

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROBERTA AYRES FERREIRA DO NASCIMENTO VOLPE

Terapia fotodinâmica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana:
avaliação da associação de terapias em camundongos experimentalmente
infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Maringá
2017

ROBERTA AYRES FERREIRA DO NASCIMENTO VOLPE

Terapia fotodinâmica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana:
avaliação da associação de terapias em camundongos experimentalmente
infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof.^a Dr.^a Thaís Gomes Verzignassi Silveira

Maringá
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROBERTA AYRES FERREIRA DO NASCIMENTO VOLPE

Terapia fotodinâmica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana:
avaliação da associação de terapias em camundongos experimentalmente
infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Thaís Gomes Verzignassi Silveira
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Andrea Cláudia Bekner Silva Fernandes
Universidade Estadual de Maringá (DAB/UEM)

Prof^a. Dr^a. Kárin Rosi Reinhold de Castro
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Noburo Hioka
Universidade Estadual de Maringá (DQI/UEM)

Dr^a. Maria Bernadete Gonçalves
Médica dermatologista e pediatra (Maringá/PR)

Aprovada em: 24 de março de 2017.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, campus da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes em minha vida:

Minha mãe, pelo apoio incondicional e constante incentivo;

Meus avós maternos, pelo exemplo de vida que são;

Meu irmão, pelo exemplo e determinação;

Meu pai, pela determinação e persistência;

Minha filha, meu maior presente e por compreender minhas ausências;

Meu marido, pelo apoio, compreensão e incentivo constantes.

A eles, meu muito obrigada.

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, que todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir e por me permitir concretizar esse sonho.

Agradeço, imensamente, a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Thaís Gomes Verzignassi Silveira por ter me aceito, sem ao menos me conhecer, e por ter acreditado em mim desde sempre. Pela confiança, exemplo de ser humano e profissional, ensinamentos e orientação, cujo amor pela pesquisa me contagiou.

Aos meus pais, Valéria e Pedro Luiz, por terem me dado educação, valores, amor e apoio incondicional.

Aos meus avós, Maria Eliza e Roberto, minhas bases, minhas fortalezas.

Ao meu irmão, Pedro Luiz, pelo exemplo e ajuda constante.

Ao meu amor, Ricardo, por ter compreendido minhas ausências e minha dedicação na busca desse sonho, pelo apoio e inúmeros sacrifícios em prol da nossa família.

Ao meu tesouro, minha filha Beatriz, que, com seu sorriso constante, me incentivava a cada dia não desistir.

Aos meus familiares, que mesmo de longe acreditaram na minha determinação.

Agradeço em especial, a Taísa Navasconi e Vanessa Nesi, pela ajuda na execução desse trabalho, por me ensinarem um pouco do conhecimento imenso que possuem, pela paciência e exemplo.

A todos os alunos e funcionários do laboratório de imunologia que me acolheram com tanto carinho, e sempre estiveram dispostos a me ajudar no que fosse preciso. Essenciais!

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A todos vocês, meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.

(MARTHIN LUTHER KING)

Terapia fotodinâmica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana: avaliação da associação de terapias em camundongos experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Apresenta-se com as formas clínicas: cutânea (LC), cutâneo-mucosa (LCM) e cutânea difusa (LCD). A forma cutânea é a apresentação mais comum, responsável por mais de 90% dos casos no Brasil. Atualmente, os medicamentos disponíveis para o tratamento são injetáveis, com muitos efeitos colaterais, longo esquema de tratamento e possibilidade de resistência medicamentosa. Deste modo, terapias alternativas têm sido avaliadas, entre elas a terapia fotodinâmica. **Objetivo:** Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica isoladamente e em associação com os medicamentos de referência para o tratamento de LTA. **Metodologia:** Camundongos BALB/c foram infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na pata posterior direita e divididos em 6 grupos: **Gluc+TFD** tratados com Glucantime® e terapia fotodinâmica com azul de metileno/LED vermelho (diodo emissor de luz); **Gluc** tratados com Glucantime®; **TFD** tratados com terapia fotodinâmica com azul de metileno/LED vermelho; **Anfo+TFD** tratados com anfotericina e terapia fotodinâmica com azul de metileno/LED vermelho; **Anfo** tratados com anfotericina e **Controle** infectados e não tratados. Dois ciclos de tratamento foram realizados, o primeiro entre 45 e 75 dias após a infecção, com os dispositivos de LED distando 4 cm da lesão, aplicados 2 vezes por semana por 4 semanas e um segundo ciclo entre 105 e 135 dias após a infecção com o LED distando 1 cm da lesão, 3 vezes por semana por 4 semanas. Após 165 dias da infecção determinou-se a carga parasitária. **Resultados:** Ao final do primeiro e do segundo ciclos de tratamento não se observou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as medidas de volume e espessura das patas infectadas nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Porém houve redução significativa ($p < 0,05$) na carga parasitária do linfonodo poplíteo dos grupos **Gluc+TFD**, **Gluc**, **TFD** e **Anfo** quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os resultados apresentados mostram que apesar de não ter sido encontrada diferença significativa nas avaliações físicas da pata (espessura e volume), houve uma tendência de queda das medidas no grupo **Gluc+TFD**, como pode ser observado especialmente nos dados de volume e corroborado pela negativação da carga parasitária.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Azul de metileno; Leishmaniose cutânea; *Leishmania* (*Leishmania*).

Photodynamic therapy for treatment of American cutaneous leishmaniasis: an assessment of association of therapies in experimentally infected mice with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* that affects the skin and mucous. There are three main clinical forms of the disease: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous. Cutaneous leishmaniasis is the most common form, accounting for over 90% of cases in Brazil. Currently available drugs for treatment are injectable, with side effects, long-term treatment regimen and the possibility of drug resistance. Thus, alternative therapies have been tested, including photodynamic therapy. **Objective:** to assess the effectiveness of photodynamic therapy on its own and associated with drugs prescribed for the treatment of ACL. **Methodology:** BALB/c mice were experimentally infected with *Leishmania amazonensis* and divided into 6 groups: **Gluc+PDT** treated with Glucantime® and photodynamic therapy with methylene blue/red LED (light-emitting diode); **Gluc** treated with Glucantime®; **PDT** treated with photodynamic therapy with methylene blue/red LED; **Ampho+PDT** treated with Amphotericin and photodynamic therapy with methylene blue/red LED; **Ampho** treated with Amphotericin and **Control** which were infected but not treated. Two treatment cycles were performed. The first between 45 and 75 days after the infection, with the LED devices 4 cm apart from the lesion, applied twice weekly for 4 weeks. A second cycle was performed between 105 and 135 days after the infection with the LED devices 1 cm away from the lesion, 3 times a week for 4 weeks. After 165 days of infection, the parasite load was determined. **Results:** At the end of the first and second treatment cycles, there were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between measures of volume and thickness of the infected footpads in the treated groups when compared with the control group. However, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the parasitic load of the popliteal lymph node of the **Gluc+PDT**, **Gluc**, **PDT** and **Ampho** groups when compared with the control group ($p > 0.05$). **Findings:** The results showed that although there is no significant difference in the evaluations of footpad size (thickness and volume), there is a downward trend of measurements in the group **Gluc+PDT**, as can be observed by volume data and by parasite load negative.

Key words: Photodynamic therapy; Methylene blue; Cutaneous leishmaniasis; *Leishmania* (*Leishmania*).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Sistema de iluminação (LED)	54
Figura 2	Fluxograma do experimento	55
Figura 3	Evolução das mensurações de volume das lesões das patas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i>	56
Figura 4	Evolução das mensurações de espessura das lesões das patas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i>	57
Figura 5	Quantificação da carga parasitária em camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i>	58
Figura 6	Estrutura química da anfotericina B	59
Figura 7	Estrutura química do antimonial de N-metilglucamina	60

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): Anais Brasileiros de Dermatologia (ABD) disponível em: <http://www.anaisdedermatologia.org.br/content/imagebank/pdf/Normas-2017-PT-1.pdf>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	14
1.1	Revisão bibliográfica	14
1.2	Leishmanioses	14
1.3	Terapia Fotodinâmica	24
1.4	Justificativa	31
1.5	Objetivos	31
1.6	Referências bibliográficas	32
2	CAPÍTULO II	39
2.1	Artigo: Terapia fotodinâmica para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana: avaliação da associação de terapias em camundongos experimentalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	39
3	CAPÍTULO III	61
3.1	Conclusões	61
3.2	Perspectivas futuras	62

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias não contagiosas que acometem o homem, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*. É considerada uma das maiores endemias mundiais e uma das seis doenças tropicais mais importantes constituindo um problema de saúde pública, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Sua importância deve-se ao seu alto coeficiente de detecção, ampla distribuição mundial e principalmente por sua alta capacidade de gerar formas clínicas incapacitantes e deformantes, podendo ser letal em algumas apresentações (Gontijo et al, 2003; Silva et al, 2008; OPAS, 2015; WHO, 2016).

Segundo a OMS, a leishmaniose é encontrada em 102 países, áreas ou territórios em todo o mundo e sua notificação é compulsória em 30. Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo e 350 milhões estejam expostas ao risco de adoecer. Anualmente, registra-se aproximadamente dois milhões de novos casos da doença no mundo (Gontijo et al, 2003; WHO, 2016).

Existem duas formas clínicas da doença, a leishmaniose visceral (LV) e a tegumentar (LT), esta última também chamada nas Américas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Silva et al, 2008). A LV apresenta a maior gravidade devido ao parasitismo do sistema linfático e inúmeras complicações sistêmicas como febre, anemia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e podendo ser algumas vezes fatal. Um relatório realizado pela OMS em 2012, (Alvar et al, 2012) estimou que 90% dos casos globais de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A leishmaniose tegumentar tem ampla distribuição mundial com ocorrência de 0,7 a 1,2 milhões de casos novos ao ano em todo o mundo, pelo menos 70% a 75% destes casos ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (Gontijo et al, 2003; Pinheiro, 2004; Alvar et al, 2012, WHO, 2016).

Nas Américas a LTA ocorre desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, tendo o território sul-americano como o principal foco, com exceção de países como Chile e Uruguai. No período de 2001 a 2013 foram registrados 743.970 casos com

média anual de 57.228 casos. Deste total, 78,8% está concentrado no Brasil e em países Andinos. No período de 2010 a 2013 houve uma redução de 19,2% no número total de casos registrados de LT nas Américas, devido a redução da notificação em países como Brasil, Colômbia, Nicarágua, Panamá, Peru, Equador, Paraguai e Argentina, porém houve aumento do registro na Bolívia, Honduras, Costa Rica, México, Guatemala e El Salvador. Essa redução pode ser atribuída a melhoria na organização dos serviços principalmente nos sistemas de vigilância, bem como naqueles relacionados aos aspectos ambientais, biológicos, físicos e sociais (OPAS, 2015).

As primeiras evidências de leishmaniose tegumentar nas Américas foram encontradas em cerâmicas no período pré-inca no Peru e Equador no primeiro século d.c., feitas por índios, as quais apresentavam desenhos de figuras humanas com mutilações de lábios e narizes. Posteriormente, descobriram-se múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose. Cunningham, em 1885 na Índia, foi o primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* em casos de LV (Basano et al, 2004; Neves et al, 2011).

No Brasil, a LTA é endêmica e tem sido assinalada em todos os estados brasileiros, com registro nacional de 25.763 casos novos registrados entre 1995 a 2014 (Brasil, 2017). O primeiro relato da existência da doença cutânea no país ocorreu em 1855 realizado por Alexandre Cerqueira. Entretanto, no Brasil, apenas em 1909 Lindenberg confirmou a natureza leishmaniótica das lesões tegumentares, identificando formas parasitárias idênticas a *Leishmania tropica* em indivíduos que trabalhavam em matas no Estado de São Paulo. Porém, Gaspar Vianna, em 1911, intitulou o parasito de *Leishmania braziliensis* por considerá-lo diferente da *Leishmania tropica*. Até a década de 1970, os casos de LT eram atribuídos a *Leishmania braziliensis* porém com o aperfeiçoamento das técnicas de identificação e análise, outras espécies de *Leishmania* foram sendo registradas (Gontijo et al, 2003; Basano et al, 2004; Brasil, 2017).

A LTA no Estado do Paraná, vem sendo descrita desde o início do século XIX e tornou-se endêmica a partir de 1980. Sua distribuição geográfica é ampla e irregular com maior concentração de notificações em municípios do norte e oeste do Estado, sendo registrada em 300 dos 399 municípios. É responsável por 99,3% dos casos registrados no Sul do país (Monteiro et al, 2009; Negrão et al, 2013).

Ambos os sexos e todas as faixas etárias podem adoecer, entretanto 90% dos casos no país ocorrem em maiores de 10 anos de idade (Brasil, 2017). A adaptação do vetor ao

ambiente peridomiciliar possibilitou a transmissão de toda a população igualmente, sem distinguir sexo, idade ou profissão (Ferreira et al, 2012).

A doença apresenta transmissão vetorial, através da picada de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos infectados. Os vetores são dípteros da família *Psychodidae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com distribuição ampla em locais de clima quente e temperado. Apenas no ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou a participação desses insetos na transmissão da LT. Existem atualmente mais de 350 espécies catalogadas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* nas Américas e pelo cerca de 200 espécies ocorrendo na bacia amazônica e pelo menos 30 são vetores comprovados. Os flebotomos (hospedeiro invertebrado) infectam-se ao picar um animal portador do parasito (hospedeiro vertebrado), geralmente mamíferos silvestres como o tamanduá, preguiça, roedores, raposas e outros, sendo as lesões neles geralmente inaparentes. Apenas os insetos fêmeas são hematófagos (Gontijo et al, 2003; Bolognia et al, 2008; Neves et al, 2011).

Apesar de ser considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres que acomete secundariamente o homem como hospedeiro acidental quando este invade regiões de florestas, a doença também pode ocorrer em zonas rurais, já desmatadas, e em locais periurbanos. Apesar de raro, hoje já se considera possível que o homem infectado seja a única fonte de infecção para o vetor caracterizando uma antroponose (Basano et al, 2004; Desjeux, 2004; Sampaio et al, 2008; Neves et al, 2011; Gomes et al, 2014; Brasil, 2017).

A leishmânia apresenta duas formas morfológicas, uma flagelada chamada de promastigota que ocorre no intestino do vetor, como parasito extracelular (animais invertebrados) e uma outra forma aflagelada, arredondada chamada de amastigota, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos e observada nos tecidos humanos e em animais vertebrados. Ambas as formas se reproduzem por divisão binária (Gontijo et al, 2003; Basano et al, 2004; Neves et al, 2011; Brasil, 2017).

A infecção dos flebotomíneos ocorre quando a fêmea pica o homem ou o animal infectado e ingere monócitos parasitados com amastigotas. No tubo digestório do inseto os monócitos se rompem liberando as leishmânias que se transformam em promastigotas e multiplicam-se por divisão binária. Quatro dias após se infectar, o inseto já pode transmitir o parasito a um novo hospedeiro definitivo. Durante um novo processo de alimentação do

flebotomíneo ocorre a transmissão do parasito pela inoculação de formas promastigotas. Quatro a oito horas após, os parasitos flagelados são fagocitados por macrófagos teciduais, nos quais transformam-se, em até 24 horas, em formas amastigotas. Após intensa multiplicação, os amastigotas esgotam a resistência da membrana macrófagica, rompendo-a e liberando os parasitos que serão novamente fagocitados disseminando, assim, a infecção por via hematogênica ou linfática e iniciando uma reação inflamatória com atração de novos macrófagos, gerando um novo ciclo (Veronesi et al, 1999; Neves et al, 2011).

Apesar dos macrófagos serem células especializadas no combate à infecção, as leishmânias desenvolvem mecanismos de escapar e continuam se multiplicando até o rompimento das células. Esse processo desencadeia a liberação de partículas antigênicas que são apresentadas ao sistema imune para gerar uma resposta específica. Devido à característica de parasitismo intracelular o controle da infecção é dependente da resposta imune mediada por células, onde as principais células efetoras na destruição dos parasitos são os linfócitos auxiliares ou também chamados “helper”, os quais ativam os macrófagos tornando-os capazes de eliminar os amastigotas através da secreção de citocinas, principalmente de interferon-gama (IFN- γ). Após a estimulação antigênica, os linfócitos T helper diferenciam-se em Th1, células associadas em combater parasitos intracelulares, que secretam principalmente IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 12 (IL-12), IL-2, linfotoxinas e algumas quimiocinas produzidas pelos macrófagos (Pinheiro et al, 2004; Neves et al, 2011). Desta forma, a apresentação clínica da leishmaniose dependerá não apenas da espécie de *Leishmania* envolvida, mas também do estado imunológico do hospedeiro. Sabe-se que a incapacidade de gerar uma resposta imune celular eficiente está associada à evolução clínica desfavorável e menor resposta terapêutica. Vários trabalhos indicam que a suscetibilidade à infecção e progressão da doença estão associadas a ativação de uma resposta imune do tipo Th2 que produzem principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 estando envolvidas em processos alérgicos e proteção contra agentes infecciosos extracelulares (Pinheiro et al, 2004; Neves et al, 2011; Brasil, 2017).

No mundo existem pelo menos 20 espécies de leishmânia causadoras de leishmaniose tegumentar e estão divididas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* de acordo com o local de evolução do parasito no tubo intestinal do flebotomíneo. No subgênero *Viannia* os parasitos se desenvolvem no intestino anterior, médio e posterior do vetor e no subgênero *Leishmania* os parasitos se desenvolvem no intestino anterior e médio. No Brasil encontramos seis espécies de leishmânias causadoras de LTA: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*,

Leishmania (Viannia) guyanensis, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie que mais comumente causa doença no homem, e está envolvida nas formas mais graves da doença. É encontrada em todas as áreas endêmicas do país, sendo a espécie mais isolada no Estado do Paraná. Apresenta com frequência animais domésticos como seu reservatório e pode produzir lesões cutâneas e também mucosas (Silveira et al, 1996; Gontijo, 2003; Desjeux, 2004; Sampaio et al, 2008; Bologna et al, 2008).

O tempo entre a picada do inseto e o aparecimento da lesão inicial pode variar de duas semanas a dois anos, porém o período de incubação médio é de 2 meses. A LT manifesta-se clinicamente na pele e nas mucosas. Sua classificação irá depender da espécie do parasito e da resposta imune do indivíduo, podendo limitar-se ao local da picada ou disseminar-se para as mucosas e outros sítios cutâneos. Subdivide-se em cutânea (LC), cutâneo-mucosa (LCM) e cutânea difusa (LCD) (Neves et al, 2011; Ferreira et al, 2012; Brasil, 2017).

Na LC a lesão inicial é caracterizada por uma pápula eritematosa, única ou múltipla localizada geralmente em regiões expostas do tegumento que evolui para úlcera indolor de bordas elevadas, infiltradas (em moldura), contorno regular e fundo com tecido de granulação recoberto com exsudato seroso ou seropurulento. Oitenta e cinco por cento dos pacientes com a forma cutânea apresentam a lesão ulcerada como manifestação clínica mais comum. Esta lesão, caso não tratada, evolui por um período médio de 6 meses, em seguida se estabiliza e a medida que prevalece a reação imune do hospedeiro tende a cura espontânea, deixando uma área cicatricial discrômica com atrofia e fibrose. Adenopatia e linfangite nodular podem ocorrer (Sampaio et al, 2008; Almeida et al, 2011; Neves et al, 2011; Brasil, 2017).

A forma cutânea-disseminada, uma variante rara (2%) da forma cutânea, descrita inicialmente em 1986, caracteriza-se por múltiplas lesões papulares, por vezes com aspecto acneiforme podendo chegar a centenas delas provavelmente devido a disseminação hematogênica ou linfática do parasito. Outro aspecto importante dessa variante é a presença de sintomas sistêmicos como febre, mal-estar, emagrecimento e anorexia além de muitas vezes serem acompanhadas de lesões mucosas em 30% dos casos. Raramente acompanha-se de adenopatia (Sampaio et al, 2008; Almeida et al, 2011; Neves et al, 2011; Brasil, 2017;).

Simultaneamente ou em seguida a lesão cutânea inicial, por disseminação hematogênica ou linfática, lesões mucosas podem aparecer, caracterizando a forma cutâneo-

mucosa da leishmaniose. Cerca de 3% dos pacientes com leishmaniose cutânea irão desenvolver a forma mucosa da doença. Setenta por cento dos casos a lesão mucosa ocorre em até 5 anos após a lesão cutânea inicial (Veronesi et al, 1999; Neves et al, 2011). Em estudo realizado com pacientes atendidos em uma universidade do noroeste do Paraná constatou que o comprometimento nasobucofaríngeo ocorreu em 7,7% dos casos (Silveira et al, 2009). No Brasil o agente etiológico envolvido é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Neves et al, 2011). As manifestações atingem mais comumente a mucosa nasal (90%) (Lessa et al, 2007), porém lábios, orofaringe, laringe, mucosa ocular e genital também podem estar envolvidos (Bologna et al, 2008). Inicialmente os pacientes queixam-se de obstrução nasal, coriza e após a progressão da lesão surge dor. A sintomatologia clínica pode variar desde um discreto edema local até intensa infiltração, destruição e perfuração da cartilagem nasal causando o desabamento do nariz para frente dando o aspecto de nariz de anta. Alterações na fonação podem ocorrer devido a destruição das cordas vocais. Sabe-se que indivíduos com lesões cutâneas que curaram espontaneamente, lesões acima da cintura e com evolução a mais de um ano apresentam maior risco de apresentarem lesões mucosas. Não existe um fator determinante para o aparecimento das lesões em mucosas, porém acredita-se que essa manifestação esteja na dependência de fatores intrínsecos do parasito, fatores inerentes a resistência natural do hospedeiro e da magnitude da resposta imune ao parasito (Veronesi et al, 1999; Lessa et al, 2007; Bologna et al, 2008; Neves et al, 2011; Brasil, 2017).

Visto raramente, a forma clínica cutânea difusa da leishmaniose caracteriza-se pela presença de nódulos, pápulas e placas, hiperpigmentadas, não-ulceradas, infiltradas que lembram a hanseníase virchowiana. Sabe-se que a multiplicidade de lesões deve-se a disseminação linfo-hematogênica do agente. No Brasil é causada mais frequentemente pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e 40% dos indivíduos parasitados por essa espécie desenvolvem (LCD). Imunologicamente os pacientes apresentam completa anergia o que explica a disseminação do quadro cutâneo e grande quantidade de parasitos nas lesões (Fonseca et al, 1986; Veronesi et al, 1999; Neves et al, 2011).

Do ponto de vista imunológico a LTA apresenta dois polos de evolução. De um lado o polo anérgico que caracteriza a LCD com ausência de imunidade celular específica, inativação de macrófagos e grande número de parasitos e no outro, o polo hiperérgico que caracteriza a LCM com intensa imunidade celular e produção de grande quantidade de citocinas Th1 gerando intenso dano tecidual e poucos parasitos. Entre os polos está a LC em

que o indivíduo apresenta uma imunidade celular específica eficiente e equilibrada (Sampaio et al, 2008; Brasil, 2017).

Na prática clínica a confirmação diagnóstica de LTA é realizada de duas maneiras: pela demonstração do parasito ou pelo diagnóstico imunológico. A pesquisa do parasito ou também chamado exame direto pode ser feita no material obtido da lesão existente através da raspagem das bordas ou coleta de amostra tecidual por biópsia cutânea. Com este material pode-se realizar quatro testes diagnósticos: o exame do esfregaço pela impressão do material por aposição em lâmina (*imprint*) com posterior coloração com Giemsa, Wright, Papanicolau ou Leishman; exame anatomopatológico a partir do fragmento obtido por biópsia cutânea; culturas do parasito *in vitro* onde o material coletado é semeado em meios de cultura como o meio sólido Novy MacNeal Nicole (NNN) associado ao Liver Infusion Triptose (LIT) ou em meio líquido Schneider's e a cultura *in vivo* pela inoculação do parasito em hamsters por via intradérmica. O isolamento do parasito permite a identificação da espécie de *Leishmania*. Atualmente também é possível realizar a pesquisa do DNA do parasito a partir do material coletado da biópsia ou escarificação da lesão para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) que apresenta alta sensibilidade e especificidade e algumas de suas técnicas ainda permitem identificar a espécie da *Leishmania*, porém restringem-se as pesquisas clínicas devido a complexidade da metodologia e ao alto custo. (; Gontijo et al, 2003; Sampaio et al, 2008; Neves et al, 2011; Ferreira et al, 2012; Gomes et al, 2014; Brasil, 2017).

O exame de esfregaço, por ser mais rápido, de baixo custo e de fácil execução é atualmente o teste diagnóstico de escolha. Apresenta sensibilidade variável, de 15 a 70% a depender do tempo de evolução da lesão. Nas lesões com menos de 3 meses, devido a grande quantidade de amastigotas, o teste apresenta alta taxa de positividade, já nas lesões antigas e mucosas a taxa decai, sendo raramente positivo após um ano. O ideal é realizá-lo antes de instituída a terapêutica, pois os parasitos desaparecem logo após o início do tratamento (Veroseni et al, 1999; Murback et al, 2011; Gomes et al, 2014; Brasil, 2017).

No exame histopatológico a visualização dos parasitos não costuma ser fácil, principalmente nas lesões mais antigas, o que torna o teste menos específico. Os achados clássicos são de uma reação granulomatosa linfo-histio-plasmocitária com áreas de células epitelióides e muitos plasmócitos. Em alguns casos, formas amastigotas podem ser visualizadas na coloração de hematoxilina eosina (HE). Para aumentar a sensibilidade do teste pode-se realizar análise de imunohistoquímica (Sampaio et al, 2008; Gomes et al, 2014).

Exames de cultura *in vitro* e inoculação *in vivo* podem alcançar até 80% de positividade, porém são reservados para uso em pesquisas devido as dificuldades técnicas, algumas técnicas apresentam ainda alta complexidade metodológica e alto custo (Veronesi et al, 1999).

O diagnóstico imunológico baseia-se em dois tipos de testes: teste intradérmico ou reação de Montenegro e teste sorológico. A reação de Montenegro, idealizada por Montenegro em 1926, é a mais utilizada. Avalia o grau de sensibilização do hospedeiro ao parasito por hipersensibilidade celular tardia ou retardada (tipo 4 de Gells e Coombs). Consiste na injeção intradérmica de 0,1 a 0,3 mL de solução fenolada de leptomonas (preparado antigênico de promastigotas) na concentração de 2 a 3 milhões/mL na face interna do braço. Após 48 a 72 horas realiza-se a leitura do teste o qual é considerado positivo quanto uma endureção de 5 mm ou mais de diâmetro se forma no local. Sua sensibilidade é variável podendo chegar a 90% em alguns estudos, entretanto sua especificidade é relativamente baixa, 75%. A positividade do teste indica que o paciente foi sensibilizado ao agente, mas não necessariamente que ele seja portador da doença, pois o teste continua positivo por muito tempo após a cura clínica da leishmaniose pela instalação de uma imunidade duradoura. Nas primeiras 4 a 6 semanas de doença, em pacientes imunocomprometidos e na LCD podem apresentar resultados negativos e nas lesões mucosas a reação é geralmente exacerbada com pápula de diâmetros elevados (Veronesi et al, 1999; Sampaio et al, 2008; Gomes et al, 2014; Neves et al, 2011; Brasil, 2017).

Na análise diagnóstica, alguns testes sorológicos são utilizados para avaliar a imunidade humoral, detectando anticorpos anti-*Leishmania*. Entre eles pode-se utilizar a imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imuno enzimático (EIE) e o *immunoblotting* (*Western Blot*). A IFI e o EIE são considerados testes de alta sensibilidade podendo obter valores de até 90% em alguns estudos. Já o Western Blot, apesar de poder apresentar sensibilidade de 100% é uma técnica que necessita de estrutura laboratorial complexa e possui alto custo o que dificulta a sua implantação como exame diagnóstico de rotina. A técnica de IFI é a mais disponível comercialmente e apresenta-se positiva (títulos superiores a 1:40) em até 70% dos pacientes com lesão cutânea no primeiro ano da doença e geralmente é negativa nos casos de acometimento mucoso. Vários estudos demonstram que com o tratamento os títulos de anticorpos declinam e alguns autores ainda consideram esse fato como um dos critérios de cura da doença, porém não o único, onde a permanência de sua positividade, após

a terapia, poderia significar maior susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões mucosas (Gomes et al, 2014; Brasil, 2017).

O tratamento de LTA foi introduzido no Brasil em 1912 por Gaspar Vianna com o antimonial tártaro emético. Atualmente, a droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente, existente sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (Pentostam®), porém apenas o primerio está disponível comercialmente no Brasil. O Glucantime® é considerado uma droga leishmanicida interferindo na glicólise e na oxidação de ácidos graxos. A OMS estipulou Glucantime® como droga de primeira escolha no tratamento de todas as formas clínicas de leishmaniose e padronizou a dose entre 10 a 20 mg $Sb^{+5}/Kg/dia$ (Sb^{+5} significando antimonial pentavalente) por 20 dias para lesões cutâneas e 20 mg $Sb^{+5}/Kg/dia$ por 30 dias para lesões mucosas. Cada frasco de 5 ml de antimoniato de N-metilglucamina contém 405 mg de Sb^{+5} e sua administração se faz por via injetável, muscular ou endovenosa (Gontijo et al, 2003; Ferreira et al, 2012; Brasil, 2017).

Não havendo cicatrização completa da lesão, em até 3 meses após o término do tratamento, o esquema pode ser repetido e não havendo resposta novamente deve-se optar por uma droga de segunda escolha. As opções existentes são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). A anfotericina B é um antibiótico poliênico utilizado apenas por via endovenosa com atividade leishmanicida tanto para promastigotas *in vitro* quanto para amastigotas *in vivo*. É a droga de primeira escolha para gestantes. A dose preconizada pelo Ministério da Saúde é inicialmente 1 mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados até no máximo 50 mg em cada aplicação até atingir dose total acumulada de 1 a 1,5 g para a forma cutânea e 2,5 a 3 g para a forma mucosa (Sampaio et al, 2008; Brasil, 2017).

Outra opção como medicação de segunda escolha são as pentamidinas. Diaminas aromáticas com eficácia contra grande número de protozoários patogênicos, de administração intramuscular na dose de 4 mg/Kg/dia a cada dois dias até no máximo de 2 g como dose total. No Brasil, a forma comercializada é apenas o isotionato de pentamidina com frasco contendo 300 mg do sal. Apesar de ser uma droga alternativa, existem poucos trabalhos sobre seu uso no tratamento de LTA nas Américas. Alguns trabalhos demonstram ter um efeito curativo inferior aos antimoniais e maior toxicidade (Sampaio et al, 2008; Neves et al, 2011; Ferreira et al, 2012; Brasil, 2017).

Depois de efetuado o tratamento, o Ministério da Saúde recomenda acompanhamento mensal por 3 meses para avaliar a cura, que é determinada apenas por critério clínico em relação ao aspecto da lesão cutânea, como reepitelização e regressão da infiltração e do edema. Se após este seguimento a cura for constatada, o paciente deve ser avaliado a cada dois meses até completar 1 ano do tratamento. Já no caso de lesões mucosas, o critério curativo é definido pelo desaparecimento dos sinais e comprovação por exame otorrinolaringológico até o sexto mês após o término da terapia. Alguns indivíduos curam rapidamente, mesmo sem tratamento, outros permanecem meses com a lesão em atividade e lentamente cicatrizam, fato que pode ser explicado pelo aparecimento rápido ou lento de uma resposta imune celular específica contra o parasito. Na LC a incapacidade de estabelecer esta resposta imunológica de forma eficiente associa-se a evolução clínica e a resposta terapêutica desfavorável (Veronesi et al, 1999; Gontijo et al, 2003; Brasil, 2017).

O arsenal terapêutico atual contra LTA é bastante restrito. As medicações disponíveis possuem via de administração injetável, efeitos tóxicos, algumas com alto custo além de necessitarem de tempo prolongado de uso para eliminar a infecção o que ocasiona em muitos casos abandono da terapia (Ameen, 2010).

É importante ressaltar que todas as medicações usadas no tratamento da LTA possuem inúmeros e frequentes efeitos adversos ao indivíduo podendo, muitas vezes, limitar seu uso na prática clínica. Para os antimoniais, as reações mais comumente observadas são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura, edema no local da aplicação, além de cardio, nefro e hepatotoxicidade. Por serem abortivos são contra-indicados em gestantes. Em relação à anfotericina observam-se como efeitos colaterais mais frequentes a náusea, vômito, febre, hipopotassemia, flebite no local da infusão, insuficiência renal, anemia, leucopenia e também cardio e nefrotoxicidade. A pentamidina também apresenta muitas reações como dor e abscessos no local da aplicação, náusea, vômito, tontura, mialgia, cefaléia, hipotensão, síncope, hipo e hiperglicemias transitórias (Gontijo et al, 2003; Kashani et al, 2007; Neves et al, 2011).

A variação na eficácia de resultados dos fármacos no tratamento da leishmaniose frequentemente dependem das diferenças na sensibilidade das espécies de leishmânias às drogas, do estado imunitário do paciente, das propriedades farmacocinéticas do medicamento e das formas clínicas da doença. Alguns estudos demonstram que a taxa de falha terapêutica ao antimonial pode chegar a 20%. Somado a esses fatores, muitos estudos tem demonstrado a

existência de resistência medicamentosa a todos os fármacos disponíveis para o tratamento, porém ainda não se sabe ao certo o mecanismo desenvolvido pelo patógeno para se tornar resistente. A resistência primária aos antimoniais pentavalentes pode ocorrer em até 14% dos casos o que contribui muito para o insucesso terapêutico (Croft et al, 2006; Rojas et al, 2006; Rodrigues et al, 2006; Firdous et al, 2009; Junior et al, 2016). Em 2009, Jeddi e colaboradores descreveram a primeira síndrome de hipersensibilidade à droga, secundária ao uso de antimonial de meglumina. Já há descrição de problemas relacionados também à qualidade dos antimoniais disponíveis (Rath et al, 2003; Jeddi et al, 2009). Além de evidências de que o antimônio pentavalente seja reduzido *in vivo* à sua forma trivalente, que é muito tóxica, justificando alguns efeitos colaterais observados (Lima et al, 2007).

Tendo em vista todos os problemas citados relacionados aos medicamentos convencionais para o tratamento da LTA, formas alternativas de terapêutica menos dispendiosas, com menor toxicidade, vias alternativas de administração das drogas, menor tempo de uso e com baixa resistência têm sido testadas, dentre elas destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD) (Garlo et al, 2003; Tardivo et al, 2005; Song et al, 2011; Peli et al, 2011).

1.2 Terapia Fotodinâmica

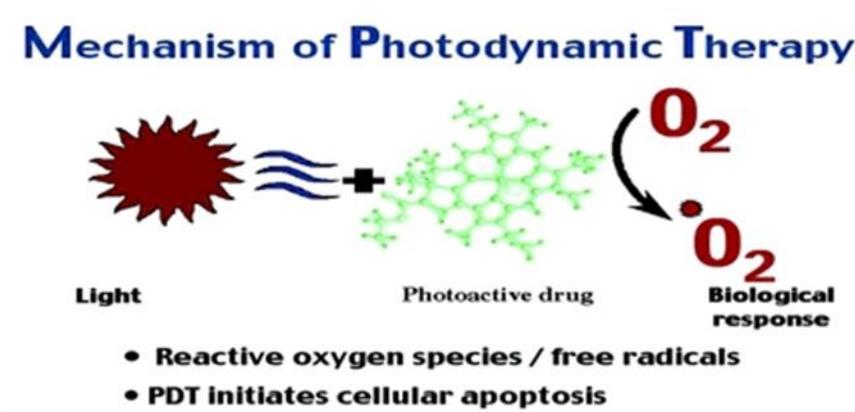
Considerada atualmente como uma nova modalidade médica terapêutica, a TFD é definida pela indução da morte celular através de uma reação fotoquímica formada a partir da combinação de luz visível, fármacos fotossensibilizantes e oxigênio presente nos tecidos, gerando formas tóxicas de oxigênio que causariam a lise das células (Silva et al, 2009; Issa et al, 2010).

Historicamente, o uso da TFD foi iniciado em 1900 por Oscar Raab pela observação de que o corante acridina quando na presença de luz causava rapidamente a inativação do protozoário *Paramecium caudatum*, o que não ocorria com a acridina no escuro. Em 1903, a descoberta realizada por Tappeiner levou a primeira aplicação clínica da TFD ao verificar a diminuição da massa tumoral após o uso do corante eosina em presença de luz para o tratamento de câncer de pele. Em 1904, este mesmo autor citou pela primeira vez o termo “ação fotodinâmica” para designar este processo. Meyer-Betz, em 1912 injetou no próprio corpo hematoporfirina e apenas após expor seu braço a luz observou a ação fotossensibilizadora deste corante, devido ao intenso eritema local gerado, que o deixou fotossensível por dois meses. Em 1925, Policard observou que elevadas concentrações de

hematoporfirinas estavam presentes em tumores malignos e que na presença de luz e oxigênio se tornavam altamente tóxicas ao tecido celular (Machado, 2000; Silva et al, 2009; Torezan et al 2009; Issa et al, 2010; Lee et al, 2011).

Anos depois, em 1960 Lipson obteve sucesso no tratamento de câncer mamário ao utilizar derivados de hematoporfirina e luz. No final dos anos 70, a TFD passou a ser reconhecida como tratamento alternativo para neoplasias após trabalhos realizados por Dougherty e seus colaboradores (Machado, 2000; Silva et al, 2009; Dougherty et al, 1991). No Brasil, a experiência com TFD iniciou em 1997 em São Paulo com a união de profissionais da Universidade de São Paulo, São Carlos, o Hospital Amaral Carvalho de Jaú e da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, que com ajuda de colaboradores internacionais iniciaram as atividades no país (Bagnato et al, 2005).

O tratamento de TFD determina citotoxicidade, e para isto três componentes são necessários: luz, oxigênio e substância fotossensibilizante. A técnica consiste na administração de um agente fotossensibilizante de uso tópico ou sistêmico, que necessita de um intervalo de tempo para se acumular nos tecidos (minutos ou horas), com posterior irradiação de luz, que deve possuir um comprimento de onda compatível com o espectro de absorção máxima da substância fotossensível. O agente fotossensibilizador ligado a célula alvo é ativado na presença de luz, levando-o do repouso para um estado ativado (singlet) de meia vida curta. Após sucessivas reações químicas em cadeia, atinge o estado triplet de meia vida mais longa que ao transferir energia para o oxigênio intracelular formam espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlet (1O_2), altamente reativo que determina um estresse oxidativo local culminando em morte celular por necrose ou apoptose (Machado, 2000; Macdonald et al, 2001; Silva et al, 2009; Torezan et al 2009).



Várias organelas da célula podem ser afetadas nesse processo, como os lisossomos, as membranas plasmáticas, núcleo, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi culminando na alteração de permeabilidade da membrana plasmática e do transporte entre o meio intra e extracelular (Silva et al, 2009). Os ROS causam dano oxidativo dos lipídios, aminoácidos e proteínas induzindo morte celular, porém acredita-se que o evento primordial na toxicidade da TFD seja a alteração da função mitocondrial por inibição da atividade enzimática desta organela (Torezan et al 2009). A fototerapia pode ainda causar morte celular de forma indireta pelo dano ao endotélio vascular com conseqüente diminuição de aporte de oxigênio para o tecido alvo, além de ativar o sistema imune local pela liberação de mediadores inflamatórios contribuindo para sucesso terapêutico. Não há descrito, até então, nenhum efeito mutagênico dessa técnica sobre as células sadias (Machado, 2000; Silva et al, 2009; Torezan et al 2009; Issa et al, 2010; Lee et al, 2011;).

Diversas fontes de luz podem ser utilizadas para ativar substâncias fotossensibilizadoras no tratamento com TFD. Podem ser divididas em três grupos principais: lâmpadas de diodo, lasers e lâmpadas de amplo espectro. As lâmpadas de amplo espectro abrangem quase toda a luz visível e início do infravermelho, produzem uma luz não-coerente. Sua vantagem está no baixo custo, porém a luz emitida apresenta vários comprimentos de onda. Ao contrário das lâmpadas de amplo espectro, os lasers produzem uma iluminação coerente (unifásica) e unidirecional (raio colimado) e apenas um comprimento de onda (monocromático) que deve ser compatível com o espectro de absorção da substância fotossensível. Vários tipos de laser podem ser usados para excitação da substância fotossensibilizadora como o de alumínio, neônio, argônio, diodo entre outros, porém o laser padrão para TFD é o de argônio. Os LEDs (diodo emissor de luz), são condutores de energia elétrica compostos por semi-condutores ligados entre si que quando energizados emitem luz visível a olho nu. Os LEDs são compactos, leves e requerem menos energia para produzir os comprimentos de onda desejados de luz. Possuem uma potência inferior aos lasers, mas são uma boa alternativa por terem custos bem acessíveis (Mang et al, 2004; Silva et al, 2009; Torezan et al, 2009; Issa et al, 2010).

Para o tratamento de TFD os comprimentos de ondas utilizados devem estar entre 400 a 800 nm, intervalo chamado de janela terapêutica, onde há máxima penetração da luz nos tecidos (transmitância) (Silva et al, 2009). A profundidade de penetração do feixe de luz é dependente do comprimento de onda utilizado, por exemplo, um comprimento de onda de 632

nm é capaz de penetrar na pele em aproximadamente 6 mm, já comprimentos entre 400 a 500 nm penetram entre 1 a 2 mm (Machado, 2000; Issa et al, 2010).

A extensão da toxicidade celular depende do tipo da substância fotossensível, da concentração e localização na célula (no meio intra ou extracelular), do tempo de administração, da fonte de luz utilizada, do tempo de exposição a luz e da disponibilidade de oxigênio no tecido (Silva et al, 2009).

Para uma efeito terapêutico efetivo da TFD, além de uma fonte de luz é necessário uma substância fotossensibilizante, a qual deve ser capaz se de acumular nos tecidos e gerar substâncias tóxicas para induzir morte celular. Tal substância deve possuir um espectro de absorção dentro da faixa do comprimento de onda da fonte de luz utilizada e atender a alguns critérios como: alta pureza química, alto coeficiente de absorção, capacidade de se localizar especificamente no tecido alvo, meia vida curta, eliminação rápida do organismo, citotoxicidade apenas na presença de luz, ausência de efeitos adversos sistêmicos, não ser oncogênica, intervalo de tempo pequeno entre a administração e seu acúmulo no tecido alvo e alta capacidade de produzir produtos tóxicos (oxigênio singlet) (Silva et al, 2009; Issa et al, 2010). A capacidade de se fixar seletivamente ao tecido lesado que as substâncias fotossensibilizantes possuem, ainda não está totalmente esclarecida. Acredita-se que alterações da permeabilidade da membrana plasmática, drenagem linfática reduzida e aumento do número e da permeabilidade dos vasos do tecido doente poderiam determinar essa seletividade (Machado, 2000; Issa et al, 2010).

Os agentes fotossensibilizadores, de acordo com sua estrutura química, podem ser classificados em: derivados da porfirina (hematoporfirina, banzoporfirina, ácido 5-aminolevulínico e metil-aminolevulínico), derivados da clorofila (clorinas e bacterioclorinas) e os corantes. Os derivados da porfirina foram a primeira geração de fotossensibilizantes usados em TFD, desenvolvidos nos anos 70 e 80 (Torezan et al, 2009; Silva et al, 2009) . Porém no início, os compostos utilizados apresentavam elevado tempo de meia vida que poderia chegar a 250 horas, além que causar uma fotossensibilização cutânea muito longa que exigia que o paciente se protegesse da luz por até 6 semanas e tempo elevado entre a administração e seu acúmulo no tecido alvo, de até 48 horas. Atualmente, utiliza-se com maior frequência compostos de uso tópico como o ácido aminolevulínico (ALA) e o metil-aminolevulínico (MAL) considerados pró-fármacos que são convertidos em protoporfirina XIX, apresentam a vantagem de se concentrarem no tecido alvo em apenas 3 a 6 horas após a

administração e por serem de uso preferencialmente tópico não causando sensibilização sistêmica do paciente por longos períodos (Allison et al, 2004).

Uma desvantagem ao uso de ALA e MAL em TFD é o alto custo dos medicamentos, já que são medicações importadas. Na busca de novos compostos fotossensibilizantes, mais baratos e fácil acesso, o azul de metileno (AM) tem sido utilizado. O AM é um corante de tiazina utilizado na medicina a mais de um século como anti-séptico de administração oral. Atua seletivamente nas mitocôndrias celulares e apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (Tardivo et al 2005; Peli et al, 2008; Peli et al, 2011). Desde 1876 é utilizado para o tratamento de metahemoglobinemia devido ao seu potencial oxidante que reduz a metahemoglobina em hemoglobina reduzida. É considerado uma alternativa no tratamento da síndrome vasoplégica em cirurgia cardíaca pela sua atividade na musculatura vascular além de ser usado como substância fotossensibilizadora na TFD no tratamento de várias neoplasias (Tardivo et al, 2005; Evora et al, 2009). Atualmente, vem sendo empregado também para desinfecção de produtos sanguíneos devido ao seu potencial de fotoinativação viral, incluindo o vírus do HIV. Além do baixo custo, o azul de metileno em meio aquoso possui um espectro de absorção na região da luz vermelha, com pico máximo entre 664 e 666 nm compatível com a chamada janela terapêutica, o que favorece seu uso para TFD (Floyd et al, 2004). Peli, em 2008, já havia demonstrado que o efeito antibacteriano e antifúngico do AM aumenta drasticamente após a irradiação com LED vermelho (Peli, 2008).

Uma diversidade de patologias podem ser tratadas com TFD em várias especialidades médicas, incluindo a urologia, pneumologia, neurologia, oftalmologia e cirurgia (van der Snoek et al, 2008). Na dermatologia a utilidade mais difundida e estudada é para neoplasias cutâneas como carcinoma basocelulares superficiais, linfomas cutâneos de células T, sarcoma Kaposi e doença de Bowen. Porém, a terapêutica é benéfica também em ceratoses actínicas, acne, psoríase, verruga vulgar, fotoenvelhecimento, esclerodermia cutânea, onicomicose e leishmaniose cutânea (Torezan et al, 2009; Lee et al, 2011).

A atividade leishmanicida da TFD foi descrita inicialmente por Gardlo em 2003 e colaboradores que relataram o tratamento de um homem de 34 anos com múltiplas lesões de LC por *Leishmania donovani*, na Líbia. O paciente foi tratado previamente com stibogluconato de sódio (Pentostam®) sem sucesso e com posterior tratamento de 5 lesões com associação de MAL com TFD usando luz vermelha (75 J/cm²) e 5 lesões com

paramomicina tópica uma vez ao dia. A TFD foi realizada duas vezes por semana por 12 semanas e depois uma vez por semana por mais quatro semanas. Todas as lesões tratadas com TFD obtiveram cura clínica e histopatológica e sem recidiva após 10 meses de acompanhamento pós-tratamento e com excelente resultado cosmético. O fato confirma que a TFD é um tratamento superior a paramomicina, com taxa de resposta completa de 93% versus 41% (Lee et al, 2011; Gardlo et al, 2003). No mesmo ano, 2003, Enk e colaboradores trataram 32 lesões de LC por *Leishmania major* em 11 pacientes israelenses com ALA-TFD com luz vermelha (100 J/cm^2) com melhora clínica e redução significativa das lesões com 1 semana de tratamento e eliminação de amastigotas em 31 lesões (Enk et al, 2003; van der Snoek et al, 2008).

Já em 2004, Gardlo e colaboradores descreveram o tratamento de um homem na Turquia com uma lesão de LC de 3 meses de evolução no ombro esquerdo. Foi utilizado MAL-TFD com iluminação vermelha (75 J/cm^2) e obteve-se cura clínica após 3 meses (Gardlo et al, 2004). Em 2006, Asilian e Davami realizaram o primeiro trabalho placebo-controlado sobre o uso de TFD em LC, realizado no Irã com *Leishmania tropica* e compararam o uso de ALA-TFD com luz vermelha (100 J/cm^2) com o uso de paramomicina tópica. O grupo controle fez uso apenas de pomada à base de parafina. Após 3 meses, 94% das lesões do grupo que realizou a terapia fotodinâmica apresentaram cura completa versus 6% no grupo tratado com paramomicina, em que a cura foi apenas parcial. Histologicamente, todas as amostras do grupo de TFD estavam livres de amastigotas versus 65% no grupo da paramomicina e 20% no grupo placebo (Asilian et al, 2006; van der Snoek et al, 2008).

No Irã, em 2006, Ghaffarifar e colaboradores relataram o tratamento de LC por *Leishmania major* de cinco indivíduos com ALA-TFD e luz vermelha (100 J/cm^2) durante 4 sessões. Após duas semanas, 71% das lesões apresentaram cura clínica e as demais lesões obtiveram redução de pelo menos 95%, sem recidiva após 4 meses. No ano seguinte, Sohl e colaboradores, realizaram o tratamento de LC na face por *Leishmania tropica* em um homem de 57 anos. O paciente havia realizado terapia prévia com paramomicina tópica, itraconazol oral e pentamidina intramuscular sem melhora, porém obteve cura após uso de MAL-TFD (100 J/cm^2) (Ghaffarifar et al, 2006; Sohl et al, 2007).

Akilov e colaboradores, em 2007 realizaram um estudo para avaliar o efeito parasiticida do ALA-TFD em lesões de LC por *Leishmania major*, realizado *in vitro* e *in vivo*. No modelo *in vivo*, a terapia tópica ALA-TFD mostrou boa eficácia em camundongos

BALB/c, com redução significativa da carga parasitária e da lesão, com diminuição intensa do número de macrófagos e aumento dos níveis de IL-6. Porém, o modelo *in vitro* não demonstrou efeito parasiticida sobre os amastigotas. Sugeriu-se que seria improvável que o bom resultado clínico tenha sido por morte direta das leishmânias pela ALA-TFD, mas a destruição inespecífica dos tecidos lesados com obstrução vascular e morte de macrófagos locais infectados (Akilov et al, 2007a).

Em 2011, Evangelou e colaboradores aplicaram ALA intralesional associado à TFD (luz vermelha de $100 \text{ J/cm}^2 = 45 \text{ mW/cm}^2$) em uma lesão de LC na face de um homem de 69 anos. O tratamento foi realizado 3 vezes em intervalos semanais e após 3 meses a lesão apresentou redução de tamanho e sem evidência de infecção residual ao exame histopatológico (Evangelou et al, 2011).

Até o momento, existem poucos trabalhos relatando o uso de AM associado a TFD no tratamento de LC. Song e colaboradores, em 2011, testaram, *in vitro*, o AM no escuro e também após irradiação em *Leishmania amazonensis*, concluindo que a citotoxicidade era muito maior após a irradiação e elevava-se com o aumento da concentração do AM. Neste mesmo estudo realizaram o tratamento de um paciente com LC com AM intralesional associado à TFD com LED (35 mW/cm^2) e baixas doses de antimonial, com cicatrização da lesão após 1 semana da segunda dose de irradiação (Song et al, 2011). No mesmo ano, Peloi e colaboradores, em 2011, avaliaram a eficácia do AM em LC com a infecção experimental em hamsters com *Leishmania amazonensis* e TFD (LED de 12 J/cm^2) 3 vezes por semana por 3 meses e constataram redução, estatisticamente significativa, da espessura da pata infectada e da carga parasitária do linfonodo regional (Peloi et al, 2011). Este mesmo grupo de estudo, em 2015, demonstrou a eficácia do AM tópico versus intradérmico em hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis* associado a TFD com LED (5 mW/cm^2). Os grupos tratados com AM foram comparados com controles tratados com anfotericina B e controles não tratados. O grupo tratado com AM tópico/TFD apresentou cicatrização das lesões e diminuição significativa da carga parasitária quando comparado ao controle não tratado, porém sem diferenças significativas quando comparado ao controle tratado com anfotericina B. O mesmo não ocorreu no uso de AM intradérmico/TFD, que foi ineficaz nos parâmetros avaliados (Sbeghen et al, 2015).

As desvantagens da TFD são mínimas, dentre elas destacam-se a sensação de queimação leve, discromias, eritema local, tempo prolongado de irradiação para algumas

patologias e necessidade de equipamento especial. Todavia, não apresenta toxicidade cumulativa, não gera resistência, baixo custo, fácil aplicabilidade e sem necessidade de internação hospitalar, configurando uma excelente técnica terapêutica atual (Enk et al, 2003; Akilov et al, 2007a; van der Snoek et al, 2008).

JUSTIFICATIVA

Os fármacos empregados no tratamento da leishmaniose possuem elevada toxicidade, via de administração injetável, alto custo, necessidade de tempo prolongado de uso e alguns casos relatados de resistência, o que muitas vezes ocasiona no abandono do tratamento. Em função disso, formas terapêuticas alternativas para LTA têm sido buscadas.

Na tentativa de proporcionar um tratamento seguro, de fácil execução, rápido e com menor número de efeitos colaterais e riscos inerentes à terapia convencional, alguns estudos têm demonstrado a eficiência da TFD no tratamento da LTA.

Essa possibilidade nos motivou a desenvolver um trabalho no intuito de avaliar a eficácia do tratamento para LTA com TFD usando o composto fotossensibilizante azul de metileno e compará-la com as drogas usadas no tratamento convencional (Glucantime® e anfotericina B).

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a associação da terapia fotodinâmica com aplicação tópica de azul de metileno com as drogas da terapia convencional para leishmaniose tegumentar americana (Glucantime® e anfotericina B).

ESPECÍFICOS

Avaliar a eficácia do tratamento com terapia fotodinâmica usando o azul de metileno em lesões induzidas experimentalmente em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Comparar a eficácia da terapia fotodinâmica com azul de metileno ao tratamento injetável convencional com Glucantime® nos camundongos infectados.

Comparar a eficácia do tratamento com terapia fotodinâmica com azul de metileno ao tratamento injetável convencional com anfotericina B nos camundongos infectados.

Avaliar a eficácia do tratamento simultâneo de Glucantime® com terapia fotodinâmica usando o fotossensibilizante azul de metileno tópico nos animais infectados.

Avaliar a eficácia do tratamento simultâneo de Anfotericina B com terapia fotodinâmica usando o fotossensibilizante azul de metileno tópico nos animais infectados.

REFERÊNCIAS

- AKILOV O.E.; KOSAKA S.; O'RIORDAN K.; HASAN T. Parasiticidal effect of d-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Experimental Dermatology*, v. 16, p. 651–660, 2007a.
- ALLISON R.R.; DOWNIE G.H.; CUENCA R.; HU X.; CHILDS C.J.H.; SIBATA C.H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*., v. 1, p. 27-42, 2004.
- ALMEIDA O.L.S.; SANTOS J.B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 86(3), p. 497-506, 2011.
- ALVAR J.; VE'LEX ID.; BERN C.; HERRERO M.; DESJEUX P.; et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, v. 7(5), p. 01-12, 2012.
- AMEEN M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology*., v. 35(7), p. 699-705, 2010.
- 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 Experimental Dermatology*., v. 31, p. 634–637, 2006.
- BAGNATO V.S.; KURACHIA C.; MARCASSA J.G. FERREIRA J.; SIBATA C.H.; ALLISON R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*., v.2, p. 107-118, 2005.

BASANO S.A.; CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, nº 3, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 1ª edição, versão eletrônica, 2017. Brasília. DF. Brasil. Acessado em 11/04/2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BOLOGNIA J.L.; JORIZZO J.L.; RAPINI R.P. *Dermatologia*. Vol. 1, Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2 ed., p. 1263-1268, 2008.

CROFT S.L.; SUNDAR S.; FAIRLAMB A. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan, p. 111–126, 2006.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305–318, 2004.

DOUGHERTY, T.J. & POTTER, W.R. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, 8: 223-5, 1991.

ENK C.D.; FRITSCH C.; JONAS F.; NASEREDDIN A.; INGBER A.; JAFFE C.L.; RUZICKA T. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Archives of Dermatology.*, v. 139, p. 432–434, 2003.

EVANGELOU G.; KRASAGAKIS K.; GIANNIKAKI E.; KRUGER-KRASAGAKIS S.; TOSCA A. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.*, v. 27, p. 254-256, 2011.

EVORA P.R.B.; RIBEIRO P.J.F.; VICENTE W.V.A.; REIS C.L.; RODRIGUES A.J.; MENARDI A.C.; et al. Methylene blue for vasoplegic syndrome treatment in heart surgery: fifteen years of questions, answers, doubts and certainties. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 24(3), p. 279-288, 2009.

FERREIRA C.C.; MAROCHIO G.G.; PARTATA A.K. Estudo sobre a leishmaniose tegumentar americana com enfoque na farmacoterapia. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v. 5, n. 41. Pub. 1, outubro, 2012.

FIRDOUS R.; YASINZAI M.; RANJA K. Efficacy of glucantime in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis. *The International Society of Dermatology*, v. 48, p. 758-762, 2009.

FLOYD R.A.; SCHNEIDER J.E.; DITTMER D.P. Methylene blue photoinactivation of RNA viroses. *Antiviral Research.*, v. 6, p. 141–151, 2004.

FONSECA A.P.M.; FONSECA W.S.M. Leishmaniose tegumentar difusa. *Anais Brasileiros de Dermatologia.*, v. 61(3). P. 145-149, 1986.

GARDLO K.; HORSKA Z.; ENK C.D.; et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *Journal of American Academy of Dermatology.*, v. 48, p. 893-896, 2003.

GARDLO K.; HANNEKEN S.; RUZICKA T.; NEUMANN N.J. Photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. A promising new therapeutic modality. *Hautarzt*, v.55, 381–383, 2004.

GHAFFARIFAR F.; JORJANI O.; MIRSHAMS M.; MIRANBAYAGI M.H.; HOSSEINI Z.H. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*, v. 12, n 6, p. 902-908, 2006.

GOMES M.C.; MORAIS O.O.; ROSELINO A.M.; PAULA N.A.; SOARES K.A.; SAMPAIO R.N.R. Exames complementares no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89(5), p.701-712, 2014.

GONTIGO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36(1), p. 71-80, jan-fev, 2003.

ISSA M.C.A.; AZULAY M.M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação Iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia.*, v. 85(4), p. 501-511, 2010.

JEDDI F.; CAUMES E.; THELLIER M.; JAURÊGUIBERRY S.; MAZIER D.; BUFFET P.A. Case Report: Drug Hypersensitivity Syndrome Induced by Meglumine Antimoniate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, v 80(6), pp. 939–940, 2009.

JUNIOR L.G.C.; MACHADO G.B.; CAIXETA A.V.; MAGALHÃES K.G.; REBELLO L.G.B.; MONTEIRO M.L.G.R. Leishmaniose Tegumentar Americana refratária ao tratamento medicamentoso: relato de caso. *Revista Panamericana de Infectología.*, v. 18(1), p. 53-58, 2016.

- KASHANI M.N.; FIROOZ A.; ESKANDARI S.E.; GHOORCHI M.H.; KHAMESIPOUR A.; KHATAMI A.; JA VADI A.; DOWLATI Y. Evaluation of meglumine antimoniate effects on liver, kidney and pancreas function tests in patients with cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology.*, v. 17(6), p. 513-515, 2007.
- LEE Y.; BARON E.D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 30(4), p. 199-209, 2011.
- LESSA M.M.; LESSA H.A.; CASTRO T.W.N.; OLIVEIRA A.; SCHERIFER A.; MACHADO P.; CARVALHO E. M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.*, v. 73(6), p. 843-7, 2007.
- LIMA E.B.; MOTTA J.O.C.; PORTO C.; SAMPAIO R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia.*, v. 82(2), p. 111-124, 2007.
- MACDONALD I.J.; DOUGHERTY T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins Phthalocyanines.*, v.5, p. 105–129, 2001.
- MACHADO A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23(2), p. 237-243, 2000.
- MANG T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, v.1, p. 43-48, 2004.
- MONTEIRO W.M.; NEITZKE H. C.; SILVEIRA T.G.V.; LONARDONI M.V.C.; TEODORO U.; FERREIRA M.E.M.C. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25(5), p. 1083-1092, mai, 2009.
- MURBACK N.D.N.; HANS-FILHO G.; NASCIMENTO R.A.F.; DORVAL M.E.M.C.; NAKAZATO K.R.O. Leishmaniose tegumentar americana; estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia.*, v. 86(1), p. 55-63. 2011.
- NEGRAO G.N.; FERREIRA M.E.M.C. Circuitos espaciais da leishmaniose tegumentar americana no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, v. 9 (17), p. 74 - 94, Dez, 2013.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 12 ed. São Paulo: Atheneu, p. 41-66, 2011.

NEVES L.O.; TALHARI A.C.; GADELHA E.P.N.; JUNIOR R.M.S.; GUERRA J.A.O.; FERREIRA L.C.L.; TALHARI S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. Anais Brasileiros de Dermatologia., v. 86(6), p. 1092-101, 2011.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Informe Leishmanioses. nº3, Julho de 2015. Disponível em: <http://new.paho.org/leishmaniasis> (Acessado em 20/11/16).

PELOI L.S.; BIONDO C.E.; KIMURA E.; et al. Photodynamic therapy for American Cutaneous Leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Experimental Parasitology., v.12, p. 353-356, 2011.

PELOI L.S.; SOARES R.R.S.; BIONDO C.E.G.; SOUZA V.R.; HIOKA N.; KIMURA E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. Journal of Biosciences., v. 33(2), June, p. 231–237, 2008.

PINHEIRO R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. Infarma, v.16, nº 7-8, 2004.

RATH S.; TRIVELIN L.A.; IMBRUNITO T.R.; TOMAZELA D.M.; JESUS M.N.; MARZAL P.C. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose: estudo da arte. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RODRIGUES A.L.; HUEB M.; SANTOS T.A.R.R.; FONTES C.J.F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., v. 39(2), p. 139-145, mar-abr, 2006.

ROJAS R.; VALDERRAMA L.; VALDERRAMA m.; VARONA M.X.; OUELLETTE M.; SARAIVA N.G. Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human *Leishmania (Viannia)* Infection. Journal of Infection Diseases, v. 193 (15 May), p. 1375-1383, 2006.

SAMPAIO S.A.P.; RIVITI E.A. Dermatologia. 3 ed, São Paulo-SP, Editora Artes Médicas, p. 755-764, 2007.

SBEGHEN M.R.; VOLTARELLI E.M.; CAMPOIS T.G.; et al. Topical and intradermal efficacy of photodynamic therapy with methylene blue and light-emitting diode in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Journal of Lasers in Medical Sciences., v. 5;6(3), p. 106-111, 2015.

SILVA, A.M.; CAMARGO N.J.; SANTOS D.R.; MASSAFERA R.; FERREIRA A. C.; POSTAI C. et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotropical Entomology*, v. 37(2), p. 209-225, 2008.

SILVA E.R.; SANTOS E.P.; RICCI-JUNIOR E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 90(3), p. 211-217, 2009.

SILVEIRA T.G.V.; TEODORO U.; LONARDONI M.V.C., GUILHERME A.L.F.; TOLEDO M.J.O., RAMOS M. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 12(2), p. 141-147, abr-jun, 1996.

SILVEIRA T.G.V.; ARRAES S.M.A.A.; BERTOLINI D.A.; TEODORO U.; LONARDONI M.V.C.; ROBERTO A.C.B.S.; et al. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v 32(4):413-423, jul-ago, 1999.

SOHL S.; KAUER F.; PASCH U.; SIMAN J.C. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 5, p. 128–130, 2007.

SONG D.; LINDOSO J.A.; OYAFUSO L.K.; KANASHIRO E.H.; UCHOA A.F.; TARDIVO J.P.; BAPTISTA M.S. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 29(10), p. 711-715, 2011.

TARDIVO J.P.; GIGLIO A.D.; OLIVEIRA C.S.; JUNQUEIRA H.C.; GABRIELLI D.S.; TADA D.B.; et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 175-191, 2005.

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

VAN DER SNOEK E.M.; ROBINSON D.J.; VAN HELLEMOND J.J.; NEUMANN H.A.M. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, p. 918-922, 2008.

VERONESI R.; FOCACCIA R. Tratado de infectologia. Vol 2, 1 edição, São Paulo-SP, Editora Atheneu, p.1221-1233, 1999.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire, n°22, 3 JUNE 2016, 91th year.

CAPÍTULO II

**Artigo: “TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO
DE TERAPIAS EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS
COM *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”**

**TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA: AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE TERAPIAS
EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

RESUMO

Fundamentos: A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Atualmente, os medicamentos disponíveis para o tratamento são injetáveis, com muitos efeitos colaterais, esquema longo de tratamento e com possibilidade de resistência medicamentosa. Deste modo, terapias alternativas têm sido avaliadas, entre elas a terapia fotodinâmica (TFD). **Objetivo:** Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica isoladamente e em associação com os medicamentos de referência para o tratamento de LTA. **Metodologia:** Camundongos BALB/c foram infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na pata posterior direita e divididos em 6 grupos: **Gluc+TFD** tratados com Glucantime® e TFD com azul de metileno (AM)/LED vermelho (diodo emissor de luz), **Gluc** tratados com Glucantime®, **TFD** tratados com TFD com AM/LED vermelho, **Anfo+TFD** tratados com anfotericina e TFD com AM/LED vermelho e **Anfo** tratados com anfotericina, **Controle** infectados e não tratados. Dois ciclos de tratamento foram realizados. Após 165 dias da infecção determinou-se a carga parasitária. **Resultados:** Não observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as medidas de volume e espessura das patas infectadas nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Porém houve redução significativa ($p < 0,05$) na carga parasitária do linfonodo poplíteo dos grupos **Gluc+TFD**, **Gluc**, **TFD** e **Anfo** quando comparado com o grupo **Controle** ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os resultados mostram que apesar de não ter sido encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) nas avaliações físicas da pata houve uma tendência de queda das medidas no grupo **Gluc+TFD**, como pode ser observado especialmente nos dados de volume e corroborado pela negativação da carga parasitária ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Azul de metileno; Leishmaniose cutânea; *Leishmania (Leishmania)*.

ABSTRACT

Fundamentals: American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* that affects the skin and mucous. Currently available drugs for treatment are injectable, with side effects, long-term treatment regimen and the possibility of drug resistance. Thus, alternative therapies have been tested, including photodynamic therapy. **Objective:** to assess the effectiveness of photodynamic therapy on its own and associated with drugs prescribed for the treatment of ATL. **Methodology:** BALB/c mice were infected with *Leishmania amazonensis* and divided into 6 groups: **Gluc+PDT** treated with Glucantime® and photodynamic therapy (PDT) with methylene blue (MB)/red LED (light-emitting diode); **Gluc** treated with Glucantime®; **PDT** treated with PDT with MB/red LED; **Ampho+PDT** treated with Amphotericin and PDT with MB/red LED; and **Ampho** treated with Amphotericin; **Control** which were infected but not treated. Two treatment cycles were performed. After 165 days of infection, the parasite load was determined. **Results:** There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between

measures of volume and thickness of the infected footpads in the treated groups when compared with the **Control** group. However, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the parasitic load of the popliteal lymph node of the **Gluc+PDT**, **Gluc**, **PDT** and **Ampho** groups when compared with the **Control** group ($p > 0.05$). **Findings:** The results showed that although there is no significant difference ($p > 0,05$) in the evaluations of footpad size (thickness and volume), there is a downward trend of measurements in the group **Gluc+PDT**, as can be observed by volume data and by parasite load negative ($p < 0,05$).

Key words: Photodynamic therapy; Methylene blue; Cutaneous leishmaniasis; *Leishmania* (*Leishmania*).

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das maiores endemias mundiais e uma das seis doenças infecciosas mais importantes, pelo seu alto coeficiente de detecção e por sua alta capacidade de produzir deformidades. Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo e 350 milhões estejam expostas ao risco de adoecer.^{1,2,3}

No Brasil a leishmaniose tegumentar (LT) é endêmica, representando a segunda doença tropical de maior prevalência. Ocorre mais frequentemente nas regiões Norte e Nordeste. No Sul, o Paraná é o estado que detém maior número de casos.⁴

A LT é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acomete clinicamente a pele e mucosas. Apresenta-se com as formas clínicas: cutânea (LC), cutâneo-mucosa (LCM) e cutânea difusa (LCD). A forma cutânea é a apresentação mais comum, responsável por mais de 90% dos casos no Brasil.³ Estima-se que de 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa.⁴

Atualmente, todos os medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento da leishmaniose são injetáveis, de administração intramuscular ou endovenosa. Os fármacos usados são os antimoniais pentavalentes (primeira escolha), anfotericina B e pentamidina (segunda escolha).⁵ Entretanto, essas fármacos possuem efeitos colaterais graves, como cardiotoxicidade, pancreatite, leucopenia, trombocitopenia, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, além de necessitarem de tempo prolongado para eliminar a infecção o que ocasiona em muitos casos o abandono da terapia.^{6,7,8,9,10,11,12} Além dos efeitos adversos graves, os relatos da existência de resistência primária e secundária ao antimonial também pode contribuir para o insucesso do tratamento da LT.¹³

Tendo em vista a toxicidade, via de administração injetável, custo e resistência dos medicamentos, somados ao tempo prolongado do tratamento, formas alternativas de terapêutica têm sido testadas. Dentre estas, a terapia fotodinâmica (TFD).^{6,14,15,16}

A TFD baseia-se na aplicação de uma substância fotossensível (colorida) na lesão alvo, que ao receber luz em comprimento de onda adequado, é ativada e desencadeia uma série de reações na presença de oxigênio molecular, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, que levam à morte celular e à destruição do tecido doente.¹⁷ A presença simultânea de luz, agente fotossensibilizador e oxigênio é fundamental para a TFD.^{17,18}

Atualmente a TFD é usada na área médica principalmente para o tratamento de tumores e algumas doenças benignas dermatológicas, como verrugas virais recalcitrantes, onicomicoses, acne, fotoenvelhecimento e psoríase.¹⁹

Os fotossensibilizantes podem ser corantes, que são substâncias fotossensíveis usualmente não tóxicas para aplicação tópica, caracterizada por alta capacidade de absorver a luz visível. Alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas, o que os tornam agentes terapêuticos.¹⁸ Um exemplo é o azul de metileno (AM), usado na prática médica há muitos anos no tratamento da metahemoglobinemia, malária e como anti-séptico urinário, na ausência de luz. O AM possui ação bacteriostática, atividade sobre a musculatura vascular, efeito antiviral, antifúngico.^{20,21} Adicionalmente, o AM quando é excitado por luz vermelha, produz oxigênio “singlet”. Apresenta ainda, a vantagem de ter baixo custo, ser de fácil aquisição e causar poucos danos ao paciente.¹⁵

Recentemente, estudos têm demonstrado a eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento da LT.^{6,14,22,23,24} Um dos primeiros relatos de TFD para LC foi realizado por Gardlo et al, (2003) em um homem de 34 anos com múltiplas lesões de LC por *Leishmania donovani*, na Líbia. O paciente foi tratado previamente com stibogluconato de sódio (Pentostam®) sem sucesso e com posterior tratamento de 5 lesões com associação de metilaminolevulínico (MAL) com TFD usando luz vermelha (75 J/cm²) e 5 lesões com paramomicina tópica uma vez ao dia. A TFD foi realizada duas vezes por semana por 12 semanas e depois uma vez por semana por mais quatro semanas. Todas as lesões tratadas com TFD obtiveram cura clínica e histopatológica e sem recidiva após 10 meses de acompanhamento pós-tratamento e com excelente resultado cosmético. Este fato confirma que a TFD é um tratamento superior a paramomicina, com taxa de resposta completa de 93% versus 41%.¹⁹

Trabalhos têm demonstrado a resolução completa da lesão de LC, a diminuição do número de parasitos nas lesões e a cessão da atividade leishmanicida para formas amastigotas e promastigotas.^{14,24,25} O efeito favorável da TFD na LT deve-se não somente ao efeito parasiticida direto, mas também a ativação do sistema imunológico, com liberação de fator de necrose tumoral, aumento da expressão de moléculas de adesão e aumento de interleucina 6.²²

Dentre os trabalhos que demonstraram benefício do uso da TFD no tratamento de LC, a maioria utilizou como agente fotossensibilizante um precursor porfirínico (ácido aminolevulínico ou metil-aminolevulínico) e como fonte de luz o laser.^{24,26,27,28,29} Como esses precursores e a fonte de luz utilizados são de alto custo e tendo em vista que uma grande porção dos casos de LC ocorre em países subdesenvolvidos, tem-se testado o uso de corantes como o AM como agente fotossensibilizante e do LED como fonte luminosa. Peli e col. (2011) e Sbeghen e col. (2015) utilizaram o AM tópico associado ao LED vermelho para tratamento de LC obtendo diminuição da espessura da lesão e da carga parasitária.^{16,30}

Até o momento não foi avaliado o uso “in vivo” a TFD utilizando o LED como fonte de luz e o AM como agente fotossensibilizante em associação com os medicamentos de referência. Neste trabalho foram avaliadas as associações da TFD com LED e AM, com Glucantime® e Anfotericina B em animais experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2. MÉTODOS

2.1. Parasitos

Leishmania (Leishmania) amazonensis (MHOM/BR/1977/LTB0016) foi mantida em camundongo, pela inoculação de 10^7 parasitos nas patas posteriores. Os animais foram sacrificados após anestesia usando cloridrato de quetamina (160 mg/ kg) e xilazina (50 mg/kg), via intraperitoneal. Fragmentos do linfonodo poplíteo regional dos animais infectados foram extraídos e inoculados, assepticamente, em meio de cultura 199 (Gibco, New York, NY, EUA), pH 7.2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco, New York, NY, EUA), 1% urina humana estéril, 20 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), 100 UI/mL penicilina G (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) e 100 µg/mL sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 25°C em câmara incubadora B.O.D. (Logen Scientific, Brasil). As culturas do protozoário foram mantidas por repiques semanais.

2.2. Animais

Para o experimento de infecção foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c, com 90 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Durante o experimento os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Imunologia (UEM) em mini-isoladores em racks ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil) com temperatura controlada, ciclos de claro/escuro e barreiras ambientais. Os animais foram sedados com uma combinação de xilazina (16 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg) antes do procedimento de infecção. Ao fim do tratamento, para a obtenção de material biológico, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia.

2.3. Produtos químicos

O azul de metileno (AM, $C_{16}H_{18}ClN_3S_3H_2O$, MW 373.90 g mol⁻¹) foi preparado a 0,5% (m/v) em solução aquosa. O Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina, Sanofi Aventis, São Paulo, Brasil) e a Anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil) foram utilizados como tratamentos de referência.

2.4. Sistema de iluminação

Foram montados dois sistemas de iluminação, constituídos de uma placa de LED vermelho formada por 6 fileiras de unidades de LED com comprimento total de 75 cm e largura de 3 cm, presa por um suporte de madeira nas laterais da placa, distando 4 cm (no primeiro sistema) e 1 cm (no segundo sistema) do LED. Entre os LEDs e as patas dos animais colocou-se acima uma tela metálica para apoio do animal. Para individualizar o tratamento, separou-se cada animal em compartimentos de 15 cm utilizando tubos de PVC (Policloreto de polivinila) com aberturas de 3 cm de diâmetro (Figura 1).

A irradiância do primeiro sistema foi $2,63 \times 10^3 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ e no segundo sistema $4,27 \times 10^3 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$. O espectro de emissão de LED (máximo 663 nm) foi obtido num espectrofluorômetro Varian-Cary Eclipse (Agilent Technologies, EUA) e as potências de luz foram medidas por um Medidor de Potência de Laser Portátil (Edmund Optics Inc., EUA). O espectro de absorção do AM (máximo 665 nm) foi registrado no espectrofotômetro modelo Varian Cary 50.

2.5. Infecção experimental

Os animais foram infectados com inoculação intradérmica contendo 5×10^5 formas promastigotas, em fase exponencial de crescimento, de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em 100 μ L de solução salina (0,9% NaCl, p/v) no coxim plantar da pata posterior direita. Os animais foram examinados semanalmente para avaliação do desenvolvimento das lesões (Figura 2).

Os animais foram divididos em 6 grupos: **Grupo Gluc+TFD** (n=5): tratados com Glucantime® (100 mg/kg/dia = 28 mg Sb⁺⁵/kg/dia) por via intraperitoneal (IP) por 20 dias (5 vezes por semana por 4 semanas) e terapia fotodinâmica após aplicação tópica de AM; **Grupo Gluc** (n=5): tratados com Glucantime® (100 mg/kg/dia = 28 mg Sb⁺⁵/kg/dia) por via intraperitoneal por 20 dias (5 vezes por semana por 4 semanas); **Grupo TFD** (n=4): tratados com terapia fotodinâmica após aplicação tópica de AM; **Grupo Anfo+TFD** (n=4): tratados com anfotericina B (5 mg/kg/dia) por via intraperitoneal por 20 dias (5 vezes por semana por 4 semanas) e terapia fotodinâmica após aplicação tópica de AM; **Grupo Anfo** (n=4): tratados com anfotericina B (5 mg/kg/dia) por via intraperitoneal por 20 dias (de segunda a sexta-feira) e **Grupo Controle** (n=3): infectados e não tratados; .

2.6. Tratamento dos animais infectados

O tratamento foi realizado em 2 ciclos.

Para o primeiro ciclo utilizou-se o primeiro sistema de iluminação e após o desenvolvimento das lesões (aproximadamente 45 dias após a infecção) os seis grupos foram tratados. Neste ciclo, o contato do AM com as lesões durou 30 minutos com sequente irradiação com LED vermelho por 30 minutos, realizado 2 vezes por semana durante 4 semanas.

Após 105 dias da infecção, os grupos **Gluc+TFD**, **TFD** e **Anfo+TFD** foram submetidos à um segundo ciclo de tratamento, no qual utilizou-se o segundo sistema de iluminação acrescido de maior tempo de contato do AM com a lesão (1 hora) e maior tempo de irradiação (1 hora). Os grupos foram irradiados mais frequentemente neste segundo ciclo, 3 vezes por semana durante 4 semanas. Neste ciclo de tratamento nenhuma medicação intraperitoneal foi aplicada.

2.7. Avaliação da evolução das lesões

Para avaliação do primeiro ciclo de tratamento, as lesões foram examinadas a cada 2 semanas (iniciando após 30 dias da infecção e terminando após 90 dias da infecção), para mensuração da espessura e volume de ambas as patas posteriores, por uso do paquímetro (Mitutoyo, Japão) e do plestimômetro (Ugo Basiel S.R.L., Itália), respectivamente.

Para a avaliação do segundo ciclo de tratamento, realizou-se uma nova aferição dos parâmetros acima citados com 135 dias após a infecção (após o término do segundo ciclo de tratamento). A espessura e volume da lesão foram calculados pela diferença entre a pata infectada e não infectada.

2.8 Determinação da carga parasitária

A quantificação de parasitos na lesão, no baço e no linfonodo regional dos animais foi realizada (165 dias após infecção), segundo metodologia descrita anteriormente por Buffet e col. com modificações.^{31,32} O baço, a lesão e o linfonodo poplíteo de cada animal foram retirados assepticamente, pesados e macerados em disruptor de células em meio de cultura 199 (Gibco, New York, NY, EUA) pH 7.2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco, New York, NY, EUA), 1% urina humana estéril, 20 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), 100 UI/mL penicilina G (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) e 100 µg/mL sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As suspensões foram diluídas a partir de ¼ na razão de 2 em placa de cultura de células com 96 poços. As placas foram incubadas a 25°C. Foram realizadas leituras em microscópio de luz invertida (Olympus, New York, NY, EUA) com 7, 14, 21, 28 dias de incubação. Cada poço foi examinado buscando-se promastigotas viáveis, considerando-se como título a maior diluição em que pelo menos um parasito foi encontrado. O experimento foi realizado em duplicata. O cálculo da carga parasitária (número de parasitos/grama de tecido) foi dado pela razão entre a média geométrica da recíproca dos títulos positivos e a massa dos órgãos (g) multiplicada por 53 que é a fração da suspensão de cada órgão inoculado no primeiro poço da placa.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo Software Biostat 5.3. A avaliação de normalidade foi realizada pelo teste Lilliefors. Considerando a distribuição normal, os valores de volume e espessura foram analisados pelo teste “t” de Student. A análise da carga parasitária foi feita pela ANOVA. Foi considerado nível de significância estatística de 5%.

2.10. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi submetido ao Comitê e aprovado conforme parecer 158/2013 de 17/11/2013.

RESULTADOS

No início do primeiro ciclo de tratamento, com 45 dias após a infecção, notou-se que as lesões não apresentavam diferenças significativas em relação a sua espessura e volume ($p>0,05$), demonstrando que os grupos não eram diferentes entre si (Figura 3 e 4).

Ao comparar o início e término do primeiro ciclo de tratamento (45 e 75 dias após a infecção) nota-se redução de volume, comparando os grupos **Gluc+TFD**, **Gluc**, **Anfo+TFD** e **Anfo** com o grupo **Controle**, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Ao final do primeiro ciclo de tratamento não houve diferença significativa ($p>0,05$) do volume das lesões de nenhum dos grupos tratados em relação ao controle (Figura 3).

Ao analisar as medidas de volume da pata entre o início e término do segundo tratamento (90 e 135 dias após a infecção) verificou-se redução de volume na comparação das curvas do grupo controle com o grupo **Gluc+TFD**, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), e também nota-se aumento de volume das lesões dos animais do grupo **TFD** em relação ao grupo controle ($p>0,05$). Com 135 dias (término do segundo tratamento) nenhum dos grupos tratados apresentou redução significativa de volume da lesão quando comparado com o grupo controle ($p>0,05$) (Figura 3).

Em relação a medida de espessura da lesão, antes e após o primeiro ciclo de tratamento, nota-se redução ao comparar o grupo controle com os grupos **Gluc+TFD** e **Gluc**, porém essa redução não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), e aumento da espessura da lesão nos grupos **Anfo**, **Anfo+TFD** e **TFD**. Ao final do primeiro tratamento não houve redução significativa de espessura da lesão em nenhum dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$) (Figura 4).

No segundo ciclo de tratamento (medidas entre 90 e 135 dias após a infecção) notou-se aumento de espessura das lesões em todos os grupos. Após o término deste ciclo de

tratamento (135 dias após a infecção) não houve redução da espessura da lesão em nenhum dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$) (Figura 4).

Na análise da quantificação da carga parasitária nos diferentes tecidos, observou-se que no linfonodo poplíteo ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando compara-se o grupo controle com os grupos **Gluc+TFD**, **Gluc**, **TFD** e **Anfo**, o que não foi observado quando comparado o grupo controle com o grupo **Anfo+TFD** ($p>0,05$). Nos demais tecidos, baço e pata com lesão, os valores não demonstraram diferença significativa em relação ao controle ($p>0,05$) (Figura 5).

DISCUSSÃO

Atualmente, todos os medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento da leishmaniose são de administração intramuscular ou endovenosa. Os fármacos usados são os antimoniais pentavalentes (primeira escolha), anfotericina B e pentamidina (segunda escolha). Porém, estes fármacos podem causar muitos efeitos colaterais, possuem esquema longo de tratamento e a necessidade de via de administração injetável.³ Tendo em vistas essas dificuldades terapêuticas somadas à resistência medicamentosa, outras terapias alternativas para a leishmaniose cutânea têm sido avaliadas, entre elas o uso da terapia fotodinâmica.^{6,14,15,16}

Vários outros trabalhos demonstraram benefício do uso da TFD no tratamento de LC, porém a maioria utilizou como agente fotossensibilizante um precursor porfirínico (ácido aminolevulínico ou metil-aminolevulínico) e como fonte de luz o laser.^{24,26,27,28,29} Como esses precursores e a fonte de luz utilizados são de alto custo e tendo em vista que uma grande porção dos casos de LC ocorre em países subdesenvolvidos, tem-se testado o uso de corantes como o AM como agente fotossensibilizante e do LED como fonte luminosa. Peli et al (2011) e Sbeghen et al (2015) utilizaram o AM tópico associado ao LED vermelho para tratamento de LC obtendo diminuição da espessura da lesão e da carga parasitária.^{16,30}

Neste trabalho, avaliamos a associação da TFD/LED com os medicamentos de referência no tratamento de LC, e observamos uma redução de espessura e volume das lesões em alguns dos grupos tratados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). No entanto, houve redução significativa da carga parasitária no linfonodo regional

dos grupos **Gluc+TFD**, **Gluc**, **TDF** e **Anfo** comparados ao grupo controle, sem tratamento ($p < 0,05$).

Os grupos **Gluc+TFD** e **Anfo+TFD**, apesar de terem reduzido a lesão após o tratamento (total de 20 injeções IP), não conseguiram manter esta redução após o término do primeiro esquema terapêutico, pois ocorreu aumento considerável e abrupto da lesão após o término do primeiro ciclo (75 dias) e as aferições com 90 dias (Figura 3). As doses, números de injeções e via de administração usados são semelhantes aos utilizados em outros trabalhos que obtiveram sucesso terapêutico,^{30,33,34} porém o número total de sessões de TFD foi de apenas de 8 no primeiro ciclo de tratamento e 12 no segundo ciclo de tratamento, o que diferiu de outros experimentos que realizaram um total de 36 sessões de irradiação, além de utilizarem hamsters e não camundongos como neste estudo.^{16,30} Deste modo, acreditamos que um tratamento mais prolongado com TFD poderá contribuir para uma maior redução do volume e espessura das lesões.

Como observado nas figuras 3 e 4, o grupo **Anfo+TFD**, não apresentou diferença significativa em relação às medidas de volume e espessura das patas quando comparado ao grupo controle. Uma hipótese seria pelo fato da anfotericina B (composto orgânico), por ser um antifúngico da classe dos polienos e possuir uma porção de dupla ligações de carbono, ser um alvo excelente para o oxigênio singlete (1O_2) gerado na reação (figura 6). O 1O_2 formado na TFD é altamente oxidante e ataca duplas ligações e anéis conjugados, desta forma ele seria consumido no ataque a anfotericina B e não para eliminação dos protozoários, diminuindo o poder terapêutico desta quimioterapia e também a atividade fotodinâmica. O que não ocorre com o antimônio pentavalente (composto inorgânico) provavelmente devido ao seu poder oxidativo ser alto (figura 7).

Os resultados detectados no grupo **TFD** não confirmaram os resultados encontrados em estudos anteriores.^{16,30} Fato que pode ter sido influenciado pela distância da fonte de iluminação até a lesão, pela frequência da irradiação e número total de sessões para o tratamento. Peloi et al (2011) e Sbeghen et al (2015) avaliaram o uso da TFD com AM em hamsters infectados experimentalmente. A fonte de irradiação utilizada estava localizada próxima à lesão, a frequência de irradiação aplicada foi de 3 vezes por semana num total de 3 meses de tratamento com obtenção de redução significativa no tamanho das lesões.^{16,30} Neste trabalho, foi realizado dois ciclos de tratamentos com dois modelos de iluminação distintos, no primeiro usou-se o LED distando 4 cm da lesão, irradiação por 30 minutos, duas vezes por

semana por 4 semanas e no segundo, utilizou-se o LED distando 1 cm da lesão, irradiação por 1 hora, 3 vezes por semana por 4 semanas. Acreditamos que após as mudanças realizadas no segundo sistema os resultados não foram satisfatórios pois a lesão já se encontrava em evolução adiantada. O sistema de iluminação usado, diferiu dos utilizados em trabalhos prévios^{16,30}, por não necessitar anestésiar os animais a cada tratamento, evitando estresse para os camundongos e risco de óbito secundário ao uso das drogas, porém neste sistema o animal fica em movimento contínuo o que pode ter influenciado no ângulo de incidência do LED e no tempo total de absorção da luz pelo AM na lesão.

Os resultados apresentados mostram que apesar de não ter sido encontrado diferenças significativas nas avaliações da pata (espessura e volume), houve uma tendência de menor crescimento como pode ser observado especialmente nos dados de volume. Pode-se considerar as medidas de volume mais fidedignas que as de espessura, pois são menos influenciadas pelo grau de ulceração da lesão. Na avaliação desse parâmetro, o grupo **Gluc+TFD** sempre apresentou menores volumes de lesão em comparação ao controle, ao final do primeiro ciclo de tratamento (75 dias após a infecção) e também ao final do segundo ciclo de tratamento (135 dias após a infecção). Esta constatação é corroborada pela negatização da carga parasitária em todos os órgãos analisados de todos os animais deste grupo.

CONCLUSÃO

Estas observações, no nosso ponto de vista, indicam a possibilidade do uso da associação do Glucantime® com a terapia fotodinâmica no intuito de reduzir o tempo de tratamento ou a dose do Glucantime®, medicação de primeira escolha no tratamento de LT, com conseqüente redução dos riscos de efeitos colaterais. No entanto, novos estudos devem ser complementados para avaliar a utilização de diferentes doses e tempo de tratamento com o Glucantime®, bem como a periodicidade, tempo de irradiação e número total de sessões da TFD com AM para obtenção da cura clínica das lesões de LC.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization – WHO. Leishmaniose [acesso em 21/11/2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE. 2012;7(5): e35671.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 1ª edição, versão eletrônica, 2017. Brasília. DF. Brasil [acesso em 11/04/2017]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
4. Brasil. Ministério da Saúde. Porta da saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana [acesso em 21/11/2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>.
5. Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília. 2000.
6. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF et al. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. Photomed Laser Surg. 2011;29(10):711-715.
7. Rodrigues AM, Hueb M, Santos TA, Cor JFF. Factors associated with treatment failure of ACL with meglumine antimoniate. Rev Soc Bras Med Tropical. 2006;39(2):139-145.
8. Ourives-Neves L, Chrusciak-Talhari A, Gadelha EPN, da Silva Júnior RM, Guerra JAO, Ferreira LCL et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1092-101.
9. Ribeiro MN, Pimentel MIF, Schubach AO, Oliveira RVC, Teixeira JL, Leite MPS et al. Factors associated to adherence to different treatment schemes with meglumine antimoniate in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2014;56(4):291-6.
10. Jeddi F, Caumes E, Thellier M, Jaureguiberry S, Mazier D, Buffet PA, Case Report: Drug Hypersensitivity Syndrome Induced by Meglumine Antimoniate. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009;80(6):939–940.
11. Oliveira RA, Lima CG, Mota RM, Martins AM, Sanches TR, Seguro AC et al. Renal function evaluation in patients with American cutaneous leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. In BMC Nephrol. 2012;13:44.

12. Kashani MN, Firooz A, Eskandari SE, Ghoorchi MH, Khamesipour A, Khatami A et al. Evaluation of meglumine antimoniate effects on liver, kidney and pancreas function tests in patients with cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2007;17(6):513-515.
13. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006;193(10):1375-1383.
14. Gardlo K, Horska Z, Enk CD, Rauch L, Megahed M, Ruzicka T et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:893-896.
15. Tardivo JP, Giglio AD, Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;2:175-191.
16. Peloi LS, Biondo CE, Kimura E, Politi MJ, Lonardon MVC, Aristides SMA et al. Photodynamic therapy for American Cutaneous Leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2011;12:353-356.
17. Bacelar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):20523-20559.
18. Machado AE. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000;23:237-243.
19. Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2011;30(4):199-209.
20. Stocche RM, Garcia LV, Reis MP, Klamt JG, Evora PRB. Uso do azul de metileno no tratamento de choque anafilático durante anestesia. *Relato de caso, Ver Bras Anesthesiol.* 2004;54(6):809-814.
21. Evora PRB, Ribeiro PJF, Vicente WVA, Reis CL, Rodrigues AJ, Menardi AC et al. Methylene blue for vasoplegic syndrome treatment in heart surgery: fifteen years of questions, answers, doubts and certainties. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009;24(3):279-288.
22. O’Riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2:247-262.
23. Van der Snoek EM, Robinson DJ, Van Hellemond JJ, Neumann HAM. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *JEADV.* 2008;22:918-922.
24. Enk CD, Fritsch C, Jonas F, Nasereddin A, Ingber A, Jaffe CL et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 2003;139: 432–434.

25. Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ et al. The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against *Leishmania* Parasites, *Chem Biol.* 2006;13:839–847.
26. Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Hasan T, 2007a. Parasiticidal effect of daminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol.* 2007a;16:651–660.
27. Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci.* 2007b;6:1067–1075.
28. 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. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31:634–637.
29. Sohl S, Kauer F, Pasch U, Siman JC, Wetzig T. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *JDDG.* 2007;5:128–130.
30. Sbeghen MR, Voltarelli EM, Campois TG, Kimura E, Aristides SMA, Hernandez S et al. Topical and intradermal efficacy of photodynamic therapy with methylene blue and light-emitting diode in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *J Lasers Med Sci.* 2015;6(3):106-111.
31. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJF, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2164-2167.
32. Lonardonni MVC, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2000;68:6355-61.
33. Mello TFP, Cardoso BM, Lopes SN, Bitencourt HR, Voltarelli EM, Hernandez L et al. Activity of synthetic chalcones in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitol Research.* 2015;114(10):3587–3600.
34. Khalili G, Dobakhti F, Niknam HM, Khaze V, Partovi F. Immunotherapy with imiquimod increases the efficacy of glucantime therapy of *Leishmania major* infection. *Iran J Immunol.* 2011;8(1):45-51.
35. Ganis P, Auitabile G, Mechlinki W, Schaffner CP. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. *J. Amer. Chem. Soc.* 1971;93:4560-4564.



Figura 1. Sistema de iluminação composto por uma placa de LED vermelho formada por 6 fileiras de LEDs com comprimento de 75 cm e largura de 3 cm, presa por um suporte de madeira nas laterais da placa onde colocou-se acima uma tela metálica para apoio do animal. (A) Sistema de iluminação utilizado para o primeiro ciclo de tratamento com a placa de LED distando 4 cm (LED apagado); (B) Sistema de iluminação do primeiro ciclo de tratamento com LED ligado; (C) Sistema de iluminação utilizado para o segundo ciclo de tratamento com a placa de LED distando 1 cm (LED apagado); (D) Sistema de iluminação utilizado para o segundo ciclo de tratamento (LED ligado). (E) Para individualizar o tratamento, separou-se cada animal em compartimentos de 15 cm utilizando tubos de PVC (Policloreto de polivinila) com aberturas de 3 cm de diâmetro. (F) Detalhe mostrando o compartimento individualizado para o tratamento com o animal e LED ligado.

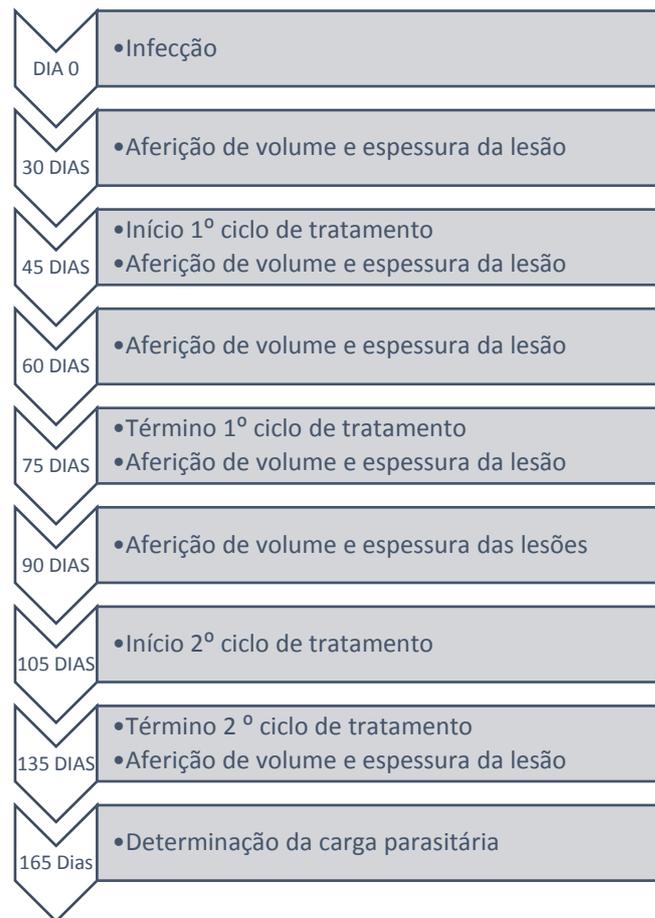


Figura 2. Fluxograma do experimento. Procedimentos realizados desde a infecção dos animais (dia 0) até a determinação da carga parasitária com 165 dias após a infecção.

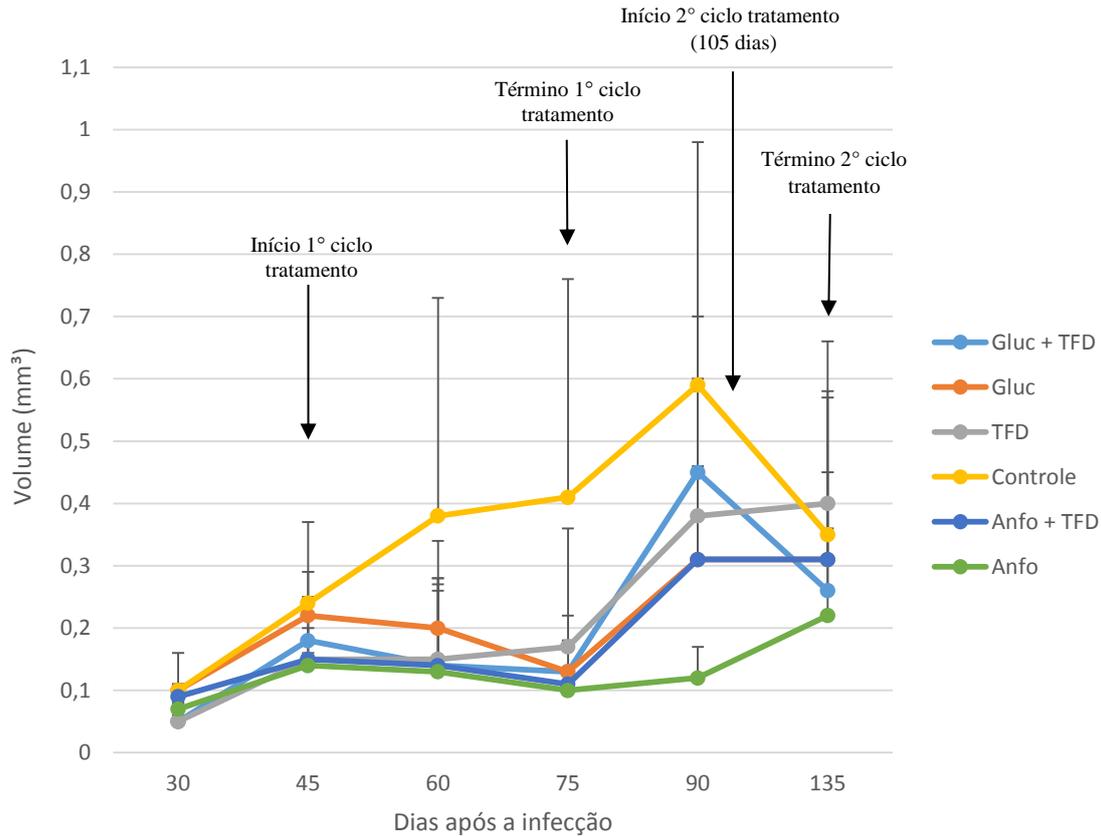


Figura 3. Evolução do volume das lesões das patas de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados com inoculação intradérmica contendo 5×10^5 de formas promastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar da pata posterior direita e divididos em 6 grupos para tratamento. Grupo Gluc + TFD (n=5) tratados com Glucantime® (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno em solução aquosa tópico, Grupo Gluc (n=5) tratados com Glucantime® (IP), Grupo TFD (n=4) tratados com TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico, Grupo Controle (n=3) com animais infectados e não tratados, Grupo Anfo + TFD (n=4) tratados com anfotericina (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico e Grupo Anfo (n=4) tratados com anfotericina (IP). As mensurações foram realizadas utilizando o plestimômetro. O volume das lesões foi calculado pela diferença ente o volume da pata infectada e não infectada, em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$).

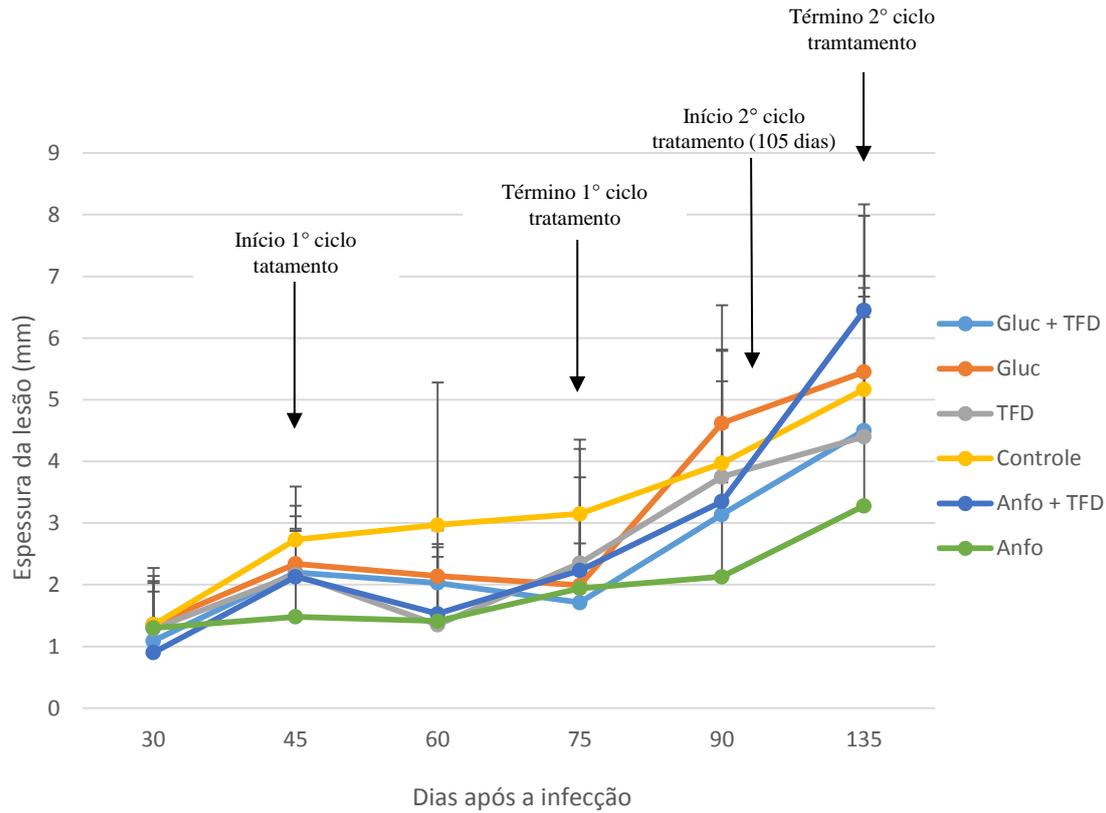


Figura 4. Evolução da espessura das lesões das patas de camundongos infectados com *L.(L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados com inoculação intradérmica contendo 5×10^5 de formas promastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar da pata posterior direita e divididos em 6 grupos para tratamento. Grupo Gluc + TFD (n=5) tratados com Glucantime® (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno em solução aquosa tópico, Grupo Gluc (n=5) tratados com Glucantime® (IP), Grupo TFD (n=4) tratados com TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico, Grupo Controle (n=3) com animais infectados e não tratados, Grupo Anfo + TFD (n=4) tratados com anfotericina (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico e Grupo Anfo (n=4) tratados com anfotericina (IP). As mensurações foram realizadas utilizando o paquímetro. A espessura das lesões foi calculada pela diferença entre a espessura da pata infectada e não infectada, em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$).

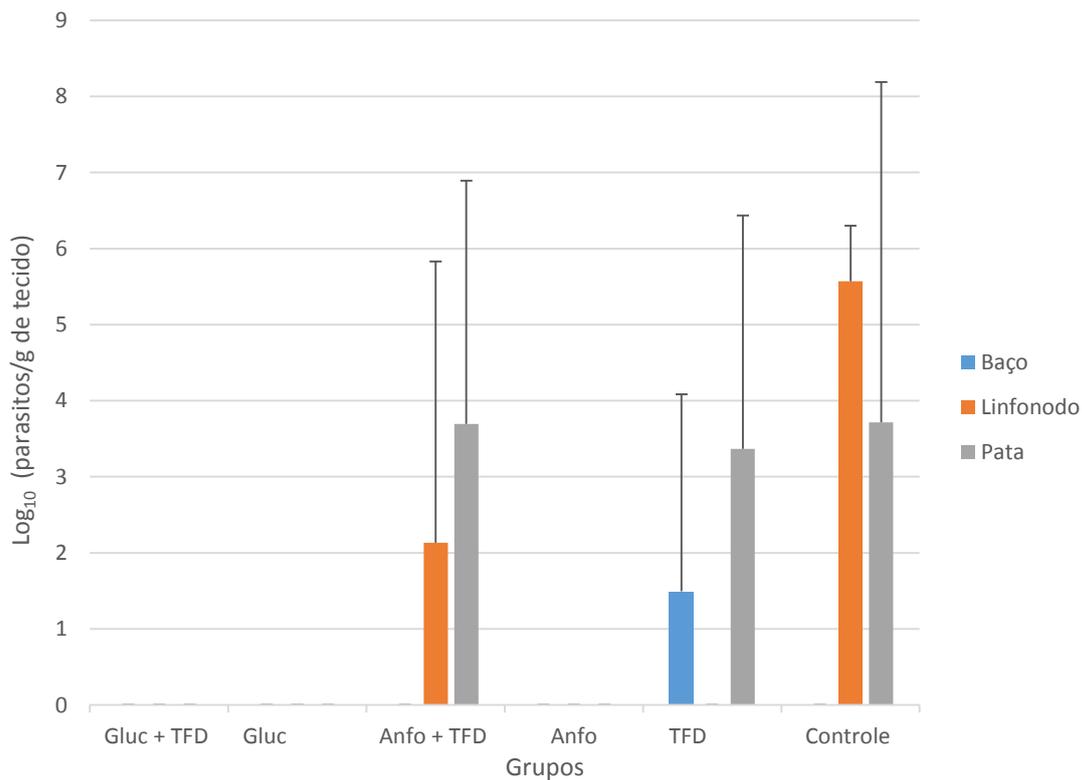


Figura 5. Quantificação da carga parasitária em baço, linfonodo poplíteo e lesão da pata de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados com inoculação intradérmica contendo 5×10^5 de formas promastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar da pata posterior direita e divididos em 6 grupos para tratamento. Grupo Gluc + TFD (n= 3) tratados com Glucantime® (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno em solução aquosa tópico, Grupo Gluc (n=3) tratados com Glucantime® (IP), Grupo TFD (n=3) tratados com TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico, Grupo Controle (n=2) com animais infectados e não tratados, Grupo Anfo + TFD (n=3) tratados com anfotericina (IP) e TFD-LED vermelho e azul de metileno tópico e Grupo Anfo (n=3) tratados com anfotericina (IP). Grupos Gluc + TFD, Gluc, Anfo e TFD, quando comparados ao grupo controle não tratado no linfonodo ($p < 0,05$).

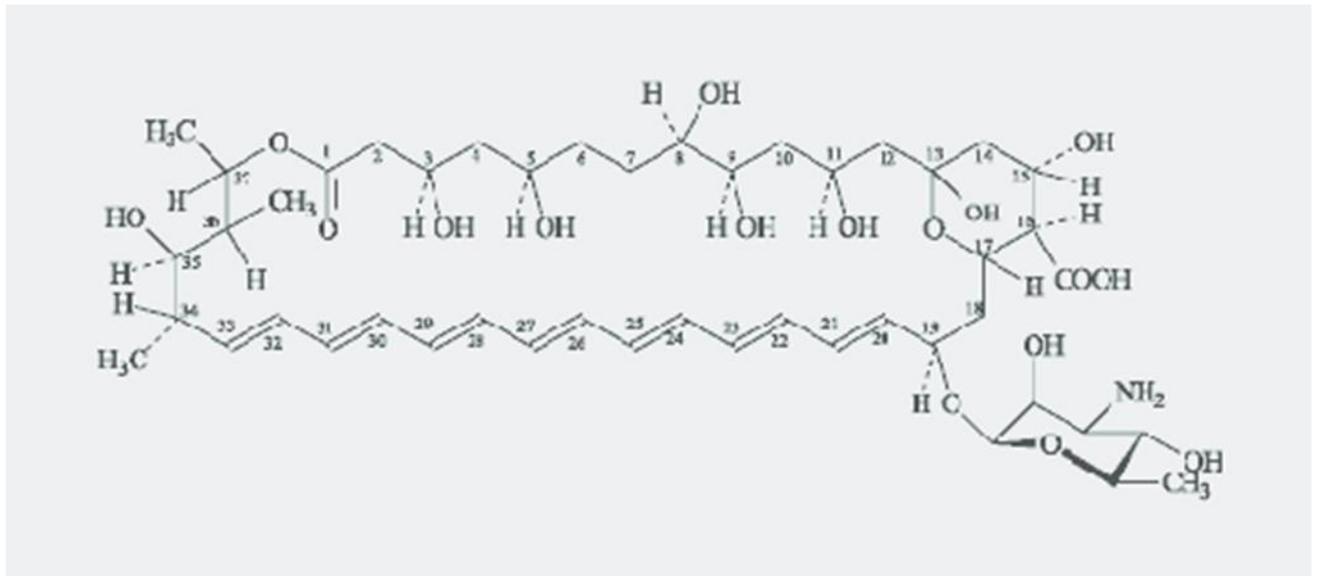


Figura 6: Estrutura química da anfotericina B (Ganis et al., 1971)³⁵.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200003

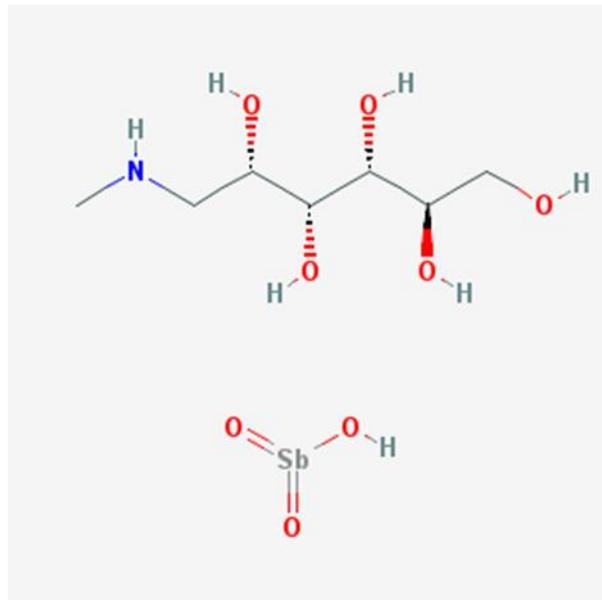


Figura 7: Estrutura química do antimônio de N-metilglucamina (Glucantime®).

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glucantime#section=3D-Conformer>

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Após a execução deste trabalho, observamos que a associação de terapia fotodinâmica e azul de metileno com o medicamento de primeira escolha no tratamento da LTA, o Glucantime®, pode ser uma alternativa de terapia, com o objetivo de reduzir o tempo e a dose deste, necessários para a cura clínica da lesão e conseqüentemente redução dos efeitos colaterais.

Porém são necessários outros estudos para definir os parâmetros ideais dessa modalidade terapêutica para sua melhor eficácia.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Ao realizar este trabalho, outros aspectos e questionamentos surgiram sobre a terapia fotodinâmica no tratamento da LTA, levando a necessidade de continuação das pesquisas nesse tema.

Os resultados obtidos no grupo **Gluc+TFD** demonstram que uma nova modalidade terapêutica para LC pode ser plausível, porém novos estudos se fazem necessários para estabelecer e avaliar a utilização de diferentes doses e tempo de tratamento com o Glucantime®, bem como a periodicidade, tempo de irradiação e número total de sessões da TFD com AM para obtenção da cura clínica das lesões.