrana celular do hospedeiro e do fagolisossoma atingindo assim os amastigotas intracelulares.³⁴ A inibição da glicogenólise e oxidação de ácidos graxos são processos relatados como possíveis mecanismos de ação responsáveis na morte do parasito, promovendo a redução na produção de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto esses métodos ainda não são completamente elucidados. Outros estudos descrevem efeitos desse fármaco na resposta imune do hospedeiro, com expansão da fagocitose por monócitos e neutrófilos, produção de ânions superóxidos e TNF- α e consequentemente elevação da produção e liberação de óxido nítrico (NO).⁵

Geralmente são administrados via parenteral, alcançando elevadas concentrações plasmáticas em aproximadamente uma hora, porém, existem relatos de resistência do parasito ao fármaco e com isso muitos pacientes não respondem ao tratamento de maneira eficaz. Seu uso também é desaconselhável em gestantes devido ao medicamento ultrapassar a barreira transplacentária, ocasionando em más formações ao feto. Além disso, os antimoniais são bastante nefro, cardio e hepatotóxicos, desencadeando efeitos colaterais significativos, incluindo insuficiência renal e hepática, alterações nos traçados eletrocardiográficos, emese, diarreia, sensibilidade abdominal, mialgia, cefaleia, insônia e até mesmo morte súbita.⁶

Como alternativa ao uso dos antimoniais, a anfotericina B tem sido amplamente empregada com boa eficácia na destruição da *Leishmania*. É um antibiótico poliênico que atua na forma promastigota *in vitro* e amastigota *in vivo*. Seu mecanismo de ação consiste na interação do ergosterol da membrana celular formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico promovendo a morte celular. Encontra-se sob três apresentações (desoxicolato, dispersão coloidal e lipossomal). Apesar da comprovada eficácia, sua administração requer internação hospitalar, a toxicidade é bastante elevada, sendo nociva aos rins pela diminuição da taxa de filtração glomerular resultante do efeito

vasoconstritor das arteríolas aferentes promovendo hipocalcemia e hipomagnesemia. Além disso, a formulação lipossomal apesar de promover menores efeitos adversos possui um custo bastante elevado. Efeitos adversos como náuseas, emese, calafrios, pirexia, hipotensão e cefaleia são comumente descritos.^{6; 7}

Outros fármacos como pentamidina, miltefosina e alguns antifúngicos também são administrados em casos de falha na terapia com antimonial ou anfotericina B. A pentamidina é uma diamina que interage com o DNA do cinetoplasto do parasito. Inicialmente, os estudos apontaram eficácia semelhante aos antimonials porém, a administração contínua do fármaco demonstrou diversos casos de resistência na Índia. Adicionalmente, o alto custo, efeitos adversos e elevada toxicidade são fatores que limitam o seu uso.^{3; 6; 7}

A miltefosina é o primeiro medicamento que pode ser administrado pela via oral contra as leishmanioses. Registrada em 2002 como leishmanicida, foi introduzida no tratamento de leishmaniose visceral na Índia. Atua sobre o metabolismo e arquitetura da membrana fofolipídica, na biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, induz à apoptose e promove modulação da resposta de macrófagos contra o parasito.³⁶ Entretanto, sua eficácia é variável em função das diferentes localizações geográficas. Apresenta potencial teratogênico, efeitos gastrointestinais, além dos relatos de recidiva descritos atualmente.^{34; 37}

Outro fármacos vem sendo estudados com paroromicina e tamoxifeno. A paroromicina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro que atua nos ribossomos inibindo a síntese de RNA e consequentemente a síntese proteica. Relatos da literatura indicam que o composto pode atuar também na cadeia respiratória de mitocôndrias reduzindo a produção de ATP.³⁸ Foi licenciado em 2006 na Índia, África e Ásia, entretanto sua eficácia possui grande variabilidade de acordo com a espécie do protozoário e localização geográfica. Além disso, o fármaco apresenta fácil indução de resistência *in vitro*, sendo geralmente associado a outros medicamentos.³⁸

O tamoxifeno é um fármaco quimioterápico cujo mecanismo de ação compreende efeitos antagônicos aos receptores de estrógeno na superfície celular. Possui ação antitumoral sendo usualmente administrado para o tratamento de câncer de mama. Recentemente, pesquisas relacionadas aos seus efeitos leishmanicidas tem sido implementadas com resultados satisfatórios.³⁹ Trinconi et al. demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L.(L.)amazonensis* obtiveram respostas

significativas quando tratados com tamoxifeno. Os resultados foram mais promissores, quando associados à miltefosina com IC₅₀ de cada composto.³⁷

Dessa forma, diante do aumento dos índices de ocorrência da doença sejam decorrentes das resistências aos fármacos atuais ou da expansão do parasito e seus vetores, o desenvolvimento de novos tratamentos para as leishmanioses apontam para a necessidade de terapias alternativas e possivelmente combinadas a fim de promover maior efetividade, menor toxicidade, acessibilidade financeira, baixos índices de resistência e recidivas aos hospedeiros acometidos.^{7; 40}

3.9.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica foi desenvolvida no século XX, quando Oscar Raab, em 1900, notou que micro-organismos (*Paramecium caudatum*) quando submetidos à ação de um corante, laranja de acridina, e expostos à luz eram induzidos à morte.^{41;42} Desde então, iniciaram-se pesquisas que pudessem elucidar os possíveis mecanismos da interação da luz, composto fotossensibilizante e célula. A PDT ganhou impulso para o tratamento de tumores e somente na década de 90 voltou-se aos estudos de Raab e ela começou a ser estudada com a finalidade de obter efeitos antimicrobianos.⁴³ Nas últimas décadas, estudos direcionados para essa área tem sido aprofundados como alternativa às resistências de micro-organismos aos antibióticos.⁴⁴ Dessa forma, o emprego da técnica tem sido amplamente utilizado na destruição de células tumorais localizadas, bem como no tratamento de infecções tópicas (bacterianas, parasitárias, fúngicas e virais) na pele e cavidade oral.^{43; 45}

O processo fundamenta-se na foto-oxidação da matéria orgânica envolvendo a absorção de um fóton emitido pela irradiação luminosa e com comprimento de onda ressonante à absorção do fotossensibilizador (FS), o qual é elevado de seu estado eletronicamente estável (estado fundamental) para um estado excitado de curta duração, denominado estado excitado singleto, cujo intervalo de tempo é da ordem de nanossegundos. Nesse caso, a direção do *spin* do elétron que é dirigido para um orbital de maior energia é preservada. Posteriormente, ocorre uma transição eletrônica em que a direção do *spin* é invertida (*spin flip*) e o composto passa para um estado denominado tripleto, com durabilidade aproximada na ordem de microssegundos.

Quanto maior o tempo de permanência no estado tripleto, maior a probabilidade de sua interação com o oxigênio molecular do meio, por intermédio de duas reações

fotoquímicas (reação do tipo I e II).⁴⁵ A reação do tipo I consiste na transferência de elétrons ao substrato, produzindo ânions superóxidos e radicais hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), enquanto na reação do tipo II ocorre transferência de energia promovendo a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).^{42; 43; 44}

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) podem atuar em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos das biomoléculas, sendo capazes de reduzir a viabilidade celular, produzindo efeitos citotóxicos nas células-alvo e induzindo à morte celular por estresse oxidativo.^{10; 46} (Figura 10)

FIGURA 10 Diagrama de Jablonski indicando as reações fotoquímicas da fotoinativação microbiana. O FS (^1FS) em estado fundamental absorve um fóton para formar o estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$) que passa por um processo de cruzamento intersistema (CI) para formar o estado tripleto ($^3\text{FS}^*$). A partir de então pode ocorrer transferência de energia para formar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2^*$) (Tipo II) ou transferência de elétrons (Tipo I) para formar radicais hidroxil ($\text{HO}^\bullet$). As ROS são capazes de promover citotoxicidade para um amplo espectro de patógenos. Figura adaptada de Hamblin, M. R. 2016.⁴³

Durante o efeito fotodinâmico o tecido saudável e células adjacentes podem ter seus danos minimizados conhecendo-se a captação intracelular do fotossensibilizador e

modificando-se os parâmetros de irradiação como o tempo de exposição à luz (s), potência (W), energia entregue (J) e tempo de pré-irradiação (PIT, do inglês *pre-irradiation time*). Portanto, a dosimetria da PDT é multifatorial, incluindo a fonte de luz utilizada e sua penetração no tecido como também as características intrínsecas ao fotossensibilizador e à célula ou micro-organismo alvo.^{42; 43}

A resposta imunológica também pode ser estimulada por intermédio da PDT com a produção e subsequente liberação de IL1- β , IL-2, TNF- α e GCSF. É importante ressaltar que, por se tratar de uma exposição à radiação não ionizante, o processo não possui potencial de desencadear mutação ou carcinogênese.⁴²

Entre os fotossensibilizadores geralmente utilizados, destacam-se as porfirinas, ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas e fenotiazinas.⁴⁶ As porfirinas, por exemplo, são conhecidas pela sua internalização na mitocôndria da célula induzindo à sua morte por meio da apoptose e necrose sob irradiação luminosa no comprimento de onda adequado.⁴²

Particularmente, as fenotiazinas são fotossensibilizadores que contêm deliberada carga catiônica que pode rapidamente se ligar e invadir as células microbianas, demonstrando alto grau de seletividade para atingir micro-organismos, quando comparados com as células do hospedeiro.^{46; 47}

O azul de metileno (AM) é um composto fenotiazínico de cor azul bastante conhecido pelo bom rendimento quântico no estado tripleto, sendo propenso à formação de ROS (especialmente o oxigênio singleto), por meio de ambas as reações fotoquímicas (tipo I e II).⁴⁸ Trata-se de um composto hidrofílico utilizado clinicamente no tratamento de malária e metemoglobinemia.^{49 46}

A administração pode ser tópica ou sistêmica, possui baixo custo e nas concentrações adequadas apresenta pouca ou nenhuma toxicidade. Compreende duas bandas principais de absorção na região visível do espectro eletromagnético, uma referente ao componente monomérico ($A_{max} \approx 664$ nm) e outra em sua forma dimerizada ($A_{max} \approx 600$ nm) cuja penetração relativa na pele é eficaz tornando-os favoráveis na ação da PDT. A forma monomérica envolve maior propensão para a formação de oxigênio singleto (reação tipo II), enquanto na forma dimerizada predomina a reação tipo I, com transferência de elétrons, desencadeando a formação de radicais hidroxil, ânion superóxidos e peróxido de hidrogênio.^{45; 46}

3.10 Terapia fotodinâmica e Leishmaniose tegumentar

Estudos recentes descrevem o uso da PDT como terapia efetiva no tratamento de algumas espécies de *Leishmania*, com resultados satisfatórios.^{50; 51; 52; 53} A utilização de porfirinas proporcionou respostas encorajadoras no tratamento de *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

A clorina e6 associada a um LED (do inglês *light-emitting diode*) emitindo no azul ($\lambda=660$ nm), na dose de 10 J/cm^2 , foi capaz de reduzir a viabilidade celular e atividade mitocondrial em um ensaio *in vitro* realizado com *L.(L.)major* e *L.(V.)braziliensis*. Ambas as espécies de *Leishmania* promotoras de LC, sendo que a primeira é responsável pela doença no Velho Mundo e a última no Novo Mundo.⁵⁴

Akilov et al. realizaram ensaios *in vitro* com macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania major*. O ALA, um precursor de PpIX, foi administrado utilizando um laser de $\lambda=635$ nm, em uma dose de 10 J/cm^2 . Nesse mesmo experimento, fêmeas BALB/c induzidas à LC no pavilhão auricular, pela mesma espécie, foram tratadas com o ALA na mesma concentração porém, na fluência de 50 J/cm^2 .⁵⁵ Não houve resultado satisfatório *in vitro*, uma vez que nenhuma alteração na quantidade de amastigotas foi observada entre os macrófagos irradiados e o controle. Entretanto, no modelo animal o tratamento repercutiu positivamente, com redução da carga parasitária, aumento de IL-6 e melhora clínica da lesão. Provavelmente, a resposta imune do animal mediante a aplicação da PDT foi estimulada nessas condições experimentais.^{47; 55}

Souza et al. demonstraram diminuição da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(V.)braziliensis* quando submetidos a 3 sessões de PDT (intervalo de 5 dias) e 5-ALA, um precursor de porfirina, como fotossensibilizador.⁵² Observou-se também aumento dos níveis de IFN- γ .

Casos clínicos utilizando ALA em seres humanos também têm sido reportados na literatura. Fink et al. demonstraram sucesso no tratamento com PDT de uma mulher de 18 anos infectada por *Leishmania tropica*. Foram realizadas 5 sessões, uma vez por semana, na dose de 37 J/cm^2 e um diodo emissor de luz (LED) na região do vermelho, com comprimento de onda de aproximadamente 630 nm.⁵⁶

Hamsters induzidos à LC por *L.(V.)braziliensis* foram tratados com azul de metileno e irradiados com um LED ($\lambda=655$ nm) por uma hora, três vezes por semanas, durante 12 semanas. Notou-se melhora clínica na aparência da lesão e redução da carga

parasitária nesses animais, quando comparados aos controles. Os resultados foram semelhante aos tratados com anfotericina B.⁵⁷ Os animais submetidos ao efeito fotodinâmico demonstraram nos achados histopatológicos aumento na formação de fibras de colágeno, organização da epiderme e redução da inflamação na derme.⁵⁷

É possível observar que não existe um consenso ou um protocolo padrão quando discorremos a respeito da terapia fotodinâmica, especialmente em relação à leishmaniose, já que muitos fatores estão envolvidos, como a variabilidade de espécies existentes e suas diferentes formas clínicas de apresentação em mamíferos. Além disso, a resposta imunológica intrínseca ao hospedeiro pode torná-lo resistente ou susceptível à infecção, sendo este fator fundamental para o prognóstico favorável ou não.⁵⁸

Adicionalmente, a PDT também impõe determinadas condições para seu sucesso. Como citado anteriormente, a densidade de energia (J/cm^2), irradiância (W/cm^2), tempo de exposição, concentração e tipo de fotossensibilizador, fonte de luz e tempo de pré-irradiação também possuem grande variabilidade e devem ser estabelecidos de acordo com cada paciente e suas características.

Outro aspecto importante diz respeito aos ensaios experimentais, em que os resultados obtidos *in vitro* não são facilmente reproduzidos em experimentos *in vivo*. Em estudos *in vitro* não há uma barreira óptica que limite a ação da técnica e, portanto, o fotossensibilizador e a luz conseguem penetrar mais facilmente no alvo em questão, enquanto que *in vivo* é improvável se determinar com exatidão a distribuição homogênea do FS bem como a absorção de fótons. Isso se deve a fatores como número de parasitos, inflamação e barreira óptica do tecido e local a ser irradiado.

3.11 A importância das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na leishmaniose

A presença dos radicais livres em meio biológico foi desvendada há pouco mais de 50 anos, quando, em 1956, Denham Harman os descreveu como uma “caixa de Pandora” que continha substâncias potencialmente tóxicas ao organismo capazes de causar danos celulares, mutagênese, carcinogênese e envelhecimento celular precoce.⁵⁹

Nos anos seguintes, McCord and Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (SOD) relatando aos colegas a importância dos radicais livres em sistemas biológicos. Nesse período, um grande número de pesquisas voltou-se para a investigação dos possíveis danos oxidativos em DNA, proteínas, lipídeos e outros componentes celulares.⁵⁹

Somente na década de 80 surgiram trabalhos relacionados às funções benéficas dos radicais livres e sua importância nos mecanismos de sinalização celular. Por exemplo, Mittal and Murard reportaram evidências de que o ânion superóxido (O_2^-), através de seus derivados, radicais hidroxil ($HO^\bullet$), estimulam a enzima guanilato ciclase e, conseqüentemente, a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), um nucleotídeo cíclico derivado da guanosina trifosfato (GTP) que atua como um segundo mensageiro, assim como o AMP cíclico, por ativar as proteínas cinases intracelulares em resposta à ligação de hormônios peptídeos à membrana celular.⁶⁰

A homeostasia dos seres vivos é profundamente afetada pela ação das espécies reativas oxigenadas e nitrogenadas (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*). No casos dos tripanossomatídeos, quando dentro dos macrófagos, são expostos aos ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila ($OH^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido à explosão respiratória. Já o óxido nítrico é a principal RNS sintetizada pela célula fagocítica.⁶¹ Tanto as ROS como as RNS são potencialmente tóxicas e altamente reativas. No caso das espécies reativas de nitrogênio, pode ocorrer a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) com toxicidade intensificada.^{59; 62}

Entretanto, a família *Trypanosomatidae* possui um sistema de defesa antioxidante bastante eficaz composto de um tiol, tripanotiona (T) e da tripanotiona redutase (TR) e também tem a habilidade para liberar NO por intermédio da oxido nítrico sintase constitutiva (cNOS).⁶³

Esses artifícios são capazes de permitir a manutenção do protozoário no interior da célula hospedeira garantindo a sua sobrevivência. O desenvolvimento desses radicais são provenientes não somente das células do hospedeiro como também do próprio parasito, conferindo um dos fatores responsáveis pelo estabelecimento ou não da infecção e seu processo de resolução ou resistência à doença.⁶⁴

A relevância das ROS e RNS nos meios biológicos tem sido bastante discutida atualmente. Particularmente, no casos dos tripanossomatídeos, os estudos apontam relatos bastante controversos. Embora as ROS e RNS sejam fatores imprescindíveis na morte do parasito, sabe-se também que existem mecanismos desenvolvidos pelo protozoário para evadir o sistema imune do hospedeiro sendo capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio e também sobreviver em elevadas concentrações de óxido nítrico (NO). Portanto, são vias metabólicas com potencial de induzir a morte parasitária, porém, que requerem

estudos minuciosos pois, dependendo das concentrações de ROS e RNS os efeitos contra as *Leishmanias* podem ser mínimos e sem eficácia terapêutica.

Os tripanossomatídeos apresentam algumas linhas de defesa contra a ação de ROS e RNS. Em relação às ROS, a primeira linha de defesa é a conversão de ânions superóxidos (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por intermédio da catálise realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Essas enzimas possuem íons metálicos (Mn, Cu, Fe e Zn) acoplados dependendo do organismo envolvido. No caso das leishmanias, a isoforma da superóxido dismutase envolve o Fe.⁶⁵

Em seguida, a remoção de H_2O_2 é proporcionada por diversas catalases e peroxidases. Em mamíferos, a glutatona também faz parte de um sistema antioxidante que juntamente com a enzima glutatona redutase (GR) permitem a formação da glutatona na forma reduzida (GSH), a qual é o tiol predominante no meio intracelular. Sua habilidade para oxirredução ocorre através do grupamento SH presente na cisteína. Os tióis e as poliaminas compõem duas importantes classes de metabólitos em células eucariotas. Os tióis possuem função de tampão para que haja equilíbrio nos mecanismos de oxirredução. Quando o GSH é exposto a um determinado oxidante, forma-se o GSSG, produzindo pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH), as quais são oxidadas por essas pontes, resultando na sua função comprometida. A recuperação de GSSG é realizada pela GR.⁶⁶

Em situações normais, a recuperação do GSH ocorre naturalmente. Porém, em condições de excesso de agentes oxidantes e/ou depleção de mecanismos protetores, há uma instabilidade entre o consumo de GSH e produção de GSSG, o que compreende o estresse oxidativo. A proporção desse estresse pode ser mensurada por meio da relação GSSG/GSH.^{66; 67}

Os tripanossomatídeos possuem GSH, porém não tem glutatona peroxidase (GP) e glutatona redutase (GR). Nessa família, foi constatada a presença de um tripeptídeo glutatona acoplado a uma poliamina, denominada tripanotiona, cuja manutenção intracelular como um ditiol é promovida pela ação da tripanotiona redutase (TR). Há também a presença de uma cascata constituída de triparedoxina (Tpx) que participa da detoxificação de hidroperóxidos nesses protozoários.⁶⁸

Dessa forma, embora esses parasitos não possuam o sistema GSSG/GSH e GR, a neutralização de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, peróxido de hidrogênio se desenvolve pela tripanotiona e tripanotiona redutase. Fairlamb, Henderson e Cerami, 1989, demonstraram que tripanossomatídeos *knock-out* do gene associado ao TR culminaram

com uma redução aproximada de 90% na atividade desse catalizador quando comparados com a cepa selvagem, o que promoveu maior susceptibilidade dos parasitos ao peróxido de hidrogênio.^{63; 64}

No entanto, apesar das características pertencentes a esses protozoários capazes de desviar dos mecanismos de defesa do hospedeiro diante da explosão respiratória e exposição às ROS, a maneira pela qual o parasito pode ser atingido depende também das quantidades de agente oxidante produzido e do estresse oxidativo gerado nesses parasitas. Além disso, ainda não existem relatos que demonstrem os mecanismos de defesa da *Leishmania* contra o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o qual é potencialmente tóxico aos micro-organismos, altamente reativo promovendo danos aos sistemas biológicos através da oxidação de macromoléculas como lipídios, ácido nucleico e proteínas.⁴⁶

Sabe-se que a PDT possui potencial no combate às infecções por *Leishmania*, entretanto, a dosimetria deve ser bem estabelecida. Akilov et al. quantificaram a formação de oxigênio singlete no tratamento de leishmaniose cutânea através da PDT utilizando quatro tipos de fotossensibilizadores. A espécie adotada foi a *Leishmania major* e os resultados indicaram que nos FS em que houve maior rendimento quântico de oxigênio singlete, melhor foi a atividade fototóxica contra esse parasito.⁴⁷

Com relação as espécies reativas de nitrogênio, o mais importante é o óxido nítrico (NO). Especialmente em casos de leishmaniose, o NO recebe notoriedade devido à sua ação patogênica, principalmente na imunidade inata. Contudo, as *Leishmanias* possuem habilidade de esquivar-se da resposta imunológica do hospedeiro podendo instaurar uma infecção crônica.⁶⁹

Vários parasitas são sensíveis à ação do óxido nítrico e seus derivados. Os macrófagos são responsáveis pela produção dessa molécula através da óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS II) a partir da L-arginina. Em concentrações micromolares, o NO é tóxico para patógenos e células tumorais. Entretanto, as formas amastigotas da *Leishmania*, que são obrigatoriamente intracelulares, habitam principalmente no interior dos macrófagos, em vacúolos parasitóforos e portanto, podem suprimir a produção de NO e resistir diretamente à sua ação ou até mesmo produzir seu próprio óxido nítrico.⁷⁰

A *Leishmania* tem a capacidade de atuar na via metabólica da L-arginina. A L-arginina é um aminoácido com duas vias metabólicas fundamentais na célula hospedeira sendo bastante relevante também ao parasito.⁷¹ Trabalhos na literatura indicam que esses parasitos podem reduzir o substrato para a iNOS e, conseqüentemente, diminuir a

produção de NO pela célula hospedeira, utilizando o mesmo substrato para produzir seu próprio NO.^{69; 70; 71}

Outro aspecto de fundamental importância relaciona-se ao balanço de citocinas Th1 e Th2. O metabolismo da L-arginina é ativado pela citocinas do perfil Th1, especialmente TNF- α e IFN- γ , induzindo a produção de NO mediada por iNOS, o qual é tóxico ao protozoário. Contudo, a ativação de citocinas mediadas pelo perfil Th2 pode inibir a produção de NO e promover a via metabólica da arginase que utiliza o mesmo substrato para a produção de NO. A L-arginase produzirá poliaminas como produto final que são utilizadas pela *Leishmania* para sua multiplicação e crescimento.⁷⁰ (Figuras 11 e 12)

Dessa forma, podemos afirmar que da mesma maneira que o conhecimento do estresse oxidativo gerado pelas espécies reativas de oxigênio são de extrema importância para estabelecer a morte do protozoário, as espécies reativas de nitrogênio são igualmente relevantes nesse processo, uma vez que as *Leishmanias* possuem a habilidade de driblar os mecanismos impostos pelo sistema imune, neutralizando as ROS e sobrevivendo a concentrações elevadas de NO.⁶⁹

FIGURA 11 Representação esquemática da arginase-1 e óxido nítrico sintase II e suas vias metabólicas. Figura adaptada de Bronte, V. et al. 2005.⁷⁰

FIGURA 12 Equilíbrio entre NOS II e arginase na multiplicação e morte em tripanossomatídeos. Figura adaptada de Muller, S. et al. 2003.⁶⁶

3.11.1 Nanopartículas doadoras de óxido nítrico

Considerando a importância do NO como “molécula-chave” para a regulação do sistema imunológico, recentemente doadores de óxido nítrico vêm sendo muito utilizados como agente em potencial contra patógenos, incluindo parasitas.⁷² O óxido nítrico, como um radical livre, é bastante instável e pode ser inativado nos sistemas biológicos. Além disso, sua natureza gasosa dificulta o tratamento de afecções diretamente com essa molécula.⁷³

Outro fator relaciona-se ao curto tempo de meia-vida do NO, da ordem de 1 a 5 segundos, o que promove rapidamente a sua reação com o oxigênio e outros compostos moleculares do tecido, fazendo-se necessário uma entrega constante desse radical ao alvo.⁷⁴ Como alternativa, doadores de NO como o S-nitrosotiol (RSNOs) e nitroprussiato de sódio (SNP) foram implementados com a finalidade de permitir a liberação gradual dessa molécula.

Entretanto, estes tem se mostrado instáveis e com maior probabilidade de decomposição diante de altas temperaturas e exposição à luz. O S-nitrosotiol (RSNOs) também possui vulnerabilidade em soluções aquosas. Isso promove uma liberação mais rápida e intensa do NO, podendo culminar em efeitos tóxicos e redução da efetividade na sinalização metabólica.^{72; 74}

Diante desse contexto, os nanomateriais foram implementadas como estratégia para assegurar a liberação de NO de maneira gradual com maior segurança e estabilidade

ao organismo, evitando a rápida degradação e decomposição dos doadores de NO e também permitindo uma liberação controlada do óxido nítrico a fim de prolongar seu tempo de ação.⁷²

De acordo com Seabra et al, em um estudo realizado com *Trypanosoma cruzi* utilizando doadores de NO de baixo peso molecular, o ácido S-nitroso-mercaptopuccínico (S-nitroso-MSA), encapsulados em nanopartículas de quitosana (CSNPs) tiveram resultados promissores com grande potencial contra o patógeno em macrófagos infectados.⁷⁴

As nanopartículas podem ser veículos de entrega de fármacos (*drug delivery*) bastante interessantes. Particularmente, a quitosana é um polissacarídeo natural usualmente conhecido em aplicações farmacológicas, com propriedades antimicrobianas. São positivamente carregadas, podendo reagir com moléculas de carga negativa.⁷²

As curvas cinética de liberação do NO dos seus doadores encapsulados às nanopartículas de quitosana foram obtidas por Seabra e colaboradores, através do acompanhamento das mudanças espectrais nos comprimentos de onda $\lambda=336$ nm e $\lambda=545$ nm, utilizando um espectrofotômetro. O ensaio foi realizado após a nitroação de MSA produzindo S-nitroso-MSA. (Figura 13). A curva foi monitorada nas temperaturas 28°C e 37°C, durante 24 horas. (Figura 14)

FIGURA 13 Representação esquemática da nitroação de MSA para obtenção de S-nitroso-MSA. Figura adaptada de Seabra, A. B. et al. 2015.⁷⁴

FIGURA 14 Curva cinética da liberação de NO das nanopartículas de quitosana com S-nitroso-MSA a 28 e 37 °C durante 24 h. Figura adaptada de Oliveira, H. C. et al. 2016.⁷²

Oliveira et al. obtiveram a mesma curva cinética em temperatura ambiente e no escuro. Nesse experimento, foi mensurada a liberação de óxido nítrico da S-nitroso-MSA, ou seja, sem a nanopartícula em comparação com o S-nitroso-MSA encapsulado nas nanopartículas de quitosana (S-nitroso-MSA-CS NPs) e com o controle negativo, representado pelas nanopartículas “vazias”, isto é, sem a liberação de NO (MSA-CS NPs). (Figura 15)

FIGURA 15 Curva cinética de NO. (i) Cinética da liberação de NO de S-nitroso-MSA livre. (ii) S-nitroso-MSA-CSNPs (concentração inicial de S-nitroso-MSA de 1000 μM em ambas as curvas) (iii) MSA-CSNPs, como controle negativo. Temperatura ambiente por 12 h. Figura adaptada de Oliveira, H. C. et al. 2016.⁷²

De acordo com os trabalhos descritos na literatura, o uso de nanopartículas tem sido muito eficiente no controle da entrega de NO, permitindo sua gradual liberação ao tecido, minimizando os possíveis efeitos tóxicos aos tecidos do hospedeiro, proporcionando boa eficiência terapêutica.⁷⁴

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP sob a orientação da Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro. Este laboratório possui as instalações necessárias para o desenvolvimento de pesquisas em terapia fotodinâmica que envolva micro-organismos. Na fase de experimentação animal, o projeto obteve a colaboração do biotério do IPEN-CNEN/SP.

Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEN-CNEN/SP N^o70/10 (Anexo 1).

Para melhor apresentação do trabalho, dividimos os ensaios em etapas sendo a etapa I um ensaio piloto com culturas de *L.(L.)amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) objetivando estabelecer a melhor densidade de energia a ser utilizada em nosso modelo experimental. A carga parasitária foi obtida pelo método de diluição limitante, o qual requer um número elevado de animais uma vez que a eutanásia é necessária.

Optamos por continuar os experimentos com a linhagem recombinante de *L.(L.)amazonensis*, que expressa o gene da luciferase (La-Luc) como técnica de quantificação parasitária em razão de suas diversas vantagens, como elevada reprodutibilidade, maior sensibilidade e diminuição dos erros manuais, além da avaliação da progressão da enfermidade *in vivo*, sem a necessidade de eutanásia, já que o mesmo animal pode ser acompanhado durante todo o período experimental.

Dessa forma, nas etapas subsequentes, linhagens recombinantes de *L.(L.)amazonensis* que expressam o gene da luciferase (La-Luc) foram obtidas e caracterizadas de acordo com suas propriedades biológicas em relação à linhagem selvagem (MHOM/BR/73/M2269) e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), sob a supervisão da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

Em todas as etapas do trabalho a inoculação do parasito foi realizada da mesma forma, assim como os parâmetros de irradiação e concentração do fotossensibilizador. Além disso, as variáveis como carga parasitária, tamanho da lesão e avaliação da sensibilidade nociceptiva foram mensuradas em todas as etapas conforme descrito a seguir.

4.1 Inoculação do Parasita

A inoculação foi realizada por meio da administração de 1×10^6 promastigotas de fase estacionária, em um volume de 20 μ l, na pata esquerda de cada camundongo pela via subcutânea.

4.2 Tamanho da lesão

Após a inoculação, os animais foram monitorados por 4 semanas para a verificação do desenvolvimento das lesões. A espessura de ambos os membros de cada animal foi mensurada com um paquímetro semanalmente. Para estimar o real tamanho da lesão, a diferença relativa dos valores obtidos entre as patas sadia e lesionada foi mensurada, em porcentagem, utilizando a fórmula:

Diferença Relativa (%) = $(P_i - P_c / \text{Média } P_c) \times 100$, onde P_i relaciona-se à pata infectada e P_c à pata contralateral não infectada do mesmo animal.

4.3 Terapia Fotodinâmica

Após 4 semanas de infecção, o tratamento foi administrado em todos os animais, com exceção do grupo controle.

O fotossensibilizador utilizado neste estudo foi o azul de metileno (AM), cuja solução estoque foi preparada pela diluição do pó (Sigma Ltd) em solução tamponada (PBS), na concentração de 1 mM, que foi filtrada em uma membrana estéril (0,22 μ m, Milipore, São Paulo, Brasil).

A solução estoque foi diluída em PBS, para a concentração final de 100 μ M e foi administrada pela via subcutânea, no membro infectado em um volume de 10 μ L (Figura 16A).

O tempo de pré-irradiação, que consiste no tempo entre a administração do AM e a irradiação, foi estipulado em 10 min. As lesões dos animais foram irradiadas com um diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda de $\lambda = 660 \pm 22$ nm e as

densidades de energia foram estimadas em função dos ensaios descritos a seguir. (Figura 16 B).

FIGURA 16 Terapia Fotodinâmica em camundongos BALB/c infectados com isolados de *L. (L.) amazonensis* PH8. (A) O AM foi administrado pela via subcutânea na pata infectada, na concentração de 100 μ M, com PIT de 10 min. (B) Animais irradiados de acordo com as doses estabelecidas em cada grupo com LED de comprimento de onda 660 $\pm$ 22nm e irradiância de 100 mW/cm².

4.4 Filamentos Von Frey para avaliação da dor

A avaliação da dor nesses animais foi determinada pelo método von Frey, que possibilita analisar a hiperalgesia por pressão crescente nas patas dos camundongos frente a um estímulo mecânico. Os filamentos von Frey representam a sensibilidade nociceptiva dos animais, com uma força expressa em gramas (Figura 17).

No trabalho em questão, os filamentos apresentavam 10g, 5g, 26g, 60 g, 100g. Foi mensurada a sensibilidade nos animais no dia da PDT durante as 3 ou 4 semanas posteriores ao tratamento, de acordo com cada etapa. A partir disso, foi realizada uma escala de dor com base nos resultados obtidos, em que 1 representa pouca sensibilidade do animal e 6 grande sensibilidade do animal. (Tabela 1)

TABELA 1 Escala de dor e suas representações utilizando o método von Frey

Escala de Dor	Força expressa em gramas (g)
1	<10
2	10-15
3	15-26
4	26-60
5	60-100
6	>100

FIGURA 17 Método von Frey realizado na análise da sensibilidade dos animais à pressão

4.5 Etapa I

4.5.1 Cultivo de *Leishmania*

Culturas de *L.(L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas como promastigotas em meio Grace's (Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco). Para a realização da curva de crescimento, os parasitos foram fixados em 4 % de paraformaldeído e contados em câmara de Neubauer durante sete dias.

4.5.2 Piloto: Culturas de *L.(L.)amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)

Para o ensaio piloto foram utilizados 28 camundongos fêmeas albinas BALB/c (*Mus musculus*), de 8 semanas de vida e massa corporal de aproximadamente 30 g.

Os animais foram divididos em 2 grupos. O primeiro grupo com 12 animais e o segundo grupo com 16 animais. (Tabelas 2 e 3)

TABELA 2 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na PDT no grupo 1.

Grupo 1	Densidade de Energia J/cm ²	Tempo de Irradiação (s)	Número de Animais
Subgrupo AC	0	0	3
Subgrupo A50	50	500	3
Subgrupo A100	100	1000	3
Subgrupo A150	150	1500	3

TABELA 3 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na PDT no grupo 2.

Grupo 2	Densidade de Energia(J/cm ²)	Tempo de Irradiação (s)	Número de Animais
Subgrupo BC	0	0	4
Subgrupo B50	50	500	4
Subgrupo B100	100	1000	4
Subgrupo B150	150	1500	4

Após o tratamento com PDT, os animais do grupo 1 foram imediatamente eutanasiados e a carga parasitária quantificada. Os animais do grupo 2, foram acompanhados durante 3 semanas para verificar a progressão da lesão, hiperalgesia e quantificação da carga parasitária nesse período.

4.5.3 Quantificação de Carga Parasitária por Diluição Limitante

Para quantificar a carga parasitária, o tecido da lesão foi removido do membro infectado e as lesões foram lavadas 3 vezes em álcool 70% por 10 minutos e maceradas em homogeneizador com meio RPMI. O conteúdo foi filtrado em filtro de 70 μm , centrifugado a 1500 x g por 10 min e ressuspensos em 1 mL de meio RPMI.

Placas de 96 poços foram previamente semeadas com meio M199. No primeiro poço foi adicionado o macerado da lesão e foi feita a diluição limitante com fator de diluição de 10 até o último poço. A placa foi incubada a 25°C por 7 dias para a confirmação da presença de promastigotas. A análise de quantificação foi realizada utilizando o programa ELIDA (ELIDA software Carl Tarswel). A quantificação de cada lesão foi realizada em triplicata.

4.6 Etapa II - Análise da carga parasitária utilizando o bioimageamento com 150 J/cm²

Diante dos resultados positivos com a maior densidade de energia utilizada (150 J/cm²) em nosso piloto, desenvolvemos mais um experimento para verificar a ação de apenas uma sessão de PDT em relação ao número de parasitos, durante as primeiras 96 h.

Como a PDT possui efeito imediato, monitorar o comportamento dos parasitos mediante sua administração em um curto período de tempo se torna interessante.

Foram inoculados 1×10^6 promastigotas de fase estacionária em 6 camundongos BALB/c, de 8 semanas e massa aproximada de 30 g, divididos em 2 grupos: Controle (infectado e não tratado, n=3) e G150 (infectado e tratado com PDT na dose de 150 J/cm² (n=3).

4.6.1 Cultivo de *Leishmania* Culturas de *L.(L.)amazonensis* (La-Luc2)

As formas promastigotas foram cultivadas em meio M199 (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, penicilina/estreptomicina 100 µg/mL. A cultura foi mantida a 25°C, em garrafas de cultura de 25 cm², com repiques semanais. Para a realização da curva de crescimento, os parasitos foram fixados em 4 % de paraformaldeído e contados em câmara de Neubauer durante sete dias.

4.6.2 Quantificação de Carga Parasitária por Bioimageamento

Após 4 semanas de infecção, os animais foram tratados com PDT e submetidos ao bioimageamento no laboratório do CEFAP do ICB-USP (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences), durante as primeiras 96 h. O reagente utilizado para a detecção de luz foi o VivoGloTM Luciferin (Promega), caracterizado como um sal de potássio de D-luciferina para testes de bioluminescência *in vivo*. Foi preparada uma solução de 15mg de luciferina, diluída em 1ml de PBS. Em seguida, uma alíquota de 100 µl foi administrada pela via intraperitoneal de cada camundongo, os quais foram anestesiados com 2,5% de isoflurano (Cristália), transferidos para a câmera de imagem e mantidos com 1,5% de isoflurano.

A mensuração da emissão de fótons foi realizada através do modo de alta resolução e a emissão foi estabelecida em uma região de interesse (ROI) no local da lesão. O mesmo ROI foi estabelecido para todos os animais. Foi determinado o tempo de maior emissão de luz, realizando uma leitura a cada 2 min, estabelecendo o tempo de 20 min para a captação da maior emissão luz. A redução da emissão luminescente é diretamente proporcional à redução da carga parasitária.

4.6.3 Etapa III - Administração de uma e duas sessões de PDT (150 J/cm²)

O experimento subsequente foi desenvolvido com base nos resultados obtidos nos dois ensaios anteriores, utilizando a *Leishmania* que expressa o gene da luciferase. Doze camundongos BALB/c foram infectados e divididos em 3 grupos, com n=4:

C (controle)-animais infectados e não tratados, PDT1 (animais infectados e tratados com 1 sessão de PDT, na dose de 150 J/cm²) e PDT2 (animais infectados e tratados com 2 sessões de PDT, na dose de 150 J/cm²). Os grupos PDT1 e PDT2 foram submetidos ao

tratamento no mesmo dia. A segunda sessão de PDT, no grupo PDT2, foi realizada 24 h após a primeira aplicação. (Tabela 4)

TABELA 4 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na etapa III.

	Densidade de Energia (J/cm ²)	N ^o de Sessões PDT	Intervalo de aplicações	Tempo de irradiação (s)	Número de Animais
Controle	0	0	0	0	4
PDT1	150	1	0	1500	4
PDT2	150	2	24h após 1 ^a PDT	1500	4

Os animais foram monitorados semanalmente, durante 4 semanas após o tratamento e o tamanho da lesão mensurado com um paquímetro. A hiperalgesia foi estimada com os filamentos Von Frey.

A quantificação da carga parasitária foi obtida por meio do bioimageamento (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences), nas primeiras 96h após o tratamento e nas 4 semanas seguintes.

4.7 Etapa IV - Nanopartículas de quitosana doadoras de óxido nítrico (S-nitroso-MSA-CS NPs)

4.7.1 Ensaio *in vitro*

Conforme os resultados obtidos nas etapas anteriores optamos por associar as nanopartículas doadoras de óxido nítrico (S-nitroso-MSA-CS NPs) à terapia fotodinâmica com o intuito de otimizar os efeitos da PDT contra a *L. (L.) amazonensis* no modelo animal.

As nanopartículas com e sem os doadores de óxido nítrico (S-nitroso-MSA-CS NPs e MSA-CS NPs, respectivamente) foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Amedea Seabra da Universidade Federal do ABC (UFABC).

Antes do seu uso *in vivo*, foi realizado um ensaio *in vitro* em placas de 96 poços, com 1.10⁷ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* que expressa o gene da luciferase (La-Luc) em fase metacíclica, por poço.

Primeiramente foi realizado um ensaio com S-nitroso-MSA-CSNPs e as MSA-CS

NPs, com um grupo controle e cinco grupos com diferentes concentrações .

Grupos tióis livres de MSA (1000mM) encapsulados em nanopartículas de quitosana foram nitrosados com a adição equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) (1000mM) em meio ácido ($\text{pH}=3$) levando a formação de S-nitroso-MSA-CS NPs. A solução foi agitada e mantida por 60 minutos em geladeira.

Após a nitroação a solução foi diluída em PBS estéril para obtenção das concentrações avaliadas, sendo um grupo controle e os demais com cinco concentrações diferentes (25,50,75,100,200 μM). (Figuras 18 e 19)

FIGURA 18 MSA-CS NPs (nanopartículas “vazias”).

FIGURA 19 S-nitroso-MSA-CS NPs após a nitroação.

As soluções foram adicionadas em placas de 96 poços, em função da distribuição dos grupos, contendo 1.10^7 promastigotas metacíclicas por poço. A placa foi mantida a 25°C durante 24 horas. Em seguida a placa foi lida após a adição de “ONE-Glo™ Reagent” (Promega) na proporção de 20 μL /100 μL de solução por poço. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro (Spectramax ® M4) e os dados obtidos por meio da intensidade de luminescência através da quantificação de unidades relativas de luz (URL).

Um experimento com as nanopartículas vazias também foi efetuado da mesma forma com a finalidade de comparar os efeitos causados pelas nanopartículas de quitosana com e sem os doadores de óxido nítrico em *L. (L.) amazonensis*.

O experimento foi realizado em triplicata, com três ensaios independentes. De acordo com os resultados obtidos, foi determinado o IC_{50} e estabelecida a melhor concentração para ser administrada no modelo animal.

4.7.2 Ensaio *in vivo*

Após os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, estabelecemos uma concentração de 80 μM para associar as nanopartículas com doadores de NO com à terapia fotodinâmica.

Os animais foram tratados com a PDT e imediatamente após o procedimento, as S-nitroso-MSA-CS NPs (nitrosadas) foram administradas no membro infectado pela via subcutânea em um volume de 10 μL .

Dezesseis camundongos BALB/C foram infectados e divididos em 4 grupos, com $n=4$: C (controle) – animais infectados e não tratados, PDT1NPNO (animais infectados e tratados com 1 sessão de PDT e administração de S-nitroso-MSA-CS NPs após o tratamento), PDT2NPNO (animais infectados e tratados com 2 sessões de PDT e administração de S-nitroso-MSA-CS NPs após a segunda sessão de PDT) e o grupo NPNO (animais infectados e tratados somente com as nanopartículas doadoras de NO). Todos os grupos foram submetidos ao tratamento no mesmo dia. A segunda sessão de PDT, no grupo PDT2NPNO, foi realizada 24 h após a primeira aplicação. (Tabela 5)

Os animais foram monitorados semanalmente, durante 4 semanas após o tratamento e o tamanho da lesão mensurado com um paquímetro. A hiperalgesia foi estimada por meio dos filamentos Von Frey.

A quantificação da carga parasitária foi obtida por meio do bioimageamento (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences), nas primeiras 96h após o tratamento e nas 4 semanas seguintes.

TABELA 5 Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na etapa IV.

	Densidade de Energia (J/cm ²)	N ^o Sessões PDT	Intervalo de Aplicações	Tempo de Irradiação (s)	S-nitroso-MSA-CS NPs	N ^o Animais
Controle	0	0	0	0	0	4
PDT1NPNO	150	1	0	1500	80 µM após 1 ^a PDT	4
PDT2NPNO	150	2	24h	1500	80 µM após 2 ^a PDT	4
NPNO	0	0	0	0	80 µM dia 0	4

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os testes ANOVA TWO WAY com medidas repetidas e Tukey como pós teste foram realizados utilizando-se o programa GraphPadPrism 6 CA, USA. O O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Etapa I

5.1.1 Carga Parasitária

O grupo 1 foi submetido à PDT na quarta semana de infecção e imediatamente após o tratamento os animais foram eutanasiados e a carga parasitária foi quantificada nos respectivos subgrupos. (Figura 20)

O grupo 2 foi acompanhado durante 3 semanas e após esse período foi obtida a carga parasitária presente nos animais, em todos os subgrupos. (Figura 21)

FIGURA 20 Avaliação da carga parasitária pelo método de diluição limitante de camundongos BALB/c infectados com *L.(L.)amazonensis* PH8, imediatamente após a PDT no grupo 1. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão (n=3). Os dados foram normalizados. Sem significância estatística.

FIGURA 21 Avaliação da carga parasitária pelo método de diluição limitante de camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* PH8, 3 semanas após a PDT no grupo 2. Camundongos fêmeas de 8 semanas foram inoculados com 1×10^6 promastigotas da fase estacionária. A carga parasitaria do membro infectado foi determinada pelo métodos de diluição limitante 3 semanas após a PDT no grupo 2. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão (n=4). Os dados foram normalizados. Sem significância estatística.

5.1.2 Tamanho da Lesão

Nossos resultados demonstraram que o perfil infectivo, *in vivo*, foi semelhante em todos os grupos, uma vez que na quarta semana de infecção e início da PDT, a espessura da pata permaneceu homogênea em todos os grupos. O tamanho das lesões indicou diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos 3 semanas após a PDT. (Figuras 22 e 23)

FIGURA 22 Avaliação do progresso da lesão 3 semanas após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* PH8. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente até a quarta semana após a infecção quando os camundongos foram submetidos à PDT e acompanhados, semanalmente, durante 3 semanas. O gráfico representa a média da diferença relativa entre os tamanhos da lesão $\pm$ desvio padrão. Observou-se diferença estatisticamente significativa na segunda e terceira semana após PDT, do subgrupo 150J/cm² em relação ao controle, infectado e não tratado

FIGURA 23 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* PH8. Avaliação do progresso da lesão acompanhado semanalmente durante 3 semanas após a PDT. (A) Representa um camundongo do grupo controle com 7 semanas de infecção. (B) Camundongo do grupo tratado com 7 semanas de infecção e 3 semanas após a PDT, na dose de 150 J/cm².

5.1.3 Escala de dor

A Figura 24 demonstra a sensibilidade nociceptiva dos animais. Observa-se que após 2 semanas de tratamento, a maior dose mostra significativa redução da dor comparada ao controle. Após 3 semanas de tratamento, as doses de 100 J/cm² e 150 J/cm² diminuíram significativamente a dor associada à leishmaniose induzida.

FIGURA 24 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* PH8. O gráfico demonstra a escala de dor estimada utilizando o método von Frey no dia da PDT e durante 3 semanas consecutivas. Observou-se diferença estatisticamente significativa nos subgrupos 150 J/cm², na segunda e terceira semanas após a PDT e no subgrupo 100 J/cm² na terceira semana pós-PDT.

5.2 Etapa II

5.2.1 Quantificação de Carga Parasitária por Bioimageamento

Como obtivemos resultados positivos em relação ao progresso da lesão e hiperalgesia na dose de 150 J/cm², optamos por repetir o ensaio com a mesma densidade de energia e observar o comportamento da carga parasitária com o bioimageamento, durante as primeiras 96 h após a PDT. (Figuras 25 e 26)

FIGURA 25 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 em 96h com PDT na dose de 150J/cm². A carga parasitária do membro infectado foi determinada pelo método de bioimageamento. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. Sem significância estatística.

FIGURA 26 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT. A imagem representa 24 h após a PDT. (A) Controle e (B) PDT 150 J/cm².

5.3 Etapa III

5.3.1 Carga parasitária

A etapa III foi desenvolvida a partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores. Apesar de não haver significância estatística na carga parasitária é possível observar que com 24h após a PDT, obtivemos a menor quantidade de carga parasitária. Diante disso, verificamos o comportamento dos parasitos frente a 2 aplicações de PDT, com um intervalo de 24h. Os animais foram acompanhados durante as primeiras 96h e depois semanalmente durante 4 semanas.

FIGURA 27 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 durante as primeiras 96h. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. O dia 0 representa o dia do tratamento. Observamos significância estatística com 72 e 96 h para os dois grupos tratados em relação ao controle.

FIGURA 28 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT.

FIGURA 29 Bioluminescência em camundongos BALB/c 48h após o tratamento com PDT.

FIGURA 30 Bioluminescência em camundongos BALB/c 72h após o tratamento com PDT.

FIGURA 31 Bioluminescência em camundongos BALB/c 96h após o tratamento com PDT.

FIGURA 32 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 após 30 dias. A carga parasitária do membro infectado foi determinada pelo método de bioimageamento nas 4 semanas seguintes. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. Há significância estatística no grupo PDT2 com 30 dias .

FIGURA 33 Bioluminescência em camundongos BALB/c 30 dias após o tratamento com PDT.

5.3.2 Escala de dor

A Figura 37 mostra a escala de dor mensurada pelo método Von Frey. Observa-se que a PDT diminuiu significativamente a dor após 2 semanas de tratamento em 50%, mas 2 sessões de PDT foram mais efetivas, mostrando uma redução de dor aproximadamente de 75% após 3 semanas.

FIGURA 34 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 e tratados com PDT. O gráfico demonstra a escala de dor estimada pelo método von Frey, no dia da PDT e durante 4 semanas consecutivas. (a) significância estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle. (b) Significância estatística do grupo PDT2 comparado aos grupos controle e PDT1.

5.3.3 Tamanho da Lesão

O tamanho da lesão durante todo o período experimental é mostrado nas figuras 38 e 39. Observa-se que a PDT significativamente reduziu o tamanho da lesão após 2 semanas. Após 4 semanas, nota-se que as lesões reincidiram para todos os grupos, mas duas sessões de PDT foram mais efetivas em manter as lesões menores.

FIGURA 35 Avaliação do progresso da lesão 30 dias após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.)amazonensis Luc2* e tratados com PDT. O gráfico representa a média da diferença relativa entre as lesões controle e tratada $\pm$ desvio padrão. (a) significância estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle. (b) Significância estatística do grupo PDT2 comparado aos grupos controle e PDT1.

FIGURA 36 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c com isolados de *L. (L.) amazonensis Luc2* 30 dias após o tratamento com PDT. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente, durante 4 semanas após a PDT. (C) Representa um camundongo do grupo controle, com 8 semanas de infecção. (PDT1) Camundongo tratado com 1 sessão de PDT, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento. (PDT2) Camundongo tratado com 2 sessões de PDT, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento.

5.4 Etapa IV

5.4.1 Ensaio *in vitro* com S-nitroso-MSA-CS NPs

Diante dos resultados adquiridos na etapa III, optamos por associar as nanopartículas de quitosana com doadores de óxido nítrico encapsulado com a finalidade de otimizar os efeitos da PDT. Para isso, iniciamos um experimento *in vitro* para avaliar a eficácia desse composto em promastigotas metacíclicas de *L.(L.)amazonensis* em diferentes concentrações. (Figura 37)

FIGURA 37 Atividade antiparasitária das S-nitroso-MSA-CSNPs em diferentes concentrações. O material foi incubado à 25⁰ C em um período de 24h. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão das amostras em triplicata. Significância estatística em todas as concentrações em relação ao controle.

Para comparar a eficiência dos doadores de NO encapsulados nas nanopartículas, o mesmo ensaio foi realizado com as nanopartículas desprovidas dos doadores de NO (MSA-CS NPs) nas mesmas concentrações testadas com o outro composto. (Figura 41)

FIGURA 38 Atividade antiparasitária das MSA-CS NPs em diferentes concentrações. O material foi incubado à 25⁰ C em um período de 24h. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão das amostras em triplicata. Significância estatística na concentração de 200 μ M em relação ao controle.

A partir dos dados obtidos, foi estabelecida uma curva de dose-resposta para S-nitroso-MSA-CS NPs e *L(L.) amazonensis*.

FIGURA 39 Curva de dose resposta das S-nitroso-MSA-CS em e *L(L.) amazonensis*.

5.4.2 Ensaio *in vivo* com S-nitroso-MSA-CS NPs

Em função dos dados obtidos com o experimento *in vitro* em S-nitroso-MSA-CS NPs e *L.(L.)amazonensis* as nanopartículas de quitosana com doadores de NO foram administradas após a PDT pela via subcutânea, na concentração de 80 μ M correspondendo o IC₉₀.

FIGURA 40 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs durante as primeiras 96h. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. Há significância estatística no grupo PDT2NPNO e NPNO com 72 e 96 h após o tratamento.

FIGURA 41 Bioluminescência em camundongos BALB/c 24h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

FIGURA 42 Bioluminescência em camundongos BALB/c 48h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

FIGURA 43 Bioluminescência em camundongos BALB/c 72h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

FIGURA 44 Bioluminescência em camundongos BALB/c 96h após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

FIGURA 45 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.)amazonensis* Luc2 e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs durante 30 dias. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. Há significância estatística 30 dias após o tratamento nos grupos NPNO e PDT2NPNO em relação ao controle.

FIGURA 46 Bioluminescência em camundongos BALB/c 30 dias após o tratamento com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

5.5 Análise de todos os grupos

5.5.1 Carga Parasitária

A figura 50 indica os resultados analisados com todos os grupos tratados em comparação ao controle e os grupos entre si nas primeiras 96 h após os tratamentos estipulados.

FIGURA 47 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs isoladamente e associadas durante as primeiras 96 h. O gráfico representa a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. (a) Indica significância estatística em relação ao grupo controle. (b) Indica significância estatística em relação ao grupo PDT1NPNO.

A figura 48 indica os resultados analisados com todos os grupos tratados em comparação ao controle e os grupos entre si nas primeiras após 4 semanas dos tratamentos estipulados.

FIGURA 48 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 e tratados com PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs isoladamente e associadas durante 30 dias. (a) Indica significância estatística em relação ao grupo controle.

5.5.2 Tamanho da Lesão

O tamanho da lesão durante todo o período experimental é mostrado na figura 52. Observa-se que a PDT, a associação de duas sessões de PDT com S-nitroso-MSA-CS NPs e as nanopartículas isoladas reduziu significativamente o tamanho da lesão após 2 semanas com melhores resultados com duas sessões de PDT. O grupo submetido à uma sessão de PDT e associados às nanopartículas doadoras de NO obtiveram aumento no tamanho da lesão. Após 4 semanas as lesões recidivaram para todos os outros grupos, entretanto duas sessões de PDT foram mais efetivas na redução do tamanho da lesão.

FIGURA 49 Avaliação do progresso da lesão 30 dias após o tratamento em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.)amazonensis Luc2*. O gráfico representa a média da diferença relativa entre as lesões controle e tratada $\pm$ desvio padrão. (*) significância estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

5.5.3 Escala de Dor

A Figura 53 demonstra a escala de dor mensurada pelo método von Frey. Observa-se que após 1 semana o grupo PDT2NPNO apresentou uma diminuição aproximada de 75% do estímulo nociceptivo que se manteve reduzida nos 21 dias subsequentes. Entretanto, após 4 semanas de tratamento, o grupo voltou a ter aparente sensibilidade frente ao estímulo doloroso. Nos grupos tratados somente com PDT, a atenuação da dor foi observada após 2 semanas de tratamento com redução em 50%. Com 2 sessões de PDT, a hiperalgesia reduziu aproximadamente de 75% após 3 semanas e se manteve da mesma maneira após 30 dias.

O grupo submetido à uma sessão de PDT e associado com S-nitroso-MSA-CS NPs, demonstrou uma redução de sensibilidade à dor de cerca de 25% após 2 semanas. Todavia, após 3 e 4 semanas de tratamento os animais voltaram a apresentar dor quando submetidos ao teste com filamentos von Frey com sensibilidade semelhante ao controle.

No grupo em que foi administrado somente o S-nitroso-MSA-CS NPs, houve diminuição de aproximadamente 25% na primeira semana que persistiu nas duas semanas seguintes. Entretanto, observa-se significância estatística em relação ao controle somente após 1 semana de tratamento. Após 4 semanas, os animais apresentaram sensibilidade nociceptiva e embora em menor grau quando comparada ao controle, não houve diferença estatística. Nesse período, essa diferença é notada em relação ao grupo PDT1NPNO, PDT2NPNO e PDT2.

FIGURA 50 Escala de dor em camundongo BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* Luc2 em todos os grupos tratados. O gráfico demonstra a escala de dor estimada por intermédio do método von Frey no dia da PDT e durante 4 semanas consecutivas. (*) Significância estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

FIGURA 51 Aspectos clínicos da lesão em camundongo BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* Luc2 30 dias após o tratamento com PDT, S-nitroso-MSA-CS NPs e associação de ambas. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente, durante 4 semanas após o tratamento. (C) Representa um camundongo do grupo controle, com 8 semanas de infecção. (PDT1) Camundongo tratado com 1 sessão de PDT, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento. (PDT2) Camundongo tratado com 2 sessões de PDT, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento. (PDT1NPNO) Camundongo tratado com 1 sessão de PDT e associação de S-nitroso-MSA-CS NPs, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento. (PDT2NPNO) Camundongo tratado com 2 sessões de PDT e associação de S-nitroso-MSA-CS NPs, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento. (NPNO) Camundongo tratado somente com S-nitroso-MSA-CS NPs, com 8 semanas de infecção e 4 semanas após o tratamento.

6 DISCUSSÃO

A *L. (L.) amazonensis* é responsável pelo desenvolvimento de lesões localizadas, porém, em alguns casos mais severos, a doença pode evoluir para a sua forma cutânea difusa. A instalação da doença em hospedeiros vertebrados ocorre por meio da transmissão de insetos vetores, do gênero *Lutzomyia*, que durante o repasto sanguíneo inoculam o parasito em sua forma promastigota.³⁰ Nos hospedeiros mamíferos, predominam as formas amastigotas do protozoário, que permanecem interiorizadas em células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente os macrófagos.^{13; 14}

O desenvolvimento da doença e aparecimento da lesão dependem da quantidade de promastigotas metacíclicas (forma infectiva) inoculadas, bem como da resposta imunológica do hospedeiro. No ambiente natural, o número de parasitas geralmente inoculados aproxima-se de 1000, no entanto, o desenvolvimento do parasito no vetor ocorre de forma que a quantidade de promastigotas metacíclicas é predominante. Além disso, a saliva do flebotomíneo que contém substâncias vasodilatadoras é fundamental na instalação da infecção.³⁰

Em ensaios experimentais, o fator da saliva do vetor não existe, e esses protozoários são cultivados em um meio que se aproxima do natural, porém, na fase estacionária da curva de crescimento, apesar de haver maior proporção de promastigotas metacíclicas em relação às procíclicas (não infectante), esta última também é inoculada. Sendo assim, para assegurar a inserção do parasito e desenvolvimento da lesão, *in vivo*, relatos da literatura indicam que um valor estimado de 1×10^6 parasitas inoculados é suficiente para tal finalidade.^{30; 37}

Camundongos da linhagem BALB/c apresentam maior susceptibilidade à infecção. O avanço das lesões nesse modelo pode ser tão intenso, que culmina com a amputação do membro em função do tempo de infecção. Obviamente, por motivos éticos, não permitimos que os animais passem por tal processo e, por isso, foram eutanasiados previamente a maiores complicações.⁷⁵

Devido à sua resposta imune ser majoritariamente do tipo Th2, favorecendo a progressão da doença, camundongos BALB/c são considerados bons modelos para estudo de leishmaniose tegumentar americana originada pela espécie *L. (L.) amazonensis*. A escolha do modelo experimental é um fator essencial, pois deve reproduzir da melhor maneira possível as condições a serem analisadas. Nessa linhagem, há predominância da resposta imune do tipo Th2, que relaciona-se com a evolução da enfermidade, uma vez que promove elevação dos níveis de IL-4, IL5 e IL-10 enquanto na resposta imune do tipo Th1 prevalecem citocinas como IFN- γ e IL-12, responsáveis pela cura e proteção contra reinfecções.^{75; 76}

De acordo com a cepa e espécie do protozoário, é possível, portanto, desenvolver modelos de susceptibilidade ou resistência em camundongos. A linhagem BALB/c geralmente é eleita como modelo experimental, uma vez que sua resposta imunológica capaz de causar danos letais ao parasito é ineficiente. Sendo assim, estudos relacionados a terapias e farmacologia de medicamentos são bastante eficazes.^{37; 50; 76}

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica foi administrada, a fim de analisar a eficiência de sua resposta nesses animais, já que é uma técnica de aplicação tópica e, portanto, minimamente invasiva.^{50; 53}

Trabalhos relacionados ao tratamento de LC com PDT têm sido descritos na literatura com a utilização de diferentes fotossensibilizadores e variados parâmetros da luz.^{8; 44; 77} Akilov e colaboradores demonstraram que as propriedades dos fotossensibilizadores também apresentam grande relevância na terapêutica da LC. Os autores apontaram que as fenotiazinas, por apresentarem carga catiônica em soluções aquosas e características anfifílicas são capazes de promover maior interação com as células dos parasitas do gênero *Leishmania* (negativamente carregadas), quando comparadas aos fotossensibilizadores aniônicos ou hidrofóbicos.⁴⁷ O uso do azul de metileno é bastante favorável em LC, pois, além de ser um cátion anfifílico, é desprovido de efeitos tóxicos aos hospedeiros (desde que esteja nas concentrações adequadas), seu custo é reduzido, além de ser um fármaco propenso à formação de ROS.^{46; 77}

A dose entregue, aliada ao FS, influencia de maneira relevante na eficácia da terapia fotodinâmica. Entretanto, os relatos da literatura referenciam muitos estudos de PDT em LC, com diferentes densidades de energia, dificultando o estabelecimento de um protocolo em PDT para aplicação clínica.^{47; 51; 54; 55} Por exemplo, Akilov e colaboradores observaram que com o uso de uma fenotiazina (3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide) associada a um LED emitindo em $\lambda=660 \pm 30$ nm, na dose de 50 J/cm², em camundongos BALB/c infectados com *L. major* no pavilhão auricular, houve uma

remissão da lesão, com diminuição significativa da carga parasitária e melhora no processo inflamatório, com apenas uma sessão de PDT.^{47; 50} Nossos dados demonstram que, no piloto realizado, com a mesma densidade de energia e outro composto fenotiazínico (azul de metileno), com apenas uma sessão, não obtivemos redução da carga parasitária da lesão. Entretanto, com 150 J/cm², os resultados foram promissores tanto clinicamente como em relação à sensibilidade nociceptiva. Devemos considerar que o modelo de infecção e a espécie do protozoário foram distintas daquelas utilizadas em nosso estudo, o que pode justificar parte da variabilidade entre nossos resultados.

O modelo animal, local de infecção, número de sessões, tempo de tratamento e momento de iniciá-lo são variáveis fundamentais a serem consideradas, pois também interferem na progressão ou remissão da doença nos modelos *in vivo*, solidificando a hipótese de que a implementação de um tratamento protocolado de PDT para LC é uma tarefa difícil de se estabelecer.

No presente estudo, em nosso piloto, observamos que, embora sem significância estatística na carga parasitária, na dose de 150 J/cm² os aspectos clínicos foram bastante expressivos. Os resultados demonstram que, após duas semanas da terapia, há uma redução significativa no tamanho da lesão em relação ao controle.

O controle apresentou lesões necróticas, eritematosas, ulceradas e edemaciadas. Quando os animais foram submetidos à PDT com 150 J/cm², o edema permaneceu (Figura 26), porém, em menores proporções. É importante ressaltar que não houve tecido granulocítico com ulcerações, exsudatos ou necrose. Além disso, associada aos resultados obtidos com o teste von Frey, é possível sugerir que os efeitos benéficos na aparência da lesão podem ter ocorrido por intermédio da modulação do processo inflamatório.

Relatos da literatura apontam que infecções causadas por leishmaniose cutânea não são dolorosas em seres humanos.^{24; 78; 79; 80} Porém, nos camundongos utilizados nesse experimento, constatamos hiperalgesia desses animais conforme a doença evoluía. Contudo, nos animais submetidos à PDT, na dose de 100 J/cm² e 150 J/cm² houve diminuição da sensibilidade à dor. Os subgrupos 50 J/cm² e 100 J/cm² não apresentaram diminuição significativa no tamanho da lesão, quando comparados ao controle. Provavelmente para estes grupos, a dose entregue foi insuficiente para promover uma resposta positiva nesses animais em apenas uma sessão.

Com relação à carga parasitaria, não foi constatada diferença significativa no grupo 1 ou grupo 2. No subgrupo 150 J/cm², os animais apresentaram aparente redução do parasita imediatamente após a PDT e 3 semanas após o tratamento. Entretanto, o desvio padrão foi

elevado e não é possível afirmar uma real diminuição desses valores. Sabe-se que nos modelos *in vivo* existe uma grande variabilidade da resposta imunológica, inflamatória, e reparação tecidual entre os animais, justificando o desvio padrão acentuado. Além disso, o número de animais por grupo pode ter sido insuficiente para o cálculo de carga parasitária com o método de diluição limitante, tornando necessário um maior número de camundongos para uma obtenção mais acurada da quantidade de parasitas por animal.

Optamos, portanto, por continuar os experimentos com a linhagem recombinante de *L.(L) amazonensis*, que expressa o gene da luciferase (La-Luc), a fim de monitorar o comportamento dos parasitos frente à uma e duas sessões de PDT, por intermédio do bioimageamento *in vivo*.

Na etapa II, o objetivo foi definir como a terapia administrada na melhor dose obtida no piloto influenciaria a carga parasitária nas primeiras 96 h, já que a PDT apresenta efeito imediato. Como resultado, observamos uma tendência à diminuição do número de parasitas com 150 J/cm² e maior redução nas primeiras 24 h após o tratamento. Assim, optamos por uma segunda sessão de PDT, seguindo o trabalho de Akilov et al., que demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L (L). major* no pavilhão auricular atingiram a remissão da lesão após 3 aplicações, com um intervalo de 4 dias entre elas.⁵⁰ Na etapa III, definimos que a segunda sessão de PDT seria realizada nas 24 h subsequentes à primeira, com tentativa de produzir um maior estresse oxidativo e evitar que o parasito se recuperasse e continuasse se multiplicando.

Nas primeiras 96 h obtivemos redução significativa dos parasitas nos grupos PDT1 e PDT2 com 72 e 96 h após a primeira aplicação quando comparados ao controle para ambos os grupos. No entanto, 30 dias após o tratamento observamos recolonização dos parasitos e, embora notemos aumento da carga parasitária, esta foi relativamente menor em comparação ao grupo não tratado com redução significativa para o grupo PDT2.

Mesmo com a não erradicação parasitária, a PDT foi capaz de induzir estresse oxidativo, por meio da produção de ROS e promover toxicidade ao protozoário na densidade de energia utilizada, durante a primeira semana. Os resultados atingidos clinicamente, como a redução do tamanho da lesão e melhora da sensibilidade ao teste von Frey nos encorajam a discutir os mecanismos que teriam induzido essa resposta.

A literatura reporta que os hospedeiros acometidos pela forma cutânea de leishmaniose não apresentam dor.^{24; 79; 81} Grevelink e Lerner reportaram que camundongos infectados com *L (L). major* possuem uma lesão em pápula eritematosa no período inicial, que evoluem para lesões nodulares e ulceradas, não dolorosas.^{78; 79} Entretanto, Kanaam et al

demonstraram que camundongos BALB/c infectados com a mesma espécie exibem evidências de nocicepção quando submetidos à testes de hiperalgesia, como o teste de placa quente e retirada de cauda.⁷⁹ O trabalho sugere que esses estímulos ocorram pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 β , conhecida por produzir efeitos nociceptivos, o que foi confirmado por Karam e colaboradores.⁸²

Embasados nesses dados, nossos resultados indicam uma semelhança dos padrões nociceptivos de camundongos BALB/c infectados com a espécie *L(L) amazonensis*. Contudo, não podemos afirmar se esse estímulo é decorrente da liberação da mesma citocina pró-inflamatória.

A apresentação clínica também demonstrou uma resposta satisfatória 30 dias após o tratamento. Nota-se que com uma sessão de PDT, apesar da redução da lesão, já existe um processo ulcerativo. Com duas sessões, o membro infectado revela-se menos edemaciado em relação ao controle e ao grupo PDT1 e o início de uma discreta ulceração. Ainda, os animais do grupo controle possuíam pontos de necrose nesse período, o que não foi observado em nenhum dos grupos tratado com a terapia fotodinâmica. (Figura 39)

Muitos trabalhos têm sido mencionados na literatura a respeito do tratamento de LC com PDT. Inúmeros estudos revelam uma grande variedade de fotossensibilizadores e parâmetros de irradiação.^{8;47;51;57} Diferentemente dos fármacos atualmente disponíveis, a técnica se torna vantajosa justamente pela praticidade, sendo minimamente invasiva, com baixa toxicidade e período de tratamento inferior aos medicamentos convencionais. Tal fato garante acessibilidade dos pacientes acometidos ao tratamento, uma vez que as regiões endêmicas de baixa infraestrutura e poucos recursos predominam.

Assim, diante dos resultados promissores, optamos associar a terapia fotodinâmica às nanopartículas doadoras de óxido nítrico com a finalidade de otimizar os efeitos promovidos pela PDT reduzindo o tempo de tratamento e melhorando a efetividade do procedimento.

Ao associarmos uma e duas sessões de PDT com S-nitroso-MSA-CSNPs, observamos resultados bastante distintos entre ambos os grupos e em relação aos animais submetidos à PDT e S-nitroso-MSA-CSNPs isoladamente. Observa-se que com uma sessão de PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs, a carga parasitária elevou-se tornando-se semelhante ao controle na primeiras 96 h e nas 4 semanas subsequentes. O tamanho da lesão também aumentou progressivamente no período experimental e, embora os animais tenham demonstrado menor sensibilidade ao teste von Frey após a primeira semana, a partir da segunda semana esse grupo revelou diminuição da tolerância aos estímulos nociceptivos.

De acordo com Karam et al, a hiperalgesia em camundongos da linhagem BALB/c infectados com leishmaniose cutânea está relacionada não somente com o processo inflamatório mas também com a quantidade de parasitas envolvida.⁸² Nesse caso, uma multiplicação intensa de parasitas associada ao edema do membro pode ter sido responsável pelo resultado obtido nesse grupo.

Quando associamos duas sessões de PDT com S-nitroso-MSA-CSNPs, observamos redução da carga parasitária durante as primeiras 96 h, com redução significativa em 72 e 96 h em relação ao controle e ao grupo PDT1NPNO. Nas 4 semanas posteriores, o número de parasitos permaneceu inferior em ambos os grupos, porém com diminuição significativa após 30 dias somente em relação ao controle.

Nota-se que com exceção do grupo PDT1NPNO, obtivemos redução da carga parasitária em todos os grupos tratados durante as primeiras 96 h e nas 4 semanas seguintes em relação ao controle. A redução no tamanho da lesão foi notória nos grupos submetidos à duas sessões de PDT e S-nitroso-MSA-CSNPs após 1 semana de tratamento com diminuição aproximada de 50% em relação o controle. Entretanto, nas duas semanas seguintes, o membro infectado aumentou de volume, que permaneceu constante nos 30 dias subsequentes, enquanto que o controle continuou evoluindo progressivamente.

Quando comparada ao controle, a diferença relativa observada para esse grupo foi cerca de 20% em 2 semanas, 30 % em 3 semanas e 50 % nas 4 semanas posteriores ao tratamento. Embora a lesão tenha aumentado após a segunda semana, a evolução ocorreu de maneira mais lenta quando comparada ao controle e manteve-se estável durante o restante do período avaliado. Provavelmente ocorreu uma resposta favorável na inflamação e diminuição na multiplicação parasitária uma vez que as manifestações clínicas corroboram com esses resultados.

Clinicamente, esses animais expressaram edema do membro infectado, início de úlcera e pontos de necrose após 4 semanas. Mesmo assim, o tamanho das lesões foi consideravelmente menor com aspectos mais satisfatórios em relação aos camundongos não tratados e ao grupo submetido a uma PDT e S-nitroso-MSA-CS NPs.

A sensibilidade nociceptiva associada às outras variáveis avaliadas no trabalho fortalecem a hipótese proposta, pois verificou-se uma redução da dor em aproximadamente 50% em relação ao controle após a primeira semana, com discreto aumento na segunda semana e redução significativa nos 21 dias posteriores à terapia instituída comparada ao controle. Porém, após 4 semanas os animais manifestaram aumento expressivo do estímulo doloroso estimado em uma diferença aproximada de apenas 16% comparada aos animais

não tratados. Por ser uma afecção de evolução crônica, é compreensível que após 30 dias tenhamos observado uma piora do quadro e não nas primeiras semanas após o início do tratamento.

Ao compararmos o grupo PDT1 com PDT1NPNO, observamos características distintas no processo de hiperalgesia e tamanho de lesão e carga parasitária. Em referência ao grupo PDT2 e PDT2NPNO foram constatadas disparidades relativas ao tamanho da lesão e sensibilidade nociceptiva. Nas condições experimentais estipuladas durante esse trabalho, as S-nitroso-MSA-CSNPs não foram capazes de otimizar os efeitos da PDT em uma ou duas sessões com 150 J/cm^2 de densidade de energia e $80 \text{ }\mu\text{M}$ de S-nitroso-MSA-CSNPs.

O estresse oxidativo gerado com uma sessão de PDT pode não ter sido suficiente para induzir uma resposta inibitória desses parasitas, que podem ter neutralizado a formação de ROS, mediante a ação da tripanotona redutase. Embora o oxigênio singlete seja potencialmente tóxico e, até onde se sabe, não existem evidências de defesa da *Leishmania* contra essa espécie reativa, a formação de $^1\text{O}_2$ pode ter sido inferior ao necessário para combater diretamente esse agente patogênico. Além disso, os parasitos sobreviventes podem ter desenvolvido resistência ao NO administrado no grupo PDT1NPNO garantindo a sua multiplicação.⁸³

Entretanto, com duas sessões de PDT o estresse oxidativo gerado foi de maior magnitude, permitindo um desequilíbrio no sistema de oxirredução do parasito. Ao associarmos as S-nitroso-MSA-CSNPs, apesar da carga parasitária ter indicado resultados semelhantes em relação ao grupo PDT2, clinicamente os efeitos resultantes dessa associação não foram tão benéficos em comparação aos animais tratados isoladamente com duas sessões de PDT. É possível que o óxido nítrico administrado tenha promovido vasodilatação e desfavorecido os efeitos anti-inflamatórios da PDT.

Giudice e colaboradores realizaram um estudo relativo à dupla função do óxido nítrico na morte dos parasitos. Espécies de *L(V.) braziliensis* e *L(L.) amazonensis* isoladas de seres humanos foram avaliadas e selecionadas de forma que espécies resistentes ao NO foram comparadas àquelas susceptíveis ao mesmo composto. Macrófagos infectados com amastigotas foram submetidos à administração de NaNO_2 em diversas concentrações. Foi constatado que ambas as espécies de *Leishmania* susceptíveis ao NO foram completamente erradicadas em uma concentração de 8 mM de NaNO_2 , enquanto que as resistentes permaneceram viáveis mesmo em 16 mM do nitrito de sódio.⁸³ Os autores também demonstraram nesse trabalho uma relevância biológica proveniente desse resultado, pois nos pacientes em que o parasito era resistente ao NO, as lesões cutâneas eram maiores, mais

ulceradas em comparação aos indivíduos acometidos pelas *Leishmania* spp susceptíveis ao NO, gerando formas clínicas mais agressivas da LC.

Adicionalmente, no mesmo trabalho uma maior proporção dos isolados *L. (L.) amazonensis* eram resistentes ao NO comparados aos isolados de *L. (V.) braziliensis*, com uma relação de 73 e 18%, respectivamente, indicando uma variabilidade inter e intra específica na susceptibilidade dos parasitos às espécies reativas de nitrogênio.⁸³

Como no presente trabalho tanto a quantidade de ROS e NO ou susceptibilidade e resistência dessa espécie ao óxido nítrico não foram mensuradas, podemos sugerir, nas condições desse estudo, que não houve sinergia proveniente da associação de ambas as técnicas. Contudo, mais estudos são necessários para se afirmar se existe sinergia ou antagonismo, já que não existem trabalhos conclusivos na literatura a respeito dessa terapia bimodal em leishmaniose tegumentar.

De acordo com Girotti e colaboradores, estudos elaborados com células de câncer tratadas com PDT e NO exógeno indicaram efeitos antagônicos oriundos dessa combinação. Os autores demonstram que as células sobreviventes ao estresse oxidativo gerado somado às concentrações elevadas de iNOS/NO são capazes de proliferar mais rapidamente e migrar de maneira mais agressiva para locais adjacentes. Além disso, os pesquisadores relatam que as células de câncer podem regular a iNOS após a PDT e o NO resultante pode auxiliar no processo de resistência das células ao efeito fototóxico.⁸⁴

Entretanto, Rapozzi et al reportaram que os efeitos citotóxicos ou citoprotetores da PDT em associação com NO exógeno em células de câncer dependem da concentração do óxido nítrico administrada.⁸⁵ Outro aspecto relevante seria na modulação do processo inflamatório, uma vez que a literatura demonstra que a PDT possui efeito anti-inflamatório, diferentemente do óxido nítrico, que por ser um agente vasodilatador, possibilita o recrutamento de mais células para o sítio de infecção.⁸⁵

Ainda, é importante ressaltar que em nosso trabalho as S-nitroso-MSA-CSNPs foram eficazes nos experimentos realizados *in vitro*, com morte parasitária dose dependente. Genestra e colaboradores, em um estudo *in vitro*, demonstraram que promastigotas e amastigotas de *L.(L.) amazonensis* são resistentes a elevadas concentrações de NO. Foi utilizado o nitroprussiato de sódio como doador de NO e de acordo com os resultados observados, a toxicidade do composto era dose dependente, como observado em nossos ensaios. Contudo, verificou-se que as formas amastigotas foram significativamente mais resistentes ao NO em relação às promastigotas.^{62; 80}

Tal fato pode ser justificado pelo ambiente hostil que as formas amastigotas enfrentam dentro da célula hospedeira. Um vez dentro dos vacúolos parasitóforos, um dos principais componentes tóxicos dos fagossomos é o NO. Sendo assim, as formas amastigotas demonstram uma habilidade peculiar de sobrevivência em seus hospedeiros, seja suprimindo sua produção, resistindo à sua ação direta ou até mesmo produzindo seu próprio NO.

Além disso, nos ensaios *in vitro* a resposta imunológica do hospedeiro não está envolvida no processo de toxicidade, o que nos permite afirmar que os resultados *in vivo* podem apresentar variabilidade permitindo novos ensaios para verificar a concentração mais adequada nesse modelo.^{62; 86; 87}

Nos modelos *in vivo*, o balanço no perfil Th1/Th2 pode contribuir para a remissão ou progressão da doença. A predominância de citocinas como IFN- γ e IL-12 mediadas pela resposta Th1, indicam resistência do hospedeiro à instalação da infecção bem como maior probabilidade de cura e melhor prognóstico. Além disso, ocorre estimulação da síntese de NO, o que viria a ser tóxico para o parasito.

Por outro lado, a resposta mediada por citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-10, garantem à susceptibilidade do hospedeiro à infecção. Essas citocinas também podem inibir a produção de NO mediante o estímulo da via bioquímica da arginase e, portanto, regulando de forma negativa a síntese de NO. Paralelamente, a L-arginina produz poliaminas responsáveis pela multiplicação do parasito tornando o hospedeiro incapaz de manter o controle parasitário.⁵³

Como nosso modelo, utilizando camundongos BALB/c, a resposta do tipo Th2 prevalece, pode-se também sugerir que a administração de S-nitroso-MSA-CSNPs nas condições utilizadas não foi suficiente para uma redução significativa de carga parasitária que permitisse a manutenção ou até mesmo a remissão da enfermidade mesmo isoladamente ou associada à PDT, já que a resposta imunológica desses animais não favorece o controle da doença.^{69; 71}

Nota-se que nos grupos NPNO em que as S-nitroso-MSA-CSNPs foram administradas isoladamente e PDT2NPNO (duas sessões de PDT e associação de S-nitroso-MSA-CSNPs) o número de parasitos quantificados pelo método do bioimageamento permanece semelhante durante todo o período experimental. O uso isolado de ambas as técnicas promoveu benefícios no tratamento de LC. Nos animais tratados unicamente com nanopartículas de quitosana doadoras de óxido nítrico, as manifestações clínicas indicaram, após 30 dias, que, apesar do aumento do tamanho da lesão, devido ao edema formado, não

há sinais de úlcera, enquanto que nos animais tratado com PDT, apesar do menor tamanho da lesão, já existe o início de um processo ulcerativo, mais evidente com uma sessão de PDT.

Assim, com base em nossos resultados, podemos afirmar que nas condições experimentais desse trabalho não foi possível otimizar a PDT mediante a administração das nanopartículas de quitosana doadoras de óxido nítrico. Entretanto, a PDT isoladamente contribuiu de maneira positiva na modulação da inflamação com redução no tamanho da lesão e hiperalgesia, com melhores respostas se administrada em duas sessões.

Já as S-nitroso-MSA-CSNPs utilizada sozinhas também promoveram melhora clínica, com redução no tamanho da lesão em relação ao controle, mas não em relação aos grupos tratados com PDT. Os animais foram mais sensíveis aos estímulos nociceptivos comparados a ambos os grupos citados acima. Esses dados nos permitem sugerir que apesar dos efeitos clínicos benéficos das S-nitroso-MSA-CSNPs, como a não formação de úlceras após 30 dias, a inflamação persistiu nesses animais.

Apesar do crescente número de relatos descritos na literatura direcionados ao tratamento de leishmaniose cutânea com terapia fotodinâmica, o aprofundamento nessa área se faz cada vez mais necessário a fim de compreender seus principais mecanismos de ação diretamente contra o parasito, como também a sua influência nas possíveis respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro, para que assim a técnica possa ser efetivamente implementada nessa enfermidade com maior eficácia e segurança no campo médico.^{43; 45; 57}

Sendo assim, é possível considerar nossos resultados promissores, especialmente com a administração de duas PDTs, já que clinicamente observou-se melhora das lesões. Os tratamentos convencionais, além de possuírem efeitos colaterais graves, deixam cicatrizes de caráter desfigurante, afetando entre outros fatores, os aspectos psicológicos e sociais de seres humanos. Logo, aprofundar pesquisas nessa área torna-se imprescindível para que novas perspectivas que conciliem erradicação do parasita, melhora na inflamação, reparação tecidual, cicatrização das lesões e qualidade de vida sejam proporcionadas aos pacientes acometidos pela doença.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a terapia fotodinâmica reduziu o tamanho da lesão e aliviou a dor em leishmaniose cutânea induzida em camundongos, sugerindo que a PDT pode ter influenciado no processo inflamatório. Contudo, nas condições analisadas, as S-nitroso-MSA-CSNPs não foram capazes de otimizar os efeitos da PDT em camundongos BALB/c infectados por *L(L.)amazonensis*. Estes resultados encorajam mais estudos para compreensão dos mecanismos da PDT e S-nitroso-MSA-CSNPs, no tratamento de leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ ORGANIZATION, W. H. WHO | Epidemiological situation. **WHO**, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis> >. Acesso em: 2016.
- ² ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012.
- ³ Ministério da Saúde. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br> >. Acesso em: 2016.
- ⁴ KARIMKHANI, C. et al. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 584-91, 2016.
- ⁵ MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **Int Immunopharmacol**, v. 8, p. 1633-8, 2008.
- ⁶ MCGWIRE, B.; SATOSKAR, A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, p. 7-14, 2014.
- ⁷ DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, p. 305-18, 2004.
- ⁸ LATORRE-ESTEVEZ, E. et al. Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using L. major expressing GFP. **J Biophotonics**, v. 3, p. 328-35, 2010.
- ⁹ TANAKA, M. et al. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. **Lasers Surg Med**, v. 43, p. 221-9, 2011.
- ¹⁰ KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers Surg Med**, v. 43, p. 755-67, 2011.
- ¹¹ AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. In: (Ed.). **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, 2016.
- ¹² SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417-9, 1984.

- 13 SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001.
- 14 RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, 2012.
- 15 ROSS, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **Br Med J**, v. 2, p. 1401, 1903.
- 16 ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **Br Med J**, v. 2, p. 1261-2, 1903.
- 17 SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 541-7, 2007.
- 18 OLIVEIRA, T. N. et al. Diagnosis and epidemiology of canine leishmaniasis in southeastern Bahia, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 15, 2016.
- 19 TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002. ISSN 0022-1899.
- 20 HASHIGUCHI, Y. et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Trop Med Health**, v. 44, 2016.
- 21 SCHONIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138, p. 405-25, 2011.
- 22 DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Front Immunol**, v. 7, 2016.
- 23 BEDOYA-PACHECO, S. J. et al. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, p. 901-5, 2011.
- 24 BORGHI, S. M. et al. *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitol Res**, 2016.
- 25 SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, v. 3, p. 189-96, 2001.
- 26 LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-27, 2005.
- 27 ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, p. 463-7, 2004.

- 28 SOARES, M. B. et al. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- α and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J Immunol**, v. 160, p. 1811-6, 1998.
- 29 KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.
- 30 ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathog**, v. 3, p. e91, 2007.
- 31 SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.
- 32 CONVIT, J.; REYES, O.; KERDEL, F. Disseminated Anergic American Leishmaniasis: Report of Three Cases of a Type Clinically Resembling Lepromatous Leprosy. **A.M.A. Archives of Dermatology**, v. 76, p. 213-217, 1957.
- 33 REVEIZ, L. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS One**, v. 8, 2013.
- 34 OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat**, v. 7, p. 257-66, 2004.
- 35 STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, 2013.
- 36 VINCENT, I. M. et al. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 4, p. 20-7, 2014.
- 37 TRINCONI, C. T. et al. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, p. 1314-22, 2016.
- 38 HENDRICKX, S. et al. In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster Model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 4714-8, 2015.
- 39 DOROODGAR, M. et al. Tamoxifen Induces Apoptosis of *Leishmania major* Promastigotes in Vitro. **Korean J Parasitol**, v. 54, p. 9-14, 2016.
- 40 NASSIF, P. W. et al. Clinical, laboratory, and therapeutic characteristics of American tegumentary leishmaniasis in the 15 th State Health Division, Northwest Parana State, Southern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, p. 593-601, 2016.

- 41 O., R. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Z Biol**, v. 39, p. 524-546., 1900.
- 42 WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 7, p. 145-63, 2014.
- 43 HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr Opin Microbiol**, v. 33, p. 67-73, 2016.
- 44 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, p. 436-50, 2004.
- 45 DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 6, p. 170-88, 2009.
- 46 NUNEZ, S. C. et al. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. **Photochem Photobiol Sci**, v. 13, p. 595-602, 2014.
- 47 AKILOV, O. E. et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. **Chem Biol**, v. 13, p. 839-47, 2006.
- 48 SILVA, Z. S., JR. et al. Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against *Streptococcus mutans* biofilms. **Sci Rep**, v. 6, p. 33270, 2016.
- 49 QIN, M. et al. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy†. **Photochem Photobiol Sci**, v. 10, p. 832-41, 2011.
- 50 AKILOV, O. E. et al. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. **Lasers Surg Med**, v. 41, p. 358-65, 2009.
- 51 DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, L. B. et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. **Nanotechnology**, v. 28, p. 065101, 2017.
- 52 SOUZA, D. M. et al. 5-ALA-mediated Photodynamic Therapy Reduces the Parasite Load in Mice Infected with *Leishmania braziliensis*. **Parasite Immunol**, 2016.
- 53 AKILOV, O. E. et al. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochem Photobiol Sci**, v. 6, p. 1067-75, 2007.
- 54 PINTO, J. G. et al. Chlorin E6 phototoxicity in *L. major* and *L. braziliensis* promastigotes-In vitro study. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 15, p. 19-24, 2016.

- 55 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. **Exp Dermatol**, v. 16, p. 651-60, 2007.
- 56 FINK, C. et al. Effective treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* with topical photodynamic therapy. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 14, p. 836-8, 2016.
- 57 SBEGHEN, M. R. et al. 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**, v. 6, p. 106-11, 2015.
- 58 SACKS, D.; ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunol Rev**, v. 201, p. 225-38, 2004.
- 59 DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- 60 PMC, E. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver... - Abstract - Europe PMC. 1995.
- 61 STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898-902, 1992.
- 62 GENESTRA, M. et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Arch Med Res**, v. 37, p. 328-33, 2006.
- 63 FAIRLAMB, A. H.; HENDERSON, G. B.; CERAMI, A. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, p. 2607-11, 1989.
- 64 MUTLU, O. Molecular modeling, structural analysis and identification of ligand binding sites of trypanothione reductase from *Leishmania mexicana*. **J Vector Borne Dis**, v. 50, p. 38-44, Mar 2013.
- 65 JAMES, E. R. Superoxide dismutase. **Parasitology Today**, v. 10, p. 481-484, 1994.
- 66 MULLER, S. et al. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 320-8, 2003.
- 67 COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radic Biol Med**, v. 95, p. 27-42, 2016.

- 68 CASTRO, H. et al. *Leishmania* infantum: provision of reducing equivalents to the mitochondrial trypanothione/trypanothione peroxidase system. **Exp Parasitol**, v. 120, p. 421-3, 2008.
- 69 VINCENTEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 9-12, 2003.
- 70 BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Rev Immunol**, v. 5, p. 641-54, 2005.
- 71 PELUFFO, G. et al. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Trends Parasitol**, v. 20, p. 363-9, 2004.
- 72 OLIVEIRA, H. C. et al. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. **Nitric Oxide**, v. 61, p. 10-19, Dec 30 2016.
- 73 MORENO, E. et al. Nanoparticles as multifunctional devices for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 11, p. 579-97, 2014.
- 74 SEABRA, A. B. et al. Nitric oxide-releasing polymeric nanoparticles against *Trypanosoma cruzi* - IOPscience. 2015 2015.
- 75 SASSI, A.; KAAK, O.; ELGAAIED, A. B. Identification of immunodominant *Leishmania* major antigenic markers of the early C57BL/6 and BALB/c mice infection stages. **Parasite Immunol**, 2015.
- 76 FELIZARDO, T. C. et al. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on *Leishmania amazonensis* dorsal skin--than on footpad-infected mice. **Exp Parasitol**, v. 130, p. 48-57, 2012.
- 77 PELOI, L. S. et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Exp Parasitol**, v. 128, p. 353-6, 2011.
- 78 GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol**, v. 34, p. 257-72, 1996.
- 79 KANAAN, S. A. et al. Hyperalgesia and upregulation of cytokines and nerve growth factor by cutaneous leishmaniasis in mice. **Pain**, v. 85, p. 477-82, 2000.
- 80 KARAM, M. C. et al. Atenolol Reduces *Leishmania* major-Induced Hyperalgesia and TNF- α Without Affecting IL-1 β or Keratinocyte Derived Chemokines (KC). **Front Pharmacol**, v. 7, 2016.
- 81 KARAM, M. C. et al. *Leishmania* major: low infection dose causes short-lived hyperalgesia and cytokines upregulation in mice. **Exp Parasitol**, v. 113, p. 168-73, 2006.

- 82 KARAM, M. C. et al. Interleukin-10 reduces hyperalgesia and the level of Interleukin-1beta in BALB/c mice infected with *Leishmania major* with no major effect on the level of Interleukin-6. **J Neuroimmunol**, v. 183, p. 43-9, 2007.
- 83 GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect Dis**, v. 7, p. 7, 2007.
- 84 AGOSTINIS, P. et al. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 250-81, 2011.
- 85 RAPOZZI, V.; DELLA PIETRA, E.; BONAVIDA, B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. **Redox Biol**, v. 6, p. 311-7, 2015.
- 86 KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **Int J Parasitol**, v. 37, p. 1087-96, 2007.
- 87 GENESTRA, M. et al. Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide (NO) production by *Leishmania* sp. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 18, p. 445-52, 2003.

ANEXO I –CEUA-IPEN/SP **Parecer - Projeto Nº 70/10 - CEUA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“ESTUDO DO EFEITO FOTODINÂMICO EM PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO CAUSADO POR PARASITAS DO GÊNERO LEISHMANIA SPP. : CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO”** de responsabilidade do pesquisador **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado APROVADO.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 20 de dezembro de 2010

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: nnascime@ipen.br