AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITO FOTODINÂMICO MEDIADO POR AZUL DE METILENO NA INATIVAÇÃO DE
LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS ESTUDO IN VITRO**

Débora Picanço Aureliano

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

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Coorientador:

Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

São Paulo

2015

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

**EFEITO FOTODINÂMICO MEDIADO POR AZUL DE METILENO NA INATIVAÇÃO DE
LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS ESTUDO IN VITRO**

Débora Picanço Aureliano

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

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Coorientador:
Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

AURELIANO, D. P. ***Efeito fotodinâmico mediado por azul de metileno na inativação de Leishmania (L.) amazonensis. Estudo in vitro***. 2015. 101 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aureliano, Débora Picanço

Efeito fotodinâmico mediado por azul de metileno na inativação de *Leishmania (L.) amazonensis*. Estudo in vitro / Débora Picanço Aureliano; orientadora Martha Simões Ribeiro; co-orientador José Angelo Lauletta Lindoso. -- São Paulo, 2015.

101 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2015.

1. efeito fotodinâmico. 2. *Leishmania*. 3. azul de metileno. 4. apoptose. I. Ribeiro, Martha Simões, orient. II. Lindoso, José Angelo Lauletta, co-orient. III. Título.

Efeito fotodinâmico mediado por azul de metileno na inativação de *Leishmania (L.) amazonensis*. Estudo *in vitro*

Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade terapêutica utilizada para causar morte celular baseada no uso de fármacos fotossensibilizadores e aplicação de luz com comprimento de onda adequado. No processo fotodinâmico, a molécula do fotossensibilizador (FS) é excitada para o seu estado singleto como resultado da absorção da luz gerando estresse oxidativo em diversas estruturas celulares, dentre elas a mitocôndria. A geração do estresse oxidativo pode induzir a resposta de morte por via apoptótica. Esse estudo tem como objetivo avaliar o tipo de resposta de morte celular em formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania (L.) amazonensis* submetidas à PDT utilizando o azul de metileno como FS. Para isso algumas condições como captação do FS pela célula, potência de irradiação (100 mW/ 250m W), concentração do FS (50, 100, 250 e 500 µM) e tempo de irradiação (60 s /300 s) foram testadas para compreender a resposta do parasito a esse desafio leishmanicida. Após essas etapas foi investigada a viabilidade das promastigotas por meio da atividade mitocondrial utilizando o MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Em seguida, a exposição de fosfatidilserina, a permeabilidade de membrana e a alteração de potencial de membrana da mitocôndria foram avaliados para analisar a via de resposta de morte celular provocada pela ação fotodinâmica e as possíveis mudanças morfológicas e ultraestruturais que esse parasito pudesse apresentar. Os resultados obtidos pelos testes “in vitro” de viabilidade celular (MTT) das promastigotas demonstra que a terapia consegue diminuir a atividade metabólica em até 80%, na condição de 50 µM - 100 mW/300s. Foi possível concluir que promastigotas de *L.(L.) amazonensis* sofrem dano celular provocado pelo estresse oxidativo. A morte celular desse parasito é possivelmente por via apoptótica. A análise por microscopia eletrônica de transmissão indica danos celulares como encolhimento celular, arredondamento, vacuolização do meio intracelular, perda de integridade do flagelo e migração da cromatina nuclear para a periferia da membrana do núcleo do parasito.

Photodynamic effect mediated by methylene blue on the inactivation of *Leishmania (L.) amazonensis*. An in vitro study

Abstract

The photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality used to cause cell death based on the substances with photosensitizing properties and application of a light with suitable wavelength. In the photodynamic process, photosensitizer (PS) molecule is excited to its singlet state as a result of light absorption generating oxidative stress on many cellular structures, among them the mitochondria. The oxidative stress may induce cell death by apoptosis. Thus, this study aims to evaluate the type of cell death in promastigotes forms of *Leishmania amazonensis* following PDT using the methylene blue as PS. For that certain conditions as PS uptake, power irradiation, PS concentration and irradiation time were tested to investigate the response of the parasite to this leishmanicidal challenge. After these steps, it has been investigated the viability of the promastigotes, the cell death response pathway caused by photodynamic challenge and the possible morphological and ultrastructural changes that this parasite could present. The results obtained by the in vitro cell viability tests (MTT) of promastigotes indicate that the therapy can reduce metabolic activity by up to 80%, in the condition of 50 μ M - 100 mW / 300s. It was concluded that *L. amazonensis* suffers cell damage caused by oxidative stress. The analysis by transmission electron microscopy indicated cell damage and cell shrinkage, rounding, vacuolization of the intracellular environment, scourge of integrity loss and migration of nuclear chromatin to the periphery of the membrane of the nucleus of the parasite.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos que amo incondicionalmente:

Minha amiga, companheira e estimada mãe Sra. Irene P. C. Aureliano,

Ao meu querido pai Sr. José Aureliano Filho,

Eu somente sou o que sou e cheguei onde cheguei, porque vocês me foram e são exemplos de luta, força, honestidade e amor incondicional mesmo diante das inúmeras dificuldades da vida! Obrigado por tudo o que vocês fizeram e fazem por minha felicidade. Eu amo vocês!

Ao meu querido amado e companheiro Prof. Dr. Thiago Martini Pereira,

Você me fez ir mais longe do que eu mesma imaginei que iria. Sempre acredita em mim até mesmo quando eu estou pra lá de Bagda (risos). Sempre me incentivando, aconselhando, acalmando e amando! Obrigado por ser esse ser humano maravilhoso! Esse trabalho é nosso... Eu te amo muito muito muito!

A minha querida "Vovis" Dona Rosa

Você é fortaleza e ao mesmo tempo a ternura que me inspira. Meu exemplo de amor, força, fé em Deus, dedicação em prol da família.

Te amo minha velhinha

Aos amados irmãos Carlos Eduardo e Fernando,

Amigos de todas e pra todas as horas! O que eu seria sem vocês dois... Amo vocês!

Aos amados e inocentes Jorge "o velhinho", Branquinha e Ameixa,

Amo tudo em vocês, das lambidas as rosnadas! Só quem tem peludos formidáveis como vocês sabem a alegria que se sente, ao receber uma lambida risonha e amorosa, depois de um final de semana inteiro escrevendo.

“...Não se cobre para criar algo inovador, apenas conecte os pontos.”

Maxie Matthiessen

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades.

Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguimos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

DALAI LAMA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”

William Shakespeare

À **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pela orientação científica, pelos conhecimentos transmitidos, pelo profissionalismo, pelas broncas, pelos conselhos de mulher e ao mesmo tempo acolhimento incondicional de mim como aluna, profissional e ser humano. Por me fazer amadurecer enormemente num ambiente científico informal, criativo e salutar. Pelos inúmeros debates acerca de ciência que tanto me foram valiosos. Deixo aqui minha declaração de imensa admiração e amizade por você.

Ao **Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso**, pela coorientação científica, pelos conhecimentos transmitidos, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis desse trabalho. Por ser sempre uma luz de conhecimento onde eu só via sombras. Pelas muitas risadas, alegria e bom humor. E por afirmar, sendo a pessoa que você é, me demonstrando que os humildes de postura são os verdadeiros detentores de conhecimento. Deixo aqui minha declaração de imensa admiração e amizade por você.

Aos amigos do coração **Camila Ramos “Camilones”** e **Claudinei Camargo “Claus”**, pela companhia nos vários congressos, viagens, pelas gargalhadas, broncas e pelo ombro amigo a qualquer momento. Pela amizade franca e sincera. Por me apoiarem e acreditarem em mim sempre. Vocês dois conseguiram fazer desse caminho um momento muito especial. *“...Ah se todos fossem iguais a vocês!”* Minha imensa amizade, admiração e carinho...Vocês moram no meu coração.

Às amigas **Joyce Dutra “Joba”**, **Elisabeth Dutra “Beth”** e **Antônia “Tonha”**, por toda a acolhida num momento complexo, pela amizade carinhosa, alegre companhia, novelas, bolos, bem casados...Pelos conselhos e momentos descontraídos! Vocês são incríveis! Minha eterna amizade e admiração.

Ao amigo **Rogério Ferreira, “Rô”**, ser humano incrível, por toda a acolhida em sua vida, pelo carinho, palhaçadas, amizade alegre e inspiradora...Por reconhecer, na pessoa imperfeita que sou, uma amizade sincera, autêntica e sem cobranças...Por todo amor e lições que você já me deu nessa vida...Um irmão de alma...Minha eterna admiração, amizade e carinho! Você é Petit Rogeriô mesmo!

AGRADECIMENTOS

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares** e ao **Centro de Lasers e Aplicações** que me acolheu no desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Instituto de Medicina Tropical da USP** e ao **Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia (LIM 38)** que me acolheu no desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa. Dra. Hiro Goto** pela oportunidade de poder desenvolver parte deste projeto dentro do Laboratório de soroepidemiologia e Imunobiologia. Obrigado por me acolher.

À **Dra. Sandra Regina**, a querida “madrinha”, pelos ensinamentos transmitidos desde o primeiro dia em que apareci no laboratório LIM 38. Pelos inúmeros ensinamentos laboratoriais, debates científicos estimulantes, conhecimentos valiosos de onde, como e com quem falar. Pela amizade, bom humor, sorrisos e risadas. Minha imensa gratidão, grande respeito e eterna amizade.

À querida **Elisabete Ourique de Mello**, pela amizade, alegria, risadas, apoio e convívio sempre agradável.

Aos caros e imprescindíveis amigos de trabalho do Centro de Lasers e Aplicações...alguns ainda estão neste caminho outros partiram para diferentes jornadas...**Alessandra, Amanda, Ana Claudia, Antônio, Cacau, Camila, Cassio, Claudinei, China, Danilo, Fernanda, Ilka, Jessica de Córdoba, Letícia, Lucas, Regiane, Renato, Rosa, Sayuri, Tania, Moises, Carol, Paulo, Vivi, Marcelo.** Agradeço pelas risadas, momentos de descontração, companheirismo, conversas criativas e ajudas inúmeras e preciosas. Sem a amizade de vocês essa jornada seria realmente árdua. Minha admiração e respeito por todos.

Às “**Angeletes**” - **Daiane, Renata, Ive, Simone** e companheiras de laboratório **Amandinha** por todas as risadas, almoços, bolos, dicas, ajudas e companheirismo. Sem vocês essa jornada não teria sido tão divertida. Minha eterna amizade.

Agradeço aos pesquisadores e a todos os funcionários **do Centro de Lasers e Aplicações** do IPEN.

Agradeço aos pesquisadores e a todos os funcionários do **Instituto de Medicina Tropical da USP e Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia (LIM 38)**.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de Doutorado e Instituto Nacional de Fotônica (573.916/2008-0)

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

SUMÁRIO

1 Introdução	20
1.1 Contextualização do problema.....	20
2 Revisão da Literatura	21
2.1 Epidemiologia	21
2.2 Agente etiológico e ciclo biológico.....	21
2.3 Apresentação Clínica	24
2.4 Terapêutica das leishmanioses	24
2.5 Terapia Fotodinâmica	25
2.6 Terapia fotodinâmica na redução antimicrobiana	27
2.7 Terapia Fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose Tegumentar.....	28
2.8 Via de morte celular programada	31
2.9 Vias de morte celular em protozoários do gênero Leishmania	32
2.10 Vias de morte celular e a Terapia Fotodinâmica	34
3 Objetivo Geral	36
3.1 Objetivos específicos	36
4 Material e Métodos.....	37
4.1 Parasitos de Leishmania (L.) amazonensis	37
4.2 Preparação do fotossensibilizador.....	39
4.3 Parâmetros de irradiação	40
4.4 Ensaio de captação do fotossensibilizador por promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis	42
4.5 Efeito fotodinâmico em promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis	43
4.6 Ensaio colorimétrico de MTT - Quantificação da viabilidade das promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis.....	44
4.7 Detecção de morte por apoptose em promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis	45

4.8. Citometria de Fluxo	45
4.8.1 Detecção de granulidade e formato das promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	45
4.8.2 Detecção de Apoptose por Anexina V/ FITC e Iodeto de Propídio (PI) em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	46
4.8.3 Detecção de alteração do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) por JC-1 em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> submetidas à PDT...	47
4.9 Avaliação das ultraestruturas das promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após PDT por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	48
4.10 Análise Estatística	49
5 Resultados e Discussão.....	50
5.1 Ensaios de captação de AM pelas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> ...	50
5.2 Avaliação dos parâmetros da terapia fotodinâmica em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	52
5.3 Ensaios para detecção de apoptose em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	62
5.3.1 Avaliação do tamanho das promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> após PDT.....	62
5.3.2 Avaliação de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídio (PI) em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> submetidas à PDT	66
5.3.3 Avaliação do potencial de membrana de mitocôndria por JC-1 em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> submetidas à PDT	71
5.3.4 Análise da morfologia e ultraestruturas das promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após PDT por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	75
6 Conclusões	87
7 Apêndice	88
7.1 Apêndice A.....	88
7.2 Apêndice B.....	89
7.3 Apêndice C.....	91

8 Referências bibliográficas	93
------------------------------------	----

Lista de Abreviações

μM: Micromolar

ALA: Ácido aminolevulínico

AM: Azul de Metileno

D/M: Dímeros/monômeros

D.O.: Densidade óptica

FITC: *Fluorescein isothiocyanate* (tradução: Isotiocianato de fluoresceína)

FS: Fotossensibilizador

LED: Light- emitting diode

LT: Leishmaniose tegumentar

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

MALA: Cloridrato de aminolevulinato de metila

MCs: Metacaspases

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium)

mW: Miliwatts

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida

nm: nanômetros

P.A.: Para análise

PBS: *Phosphate-buffered* saline (tradução: Tampão fosfato salino)

PDT: *Photodynamic therapy* (tradução: Terapia fotodinâmica)

PI: *Propidium iodide* (tradução: Iodeto de propídio)

PS: Fosfolipídio fosfatidilserina

ROS: *Reaction Oxygen Species* (tradução: Espécies reativas de oxigênio)

SFB: Soro fetal bovino

SDS: Dodecil sulfato de sódio

Lista de Figuras

Figura 1: Formas amastigotas e promastigotas de <i>Leishmania spp.</i> (Fonte: Ministério da Saúde 2006).	22
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i> (Fonte: Center of Disease Control & Prevention. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm)	23
Figura 3: Esquema do delineamento experimental com todas as etapas realizadas neste estudo.....	37
Figura 4: Tubos contendo o corante de azul de metileno previamente diluído nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM.	39
Figura 5: Fórmula química do fotossensibilizador Azul de Metileno utilizado neste estudo.	40
Figura 6: Imagem do dispositivo LED 630 (MMoptics).....	40
Figura 7: Figura adaptada esquematizando os espectros de emissão do LED com suas específicas faixas de potência. A linha em azul demonstra a sobreposição do espectro de absorção do corante AM com a emissão do LED 630. Observa-se que o LED excita as duas principais banda de absorção, em $\lambda \cong 664$ nm, na forma de monômeros e $\lambda \cong 610$ nm, na forma de dímeros do corante. Figura adaptada de Silvia Nuñez, 2007.	41
Figura 8: Esquema de placa utilizada para a o teste de captação de AM por <i>Leishmania spp.</i> Cada poço continha 1×10^7 de promastigotas (<i>L. (L.) amazonensis</i>) com AM diluído em PBS nas concentrações acima descritas. Os parasitos foram deixados em contato com o AM de acordo com os tempos de 10, 30 e 60 minutos.	43
Figura 9: Resultados dos ensaios de captação de AM por promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (Barras coloridas representam a média do número de moléculas de AM/promastigotas, n=21). Barras de erro representam o desvio padrão. Ensaios realizados em septuplicata em três dias diferentes. Os símbolos iguais representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).....	50
Figura 10: Análise estatística entre as concentrações utilizadas por tempos testados dos resultados dos ensaios de captação de AM nas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (Barras coloridas representam média do número de moléculas de AM/promastigotas, n=21). Barras de erro representam desvio padrão. Ensaios	

realizados em septuplicata em três dias diferentes. Os símbolos iguais representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).....	51
Figura 11: Médias de viabilidade celular das promastigotas de <i>L.amazonensis</i> (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de AM, tempo de irradiação de 60 s, LED (P= 100 mW, D= 20 J/cm ²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam o erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).	53
Figura 12: Médias de viabilidade celular das promastigotas de <i>L.amazonensis</i> (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 300s, LED (P= 100mW, D= 100J/cm ²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).....	55
Figura 13: Médias de viabilidade celular das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 60 s, LED (P= 250 mW, D= 50 J/cm ²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).....	56
Figura 14: Médias de viabilidade celular das promastigotas de <i>L.amazonensis</i> (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 300 s, LED (P= 250 mW, 250 J/cm ²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Barras azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).....	57
Figura 15 (gráficos A e B): Médias de viabilidade celular das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após PDT usando diferentes concentrações de AM, potências do LED 100 mW e 250 mW, respectivamente, e tempos de 60 s e 300 s. Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	58
Figura 16: Efeito das diferentes energias na viabilidade celular das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após PDT, nas concentrações de 50 µM e 100 µM de AM. Barras pretas indicam erro padrão dos resultados.....	59

Figura 17: Detecção de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliados pelo espalhamento da luz por meio de citometria de fluxo. A. Controle sem tratamento. B. Controle com Luz – Análise de irradiação com potência de 250 mW e tempo de exposição de 300s. C e D. Análise após captação (10 min) de AM nas concentrações de 50 µM e 100 µM. E e F. Análise após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 µM e 100 µM, LED irradiando na potência de 250 mW e tempo de exposição de 300s.....63

Figura 18: Porcentagem do volume celular de amostras de promastigotas (pro) de *L. amazonensis* calculadas de 10.000 eventos. As amostras (pro + luz) foram irradiadas por 300 s (LED λ =645nm/ P=250mW).....65

Figura 19: Detecção da exposição de fosfatidilserina e permeabilidade de membrana, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo método de Anexina V e PI por citometria de fluxo. A. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* sem marcação. B. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* com marcação. C. Controle de Apoptose - Promastigotas de *L. Amazonensis* sob indução de apoptose por camptotecina (5 µM /3h/ 37°C). D e E. Controle com Luz – Promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100 mW/250 mW) e tempos de exposição (300 s). F e G. Promastigotas de *L. Amazonensis* após captação (10 min) de AM nas concentrações de 50 µM e 100 µM. H e I. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 µM e 100 µM, LED irradiando na potência de 100 mW. J e K. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 µM e 100 µM, LED irradiando na potência de 250 mW.71

Figura 20: Detecção de alteração do $\Delta\psi_m$, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo ensaio de JC-1 por citometria de fluxo. **A** e **B**. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* não tratadas sem marcador JC-1 e na presença de JC-1. **C**. Controle com Camptotecina (Cpto) 5µM. **D** e **E**. Controle com Luz – Promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100mW e 250mW) e tempos de exposição de 300s na presença de JC-1. **F** e **G**. Controle com AM - Promastigotas de *L. Amazonensis* após captação do fotossensibilizador AM (10 min) nas concentrações de 50µM e 100µM, na presença de JC-1. **H** e **I**. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50µM e 100µM, LED irradiando na

potência de 100mW, na presença de JC-1. J e K. Promastigotas de <i>L. Amazonensis</i> após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50µM e 100µM, LED irradiando na potência de 250mW, na presença de JC-1.	74
Figura 21: Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Imagens – A/B/C <i>L. amazonensis</i> sem tratamento. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar.	77
Figura 22: Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Imagens – D-H <i>L. amazonensis</i> após irradiação de LED 645 nm (100 mW/ por 5 min). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar.....	78
Figura 23: Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Imagens – I-K. <i>L. amazonensis</i> tratadas com AM (50 µM por 10 min). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar; F - Flagelo.	79
Figura 24: Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Imagens – L - Z. <i>L. amazonensis</i> após PDT (50 µM AM, uptake10 min; LED com P=100 mW/5 min). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). C – Cinetoplasto; F – Flagelo; L – lipídios; M – Mitoc ôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar; * – vacúolos; - visículas.	85

1 Introdução

1.1 Contextualização do problema

Sabe-se, atualmente, que mais de 12 milhões de indivíduos encontram-se infectados por parasitos do gênero *Leishmania*, com no mínimo 2 milhões de casos novos ocorrendo anualmente e 350 milhões de pessoas vivendo em área de risco de leishmaniose. A doença ocorre geralmente em áreas de extrema pobreza no mundo, com desigualdades sociais evidentes e ocupação geográfica irregular e exploratória. As leishmanioses são consideradas pela OMS, um problema mundial de saúde pública. É considerada uma doença negligenciada devido à falta de investimentos em terapêutica e inovações.

O tratamento da leishmaniose no Brasil e no mundo, atualmente, ainda se baseia em três principais fármacos: antimonial pentavalente, anfotericina B e pentamidina. Além desses fármacos de uso sistêmico, a miltefosina também vem sendo empregada no tratamento de diferentes formas clínicas da leishmaniose. Apesar de termos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, nenhum deles foi desenvolvido especificamente para leishmaniose. Outra lacuna importante no tratamento das leishmanioses, deve-se ao fato de que esses fármacos apresentam toxicidade elevada, tempo de tratamento prolongado, contra-indicações de uso e aparecimento de cepas resistentes.

Estes fatos juntos, reforçam a necessidade de desenvolvimento de novas opções terapêuticas, com a descoberta de novos fármacos e também a busca por modalidades de tratamento menos tóxicas, porém com eficácia comprovada. Neste contexto, a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa às atuais terapias empregadas, visto que pode ser utilizada como tratamento local e ainda ser efetiva contra diferentes espécies de *Leishmania* por ter um mecanismo de indução de espécies reativas de oxigênio, que podem agir indiscriminadamente sobre diferentes patógenos e consequentemente, diferentes espécies de *Leishmania*.

Entretanto, poucos estudos “*in vitro*” são realizados para esclarecer quais os mecanismos de ação da PDT sobre parasitas do gênero *Leishmania*, foco deste estudo.

2 Revisão da Literatura

2.1 Epidemiologia

As leishmanioses são enfermidades de grande importância em saúde pública, com ampla distribuição geográfica, encontradas na África, Ásia, Europa, Oriente Médio e nas Américas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). São endêmicas das áreas tropicais, subtropicais e sudoeste da Europa, estendendo-se desde as florestas tropicais da América do Sul até os desertos no ocidente da Ásia (HERWALDT, 1999).

2.2 Agente etiológico e ciclo biológico

Essas doenças são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae (GOTO H; LAULETTA LINDOSO, 2012). Atualmente, em todo o mundo, são conhecidas cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania*. Um total de 21 espécies desse gênero foram identificadas como patogênicas para o homem, tais como *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) infantum*, *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*. Na forma tegumentar, as espécies causadoras podem pertencer tanto ao subgênero *Leishmania* quanto ao subgênero *Viannia*. Nas Américas do Sul e Central, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por 11 espécies de *Leishmania*, sendo as mais comuns: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* (LAINSON; SHAW, 2010).

O protozoário apresenta duas formas morfológicas distintas: uma com pequeno flagelo intracelular denominada amastigota (Figura 1A), que mede 2-4 µm de diâmetro, observada nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados, onde ocorre sua multiplicação. A outra forma é flagelada extracelular denominada promastigota (Figura 1B), que mede 15-20 µm x 1,5-3,5 µm com 15-28 µm de flagelo, encontrada no tubo digestivo da fêmea do flebotomíneo e também em meios de cultivo. Tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas podem ser cultivadas *in vitro*, mas

as formas promastigotas são as mais comumente utilizadas em estudos farmacológicos, genéticos, imunológicos e vacinais (LAINSON; SHAW, 2010).

As formas em fase estacionária (promastigotas metacíclicas) de *L. (L.) amazonensis* foram definidas para o cultivo e utilização em todos os ensaios clínicos deste estudo. Essa escolha se fez devido a alguns fatores relevantes como, o cultivo desta forma ser bem padronizado e difundido na literatura (SCHUSTER; SULLIVAN, 2002); seu tempo de crescimento, para alcançar o período mais infectante, onde se encontram a maior quantidade de formas promastigotas metacíclicas, que é em torno de 4 dias para a *L. (L.) amazonensis*, o que facilitou a obtenção das formas para os ensaios. Ademais, a literatura científica demonstra que tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas desses protozoários possuem mais de 94% de similaridade genética em seu DNA (ácido desoxirribonucleico) e seu RNA (ácido ribonucleico) apresenta similaridades de aproximadamente 97% (LEIFSO et al., 2007).

Figura 1: Formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* spp. (Fonte: Ministério da Saúde 2006).

Todos os organismos deste grupo são reconhecidos como parasitas obrigatórios e heteroxênicos por apresentarem necessidade de relacionamento com dois tipos de hospedeiros, um invertebrado e o outro vertebrado.

A *Leishmania* é transmitida, principalmente, pela picada do flebotomíneo fêmea, conhecido popularmente no Brasil como mosquito palha. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea inocula, junto com a saliva, formas promastigotas metacíclicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Estas formas, na pele, são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas. As amastigotas multiplicam-se no

interior das células infectadas e podem afetar diferentes tecidos, dependendo da espécie de *Leishmania*, originando as diferentes manifestações clínicas. Os flebotomíneos se infectam durante os repastos realizados em hospedeiro vertebrado infectado, quando ingerem macrófagos com as formas amastigotas do parasito (BASANO, 2004).

No intestino do inseto, o parasito se diferencia em promastigotas, que se multiplicam e migram para a probóscide e quando realizam o repasto regurgitam junto com a saliva as formas infectantes contaminando o hospedeiro como demonstrado na Figura 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Os hospedeiros vertebrados podem ser animais silvestres como gambás, cuícas, lobos, preguiça, quatis e animais domésticos como cães (*Canis lupus familiares*) e gatos (*Felis silvestres catus*), ou ainda o homem.

Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania* spp (Fonte: Center of Disease Control & Prevention. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm>)

2.3 Apresentação Clínica

As leishmanioses caracterizam-se por diferentes apresentações de formas clínicas dependendo da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro (LAINSON; SHAW, 2010 ; GOTO H, LAULETTA LINDOSO, 2012)). Na leishmaniose cutânea, ocorre uma lesão na pele no local da picada do inseto. Na maioria dos casos, a lesão torna-se ulcerosa e com as bordas elevadas. Essa lesão pode permanecer única, mas, em situações em que macrófagos infectados transportam o parasito para outras partes do corpo, podem se estabelecer lesões secundárias. Quando a infecção é causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *L (V.) guyanensis*, pode haver comprometimento de mucosa, secundariamente (LAINSON; SHAW, 2010).

Outras espécies podem produzir uma condição mais grave e aparentemente incurável em indivíduos que não conseguem mediar uma resposta imune contra o parasito, desenvolvendo um grande número de lesões nodulares, denominada leishmaniose cutâneo difusa, sendo que a única espécie causadora desta forma clínica, no Brasil, é a *Leishmania (L.) amazonensis*; objeto de nosso estudo. Outra manifestação da doença é a leishmaniose visceral, na qual os parasitos apresentam tropismo por órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, tal como fígado, medula óssea, baço e tecidos linfoides (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Essa doença apresenta ampla distribuição com registro de casos em praticamente todas as regiões brasileiras.

2.4 Terapêutica das leishmanioses

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza alguns principais fármacos para o tratamento da leishmaniose, independentemente de sua forma clínica, que são: antimoniais pentavalentes (Glucantime®), anfotericina B e pentamidina. Entretanto,

todos os fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, seja o antimônio pentavalente, a anfotericina B ou a pentamidina, possuem várias restrições em relação a sua aplicação, tais como dificuldade na administração, toxicidade, efeitos adversos, ou ainda o desenvolvimento de possível resistência.

Essa zoonose, há muito tempo, vem recebendo pouca atenção e recursos para a pesquisa clínica e de desenvolvimento terapêutico, uma vez que a grande parte dos casos acontece em regiões de muita e/ou extrema pobreza. Contudo, o que há algum tempo atrás era tratado com considerável sucesso terapêutico pelos antimoniais, atualmente não vem conseguindo o mesmo desempenho.(AURELIANO et al., 2014; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014)

Na busca por novas opções terapêuticas, atualmente a miltefosina, um fármaco de uso oral, vem sendo empregado no tratamento do calazar indiano. No Brasil esse fármaco mostrou-se eficaz no tratamento de LTA (CHRUSCIK-TALHARI ET AL., 2011; MACHADO ET AL., 2010). Além de outros medicamentos, novas formas de terapia têm sido apontadas como tratamentos adjuntos, que podem colaborar como diferentes alternativas para potencializar, e até mesmo suprir, a falta de novos medicamentos leishmanicidas.

Em 2010, a Organização Mundial de Saúde recomendou o uso de terapias alternativas, em determinadas apresentações clínicas do tratamento tópico seja com fármacos (imiquimode/paramomicina), ablação química ou térmica (crioterapia/termoterapia) (WHO TECHNICAL REPORT SERIES, 2010). Desse modo, tem sido estimulada a busca por novos tratamentos locais que possam apresentar menos efeitos adversos. Focando essa problemática, uma das possíveis opções atuais é a Terapia Fotodinâmica (PDT) que vem apresentando resultados promissores no tratamento da leishmaniose e de outras doenças dermatológicas (AURELIANO et al., 2014; KHARKWAL et al., 2011).

2.5 Terapia Fotodinâmica

A PDT é uma modalidade terapêutica utilizada para causar morte celular baseada no uso de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e aplicação de uma luz com comprimento de onda adequado. No processo fotodinâmico, como mostra a figura 3, a molécula do fotossensibilizador (FS) é

excitada para o seu estado singleto como resultado da absorção da luz. Após sofrer decaimento para o estado tripleto via cruzamento intersistemas, o FS pode transferir energia para o oxigênio molecular (reação do tipo II) ou pode participar de um processo de transferência de elétrons que leva à formação de radicais (reação do tipo I). Estas transferências resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido, radicais hidroxila e oxigênio singleto, que possuem efeitos citotóxicos e podem levar à morte celular (KHARKWAL et al., 2011; PRATES et al., 2013).

Figura 3: Esquema do mecanismo fotoquímico da PDT.

Diversos sítios celulares podem ser afetados pelo estresse oxidativo gerado pelo efeito fotodinâmico, dentre eles componentes lipídicos das membranas lipoproteicas, a membrana externa de mitocôndrias, o retículo endoplasmático e lisossomos (AGARWAL et al., 1992; BERG; MOAN, 1997; GIROTTI, 2001; GREBENOVÁ et al., 2003). Como consequência, vários sinais de dano são emitidos e induzem as células afetadas a iniciar um processo de reparo ou

caminhar para a morte celular, tanto por necrose como por morte programada (MOOR, 2000). Os tipos de danos e as respostas celulares ao efeito fotodinâmico são dependentes principalmente da localização do FS na célula, porém o tipo de FS utilizado, condições de iluminação, tipo de células alvo, concentração do FS e estado de oxigenação do tecido também são fatores determinantes neste processo (MOOR, 2000).

2.6 Terapia fotodinâmica na redução antimicrobiana

Na última década, tanto o encontro de bactérias resistentes Gram-positivas e Gram-negativas a antibióticos de amplo espectro, quanto à resistência de outros patógenos como fungos, vírus e parasitos aos medicamentos disponíveis para seus tratamentos, impulsionou um movimento científico na busca de terapêuticas alternativas. Essas terapias são estudadas com o intuito de desenvolver não somente fármacos, mas também novas metodologias de inativação e morte desses microrganismos (JORI et al., 2001; SILVIA CRISTINA NÚÑEZ, MARTHA SIMÕES RIBEIRO, 2013).

A PDT é uma das modalidades de tratamento com vários relatos sobre a sua capacidade de inativação de bactérias resistentes, a exemplo das *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* entre outras (JORI et al., 2001; SILVIA CRISTINA NÚÑEZ, MARTHA SIMÕES RIBEIRO, 2013).

Dentre os microrganismos patógenos, os fungos são considerados uns dos mais resistentes aos fármacos de última geração e estudos com PDT demonstram capacidade de fotoinativação de fungos como *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Tinea rubrum*. Acrescentando a esses relatos, essa terapia também apresenta resultados interessantes quanto a sua utilização para fotoinativação de vírus como os causadores da herpes genital e o do HPV humano (JORI et al., 2001; SILVIA CRISTINA NÚÑEZ, MARTHA SIMÕES RIBEIRO, 2013).

A efetividade da terapia fotodinâmica depende do comprimento de onda da fonte de luz utilizada, da dose de energia entregue ao tecido e do tempo de exposição. Outros fatores a serem destacados são o FS de escolha e a adequação do tempo de captação do fármaco pelo tecido e/ou microrganismo para que alcance concentração ideal e ocorra o desencadeamento do processo fotodinâmico (JORI

et al., 2001; ORIORDAN; AKILOV; HASAN, 2005; SILVIA CRISTINA NÚÑEZ, MARTHA SIMÕES RIBEIRO, 2013).

Em meio a todas as áreas de pesquisas que envolvem a terapia fotodinâmica, um dos campos que concentram muitos esforços é o dos fotossensibilizadores (CASSIDY et al., 2009; HAMBLIN; HASAN, 2004). Dentre os FS pesquisados, o azul de metileno é um dos mais utilizados para a fotoinativação microbiana e sua alta efetividade já foi demonstrada em bactérias, fungos e vírus (AURELIANO et al., 2014; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; JORI et al., 2001; PRATES RENATO ARAUJO, 2010; TARDIVO et al., 2005; WAINWRIGHT, 2004).

O corante azul de metileno (AM) é um composto pertencente à família das fenotiazinas que possui, em solução aquosa, duas bandas principais de absorção na região visível do espectro eletromagnético, uma referente ao componente monomérico ($\lambda_{\text{max}} \sim 660 \text{ nm}$) e outra da sua forma dimerizada ($\lambda_{\text{max}} \sim 610 \text{ nm}$) (WAINWRIGHT, 2004). Dentre as duas formas citadas, sabe-se que os monômeros de AM são mais efetivos, quando aplicados em tratamentos médicos, em relação a seu dímero. Esse corante apresentar diversas características favoráveis ao efeito fotodinâmico, considerado seguro para as aplicações da PDT *in vivo*, visto que sua utilização é consagrada em diversos procedimentos na área médica. É importante salientar também que a fotoinativação de fungos, bactérias e parasitos com o AM pode ser realizada de forma seletiva quando comparada às células epiteliais (WAINWRIGHT, 2004).

2.7 Terapia Fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose Tegumentar

Devido à ampla capacidade de inativar diferentes microrganismos, como bactérias, vírus e fungos que acometem e causam doenças nos seres humanos, a PDT tem sido bastante utilizada, principalmente em doenças que acometem o tecido cutâneo. Atualmente, tem sido investigada a capacidade dessa terapia em inativar parasitas, tanto "*in vitro*" quanto "*in vivo*", em animais e seres humanos.

Há relatos na literatura que descrevem sobre o tratamento de pacientes com leishmaniose por meio da PDT (ASILIAN; DAVAMI, 2006; ENK et al., 2003;

GARDLO et al., 2003). Um dos primeiros estudos foram realizados pelos grupos de Enk e de Gardlo, em 2003. Ambos os estudos relataram o uso de ALA e MAL, combinada com luz vermelha. No estudo desenvolvido por Enk e colaboradores, foi avaliado o tratamento de 32 lesões de LT de 11 pacientes israelenses. O diagnóstico foi realizado por meio da verificação da presença amastigota no exame direto das lesões parasitadas por espécies de *Leishmania* do velho mundo. Este trabalho mostrou que cerca de 96% das lesões foram curadas, deixando apenas cicatrizes leves e uma certa pigmentação cutânea em lesões antigas. Apenas uma lesão apresentava formas amastigotas após a PDT.

Gardlo e colaboradores, em 2003, publicou o caso de uma paciente de 34 anos, com LT confirmada por histologia. De acordo com os autores, a paciente desenvolveu resistência ao tratamento com estibogluconato de sódio. Esta apresentava dez lesões, que foram tratadas cinco vezes com PDT e cinco vezes com uma pomada composta de desulfato de paromomicina. O resultado obtido foi semelhante ao trabalho anterior e mostrou que as cinco úlceras tratadas com PDT cicatrizaram sem a presença de amastigotas, enquanto duas úlceras tratadas com paromomicina parcialmente responderam ao fármaco, uma delas não respondeu e duas lesões não apresentaram formas amastigotas. As úlceras que não responderam ao tratamento com pomada de paromomicina foram subsequentemente tratadas com PDT e cicatrizaram com sucesso.

Asilian e Davami, em 2006, realizaram um ensaio clínico aleatório e controlado por placebo, que forneceu evidências a cerca da eficácia da PDT no tratamento da LT. Sessenta pacientes com LT, confirmada por diagnóstico clínico e parasitológico, foram separados em 3 grupos com diferentes tratamentos. O grupo 1 foi tratado com PDT uma vez por semana; o grupo 2 recebeu uma pomada contendo paramomicina mais cloreto de metilbenzetônio duas vezes ao dia, e no grupo 3 foi utilizada uma pomada placebo com o mesmo tempo de aplicação do grupo 2. Durante quatro semanas, os grupos receberam os tratamentos descritos acima. Concluiu-se que a porcentagem de cura foi de 93,5% nos pacientes do grupo 1; 41,2% do grupo 2 e 13,3% do grupo 3. Ao mesmo tempo, 100%, 64,7% e 20% das lesões tiveram cura parasitológica nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

Outros estudos realizados no Irã e Alemanha corroboram com os resultados descritos acima. De acordo com os autores, a PDT mostrou ter a capacidade para

tratar feridas causadas por espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Destacamos que a maioria dos estudos afirma que esta modalidade terapêutica pode alcançar resultados superiores a 90% de cicatrização das feridas de LT. No entanto, uma ressalva deve ser feita, uma vez que alguns destes estudos indicam que nem todas as feridas cicatrizadas tornam-se livres dos parasitos (ENK et al., 2013; GARDLO et al., 2003).

Song e colaboradores relataram um dos poucos casos de LT do Novo Mundo descritos na literatura no qual foi aplicada a PDT como tratamento adjuvante. Foi o caso de um paciente brasileiro que apresentava leishmaniose cutânea, confirmada por esfregaço. A PDT foi aplicada usando o corante AM. Neste caso específico, devido a preocupações éticas ocasionadas pela possível evolução da doença para a forma mucocutâneo, o paciente recebeu concomitantemente uma baixa dose de antimônio. O paciente apresentava duas úlceras, uma delas foi realizada a PDT e a outra foi tratada com baixa dose de pentavalente. O tratamento apresentou 100% de cura em ambas as lesões, mas as lesões tratadas com PDT apresentaram uma recuperação mais rápida da ferida em comparação com o antimônio isoladamente (SONG et al., 2011a).

Esta breve consideração sobre a PDT demonstra a capacidade desta modalidade terapêutica quando utilizada no tratamento da LT. Além disso, encoraja a sua aplicação como uma terapia adicional e possivelmente, no futuro, em substituição aos fármacos leishmanicidas atualmente disponíveis. Também estimula a pesquisa na procura de novos protocolos, o que poderia garantir não só a cicatrização das feridas leishmanióticas, mas também a cura clínica e parasitológica.

As diferentes terapêuticas utilizadas no tratamento da leishmaniose tem vias de ação sobre o parasito de forma distinta. Sabidamente, miltefosina induz a morte de *Leishmania* por apoptose (PARIS et al., 2004), entretanto outros fármacos alteram a permeabilidade da membrana do parasito induzindo a morte por rompimento celular. Apesar de já haver descrição da ação de PDT sobre *Leishmania*, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o mecanismo de indução de morte não está claro, sendo uma possível via de morte do parasito, a apoptose.

2.8 Via de morte celular programada

O processo organizado e não inflamatório de morte denominado de apoptose ocorre em células privadas de fatores de manutenção de sobrevivência, células senescentes ou ainda danificadas. Esse processo acaba por desencadear a fragmentação do DNA nuclear e a degradação das estruturas intracelulares. Morfologicamente, está associado com a retração das células e agregação das organelas, condensação da cromatina seguida de periferização e agregação à carioteca, fragmentação do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, não havendo, porém, fragmentação e/ou rompimento da membrana celular (KESSEL; OLEINICK, 2010).

As duas principais famílias de proteínas que estão diretamente envolvidas na apoptose são a família Bcl-2, que controla a integridade da membrana mitocondrial, e as caspases, que participam ativamente da cascata de reações que finalizam com a desorganização do núcleo da célula (SHAH, 2006).

A apoptose pode ser desencadeada por diferentes vias: via extrínseca, que ocorre pela ligação de receptores de morte na membrana plasmática (receptores de morte pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral – TNF- α) via intrínseca, que envolve a liberação de fatores pró-apoptóticos (por exemplo citocromo c) da mitocôndria para o citosol. As duas vias provocam a ativação de caspases (*cysteine aspartic acid-specific proteases*, tradução: proteases específicas para cisteína e ácido aspártico). Estas existem na forma inativa (denominadas pró-caspases) e quando ativadas são capazes de provocar alterações na morfologia celular. Podem ser do tipo iniciadoras, formadas a partir da ocupação de receptores na membrana celular (caspases 8, 9 e 10), ou efetoras (caspases 3, 6 e 7), ativadas pelas caspases iniciadoras e responsáveis pela destruição da célula, pois possuem um domínio N- terminal curto denominado DED (domínio efetor de morte) que provoca a fragmentação nuclear e a degradação do citoesqueleto (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003; LOGUE; MARTIN, 2008).

Em revisão sobre os mecanismos de morte celular desencadeados pela PDT, Agostinis e colaboradores, em 2007, apontam que esta terapia parece interferir diretamente na via intrínseca da apoptose, por promover aumento da

permeabilidade mitocondrial devido a ação das ROS, com subsequente liberação de fatores ativadores das caspases, como citocromo c. Concomitantemente, as células fotossensibilizadas exibem colapso do potencial de membrana mitocondrial e queda de ATP na mitocôndria, levando a célula ao desequilíbrio e morte. Nesse trabalho é destacado que o mecanismo exato de como a PDT contribui diretamente para esse aumento de permeabilidade mitocondrial não é totalmente conhecido, mas há indícios de que esse mecanismo esteja ligado à afinidade de algumas proteínas de membrana mitocondrial a agentes fotossensibilizadores, bem como à sensibilidade dos poros à fotoxidação, principalmente ao oxigênio singlete (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

2.9 Vias de morte celular em protozoários do gênero *Leishmania*

Estudos descrevem que a morte celular por apoptose em eucariontes unicelulares possuem algumas diferenças quando comparados à morte programada, principalmente à apoptose de seres eucariontes pluricelulares. Tanto os motivos para a ocorrência desse tipo específico de morte, quanto às proteínas que possivelmente estão envolvidas nessa situação biológica, vem sendo investigados por pesquisas em áreas biológicas básicas (DEBRABANT et al., 2003; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010).

Diversos fatores podem induzir à morte das *Leishmanias* por via apoptótica, dentre estes, destaca-se a mudança de temperatura durante o seu ciclo de vida, variando desde a temperatura no interior do vetor invertebrado (22-28 °C) até a temperatura do hospedeiro mamífero (34-37 °C) (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; WANDERLEY et al., 2005). Outros fatores também podem induzir a apoptose, tais como fármacos: miltefosina (PARIS et al., 2004; VERMA; SINGH; DEY, 2007a) e Curcumina, um composto de polifenóis responsável pela geração de ROS (DAS; MUKHERJEE; SHAHA, 2001).

Apesar de estudos descreverem que a apoptose encontrada nesses parasitas seja semelhante à descrita para mamíferos (ALZATE et al., 2006; ARNOULT et al., 2002), pouco foi desvendado sobre as vias e as proteínas

envolvidas. Comparações entre genomas revelaram que a grande maioria das proteínas (especialmente as da via Bcl-2/Bax) envolvidas na apoptose de mamíferos aparentemente não são codificadas no genoma de *Leishmania* ou de outros protozoários relacionados (KANELLOPOULOS et al., 2014).

No gênero *Leishmania*, uma das principais famílias de proteínas envolvidas nessa cascata de eventos, as caspases, são substituídas pelas chamadas metacaspases (MCs), proteínas que estão diretamente relacionadas à morte programada em plantas, fungos e protozoários (MESLIN et al., 2011). Em termos de sequência, as MCs tem pouca similaridade com as caspases, mas predições de estrutura secundária indicam que as MCs possuem dobramentos similares a caspase-3 e a caspase-1 (UREN et al., 2000). Em relação a sua função e atividade, verificam-se grandes diferenças entre MCs e caspases. Enquanto caspases apresentam especificidade por substratos com um ácido aspártico na posição P1, MCs de algumas plantas possuem especificidade por substratos com arginina/lisina (VERCAMMEN et al., 2004, 2006).

Parasitas do gênero *Leishmania* exploram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferarem no hospedeiro. As formas apoptóticas de promastigotas são sempre destinadas à morte, e provocam a síntese de TGF- β pelo macrófago, inibindo sua atividade inflamatória e colaborando para a sobrevivência dos parasitas não apoptóticos (EL-HANI et al., 2012; LÜDER et al., 2010). Realmente, estudos indicam que um inóculo de promastigotas viáveis sem exposição de PS não minimiza a síntese de NO pelo macrófago e com isto os parasitas são destruídos, não havendo geração e multiplicação de amastigotas e progressão da doença (WANDERLEY et al., 2005). A exposição de PS contribui assim para a infectividade dos promastigotas, e é mais elevada na fase estacionária, onde há maior quantidade de promastigotas metacíclicos (forma infectiva) (TRIPATHI; GUPTA, 2003).

2.10 Vias de morte celular e a Terapia Fotodinâmica

Os mecanismos de morte celular envolvidos no efeito fotodinâmico ainda não foram por inteiro esclarecidos. Simultaneamente em que avançam os estudos clínicos e pesquisas de novas metodologias de administração de PDT, de FS e de fontes de irradiação, as pesquisas em áreas biológicas básicas também são desenvolvidas com o intuito de ampliar o conhecimento do comportamento de células e de tecidos frente ao desafio da PDT.

O nível de destruição tecidual e de citotoxicidade após a PDT vai depender da estrutura molecular do FS, de sua localização no momento da irradiação, da dose administrada, do tempo de exposição à luz, do tipo de tecido e/ou célula e do seu nível de oxigenação.

Um dos efeitos da PDT na célula consiste em causar destruição da proteína Bcl-2, uma proteína regulatória da permeabilidade da membrana mitocondrial (LAM; OLEINICK; NIEMINEN, 2001; MOOR, 2000). A PDT também provoca dano seletivo à mitocôndria e pode iniciar uma resposta apoptótica rápida se boa parte das proteínas necessárias ao ciclo apoptótico estiverem intactas; do contrário, resposta necrótica poderá ocorrer (LAM; OLEINICK; NIEMINEN, 2001).

As ROS geradas durante o processo fotodinâmico ativam cascatas de sinalização celular que podem levar à morte por uma ou mais vias de morte celular. Por serem espécies de meia vida muito curta, em especial o oxigênio singlete, a ação das ROS acaba por se restringir ao local em que o FS se localiza. Assim os FS fenotiazínicos, como o AM, que têm preferência por organelas ácidas como a mitocôndria, podem levar à morte celular principalmente por apoptose (ALMEIDA et al., 2004).

Assim, sugerimos que a PDT induza a morte da *Leishmania* por ação direta ou ainda pela ativação dos macrófagos com liberação de óxido nítrico e consequente morte do parasito.

O estudo do efeito do AM em parasitos do gênero *Leishmania* tem fundamental importância, onde os poucos trabalhos que reportam a PDT para tratamento da leishmaniose cutânea utilizam o precursor de protoporfirina IX, que é um cromóforo endógeno, sendo estudado em aplicação tópica. Porém, testes

com outros tipos de FS são pouco descritos na literatura. Diante desse cenário, são necessários estudos mais aprofundados dos parâmetros de irradiação e de utilização do AM em espécies como a *L (L.) amazonensis*. Junto a estes conhecimentos, é de suma importância para compreensão da ação fotodinâmica o mecanismo de ação dessa terapia sobre o parasito, se ocorre o desencadeamento de morte programada e qual a possível via ativada.

3 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre as formas promastigotas metacíclicas *L. (L.) amazonensis* e investigar os mecanismos de morte desencadeados pelo efeito fotodinâmico mediado pelo azul de metileno.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a captação do azul de metileno, usando como ferramenta a espectroscopia de absorção, em relação ao tempo de pré-irradiação e à concentração do fotossensibilizador, para viabilizar a inativação das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por PDT;
- Investigar os parâmetros de irradiação adequados, utilizando uma fonte de luz LED emitindo em $\lambda=645 \pm 15$ nm, com duas potências e dois tempos de irradiação diferentes, para inativação das formas promastigotas metacíclicas axênicas de *Leishmania (L.) amazonensis* por meio da PDT;
- Avaliar a via de morte celular investigando, por meio de citometria de fluxo, a presença de danos por meio de mudanças morfológicas, permeabilidade de membrana, clivagem do DNA nuclear, exposição de fosfatidilserina da membrana celular e alteração no potencial de membrana mitocondrial por meio de marcadores como Anexina V conjugada ao Iodeto de propídeo e o fluorocromo JC-1.
- Avaliar a presença de danos ultra estruturais das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, por meio da microscopia de eletrônica de transmissão, relacionados a via de morte devido à ação da PDT.

4 Material e Métodos

Para melhor compreensão do trabalho, abaixo segue esquema com o delineamento experimental das fases propostas para o desenvolvimento do estudo (Figura 4).

Figura 4: Esquema do delineamento experimental com todas as etapas realizadas neste estudo.

4.1 Parasitos de *Leishmania* (L.) *amazonensis*

Cultivo: A manutenção das formas promastigotas infectantes foi realizada por meio do cultivo da cepa de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (MHO/BR/73/M2269), em garrafas Roux, com meio M199 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB), HEPES, antibióticos penicilina e estreptomicina. As promastigotas foram cultivadas à temperatura de 26°C, em estufa incubadora tipo B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio), por 4 a 7 dias. Para os experimentos foram

preparadas suspensões do parasito, com concentração definida por meio da contagem dos microrganismos em câmara de Neubauer.

Obtenção das formas promastigotas metacíclicas: Para a obtenção das formas promastigotas da cepa acima descrita, foi feita a remoção da pata de um animal previamente infectado e limpeza do tecido necrosado. No meio específico para a cepa, o tecido foi macerado e passado em gaze estéril para remoção de ossos e restos teciduais. A suspensão celular obtida foi passada 4 vezes por agulha fina (15x5 mm) para lise de macrófagos e liberação dos parasitos. Em seguida, a suspensão celular foi lavada três vezes em meio a 250 x g por 10 min a 4°C, com recuperação dos parasitos por centrifugação a 2100 x g por 30 min a 4°C. As formas promastigotas foram obtidas a partir da cultura dessas amastigotas como descrito no item cultivo.

As formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos experimentos e os repiques foram realizados até a vigésima passagem. Essa escolha se fez devido a alguns fatores relevantes como, o cultivo desta forma ser bem padronizado e difundido na literatura (SCHUSTER; SULLIVAN, 2002); seu tempo de crescimento, para alcançar o período mais infectante, onde se encontram a maior quantidade de formas promastigotas metacíclicas, que é em torno de 4 dias para a *L. (L.) amazonensis*, o que facilitou a obtenção das formas para os ensaios. Adicionalmente, a literatura científica demonstra que tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas desses protozoários possuem mais de 94% de similaridade genética em seu DNA (ácido desoxirribonucleico) e seu RNA (ácido ribonucleico) apresenta similaridades de aproximadamente 97% (LEIFSO et al., 2007).

Animais: Os animais utilizados neste projeto para a manutenção das cepas de *Leishmania* foram camundongos machos, da linhagem BALB/c, de 45 a 60 dias de idade, fornecidos e mantidos pelo Centro de Bioterismo do IPEN-CNEN/SP (Aprovação do comitê de ética: Projeto Nº 70/10 – CEUA-IPEN/SP) sob temperatura controlada, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*

4.2 Preparação do fotossensibilizador

Uma solução estoque de azul de metileno (AM) foi preparada pela diluição do pó (Sigma-Aldrich, EUA) em água destilada na concentração de 10 mM e filtrada em uma membrana estéril de 0,22 μm (Milipore). Esta solução estoque foi diluída em PBS (phosphate-buffered saline) e utilizada nas concentrações 50 μM , 100 μM , 250 μM e 500 μM e já foram previamente testadas pelo grupo em células outros trabalhos (Figura 5)(PRATES RENATO ARAUJO, 2010).

Figura 5: Tubos contendo o corante de azul de metileno previamente diluído nas concentrações de 50 μM , 100 μM , 250 μM e 500 μM .

A escolha do AM (figura 5) como FS é devido à efetiva capacidade de ação antimicrobiana mediada por luz, descrito na literatura científica (WAINWRIGHT, 2005). Além disso, é alta a sua eficácia na produção de oxigênio singlete quando irradiado em condições tanto *in vitro* como *in vivo* (WAINWRIGHT, 2005).

Figura 6: Fórmula química do fotossensibilizador Azul de Metileno utilizado neste estudo.

4.3 Parâmetros de irradiação

A Figura 7 apresenta o dispositivo de luz utilizado para a realização deste estudo, denominado LED 630 (MMOptics), com a emissão em $\lambda=645$ nm, com uma banda de ± 10 nm.

Figura 7: Imagem do dispositivo LED 630 (MMOptics).

O aparelho denominado LED 630, é um dispositivo anteriormente caracterizado pelo grupo e a medição de sua potência indicou uma potência total de saída de 250 mW. Em cada faixa de emissão espectral sua potência foi aferida, no qual se obteve os seguintes valores: $\cong 37,7$ mW entre $\lambda=610$ nm e $\lambda=629$ nm; 164,5 mW entre $\lambda=630$ nm e $\lambda=649$ nm e $\cong 36,2$ mW entre $\lambda=650$ nm e $\lambda=679$ nm (Figura 8).

Figura 8: Figura adaptada esquematizando os espectros de emissão do LED com suas específicas faixas de potência. A linha em azul demonstra a sobreposição do espectro de absorção do corante AM com a emissão do LED 630. Observa-se que o LED excita as duas principais banda de absorção, em $\lambda \cong 664$ nm, na forma de monômeros e $\lambda \cong 610$ nm, na forma de dímeros do corante. Figura adaptada de Silvia Nuñez, 2007.

As amostras foram irradiadas de baixo para cima, em placas de 96 poços de fundo chato. O feixe do LED foi ajustado ao diâmetro de $0,3 \text{ cm}^2$, área que corresponde ao fundo do poço da placa utilizada. As quatro diferentes fluências utilizadas neste trabalho são originadas das potências do LED de 100 mW e 250 mW, testadas com os tempos de 60 s e 300 s. A Tabela 1 contém os parâmetros de irradiação utilizados no presente trabalho.

Tabela 1: Parâmetros de irradiação utilizados nos grupos submetidos à PDT.

Tempo (s) x Potência (mW)	60 x 100	60 x 250	300 x 100	300 x 250
Energia (J)	6	15	30	75
Fluência (J/cm ²) (Densidade de energia)	20	50	100	250
Taxas de fluência (W/cm ²) (Densidade de potência)	0,33	0,83	0,33	0,83

4.4 Ensaio de captação do fotossensibilizador por promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Para avaliar a capacidade de captação do FS pelos parasitos, as promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e acertadas para a concentração de 10^7 células/ml, em seguida foram realizados ensaios com diferentes concentrações de AM (citadas no item 3.3), nos tempos de 10 min, 30 min e 60 min. Seguidamente, as células encubadas foram centrifugadas a 3600 RPM durante 10 min, lavadas com PBS para retirar o excesso do AM e novamente centrifugadas como descrito. Após as lavagens, as células foram digeridas em solução de lise (dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% + NaOH 0,1M) por 24 h. Para a leitura dos ensaios foi utilizado o espectrofotômetro (Spectramax M4 – Molecular Devices – USA) usando como medida a fluorescência específica do AM (excitação – 532 nm e emissão – 690 nm) que ficou retido no citoplasma dessas células. Uma curva de calibração com o AM foi realizada e a equação dessa curva obtida. O resultado da fluorescência das amostras de parasitos lisados foi correlacionado à equação. Desse modo, obtivemos a concentração de AM acumulada nas amostras de células digeridas. A representação do resultado foi feita relacionando o número de moléculas do FS pelo número de parasitos presentes nas amostras testadas com as quatro concentrações de AM.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato, em septuplicata, em três dias diferentes para melhor obtenção das médias e desvio padrão que são utilizados na expressão dos resultados (Figura 7).

	10min				30min				60min			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
b	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
c	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
d	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
e	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
f	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
g	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
h	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco					

Figura 9: Esquema de placa utilizada para o teste de captação de AM por *Leishmania spp.* Cada poço continha 1×10^7 de promastigotas (*L. (L.) amazonensis*) com AM diluído em PBS nas concentrações acima descritas. Os parasitos foram deixados em contato com o AM de acordo com os tempos de 10, 30 e 60 minutos.

4.5 Efeito fotodinâmico em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

As suspensões de parasitos na forma promastigota infectante foram incubadas no escuro com fotossensibilizador nas concentrações definidas. Em seguida, foram irradiadas utilizando o dispositivo LED 630, com $\lambda = 645 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. As amostras de *Leishmania* foram irradiadas de baixo para cima em uma placa de micro-titulação de 96 poços, na qual o feixe de luz foi adequado ao 0,3 cm de diâmetro correspondente à área do fundo de um poço da placa. A variação de potência utilizada do equipamento foi 100 mW e 250 mW e os tempos de irradiação testados foram 60 e 300 s.

Os efeitos dos parâmetros de irradiação (diferentes taxas de fluência, tempos de irradiação e fluência) e das concentrações de azul de metileno foram

avaliados e comparados aos controles. Com os resultados obtidos, estabelecemos as melhores condições para avaliação dos mecanismos de morte celular.

4.6 Ensaio colorimétrico de MTT - Quantificação da viabilidade das promastigotas de *Leishmania* (L.) amazonensis

A determinação da porcentagem de parasitos viáveis foi realizada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma-Aldrich, EUA). Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resultando na produção de cristais de formazan intensamente coloridos, no interior das células. Estes cristais podem ser observados ao microscópio e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO), permitindo a sua quantificação por meio da espectrofotometria (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010).

Após as amostras serem submetidas à PDT, nos parâmetros citados no item 3.6, as formas promastigotas foram incubadas com 20 µL de MTT (5 mg/ml) adicionados a 180 µL de PBS, durante 3 h. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (3600 RPM, 10 min, 22°C) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 100 µL de DMSO P.A. (Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizou-se a placa até a total lise das células e solubilização do formazan. A leitura foi realizada após 15 minutos, por leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, USA) no $\lambda=570$ nm (KHADEM VATAN et al., 2013).

Os dados de densidade óptica (D.O.) obtidos são convertidos em viabilidade celular (%) utilizando a equação:

$$Viabilidade\ celular = (D.O._T - D.O._b) / (D.O._c - D.O._b) \times 100$$

Onde:

$D.O._T$ = D.O. da amostra tratada

$D.O._B$ = D.O. do controle branco

$D.O._c$ = D.O. da amostra controle

Para o controle branco foi utilizado o tampão PBS. As amostras controle são as formas promastigotas sem tratamento, as amostras tratadas são as submetidas à PDT como descrito no item 3.6. e o controle de parasitos mortos são tratados com DMSO P.A.

4.7 Detecção de morte por apoptose em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

4.8. Citometria de Fluxo

Para a obtenção dos parâmetros de morte após PDT das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* utilizamos a citometria de fluxo como metodologia. Com isso foram mensurados parâmetros morfológicos e funcionais das células avaliadas. Neste caso, verificou-se tamanho, granulosidade e marcação com fluorocromos.

O citômetro de fluxo utilizado para este estudo foi o L SR FORTESSA, da marca BD (Beckton Dickinson, EUA), que possui a detecção de 18 cores de fluorocromos simultaneamente e três lasers para excitação da amostra, sendo o laser azul (488 nm), laser vermelho (640 nm) e o laser violeta (405 nm). O equipamento utilizado pertence a central multiuso do IMT/USP (Multiusuário).

4.8.1 Detecção de granulosidade e formato das promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

As formas promastigotas após serem submetidas à PDT foram avaliadas em relação ao seu formato e granulosidade. No citômetro essas informações são coletadas pelo espalhamento frontal da luz (*forward scatter* – FSC) que é proporcional ao tamanho da célula. O espalhamento lateral da luz (*side scatter* – SSC) proporciona informações sobre a granulosidade intracelular dos parasitos.

Desse modo, os dados utilizados para as análises foram os valores de FSC e SSC. Nenhum marcador foi usado para os ensaios. As células foram lavadas 3 vezes com tampão ISOTON e então analisadas no citômetro para os parâmetros de SSC e FSC. A leitura de 10.000 eventos independentes foi padrão para os 3 ensaios realizados.

4.8.2 Detecção de Apoptose por Anexina V/ FITC e Iodeto de Propídio (PI) em promastigotas de *Leishmania* (L.) amazonensis

As formas promastigotas dos parasitos, após terem sido submetidas à PDT, foram incubadas com Anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídio, por 15 min, à temperatura ambiente, protegido da luz, seguindo-se as orientações do kit Annexin V- FITC para detecção de apoptose (eBioscience, EUA). Após esse período, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo e a respectiva fluorescência (excitação: 488 nm, emissão FITC: 525 nm/ emissão PI: 575 nm) dos marcadores foi detectada. A leitura de 10.000 eventos independentes foi padrão para todos os ensaios realizados.

Os resultados foram expressos em gráficos *dot plot*, com quatro quadrantes específicos, que mostram a marcação dos fluorocromos utilizados, na seguinte ordem:

Q1 (quadrante superior esquerdo) – amostras marcadas somente com PI

Q2 (quadrante superior direito) – amostras marcadas com Anexina V e PI

Q3 (quadrante inferior esquerdo) – amostras marcadas somente com Anexina V

Q4 (quadrante inferior direito) – amostras não marcadas

4.8.3 Detecção de alteração do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) por JC-1 em promastigotas de *Leishmania* (L.) amazonensis submetidas à PDT

A alteração do potencial de membrana da mitocôndria das formas promastigotas, após terem sido submetidas aos protocolos de PDT, foi analisado usando o fluorocromo lipofílico JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro- 1,1', 3,3'-ettraetilbenzimidazolilcarbocianina). O acúmulo desse corante na mitocôndria é dependente do $\Delta\psi_m$.

De acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, culturas com 10^7 parasitos, após lavagem fria com PBS 0,01 M e pH 7,2 (phosphate-buffered saline = PBS), foram ressuspensas em 0,5 mL do reagente (JC – 1 working solution). Após a lavagem, as células foram incubadas a 37°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminada a incubação, os parasitos foram centrifugados por 10 minutos a 2100 x *g* e o sobrenadante removido. O *pellet* foi ressuspenso em 2 mL do tampão de ensaio (JC-1- assay wather) em seguida realizou-se duas sequencias de centrifugação e novamente o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de parasitos foi ressuspenso em 0,5 mL do tampão de ensaio (1x JC-1-Kit). A detecção do $\Delta\psi_m$ das promastigotas foi em seguida analisada por citometria de fluxo. Os resultados que exibem JC-1 agregados à membrana de mitocôndrias que não alterou seu $\Delta\psi_m$, estão expressos no quadrante superior direito de cada gráfico de *dot plot* e são, portanto detectados no canal FL2 enquanto que no quadrante inferior direito de cada painel foi detectada em canal FL1, a membrana da mitocôndria que sofreu alteração no seu $\Delta\psi_m$ e possibilitou quebra do padrão monomérico do JC-1.

4.9 Avaliação das ultraestruturas das promastigostas de *L. (L.) amazonensis* após PDT por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização da MET, as amostras controle e as que passaram pelos protocolos de PDT foram centrifugadas a 2100 x *g* para a formação de um *pellet* visível. Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído a 3%, e permaneceram de 30 minutos a 7 dias no fixador, até o momento da realização de todo o protocolo de inclusão para observação ao MET.

Após a fixação, o material foi lavado 2 vezes em tampão cacodilato (cacodilato 0,1M acrescido de sacarose em pH 7,4) durante 3 minutos a 5000 RPM. Em seguida, o material foi fixado em tetróxido de ósmio a 2%, por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato, no mesmo protocolo de centrifugação descrito anteriormente, e contrastadas com acetato de uracila a 2,5% em álcool 50% durante 5 minutos. Finalizado o processo de contrastação, seguiu-se a etapa de desidratação, lavando-se 3 vezes a amostra com etanol a 70%. Em seguida foi adicionado ao material 2-2-dimetoxipropano P.A. durante 5 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se acetona P.A. por 2 min.

Ao término do processo de desidratação, as amostras foram embebidas em resina (araldite 502/ EMBED 812/ DDSA/ DMP 30) com adição de acetona P.A na proporção 1:1 durante 30 min. Em seguida, foi adicionada a resina pura e o material foi acondicionado em estufa a 100°C, por 24 h. Terminada a completa polimerização da resina, o material sofreu cortes ultrafinos de 80 nm de espessura. A leitura do material foi realizada na sessão Multiusuários de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP.

4.10 Análise Estatística

A distribuição dos dados dentro de cada grupo e a homogeneidade das variâncias foram verificadas para a escolha do teste estatístico ANOVA para cada experimento. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

5 Resultados e Discussão

5.1 Ensaios de captação de AM pelas promastigotas de *L. (L) amazonensis*

Os resultados obtidos dos ensaios de captação do AM por promastigotas de *L. amazonensis* estão demonstrados na Figura 10. Com esses ensaios foi possível obter informações sobre a concentração molar que os microrganismos são capazes de absorver em seu meio intracelular em relação ao tempo (10, 30 e 60 minutos) em que os mesmos são incubados com o AM.

Figura 10: Resultados dos ensaios de captação de AM por promastigotas de *L. amazonensis* (Barras coloridas representam a média do número de moléculas de AM/promastigotas, n=21). Barras de erro representam o desvio padrão. Ensaios realizados em septuplicata em três dias diferentes. Os símbolos iguais representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

Observamos no gráfico da Figura 10 que a captação do AM pelo parasito aumenta dependendo da concentração do FS, independente do tempo de incubação, ou seja, mais tempo, de incubação não resulta em maior captação de AM, com exceção de algumas concentrações que demonstraram diferença

estatística no gráfico. Esse resultado indica que possivelmente ocorreu uma saturação do corante no meio intracelular desses microrganismos, não necessitando, portanto, de tempos maiores que 10 minutos para a captação máxima do FS pelo parasito.

O fato da dinâmica de captação de AM pelo parasito ser extremamente rápida se deve ao fato de que este fotossensibilizador é catiônico (carga positiva) enquanto que o parasito têm superfície aniônica (carga negativa), e essas propriedades de cargas facilitam quimicamente a absorção do AM pelo microrganismo (AKILOV et al., 2006).

Quando analisamos as diferentes concentrações do corante por cada tempo testado, encontramos diferenças estatísticas entre todas as concentrações (Figura 11). Observamos que há um aumento do número de moléculas do fotossensibilizador, em decorrência da maior concentração. Diante dessa constatação, decidimos que todas as concentrações no tempo de incubação de 10 minutos seriam testadas nos ensaios de ação antiparasitária da terapia fotodinâmica, para verificar se esse fator (concentrações) faria diferença nos índices de viabilidade celular dos ensaios *in vitro*.

Figura 11: Análise estatística entre as concentrações utilizadas por tempos testados dos resultados dos ensaios de captação de AM nas promastigotas de *L. amazonensis* (Barras coloridas representam média do número de moléculas de AM/promastigotas, n=21). Barras de erro representam desvio padrão. Ensaios realizados em septuplicata em três dias diferentes. Os símbolos iguais representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

5.2 Avaliação dos parâmetros da terapia fotodinâmica em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Após a realização dos ensaios de captação e estabelecido o tempo necessário para que o fotossensibilizador penetrasse nos parasitos, foram realizados ensaios de PDT com as promastigotas para verificar sua ação. Foram testadas diferentes concentrações de AM, citadas no item anterior, duas potências do LED e dois tempos de irradiação, resultando em 4 energias distintas. A susceptibilidade das *Leishmanias* à PDT foi avaliada por meio do teste de viabilidade celular (MTT). A Figura 12 demonstra os resultados de viabilidade celular utilizando os parâmetros conforme item 3.4.

Na sequência de experimentos, primeiramente as promastigotas foram submetidas à captação de AM durante 10 min. Em seguida a PDT foi realizada com LED ($\lambda = 645$ nm) com a potência de 100 mW durante 60 s com as diferentes concentrações de AM.

Figura 12: Médias de viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de AM, tempo de irradiação de 60 s, LED (P= 100 mW, D= 20 J/cm²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam o erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).

Observa-se que o controle (parasitos sem tratamento) demonstrado pela barra verde, possui diferença estatística significativa quando comparado com os parasitos que sofreram PDT, nas concentrações de AM em 50 µM e 100 µM.

Observamos também que o fotossensibilizador, incubado com as promastigotas e sem tratamento, não é suficiente para exercer ação tóxica que leve a uma queda significativa na viabilidade das mesmas. A porcentagem de microrganismos viáveis (AM sem luz) analisados, nas concentrações utilizadas, é acima de 80%. Além disso, sabe-se que a incidência do LED ($\lambda = 645$ nm) sozinho não é capaz de causar dano ou morte a células.

Na concentração de 50 µM do fotossensibilizador, observamos uma diminuição de 54% da viabilidade celular e na concentração de 100 µM houve uma diminuição

de 28% da viabilidade celular. Menores concentrações mostraram melhor efeito fotodinâmico o que corroboram com o trabalho de Prates (2010).

Nas concentrações mais elevadas (250 e 500 μM), as porcentagens de viabilidade celular são maiores em relação as concentrações mais baixas (50 e 100 μM), indicando que o aumento da concentração do fotossensibilizador AM possivelmente interfere na passagem da luz e age como uma “blindagem”. Com isso, a relação de queda na viabilidade dos parasitos parece ser inversamente proporcional à concentração do fotossensibilizador utilizada.

Adicionalmente, trabalhos na literatura evidenciam que conforme a concentração do fotossensibilizador aumenta, a relação dímero/monômero (D/M) do corante AM se modifica, tendendo a maior formação de dímeros. Os parasitos presentes nas amostras também podem influenciar no equilíbrio D/M. Desse modo, a absorbância máxima do corante é modificada e sua eficácia na ação fotodinâmica pode ser reduzida (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003). Caso isso ocorra, esse efeito pode ser um fator complicador para provocar ação fotodinâmica eficiente, e, portanto, não alcançará o ponto de danificar o parasito, induzir dano à mitocôndria e consequentemente diminuir sua viabilidade celular.

Trabalhos realizados por nosso grupo testaram a influência do tempo de irradiação e seu efeito sobre patógenos resistentes como o fungos. Verificou-se que a formação de ROS, por FS como AM é dependente do tempo de irradiação e que este fator pode promover melhor resposta fotoquímica. Então, no intuito de testar a ação do tempo de exposição ao LED na $P=100\text{ mW}$, as amostras foram irradiadas por 300 s (

Figura 13).

Figura 13: Médias de viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 300s, LED (P= 100mW, D= 100J/cm²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).

Observa-se que o controle demonstrado pela barra verde (parasitos sem tratamento) possui diferença estatística quando comparados as amostras que sofreram PDT, nas concentrações de AM de 50 µM, 100 µM e 250 µM. Verificamos uma queda de viabilidade de cerca de 81%, 79% e 70% respectivamente. Nossos dados apresentam uma tendência demonstrada na literatura, na qual a aplicação de maior tempo de irradiação apresenta menor viabilidade dos microrganismos, ou seja, uma diminuição na sobrevivência dos microrganismos que sofrem a ação da terapia (PRATES et al., 2013).

Uma possível explicação para maior diminuição da viabilidade do parasito, em decorrência de maior tempo de exposição à irradiação, deve-se ao fato de que quanto mais tempo exposto, maior a chance de ocorrer o encontro do fóton com uma molécula de fotossensibilizador e esta ser excitada e elevar o seu nível

energético. Isso, possivelmente, implica num maior número de fótons absorvidos e, conseqüentemente, uma melhora na ação fotodinâmica. Isso demonstra que o ajuste de emissão de fótons e sua absorção estão intrinsicamente ligados à eficiência da PDT.

Na sequência de experimentos foi feita avaliação da PDT utilizando LED com potência de saída de 250 mW, nos dois tempos de irradiação já citados anteriormente. Na figura 12 observa-se que o controle (parasitos sem tratamento) demonstrado pela barra verde, possui diferença estatística quando comparados com os parasitos que expostos à PDT, em todas as concentrações de AM testadas. Encontramos o mesmo comportamento de diminuição da viabilidade celular quando comparamos os dois tempos de exposição na potência de 250 mW (Figura 14 e Figura 13).

Figura 14: Médias de viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 60 s, LED (P= 250 mW, D= 50 J/cm²). Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas

azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).

É possível observar que a utilização de uma potência maior leva a uma diferença estatisticamente significativa na concentração de 500 μM de AM em relação ao controle. Este resultado não é observado quando se utiliza a potência de 100 mW, em ambos os tempos de irradiação utilizados no estudo. Presumimos que isto se deva ao fato de que um fluxo de fótons maior leve a um aumento da penetração da luz, mesmo na concentração de 500 μM , o que acarreta em um maior volume de amostra irradiado e consequentemente mais parasitas sofrem a ação da PDT.

Figura 15: Médias de viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* (MHO/BR/73/M2269), usando diferentes concentrações de azul de metileno, tempo de irradiação de 300 s, LED ($P = 250 \text{ mW}$, 250 J/cm^2). Avaliação realizada por ensaio de MTT ($n=12$). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Barras azuis indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p < 0,05$).

Para melhor análise das diferenças de viabilidade encontradas entre os grupos irradiados com P=100 mW e os irradiados com P=250 mW foram comparadas as concentrações que mais exerceram ação antiparasitária. Abaixo seguem os gráficos da análise (Figura 15)

Figura 16 (gráficos A e B): Médias de viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* após PDT usando diferentes concentrações de AM, potências do LED 100 mW e 250 mW, respectivamente, e tempos de 60 s e 300 s. Avaliação realizada por ensaio de MTT (n=12). Barras pretas indicam erro padrão dos resultados. Linhas azuis indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os dados do gráfico A (Figura 16) apresentam diferenças estatisticamente quando comparamos as concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M de AM. Quando a PDT é realizada utilizando 300 s comparada ao tempo de 60 s há uma diminuição na viabilidade celular dos parasitos.

O gráfico B (Figura 16) não apresenta nenhuma diferença estatística considerando as mesmas concentrações e tempos de irradiação. Interessantemente, quando o tempo é de 300 s, os valores de viabilidade celular são intermediários aos apresentados no gráfico A. Estes dados indicam que, independente de outros parâmetros, a energia entregue tem papel importante na ação antiparasitária da PDT. No entanto, por limitação do método de MTT (WANG; HENNING; HEBER, 2010) ou por consumo do oxigênio do meio (BAJGAR et al.,

2014) ou por fotobranqueamento do metileno (MILLS; WANG, 1999), quando a densidade de energia é de 250 J/cm², observamos que não há diminuição da viabilidade celular comparada à densidade de energia de 50 J/cm².

A

Figura 17 apresenta as energias testadas que foram entregues nas amostras de promastigotas de *L. amazonensis*, em relação à viabilidade celular obtidas pelos ensaios de MTT. Observa-se que conforme ocorre o aumento da energia utilizada, a viabilidade celular dos parasitos diminui progressivamente. A menor viabilidade é encontrada quando a amostra recebeu 30 J e 75 J de energia quando incubadas com 50 µM de AM. Nota-se que a maioria dos resultados que apresentam menor viabilidade celular dos parasitos ocorre quando incubados com a concentração de 50 µM de AM.

Figura 17: Efeito das diferentes energias na viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* após PDT, nas concentrações de 50 µM e 100 µM de AM. Barras pretas indicam erro padrão dos resultados.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, em que foram testadas as promastigotas de *L. amazonensis* e a terapia nos parâmetros definidos no item 7.2, conclui-se que a PDT induziu fotodano a esses microrganismos. Esse processo, indiretamente verificado pelo método de MTT, demonstra que a PDT conseguiu diminuir a viabilidade celular do microrganismo em aproximadamente 80% nas condições consideradas melhores (P:100mW/ 300s) para a ação leishmanicida.

Atualmente, os fármacos de primeira escolha para o tratamento da LTA são os antimoniais: estibogluconato de sódio (Pentostan ®) e antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime ®). Esses medicamentos são efetivos no tratamento, entretanto induzem efeitos adversos severos, tais como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade e são contraindicados para idosos, e mulheres grávidas. (GOTO; LINDOSO, 2010). Além disso, podemos destacar os inúmeros relatos de resistência aos antimoniais que vem sendo descritos. O fármaco de segunda escolha, no Brasil, é a anfotericina B em suas três apresentações (desoxicolato, de dispersão coloidal e lipossomal). Mesmo este fármaco apresentando excelentes resultados terapêuticos, ele pode causar efeitos adversos como nefrotoxicidade e exige a necessidade de internação hospitalar para acompanhamento do paciente devido aos seus efeitos adversos (GOTO; LINDOSO, 2010).

Nos últimos quarenta anos constatou-se inúmeros casos de resistência aos medicamentos disponíveis de primeira e segunda escolha para o tratamento dessa enfermidade. Além disso, destaca-se a falta de investimento no desenvolvimento de novos fármacos, e também que grande parte dos medicamentos disponíveis empregados no tratamento da LTA não consegue alcançar mais do que 70% de índice de cura (AMATO et al., 2007; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Diante da realidade terapêutica insatisfatória apresentada, alcançar nos ensaios *in vitro* com a PDT aproximadamente 80% de redução da viabilidade celular de *L. amazonensis* faz deste, um resultado promissor para o futuro do tratamento desta moléstia. Adicionalmente, a inexistência de efeitos colaterais em pacientes e de resistência de microrganismos descritos, de acordo com os relatos da literatura, torna a ideia de utilizar a PDT como adjuvante no tratamento de LTA é plausível.

Outra possibilidade seria a utilização da PDT como um fator à implementação de doses mais baixas, nos atuais protocolos clínicos, tanto para os

fármacos de primeira como para os de segunda escolha disponíveis. Isso, possivelmente, diminuiria os efeitos adversos conhecidos, em consequência do uso de antimoniais, da anfotericina B e da miltefosina. Ademais, a associação de PDT e fármacos leishmanicidas podem influenciar no período do tratamento, diminuindo-o.

As vantagens dessa terapia, de maneira geral, leva-nos a acreditar na possibilidade, num futuro próximo, da substituição dos fármacos leishmanicidas de uso parental e/ou oral para LT, por protocolos tópicos eficazes de PDT. Estudos que testaram o uso da PDT em pacientes com leishmaniose tegumentar, descrevem até a possibilidade de cura clínica associada a cura parasitológica, esta última atualmente considerada um dos problemas nos protocolos de tratamento para LT (ENK et al., 2003; GHAFARIFAR et al., 2006; SONG et al., 2011b).

Diante do exposto, a ação desse tipo de terapia e os mecanismos de morte de *L. amazonensis* se torna fator fundamental a ser investigado para maior compreensão de como a PDT induz a morte celular.

O processo de morte celular é complexo, podendo ser induzido por diversos fatores como processo inflamatório, injúrias, hormônios e agentes tóxicos (BALL et al., 1998). Este se desenrola numa cascata de eventos morfológicos e bioquímicos controlados, que podem levar o parasito a diferentes tipos de morte como a necrose, a autofagia ou a apoptose (REECE et al., 2011). Frente a isto, o estudo rumou no sentido de investigar qual via de morte celular teria sido ativada diante do desafio da PDT.

De acordo com a literatura, o corante AM é descrito como um fotossensibilizador que possui a capacidade de se ligar a estruturas que apresentam polaridade aniônica (carga negativa) (BALL et al., 1998; TARDIVO et al., 2005). Nas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo esta célula eucariótica, apresenta em sua estrutura celular uma mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático como organelas que apresentam polaridade aniônica. A captação do AM, diante do exposto, estaria então facilitada nestas organelas.

O corante AM é conhecido indutor de morte via apoptose devido a sua capacidade de penetrar na mitocôndria, acumulando-se em seu interior e, conseqüentemente, gerando ROS após a PDT, que danificam e desestruturam a

membrana dupla que a compõem. Esses danos levam a liberação de citocromo c no citosol, que pode induzir apoptose por ativação da via intrínseca (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

5.3 Ensaio para detecção de apoptose em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

5.3.1 Avaliação do tamanho das promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* após PDT

Após constatação de diminuição de viabilidade celular das amostras de promastigotas, submetidas à PDT e avaliadas pelo método MTT, fomos investigar as possíveis vias de morte do parasito usando como ferramenta a citometria de fluxo.

A resposta a esse tipo de terapia pode ocorrer em diferentes tipos de células, como as de mamíferos, por exemplo, as que constituem os tumores malignos; nas procarióticas, no caso das bactérias; e nas eucarióticas inferiores, como fungos e parasitas (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011; JORI, 2006; WYLD; REED; BROWN, 2001). Adicionalmente, o tipo de resposta pode variar, sendo que algumas células após o fotodano reagem iniciando um processo de morte, que pode ser por via necrótica, ou por morte programada como a autofagia ou a apoptose (BACELLAR et al., 2015). A PDT com uso de AM pode induzir a morte por causar danos em diversos sítios celulares, tais como membrana plasmática, DNA, lisossomos, retículo endoplasmático e mitocôndria (JORI, 2006; TARDIVO et al., 2005; TUIE; KELLY, 1993). No entanto, o mecanismo de morte do parasito induzido pela PDT não foi ainda demonstrado. Especula-se então que a PDT, utilizando o AM como FS, pode induzir a morte por apoptose devido ao dano direto na membrana da mitocôndria, alterando o seu potencial, que é uma das vias intrínsecas de indução de morte por apoptose.

Estudos científicos descrevem como situação clássica envolvida na morte apoptótica, por via intrínseca, a mudança do formato celular (BRUCHHAUS et al., 2007; ELMORE, 2007; HORIKAWA; PENA, 2011). Essa mudança é sempre

relacionada ao encolhimento, mais especificamente a redução do tamanho do parasito. Desse modo, iniciamos nossa investigação pela citometria de fluxo avaliando o tamanho celular das promastigotas de *L. amazonensis*, sendo ou não submetidas aos protocolos de PDT, nas condições que demonstraram menor viabilidade celular.

Figura 18: Detecção de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliados pelo espalhamento da luz por meio de citometria de fluxo. A. Controle sem tratamento. B. Controle com Luz – Análise de irradiação com

potência de 250 mW e tempo de exposição de 300s. C e D. Análise após captação (10 min) de AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M. E e F. Análise após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 250 mW e tempo de exposição de 300s.

Na figura 16, verificamos a análise de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* submetidas à PDT ou não e analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente, observamos que a irradiação com LED com P = 250 mW durante 300s (Figura 16B) quase não alterou a dispersão da nuvem celular em relação ao controle não irradiado (figura 16-A). Quando avaliamos a ação do fotossensibilizador de AM (figura 16- C-D), nas condições de concentração as quais obtivemos os melhores resultados após irradiação, encontramos diferença na dispersão da nuvem celular em relação ao controle sem tratamento (16A) e as promastigotas somente irradiadas com LED 645nm (16B). Entretanto, ao avaliarmos a dispersão das células que sofreram os dois protocolos de PDT, que alcançaram eficiência na redução da viabilidade dos parasitos (16E e 16F), constatamos uma mudança no formato da dispersão dessas promastigotas em relação aos controles (promastigotas sem tratamento (16A), irradiadas (16B) e com corante AM (16C e D)).

Os resultados do espalhamento da luz, em porcentagem é apresentado na Tabela 2. Nota-se que as porcentagens de FSC (volume celular) possuem uma evidente diminuição após quando as células foram submetidas à PDT em relação aos controles. Entretanto, as porcentagens de SSC (granulosidade) demonstram pouca mudança entre os valores de todas as amostras analisadas neste experimento.

Tabela 2: Resultados médios de FSS e SSC das promastigotas analisadas por citometria de fluxo sem fluorocromos.

	Volume % média (FSC)	Granulosidade % média (SSC)
Controle	69,23	14,24
Luz (250 mW)/300s	69,85	14,05
AM (50 μM)	58,99	15,34
AM (100 μM)	53,27	14,98
PDT (50 μM/250 mW)	32,79	11,5
PDT (100 μM/250 mW)	34,38	11,38

Figura 19: Porcentagem do volume celular de amostras de promastigotas (pro) de *L. amazonensis* calculadas de 10.000 eventos. As amostras (pro + luz) foram irradiadas por 300 s (LED $\lambda=645\text{nm}$ / $P=250\text{mW}$).

A Figura 19 apresenta os resultados do volume celular (%) das promastigotas de *L. Amazonensis*, sem tratamento e após PDT, normalizado em relação ao controle. Observa-se que em relação ao controle (sem tratamento) e ao controle com luz (Pro+luz) tanto as amostras tratadas com 50 μM AM+PDT, quanto as tratadas com 100 μM AM+PDT apresentaram menor volume.

Essa situação possivelmente aconteceu devido a geração de ROS e sua ação fotooxidante sobre os lipídeos (principais componentes da membrana celular das promastigotas), promovendo a desestruturação de sua bicamada fosfolipídica. A célula, por não suportar a ação fotooxidante, tem como resultado a alteração de seu formato original alongado e flagelar. Adicionalmente, podem ter ocorrido danos ao citoesqueleto da *Leishmania*, já que este é componente importante para manter o formato estrutural celular.

Segundo Jimenéz-Ruiz e colaboradores, um dos indícios de morte por via apoptótica em diversos microrganismos e em parasitos do gênero *Leishmania* é a alteração morfológica, neste caso, retração celular. Dados na literatura indicam que a ação da PDT com o AM sobre diversos tipos de célula pode levá-las à morte programada por via apoptótica (BACELLAR et al., 2015; TARDIVO et al., 2005).

Uma vez que observamos menor volume celular do parasito, nossos dados apontam um indício de morte programada, existindo a possibilidade de ser por apoptose.

Contudo, são necessárias mais investigações para a confirmação dessa hipótese. Novos ensaios de citometria de fluxo foram realizados para verificar outras características inerentes a esse processo, como a exposição de fosfatidilserina, consequência da inversão da bicamada da membrana, permeabilização da carioteca e mudança do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi m$) do parasito.

5.3.2 Avaliação de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídio (PI) em promastigotas de *Leishmania* (L.) amazonensis submetidas à PDT

Anexina V- FITC foi usado para verificar quantitativamente a porcentagem de células dentro das amostras, que após tratadas pela PDT, estariam possivelmente sofrendo processo de apoptose. Isso ocorre devido à perda da assimetria de membrana perto da fase de apoptose (GRIVICICH, IVANA; REGNER, ANDRÉA; ROCHA, 2007). Em células apoptóticas, o fosfolípido fosfatidilserina (PS), componente da membrana celular, é deslocado do interior da membrana plasmática para fora dela, com a exposição de PS no ambiente externo. Esta modificação da estrutura celular sinaliza sua morte por apoptose ao ambiente. Então, utilizamos a Anexina V, que é uma proteína dependente de cálcio, que tem uma grande afinidade por PS, para identificar células apoptóticas por meio da exposição de PS como indicador. Para mensurar a viabilidade celular, foi utilizado o iodeto de propídio (PI) (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). Células viáveis não permitem que o PI entre na membrana, enquanto que a membrana de células danificadas ou mortas pode ser penetrada pelo PI. Células em processo irreversível de apoptose permitem que o PI entre em seus núcleos e se liguem ao DNA que foi clivado em decorrência do processo de morte por apoptose.

Células que são positivas para Anexina V e negativas para PI são consideradas em fase inicial de apoptose. Células que são positivas para Anexina V e PI estão no final do estágio de apoptose ou estão totalmente inviáveis (mortas). Células que são negativas para Anexina V e PI estão viáveis (vivas) (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). Estes foram os critérios utilizados neste estudo para compreender se as células analisadas estavam ou não em processo de morte celular por via de apoptose.

A Figura 20 mostra as análises realizadas nas promastigotas de *L. amazonensis*. Na figura 18 A, se encontra o controle sem tratamento e marcação, que como demonstrado, não apresenta fluorescência (quadrante Q4). As promastigotas não submetidas aos protocolos de PDT foram avaliadas para a detecção de apoptose (figura 18 – B) pelos fluorocromos Anexina V-FITC e PI. Verificamos que uma porcentagem de mais de 35%, dessas células naturalmente está expressando fosfatidilserina.

Para o controle positivo de apoptose (Figura 20 - C), foi utilizado o fármaco camptotecina (5 μ M incubado durante 3 h, a 37°C com as promastigotas). Esta substância é descrita na literatura como um indutor de apoptose, devido sua capacidade inibidora da topoisomerase I no DNA, atingindo diretamente o núcleo, além da privação de nutrientes, indicativo de que age na via intrínseca da mitocôndria (BRANDÃO et al., 2010; SEN et al., 2004). Podemos notar que mais de 26% (Q2 + Q3) das células estão expressando fosfatidilserina e uma pequena parte apresenta-se positiva para PI indicando inviabilidade das mesmas. Esse controle foi usado como parâmetro para a análise de apoptose, em relação às células que foram submetidas à PDT.

A ação da irradiação da luz sozinha também foi avaliada em relação à indução do processo apoptótico (Figura 20 - D/E). Verificamos que em ambas as potências do LED utilizadas para irradiação das células, aproximadamente 50% a 60% delas demonstraram possível fase inicial de apoptose.

Aparentemente, a exposição da célula à luz possivelmente induziu algum mecanismo de autoproteção ou escape desses parasitos. Há muito se descreve que parasitos do gênero *Leishmania* podem simular apoptose (*apoptose-like*), no intuito de atraírem os macrófagos do sistema imune e serem fagocitados. Essa situação é um mecanismo altruísta de escape que esses parasitos possuem para

sobreviverem em situações de estresse (DUSZENKO et al., 2006). Também é descrita a morte de amastigotas de *Leishmania infantum*, in vivo, como possível mecanismo de sobrevivência do parasito, devido a privação de nutrientes no interior das células hospedeira, em decorrência da grande quantidade de parasitos (Lindoso et al, 2004).

Os resultados da citometria das promastigotas após captação do AM são apresentados na figura 18 - F e G. Na imagem F é interessante destacar que a concentração de 50 μ M de AM, induz em torno de 70% de apoptose em fase inicial nas promastigotas. Quando avaliamos os resultados no gráfico G (Figura 20), onde as células foram incubadas com 100 μ M de AM, também nota-se uma indução de apoptose em fase inicial em torno de 71%.

Em ambos os gráficos de *dot plot* (Figura 20 - F e G), os quadrantes Q2, mostram menor expressão de PS e permeabilidade celular, em relação à fase inicial de apoptose apresentados nos quadrantes Q3 de ambos os gráficos.

As porcentagens de fluorescência positiva para Anexina V encontradas nos quadrantes Q3, após incubação com AM, em ambas as concentrações, apresentam um possível indicativo de início de apoptose nas células analisadas. Entretanto, somente a utilização do FS AM não inviabiliza as promastigotas. Os nossos resultados de MTT corroboram com essa hipótese, pois demonstram que não ocorre uma alteração na via metabólica respiratória do parasita quando somente o AM foi avaliado (sessão 4.2).

As amostras de promastigotas submetidas à ação da PDT, na potência de 100 mW do LED, nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M de AM são mostradas na Figura 20 - H e I. Observar-se que os parasitas apresentaram alta porcentagem, acima de 73%, de células inviáveis (fase de apoptose tardia). O mesmo ocorre nas amostras de *Leishmania* submetidas à PDT na potência de 250 mW do LED, nas duas concentrações de AM (Figura 20 - J e K). Contudo, pode ser notada uma leve diminuição nas porcentagens de parasitos que apresentam expressão de fosfatidilserina e permeabilidade de membrana em relação aos parasitos analisados após PDT irradiados com P = 100 mW (Figura 18 – H e I).

Este resultado pode ser explicado pela capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que a PDT com o fotossensibilizador AM é capaz de produzir (TARDIVO et al., 2005) e de danificar diversos sítios celulares, somando-

se a possível capacidade que o AM tem de se acumular em mitocôndria e lisossomo e gerar danos nessas estruturas bem como na membrana da célula (WAINWRIGHT et al., 1997). A literatura descreve a capacidade que a PDT realizada com o AM tem de causar dano celular e levar a morte da mesma por processo apoptótico (BALL et al., 1998).

Figura 20: Detecção da exposição de fosfatidilserina e permeabilidade de membrana, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo método de Anexina V e PI por citometria de fluxo. A. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* sem marcação. B. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* com marcação. C. Controle de Apoptose - Promastigotas de *L. Amazonensis* sob indução de apoptose por camptotecina (5 μ M /3h/ 37°C). D e E. Controle com Luz – Promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100 mW/250 mW) e tempos de exposição (300 s). F e G. Promastigotas de *L. Amazonensis* após captação (10 min) de AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M. H e I. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 100 mW. J e K. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 250 mW.

5.3.3 Avaliação do potencial de membrana de mitocôndria por JC-1 em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* submetidas à PDT

Para avaliar alterações no $\Delta\psi_m$ das formas promastigotas do parasito após serem submetidas a diferentes condições de tratamento, utilizamos o marcador JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro- 1,1', 3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina). Este marcador possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção de alteração no $\Delta\psi_m$. Ele necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em altas concentrações, o corante apresenta-se na forma de j-agregado e emite coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Então, em mitocôndrias funcionais, que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo, o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite

coloração vermelha (Reers, 1991). Assim, a formação e manutenção de j-agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico de sua membrana (Smiley et al., 1991).

Os resultados obtidos desse ensaio são apresentados na Figura 21 que demonstra que promastigotas expostas tanto à irradiação do LED (D e E), como ao fotossensibilizador AM (F e G) sofre pouca alteração em seu potencial de membrana, pois apresenta fluorescência majoritariamente vermelha.

Quando os parasitos sofrem a ação da PDT, nas condições de irradiação com P=100 mW, durante 5 min, com 50 μ M de AM, visualizamos (figura 19 - H) uma mudança no padrão de distribuição da fluorescência. O quadrante Q3 da figura 19 -H mostra uma porcentagem maior que 92% de fluorescência verde. Esse fato demonstra alteração no $\Delta\psi_m$ das células após tratamento com PDT, o que é indicativo de morte celular por apoptose, em consequência de provável dano mitocondrial. Acreditamos que após a PDT, ocorra fotodano na mitocôndria do parasito, o que possivelmente desencadeia a apoptose por via mitocondrial, ativada por via intrínseca. A mitocôndria danificada, libera citocromo c e consequentemente desencadeia a ligação da apaf 1 e caspase 9, seguido da formação de apoptossomas e ativação da caspase 3.

Os dados da figura 19 - J e K apresentam os resultados do promastigotas irradiadas com PDT utilizando condições de irradiação com P=250 mW, durante 5 min, nas concentrações de com 50 e 100 μ M de AM. Verificou-se uma similaridade de porcentagem de alteração de $\Delta\psi_m$ em relação à potência de 100 mW.

Diante dos dados apresentados na citometria de fluxo, verificou-se que há várias alterações bioquímicas nas promastigotas que indicam que o fotodano gerado pela PDT utilizando como FS o MB induzem no parasito a morte por via apoptótica. Desse modo, no presente trabalho também foi verificado se os parasitos apresentavam sinais ultraestruturais da ação leishmanicida da PDT por meio da técnica de MET.

Figura 21: Detecção de alteração do $\Delta\psi_m$, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo ensaio de JC-1 por citometria de fluxo. **A** e **B**. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* não tratadas sem marcador JC-1 e na presença de JC-1. **C**. Controle com Camptotecina (Cpto) 5 μ M. **D** e **E**. Controle com Luz – Promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100mW e 250mW) e tempos de exposição de 300s na presença de JC-1. **F** e **G**. Controle com AM - Promastigotas de *L. Amazonensis* após captação do fotossensibilizador AM (10 min) nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, na presença de JC-1. **H** e **I**. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 100mW, na presença de JC-1. **J** e **K**. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 250mW, na presença de JC-1.

5.3.4 Análise da morfologia e ultraestruturas das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após PDT por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após definirmos a melhor concentração do FS (50 mM), o tempo ideal de exposição a luz (5 minutos) e a energia (100 mW) capaz de induzir a morte das promastigotas por provável indução de apoptose, conforme demonstrado pela citometria de fluxo, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão para avaliar as possíveis mudanças morfológicas e de conformação ultraestrutural dos parasitos submetidos a PDT nas condições predefinidas.

Na Figura 22 as imagens de A-C apresentam amostras de promastigotas de *L. amazonensis* sem tratamento com PDT. Observa-se que morfológicamente o parasito apresenta sua forma fusiforme alongada característica. Na análise ultraestrutural das imagens A e B, nota-se o núcleo bem arredondado, ocupando posição quase central. A mitocôndria com seu formato alongado e vesicular, que percorre grande parte da lateral do corpo do protozoário. A membrana plasmática das promastigotas estão bem definidas com glicocálix constituído, sem nenhum rompimento ao longo de seu contorno. Os citoesqueletos nas imagens A e B, apresentam um arranjo complexo de microtúbulos, um dos componentes responsáveis por seu formato alongado (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014), bastante conservado.

As amostras de parasito tratadas somente na presença de AM (Figura 24, imagens de D-H) ou somente irradiadas com LED (Figura 23) na melhor condição de energia para a PDT (Figura 23, imagens de I-K) também apresentam parasitos com as organelas como núcleo, mitocôndria e seu cinetoplasto, sem alterações em sua estrutura (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). A bolsa flagelar e o corpo paraxial¹ do flagelo não apresentam nenhum tipo de dano causado tanto pela exposição ao AM, quanto pela irradiação do LED utilizado nas experimentações.

¹ Corpo paraxial: Também conhecido como estrutura paraflagelar, é formado por um arranjo de filamentos proteicos conectados aos pares de microtúbulos, que formam a base do flagelo do parasito.

Na imagem F, da Figura 23, conseguimos visualizar o complexo de Golgi, com toda sua formação de cisternas bem característica, assim como o cinetoplasto, ambos sem apresentarem dano. Outro ponto a ser destacado em todos os painéis (Figura 22/Figura 23/Figura 24) é o formato alongado característico das promastigotas bem preservado.

Diante de todo o exposto, é passível concluir que sozinhos, FS ou irradiação, não conseguiram gerar nenhum tipo de dano morfológico e/ou ultraestrutural que pudesse ser captado pela técnica de MET, nas estruturas e organelas que constituem as promastigotas de *L. amazonensis*.

Figura 22: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*. Imagens – A/B/C *L. amazonensis* sem tratamento. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar.

Figura 23: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*. Imagens – D-H *L. amazonensis* após irradiação de LED 645 nm (100 mW/ por 5 min). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar.

Figura 24: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*. Imagens – I-K. *L. amazonensis* tratadas com AM (50 µM por 10 min). Imagens obtidas por

microscopia eletrônica de transmissão (MET). L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar; F - Flagelo.

Entretanto, quando observamos as promastigotas que sofreram PDT, após protocolo com melhores resultados para a inviabilidade do microrganismo, notamos uma completa mudança em sua morfologia externa. Esta se torna arredondada, demonstrando retração da célula do parasito (Figura 25, imagens R/T/U/Z). Esse resultado corrobora com os obtidos no experimento de citometria (FSC x SSC), que mostrou um padrão de espalhamento indicativo de diminuição e provável arredondamento das promastigotas.

Essa situação, possivelmente, se deve a perda da integridade do citoesqueleto, que fará com que a célula não seja capaz de manter seu formato original (alongado) após o início da cadeia de reações que o parasito sofre quando os sinais apoptóticos são desencadeados. Outros trabalhos na literatura descrevem esse mesmo processo de desorganização citoesquelética em organismos unicelulares eucariontes quando do processo de morte programada (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010).

A membrana celular apresenta sinais de descaracterização de sua integridade em praticamente todos os parasitos observados, contudo não encontramos ruptura de sua estrutura ou da célula. A PDT deve ser o fator responsável por essa desestruturação, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, levando a oxidação das biomoléculas (lipídios e proteínas) que são os componentes básicos do glicocálix da membrana. Sabe-se que a PDT que utiliza FS fenotiazínicos tem como produto o oxigênio singlete, que é um composto químico muito agressivo (WAINWRIGHT, 2005). Este consegue rapidamente reagir com biomoléculas próximas a ele e desestabilizá-las no âmbito molecular. Por meio de todo esse conjunto de reações químicas agressivas ao parasito, temos como efeito colateral desejado o dano ao mesmo e, conseqüentemente, a indução da morte por apoptótica.

Outra característica comum, observada em grande parte das formas promastigotas estudadas, é a intensa vacuolização do citoplasma, constatada nas micrografias eletrônicas (Figura 25, imagem: L - T). Este fenômeno morfológico vem

sendo descrito na literatura após utilização de fármacos com ação leishmanicida (SEN et al., 2004). Essa alteração é relacionada à morte por apoptose dos parasitos da família dos tripanossomatídeos (GALLUZZI et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010).

A mitocôndria, em protozoários do gênero *Leishmania*, normalmente apresenta um corpo alongado tubular, que percorre grande porção lateral do comprimento do protozoário (BESTEIRO et al., 2007). Nas imagens – O; Q; R; W - da Figura 25, as mitocôndrias demonstram uma perceptível desestruturação em suas lamelas internas e uma completa deformação ao longo de seu comprimento. Na porção mitocondrial próxima a bolsa flagelar se encontra o cinetoplasto. Esta é uma região complexa, repleta de DNAs circulares, que possui um formato de bastão (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Muitos dos cinetoplastos perderam completamente sua forma, como demonstrando nas micrografias, após a PDT (Figura 25, imagens - L, M, N, O, P, Q, W). Esses dados reforçam os resultados encontrados na citometria de fluxo, onde foram confirmadas as alterações do potencial de membrana mitocondrial após PDT.

Diferentemente dos eucariontes superiores, os eucariontes unicelulares do gênero *Leishmania*, possuem somente uma mitocôndria em seu citoplasma. Esta organela é essencial à sobrevivência dos tripanossomatídeos, sendo a responsável pelo metabolismo energético do parasito, através da produção de ATP (DE SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009). Desse modo, a manutenção do potencial de membrana é de fundamental importância para esse processo metabólico e a sobrevivência da célula.

Por estes motivos, a mitocôndria é uma das organelas considerada principal alvo de inúmeros estudos, que buscam fármacos leishmanicidas (FONSECA-SILVA et al., 2011; SEN et al., 2004; VERMA; SINGH; DEY, 2007b). A constatação, neste estudo, de que a PDT consegue causar dano mitocondrial é de suma importância para que possamos desenrolar e compreender qual via de morte foi induzida nesses protozoários.

As bolsas flagelares de alguns parasitos apresentam retração (Figura 25, imagens – L; P; R) e intensa produção de vesículas em sua parte interna (Figura 25, imagens – V; W; X). Esse processo, onde ocorre o surgimento de vesículas na bolsa flagelar,

já foi reportado em outro trabalho com fármacos de atividade antiparasitária em *L. infantum* (RODRIGUES et al., 2014). Contudo, sobre esse processo pouco se tem descrito na literatura.

Os flagelos apresentam o surgimento de um processo denominado de vesiculação (Figura 25, imagem – U). Podemos verificar que isso ocorre com o surgimento de pequenas bolhas em diversas regiões do flagelo do protozoário, numa demonstração de desorganização de suas proteínas constituintes. Corroborando com os nossos dados, Lopes *et al.* 2012, destacou que ao utilizar o fármaco geranilgeraniol, que induz a produção de ROS no interior de *L. amazonensis*, ocorreu alterações morfológicas externas que envolvem a vesiculação da membrana e flagelo do protozoário.

O núcleo de alguns parasitas demonstra desorganização da cromatina e migração da mesma para as bordas da membrana nuclear (Figura 25, imagem – P; S; T). Os envoltórios nucleares também mostram certa frouxidão em sua estrutura. Verificamos, então, que nossos achados estão de acordo os dados da literatura, já que essa situação é descrita em vários trabalhos sobre apoptose em eucariontes unicelulares, entre eles os protozoários do gênero *Leishmania* (BRUCHHAUS et al., 2007; DEPONTE, 2008; LEE et al., 2002). Contudo, podemos verificar que muitas das promastigotas analisadas nas micrografias da Figura 25, mesmo com várias características de morte por via apoptótica, não possuem seus núcleos danificados. Uma hipótese, que possivelmente pode explicar esse fato, é que nem todos os parasitas estão no mesmo momento do processo de morte apoptótica, mesmo tendo sofrido o mesmo estímulo provocado pela PDT.

Figura 25: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*. Imagens – L - Z. *L. amazonensis* após PDT (50 µM AM, uptake 10 min; LED com P=100 mW/5 min). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). C – Cinetoplasto; F – Flagelo; L – lipídios; M – Mitocôndrias, N – núcleo; BF – Bolsa flagelar; * – vacúolos; → – vesículas.

Ao longo desse estudo, que teve como principal foco de investigação o protozoário *L. (L.) amazonensis*, a PDT e a resposta de via de morte desse parasito a esse tipo de terapia, conseguimos perceber que várias etapas seriam necessárias para responder a esse questionamento. Buscamos compreender a captação do FS AM pelo protozoário; a resposta de viabilidade celular do parasito frente a diferentes energias empregadas para a realização da PDT. Diante dos resultados expressivos de inviabilidade celular causadas pelo PDT, avaliamos a *L. (L.) amazonensis*, frente a fluorocromos como Anexina V, PI e JC-1 no intuito de investigar se os parasitos teriam sua via de morte apoptótica ativada. Diante da confirmação de morte por apoptose, confirmamos por meio de MET, ao encontrar todas as alterações morfológicas características desse tipo de morte, como danos as organelas, a membrana plasmática, e na estrutura celular do microrganismo. Todos esses resultados nos levam a acreditar que a morte desse protozoário ocorreu por apoptose, por meio da ativação de via clássica intrínseca no qual se inicia por dano mitocondrial.

Apesar de todos os estudos já realizados sobre PDT e microrganismos causadores de doenças tópicas, que podem ser tratados por meio desta modalidade terapêutica, verificamos que pouco se tem descrito sobre o tratamento de LTA e PDT. Alguns trabalhos, que abordam esse assunto, descrevem a PDT como uma possível ferramenta para tratar a LT no Velho e no Novo mundo. Entretanto, a investigação mais aprofundada de quais mecanismos de morte estão envolvendo esse parasito frente ao desafio fototerapêutico não havia sido descrito.

A oportunidade de estudar um assunto pouco explorado, nos fez perceber o quanto se faz necessário pesquisas neste campo que abre portas para muitos outros questionamentos a respeito da capacidade de tratamento da PDT como terapia leishmanicida, da busca de protocolos mais eficientes, de investigações *in vitro* em modelos animais adequados para LT, e dos diversos mecanismos envolvidos na morte celular desse protozoário.

6 Conclusões

- A captação de moléculas do fotossensibilizador azul de metileno, pelas formas promastigostas de *L. amazonensis*, independe dos tempos testados;
- As concentrações de azul de metileno testadas (50 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M) apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si nos tempos testados; Quanto maior a concentração de Am maior a captação pela célula
- Os resultados obtidos pelos testes “*in vitro*” de viabilidade celular (MTT) das promastigotas demonstra que a terapia consegue diminuir a atividade metabólica em até 80%, na condição de 50 μ M de AM com irradiação de 100 mW durante 300s. Menores concentrações de fotossensibilizador resulta em melhor efeito fotodinâmico.
- Os dados de citometria de fluxo relativos ao tamanho demonstram alteração de volume celular após a PDT, mas a granulosidade não foi alterada;
- A exposição de fosfatidilserina, a permeabilidade celular e a alteração do potencial de membrana das formas promastigostas de *L. (L.) amazonensis* foram constatados após a PDT, indicando resposta de morte programada por apoptose possivelmente por via intrínseca;
- A análise das ultraestruturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentam fotodanos e as micrografias apresentam alteração das organelas como a mitocôndria; alteração nuclear e migração do DNA para a periferia da carioteca; alteração no citosol (processo de vacuolização); alteração flagelar com surgimento de bolhas e prolongamentos.
- Concluímos com todo o exposto, que a via de morte provocada pela PDT, nas condições utilizadas neste estudo, é apoptótica, secundário a dano mitocondrial, com alteração do potencial de membrana dessa estrutura.

7 Apêndice

7.1 Apendice A

Deteção da exposição de fosfatidilserina e permeabilidade de membrana, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo método de Anexina V e PI por citometria de fluxo. A e B: Controle sem tratamento - Análise de promastigotas de *L. Amazonensis* sem tratamento, na presença de Anexina V e PI. C: Controle de Apoptose - promastigotas de *L. Amazonensis* com tratamento de indução de apoptose por camptotecina ($5 \mu\text{M}$ /3h/ 37°C) na presença de Anexina V e PI. D: Controle de temperatura (37°C) - Análise de promastigotas de *L. Amazonensis* submetidas as mesmas condições do controle C na presença de Anexina V e PI. E e F: Controle com Luz – Análise de

promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100 mW/250 mW) e tempos de exposição (60s/300s) na presença de Anexina V e PI.

7.2 Apêndice B

Figura 26: Detecção da exposição de fosfatidilserina e permeabilidade de membrana, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo método de Anexina V e PI por citometria de fluxo. A e B. Análise de promastigotas de *L. Amazonensis*

após captação (10 min) de AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M na presença de Anexina V e PI. C e D. Análise de promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 100 mW, na presença de Anexina V e PI. E e F. Análise de promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 250 mW, na presença de Anexina V e PI

7.3 Apêndice C

2º Experimento de citometria de fluxo com marcação de JC-1

Figura 27: Detecção de alteração do $\Delta\psi_m$, em promastigotas de *L. amazonensis*, avaliada pelo ensaio de JC-1 por citometria de fluxo. Controle sem tratamento - Promastigotas de *L. Amazonensis* não tratadas sem marcador JC-1 e na presença de JC-1. Controle com Camptotecina (Cpto) 5 μ M. Controle com Luz - Promastigotas de *L. Amazonensis* irradiadas com diferentes potências (100mW e 250mW) e tempos de exposição de 300s na presença de JC-1. Controle com AM - Promastigotas de *L. Amazonensis* após captação do fotossensibilizador AM (10 min) nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, na presença de JC-1. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 100mW, na presença de JC-1. Promastigotas de *L. Amazonensis* após PDT, com o fotossensibilizador AM nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, LED irradiando na potência de 250mW, na presença de JC-1

8 Referências bibliográficas

AGARWAL, R. et al. Photodynamic effects of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate are mediated by singlet oxygen: in vivo and in vitro studies utilizing hepatic microsomes as a model membrane source. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 294, n. 1, p. 30–7, abr. 1992.

AKILOV, O. E. et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. **Chemistry & biology**, v. 13, n. 8, p. 839–47, ago. 2006.

ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1704, n. 2, p. 59–86, 2004.

ALZATE, J. F. et al. Heat-induced programmed cell death in Leishmania infantum is reverted by Bcl-X(L) expression. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 11, n. 2, p. 161–71, fev. 2006.

AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–274, 2007.

ARNOULT, D. et al. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 1, p. 65–81, 2002.

ASILIAN, A.; DAVAMI, M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. **Clinical and experimental dermatology**, v. 31, n. 5, p. 634–7, set. 2006.

AURELIANO, D. P. et al. Treatment and Control of Leishmaniasis Using Photodynamic Therapy. In: CLABORN, D. M. (Ed.). **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] INTECH, 2014. v. 1.

BACELLAR, I. O. L. et al. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–59, 31 jan. 2015.

BAJGAR, R. et al. High oxygen partial pressure increases photodynamic effect on HeLa cell lines in the presence of chloraluminium phthalocyanine. **Anticancer research**, v. 34, n. 8, p. 4095–9, ago. 2014.

BALL, D. J. et al. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 42, n. 2, p. 159–63, fev. 1998.

BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. **Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle *American cutaneous leishmaniasis : Revista Brasileira*

de Epidemiologia, v. 7, p. 328–337, 2004.

BERG, K.; MOAN, J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. **Photochemistry and photobiology**, v. 65, n. 3, p. 403–9, mar. 1997.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–75, ago. 2007.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRUCHHAUS, I. et al. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 8, p. 376–83, ago. 2007.

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

CASSIDY, C. M. et al. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 95, n. 2, p. 71–80, 4 maio 2009.

CHRUSCIK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) guyanensis in Manaus, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255–60, 4 fev. 2011.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological reviews**, v. 193, p. 10–21, 2003.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 13, p. 2461–2469, 2001.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 10, p. 2069–80, out. 2009.

DEBRABANT, A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 257–267, mar. 2003.

DEPONTE, M. Programmed cell death in protists. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 7, p. 1396–405, jul. 2008.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological research**, v. 163, n. 1, p. 1–12, jan. 2008.

DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 11, p. 536–42, nov. 2006.

EL-HANI, C. N. et al. Apoptosis and apoptotic mimicry in Leishmania: an evolutionary perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2,

n. July, p. 96, jan. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ENK, C. D. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. **Archives of dermatology**, v. 139, n. 4, p. 432–4, 1 abr. 2003.

ENK, C. D. et al. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Photodynamic Therapy. 2013.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14666, 2 jan. 2011.

GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 8, p. 1093–1107, 2009.

GARDLO, K. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 893–6, jun. 2003.

GHAFFARIFAR, F. et al. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. **Eastern Mediterranean health journal = La revue de santé de la Méditerranée orientale = al-Majallah al-ṣiḥḥīyah li-sharq al-mutawassiṭ**, v. 12, n. 6, p. 902–8, nov. 2006.

GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 63, n. 1–3, p. 103–13, out. 2001.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, jun. 2012.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–33, abr. 2010.

GREBENOVÁ, D. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 69, n. 2, p. 71–85, fev. 2003.

GRIVICICH, IVANA; REGNER, ANDREA; DA ROCHA, A. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 3, n. 5, p. 436–50, maio 2004.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–9, 2 out. 1999.

HORIKAWA, M. M.; PENA, M. S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 32–

37, 2011.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 104, jan. 2010.

JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 18–24, jun. 2001.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 25, n. 1–2, p. 505–19, jan. 2006.

KANELLOPOULOS, P. et al. Assessment of the infectivity potential of *Leishmania infantum*, using flow cytometry. **Experimental Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 29–33, 2014.

KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy and cell death pathways. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 635, p. 35–46, 2010.

KHADEM VATAN, S. et al. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 208–216, out. 2013.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–67, set. 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. v. 5

LAM, M.; OLEINICK, N. L.; NIEMINEN, A. L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47379–86, 14 dez. 2001.

LEE, N. et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 1, p. 53–64, 2002.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35–46, mar. 2007.

LOGUE, S. E.; MARTIN, S. J. Caspase activation cascades in apoptosis. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 1, p. 1–9, 1 fev. 2008.

LÜDER, C. G. et al. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 116, 2010.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, jan. 2010.

MESLIN, B. et al. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 26, 2011.

MILLS, A.; WANG, J. Photobleaching of methylene blue sensitised by TiO₂: an

ambiguous system? **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 127, n. 1–3, p. 123–134, out. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <Ministério da Saúde>.

MOOR, A. C. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **Journal of photochemistry and photobiology B Biology**, v. 57, n. 1, p. 1–13, 2000.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–21, 7 jan. 2002.

ORIORDAN, K.; AKILOV, O.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 247–262, 2005.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in Leishmania donovani Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of Cryptococcus neoformans. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54387, 18 jan. 2013.

PRATES RENATO ARAUJO. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS**. [s.l.] Univeisdade de São Paulo, 2010.

REECE, S. E. et al. The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002320, 1 dez. 2011.

RODRIGUES, I. A. et al. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on Leishmania spp. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 374–389, 1 jul. 2002.

SEN, N. et al. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate Leishmania donovani. **Cell death and differentiation**, v. 11, n. 8, p. 924–36, ago. 2004.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 233–44, mar. 2006.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–51, maio 2004.

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ, MARTHA SIMÕES RIBEIRO, A. S. G. **PDT Terapia fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia** -. Disponível em: <<http://blogelseviersaude.elsevier.com.br/tag/livro-pdt-terapia-fotodinamica-antimicrobiana-na-odontologia/>>. Acesso em: 1 out. 2013.

SONG, D. et al. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Photomedicine and laser surgery**, 14 jun. 2011a.

SONG, D. et al. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Photomedicine and laser surgery**, 14 jun. 2011b.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, set. 2005.

TRIPATHI, A.; GUPTA, C. . Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in Leishmania promastigotes☆. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 1–9, 25 abr. 2003.

TUITE, E. M.; KELLY, J. M. New trends in photobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 21, n. 2–3, p. 103–124, dez. 1993.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 71, n. 1–3, p. 87–98, 15 out. 2003.

VERCAMMEN, D. et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329–45336, 2004.

VERCAMMEN, D. et al. Serpin1 of Arabidopsis thaliana is a Suicide Inhibitor for Metacaspase 9. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, n. 4, p. 625–636, 2006.

VERMA, N. K.; SINGH, G.; DEY, C. S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, maio 2007a.

VERMA, N. K.; SINGH, G.; DEY, C. S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, maio 2007b.

WAINWRIGHT, M. et al. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, n. 3, p. 233–239, out. 1997.

WAINWRIGHT, M. Photoinactivation of viruses. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 3, n. 5, p. 406–11, 30 maio 2004.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 4, p. 263–72, 1 dez. 2005.

WANDERLEY, J. L. M. et al. **Apoptotic mimicry: An altruistic behavior in**

host/Leishmania interplay **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2005.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 16 jan. 2010.

WHO TECHNICAL REPORT SERIES. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.** World Health Organization technical report series. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WYLD, L.; REED, M. W.; BROWN, N. J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. **British journal of cancer**, v. 84, n. 10, p. 1384–6, 18 maio 2001.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. et al. In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 15, n. 1, p. 68–76, jan. 2010.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 104, jan. 2010.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**