

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

LUCIANA MARIA CORTEZ MARCOLINO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA EM  
PROMASTIGOTAS E CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM  
AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

São José dos Campos, SP

2021

LUCIANA MARIA CORTEZ MARCOLINO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA EM  
PROMASTIGOTAS E CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM  
AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complemento dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Juliana Ferreira Strixino

São José dos Campos, SP

2021

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Marcolino, Luciana Maria Cortez

Efeito da terapia fotodinâmica com curcumina em promastigotas e curcumina nanoencapsulada em amastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major* / Luciana Maria Cortez Marcolino; orientadora, Juliana Ferreira Strixino. - São José dos Campos, SP, 2021.

1 CD-ROM, 108 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Leishmania. 3. terapia fotodinâmica. 4. curcumina. 5. nanopartículas. I. Strixino, Juliana Ferreira, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Luciana Maria Cortez Marcolino, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 20 de Dezembro de 2021.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 24, 09, 2021

**LUCIANA MARIA CORTEZ MARCOLINO**

**“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA EM PROMASTIGOTAS E CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> CRISTINA PACHECO SOARES

*Cristina Pacheco Soares*

PROF. DR. JULIANA FERREIRA STRIXINO

*Juliana Strixino*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> LUCIANA BARROS SANT'ANNA

*Luciana Barros Sant'Anna*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MARTHA SIMÕES RIBEIRO - USP

*Martha Ribeiro*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> DAYANE BATISTA TADA - Unifesp

*Dayane*

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 24 de setembro 2021.

Dedico esse trabalho a meu esposo Pascoal e filhos Raphael, Lucas e Felipe, por terem fé em mim e orgulho da minha trajetória. Dedico também a minha mãe Benedita que me acolheu e me apoiou e em especial ao meu pai José (*in memorian*), que sempre acreditou em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida e por sempre me mostrar o caminho certo. A minha mãe Benedita pelo apoio e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações. Ao meu esposo Pascoal que acima de tudo é um grande amigo, por compreender minha dedicação ao projeto de pesquisa e por sempre estar presente, inclusive nos momentos difíceis. Aos meus filhos Raphael, Lucas e Felipe, que sempre me esperaram, mesmo eu saindo cedo de casa e voltando quase a noite, me incentivaram e demonstraram orgulho de mim. Aos meus irmãos Edson, Lucélia e Leila pela amizade, confiança no meu trabalho e pelo apoio emocional que tantas vezes precisei, vocês são muito especiais na minha vida.

A professora Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira-Strixino que apesar da intensa rotina que tinha, foi, além de uma excelente orientadora, uma grande amiga. Obrigada por toda paciência, confiança, cuidado comigo e todo ensinamento e dedicação durante todo o esse processo, me tornando uma pessoa melhor.

Agradeço em especial a minha irmã-amiga Ju Guerra, que desde a graduação esteve comigo, me ouvindo, me aconselhando, dividindo seus conhecimentos comigo, saiba que você mora no meu coração. Aos amigos do laboratório Gabi, Bia, Isa, Emília, Bruno, foram momentos muito bons, de troca de experiência, risadas, confraternizações entre outras tantas coisas que não é possível enumerar. Agradeço a Jéssica, pela síntese das nanopartículas. Agradeço ao André por dividir comigo momentos alegres, como fazer o cometa, mas também momentos de inseguranças. E nada de *pororoca* hein. Agradeço a Letícia pela parceria de sempre. Não posso deixar de agradecer a Josane e Marco Antonio, por tudo que me ensinaram sobre pesquisa e pela amizade.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha jornada, cedendo laboratório, dividindo conhecimento e até mesmo materiais: Profa Cristina Pacheco, Prof. Newton, Profa Kumiko, Profa Andreza, Profa. Renata Canevari, Profa Maricília e Prof. Leandro Também quero agradecer a CAPES pela bolsa de estudo e a FAPESP pelo apoio no projeto, senão não seria possível a realização desse sonho. Ao IP&D por toda infraestrutura oferecida, à Universidade do Vale do Paraíba que demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino e todos os professores que participaram da minha formação até aqui.

A todos o meu muito obrigada

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.

Antoine Saint Exupéry (O Pequeno Príncipe)

# EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA EM PROMASTIGOTAS E CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença zoonótica, transmitida por fêmeas de flebotomíneos e causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É considerada pela OMS um problema de saúde pública que nos últimos anos apresentou aumento significativo, tanto no número de casos quanto na distribuição geográfica. O tratamento convencional é tóxico e contraindicado para pacientes que apresentam algumas comorbidades e pode causar diversos efeitos colaterais graves. Tendo em vista uma alternativa de tratamento não agressivo vem se estudando a Terapia Fotodinâmica, que consiste em um tratamento não invasivo, não apresenta efeitos colaterais, de fácil acesso que utiliza substâncias de baixo custo, como a curcumina. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da curcumina livre em promastigotas e curcumina nanoencapsuladas em amastigotas de espécies de *Leishmanias*. Para isso os promastigotas foram incubados com curcumina livre divididos em grupo escuro e irradiado, além do grupo controle escuro e apenas irradiado. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com azul de tripan, a atividade mitocondrial por MTT, as alterações morfológicas por MEV. Para analisar o tipo de morte celular utilizou-se os marcadores Anexina V e iodeto de propídio e para avaliar o potencial de membrana mitocondrial o JC-1, para isso foram obtidas as imagens por microscopia confocal e a fluorescência emitida pelos marcadores foram quantificadas utilizando o *software* ImageJ. Para analisar a produção de espécies reativas de oxigênio utilizou-se o reagente H<sub>2</sub>DCF-DA e a fragmentação de DNA foi verificada pelo teste do cometa. Verificou-se a diminuição da viabilidade dos parasitas bem como alterações na atividade mitocondrial. A TFD provocou alterações no potencial de membrana mitocondrial das duas espécies, independentemente do tempo de análise (imediatamente ou 18 horas após tratamento). A produção de ERO foi concentração-dependente e foi observada apenas nos grupos submetidos à TFD e a espécie *L. braziliensis* apresentou maior produção de ERO que *L. major*, no entanto *L. braziliensis* foi mais resistente que *L. major* quando analisada a viabilidade após TFD. Os danos no DNA também foram observados nas duas espécies, é sugestivo que a apoptose prevaleceu na espécie *L. braziliensis*. A morfologia das células foi afetada, principalmente na concentração mais elevada de curcumina, deixando as células arredondadas e flagelo encurtado. Os resultados apoiam o uso da curcumina como fotossensibilizador na TFD contra células de *Leishmania*. Foram testadas também nanopartículas de BSA associada a curcumina em amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*. Para isso macrófagos e macrófagos infectados com *Leishmanias* foram incubados com a curcumina encapsulada em BSA catiônica e aniônica. Foram realizados testes de viabilidade pelo método de exclusão com azul de tripan, onde foi verificado que apenas a concentração 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  da BSA-Cur catiônica demonstrou redução na viabilidade das células e as concentrações de 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  da BSA-Cur aniônica reduziu a viabilidade das células, já a concentração de 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  foi citotóxica. A análise através da microscopia confocal foi realizada para verificar se as nanopartículas eram internalizadas pelos macrófagos e pode-se verificar que as nanopartículas catiônicas e aniônicas se encontravam dentro dos macrófagos e protozoários. Por fim foi realizado teste de viabilidade com os fibroblastos

e verificou-se que as nanopartículas não afetaram a viabilidade dessa linhagem celular, no entanto a curcumina livre promoveu diminuição da viabilidade dos fibroblastos após tratamento. Os resultados obtidos foram satisfatórios, demonstrando a capacidade das nanopartículas reduzirem a viabilidade das células em menores concentrações do que a curcumina livre.

**Palavra-chave:** *Leishmania*; terapia fotodinâmica; curcumina; nanopartículas.

**EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH CURCUMIN IN  
PROMASTIGOTS AND NANOENCAPSULATED CURCUMIN IN  
AMASTIGOTS OF *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

**ABSTRACT**

Tegumentary leishmaniasis is a zoonotic disease, transmitted by female sandflies and caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It is considered by the WHO as a public health problem that in recent years has shown a significant increase, both in the number of cases and in geographic distribution. Conventional treatment is toxic and contraindicated for patients who have some comorbidities and can cause several serious side effects. In view of a non-aggressive treatment alternative, Photodynamic Therapy has been studied, which consists of a non-invasive treatment that does not have side effects and is easily accessible and uses low-cost substances such as curcumin. This study aimed to evaluate the effects of free curcumin in promastigotes and nanoencapsulated curcumin in amastigotes of *Leishmania* species. For this, the promastigotes were incubated with free curcumin, divided into a dark and irradiated group, in addition to a dark and only irradiated control group. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion test, mitochondrial activity by MTT, morphological changes by SEM. To analyze the type of cell death, the markers Annexin V and propidium iodide were used, and to assess the mitochondrial membrane potential of JC-1, images were obtained by confocal microscopy and the fluorescence emitted by the markers was quantified using the ImageJ software. To analyze the production of reactive oxygen species, the reagent H<sub>2</sub>DCF-DA was used and DNA fragmentation was verified by the comet test. There was a decrease in parasite viability as well as changes in mitochondrial activity. PDT caused alterations in the mitochondrial membrane potential of the two species, regardless of the time of analysis (immediately or 18 hours after treatment). The ROS production was concentration-dependent and was observed only in the groups submitted to PDT and the species *L. braziliensis* presented higher ROS production than *L. major*, however *L. braziliensis* was more resistant than *L. major* when analyzing the viability after TFD. DNA damage was also observed in both species, suggesting that apoptosis prevailed in *L. braziliensis*. Cell morphology was affected, mainly at the highest concentration of curcumin, leaving the cells rounded and flagellum shortened. The results support the use of curcumin as a photosensitizer in PDT against *Leishmania* cells. BSA nanoparticles associated with curcumin were also tested in amastigotes of *L. braziliensis* and *L. major*. For this, *Leishmania*-infected macrophages and macrophages were incubated with curcumin encapsulated in cationic and anionic BSA. Viability tests were performed by the trypan blue exclusion method, where it was verified that only the concentration 0.7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  of cationic BSA-Cur demonstrated a reduction in cell viability at concentrations of 0.1 and 0.08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  of the anionic BSA-Cur reduced cell viability, since the concentration of 0.7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  was cytotoxic. The analysis through confocal microscopy was performed to verify if the nanoparticles were internalized by macrophages and it can be verified that the cationic and anionic nanoparticles were found inside the macrophages and protozoa. Finally, a viability test was performed with the fibroblasts and it was found that the nanoparticles did not affect the viability of this cell line, however free curcumin promoted a decrease in the viability of fibroblasts after treatment. The results obtained

were satisfactory, demonstrating the ability of nanoparticles to reduce cell viability at lower concentrations than free curcumin.

**Keyword:** *Leishmania*; photodynamic therapy; curcumin; nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais estruturas intracelulares das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> . Em (A) verificamos as formas Promastigotas e (B). Amastigota.....	25
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> .....	26
Figura 3 - Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da leishmaniose tegumentar no Brasil, 2015 .....	30
Figura 4 - Diagrama de Jablonski- Adaptado mostrando reação do tipo II .....	34
Figura 5 - Espectro de absorvância da Curcumina Livre .....	38
Figura 6 - Análise da viabilidade de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão assinaladas com símbolos: (*) para comparação dos grupos com o controle; os símbolos (#) mostram as diferenças dos grupos com os seus respectivos controles. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = $p \leq 0,05$ ).....	48
Figura 7 - Análise da viabilidade de promastigotas de <i>L. major</i> imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão assinaladas com símbolos: (*) para comparação dos grupos com o controle; os símbolos (#) mostram as diferenças dos grupos com os seus respectivos controles. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = $p \leq 0,05$ ).....	48
Figura 8 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de MTT, imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina, em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> . As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz). (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	49
Figura 9 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de MTT, imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina, em promastigotas e <i>L. major</i> . As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz). (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	50
Figura 10 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão sinalizadas com o símbolo * comparando com o grupo controle e # comparando o grupo escuro com o grupo irradiado. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = $p \leq 0,05$ ).....	51
Figura 11 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de <i>L. major</i> após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão sinalizadas com o símbolo *, comparando com o grupo controle. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = $p \leq 0,05$ ).....	51
Figura 12 Avaliação da morte celular por marcação com Anexina V e IP em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após terapia fotodinâmica com curcumina. Em (A) é apresentado os valores obtidos pelo software ImageJ e em (B) as imagens obtidas pelo microscópio confocal Zeiss LSM 700. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: (* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz; ° em relação a em relação à mesma concentração) (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	53
Figura 13 - Avaliação da morte celular por Anexina V e coloração de PI em promastigotas de <i>L. major</i> , após terapia fotodinâmica com curcumina. Em (A) é apresentado os valores obtidos pelo software ImageJ e em (B) as imagens obtidas pelo microscópio confocal Zeiss LSM 700. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: (* em comparação	

com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz; ° em relação a em relação à mesma concentração) (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	54
Figura 14 - Avaliação da fragmentação do material genético pelo teste do cometa em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após exposição à TFD com curcumina. Os parâmetros de comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda foram analisados. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle irradiado; ° em comparação com em relação à mesma concentração). (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	55
Figura 15 - Avaliação da fragmentação do material genético pelo teste do cometa em promastigotas de <i>L. major</i> após exposição à TFD com curcumina. Os parâmetros de comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda foram analisados. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle irradiado; ° em comparação com em relação à mesma concentração). (ANOVA $p \leq 0,05$ ). .....	56
Figura 16 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> , onde pode-se verificar os danos causados pela TFD. Mag 5000 K.x. ....	57
Figura 17 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de promastigotas de <i>L. major</i> , onde pode-se verificar os danos causados pela TFD. Mag 5000 K.x. ....	58
Figura 18 - Avaliação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) com JC-1 em <i>L. braziliensis</i> . Imediatamente após a TFD: em (A) e 18 horas após a TFD: em (B). As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle de luz; ° em comparação com a mesma concentração). (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	60
Figura 19 - Avaliação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) com JC-1 em <i>L. major</i> . Imediatamente após a TFD: em (A) e 18 horas após a TFD em (B). As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle de luz; ° em comparação com a mesma concentração). (ANOVA = $p \leq 0,05$ ). .....	61
Figura 20 - Esquema das nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica e aniônica .....	73
Figura 21 - Espectros de absorção da curcumina ( $0,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ ) padrão e extraída de nanopartículas de BSA. ....	74
Figura 22 (a): Espectros de absorção da curcumina em diferentes concentrações ( $0,1-0,7 \mu\text{mol. L}^{-1}$ ). (b): plot da concentração de curcumina vs. absorbância .....	75
Figura 23 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura: a) Nanopartículas de BSA sem curcumina; b) Nanopartículas de BSA encapsulada com curcumina. Mag 138 K.x. ....	77
Figura 24: Análise da viabilidade de macrófagos e macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica. Em A é apresentado o gráfico do grupo escuro; em B é apresentado o grupo irradiado. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = $p \leq 0,05$ ) e estão assinaladas com símbolos: (*) para comparação dos grupos com o controle. ....	82
Figura 25: Análise da viabilidade de macrófagos e macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina aniônica. Em A é apresentado o gráfico do grupo escuro; em B é apresentado o grupo irradiado. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância	

(ANOVA = $p \leq 0,05$ ) e estão assinaladas com símbolos: (*) para comparação dos grupos com o controle.....	83
Figura 26: Análise da viabilidade dos fibroblastos 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica $0,7 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e aniônica $0,08 \mu\text{mol. L}^{-1}$ em <b>A</b> e Curcumina livre $42$ e $21 \mu\text{mol. L}^{-1}$ em <b>B. L}^{-1}. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA = <math>p \leq 0,05</math>) e estão assinaladas com símbolos: (*) para comparação dos grupos com o controle. ....</b>	84
Figura 27: Micrografia obtida por microscopia confocal de fluorescência, indicando internalização das nanopartículas BSA-Curcumina catiônica em (A) e nanopartículas BSA-Curcumina aniônica (B) em macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> . Setas indicam núcleo; ponta de seta indicam Leishmanias. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados da caracterização físico-química das nanopartículas de BSA encapsulada com curcumina.....	76
--	----

## LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1 Cálculo para obter a viabilidade celular: .....	41
Equação 2 Cálculo para verificar a atividade mitocondrial: .....	42
Equação 3: Viabilidade celular dos macrófagos e macrófagos infectados com Leishmanias.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

Água DI	Água deionizada
Água ultrapura	Água MiliQ
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AlPhCl	Cloro Alumínio Ftalocianina
AM	Azul de Metileno
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CO <sub>2</sub>	Dioxido de carbono
DBA t	trans-Dibenzalacetona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio com imuno adsorvente ligado a enzima
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
F	Foward
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
GC	Grupo controle
GE	Grupo Escuro
GI	Grupo Irradiado
Gp63	Glicoproteína de superfície
GTP	Guanina trifosfato
HCT116	Linhagem celular de câncer colo retal
HDMS	Hexamethyldisilazane
HeLa	Linhagem celular de Câncer cervical
HT1080	Linhagem celular de fibrosarcoma
IDRM	Teste intradermorreação de Montenegro IFI Teste imunofluorescência indireta
IFSC	Instituto de Física de São Carlos

IL-12	Interleucina 12
IP	Iodeto de Propídio
IP&D	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
JC-1	1H-Benzimidazolium, 5,6-dichloro-2-[3-(5,6-dichloro-1,3-diethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene)-1-propenyl]-1,3-diethyl-, iodide, (E)- 47729-63-5
Kb	1000 pares de bases
kDNA	Cinetoplasto, estrutura que armazena material genético mitocondrial
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutaneomucosa
LED	Diodo emissor de luz
LIT	Liver triptose infusion – Infusão de fígado e triptose
LPG	Lipofosfoglicanos
LT	Leishmaniose tegumentar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês
MTT	(3-(4,5 dimetiazol-2il)-2,5 difeniltetrazolium brometo)
NaCl	Cloreto de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organização mundial de saúde
PAH	Poli(alilamina hidroclorada)
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Poli-láctico-co-glicólico
Pp IX	Protoporfirina IX
H <sub>2</sub> DCF-DA	Permeante celular 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
RAW	Linhagem de macrófagos
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SFB	Soro Fetal Bovino
SiPc(OH) <sub>2</sub>	di-hidróxido de silício ftalocianina

SMF	Sistema mononucleares fagocitário
TFD	Terapia Fotodinâmica
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U20S	Linhagem celular de osteosarcoma
USP	Universidade de São Paulo
Zn	Zinco
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específico .....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 Leishmania.....	24
3.2 Ciclo de vida.....	25
3.3 Leishmaniose Tegumentar e vias de infecção .....	27
3.4 Diagnóstico e Tratamento.....	30
3.5 Terapia fotodinâmica - TFD .....	32
<b>CAPÍTULO 1: UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA LIVRE EM PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>39</b>
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Cultivo dos parasitos.....	40
4.2 Fotossensibilizador .....	40
4.3 Terapia fotodinâmica .....	40
4.4 Método de viabilidade por exclusão com Azul de Tripan .....	41
4.5 Avaliação da viabilidade por atividade mitocondrial por teste MTT .....	41
4.6 Dosagem da produção de espécies reativa de oxigênio .....	42
4.7 Identificação de morte celular com Anexina V e Iodeto de Propídio.....	43
4.8 Ensaio do Cometa.....	43
4.9 Análise morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	44
4.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial com JC-1 .....	45
4.11 Análise de fluorescência.....	45
4.12 Análise Estatística .....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Tripan .....	47
5.2 Análise da Atividade Mitocondrial pelo teste MTT .....	49
5.3 Dosagem da produção de espécie reativa de oxigênio.....	50
5.4 Identificação de morte celular com Anexina V e Iodeto de Propídio.....	51
5.5 Teste do Cometa .....	54
5.6 Análise morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	56
5.7 Análise do Potencial de Membrana por JC-1 .....	59
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	68
<b>CAPÍTULO 2: AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA-CURCUMINA CATIONICA E ANIÔNICA EM AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>69</b>
8 INTRODUÇÃO.....	70
9 METODOLOGIA.....	72
9.1 Cultivo de macrófagos .....	72
9.2 Infecção dos macrófagos RAW com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> .....	72
9.3 Fotossensibilizador .....	72
9.4 Caracterização das nanopartículas de BSA.....	74

<b>9.5</b>	<b>Terapia fotodinâmica.....</b>	<b>77</b>
<b>9.6</b>	<b>Viabilidade das células tratadas com a curcumina nanoencapsulada com método de exclusão com azul de tripan .....</b>	<b>79</b>
<b>9.7</b>	<b>Internalização da curcumina nanoencapsulada em macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>9.8</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>10.1</b>	<b>Viabilidade das células tratadas com curcumina nanoencapsulada pelo método de exclusão por azul de tripan.....</b>	<b>81</b>
<b>10.2</b>	<b>Internalização da curcumina nanoencapsulada .....</b>	<b>84</b>
<b>11</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>12</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO – PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica transmitida por fêmeas de flebotomíneos e causada por 21 espécies diferentes de *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae (BASTOS *et al.*, 2012). As diferentes espécies de *Leishmania* spp. infectam uma variedade de animais, incluindo seres humanos (GOMES-SILVA *et al.*, 2008) sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública mundial.

Em mamífero, as leishmanioses são divididas em três manifestações: Cutânea, mucocutânea e visceral. A forma cutânea afeta a pele provocando úlceras em algumas partes do corpo, como por exemplo: face, braços e pernas, formando lesões destrutivas. Em alguns casos há cicatrização das lesões, mas em outros podem ocorrer marcas permanentes, ocasionando algum prejuízo social (CALVO-ÁLVAREZ *et al.*, 2012).

A Leishmaniose tegumentar (LT) nos últimos anos apresentou um aumento significativo, tanto no número de casos quanto na distribuição afetando vários países. Segundo a OMS, em 2018, 92 países foram considerados endêmicos ou notificados de leishmaniose tegumentar. Na América Latina, cerca de 940.396 novos casos foram registrados no período de 2001 a 2017. Em 2019, 15.484 novos casos de LT (PAN AMERICAN, 2020; BRASIL, 2021) foram notificados no Brasil, com *L. braziliensis* sendo a espécie mais importante devido à sua ampla distribuição no território brasileiro (ROUGERON *et al.*, 2009; POSTIGO, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2018; MIRAHMADI *et al.*, 2018; BRASIL, 2021).

Um dos motivos para o aumento dos casos da leishmaniose está relacionado as mudanças climáticas. Trabalhos de Costa *et al.* (2018) descreveram em seus estudos a ocorrência dos vetores de leishmaniose tegumentar em diversos municípios brasileiros e a tendência é que o número de casos aumente.

Outro fator importante é a expansão urbana e o desmatamento. As ocupações ilícitas comprometem o equilíbrio ambiental natural e assim algumas doenças podem afetar a população, principalmente as que se encontram em condições de vida precárias. Isso pode acontecer pela dispersão de espécies vetores de LT nas áreas urbanas (KARIMKHANI *et al.*, 2016).

O tratamento convencional da leishmaniose cutânea é baseado na administração oral, tópica ou sistêmica de fármacos à base de Antimônio. Ele é contraindicado em pacientes com doenças cardíacas e renais, pois apresenta diversos efeitos colaterais. É um tratamento de longo prazo que pode falhar se não for seguido à risca (BILGIC-TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019; BRASIL, 2021) e além disso possui um custo elevado.

Para superar essas desvantagens, fica evidente a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a doença, seus vetores e formas de contágio, a criação de novos mecanismos e políticas públicas de controle, com a devida orientação à população exposta, além da necessidade iminente no desenvolvimento de novos tratamentos eficazes e eficientes para a leishmaniose. Nesse sentido, várias estratégias de tratamento estão sendo estudadas, entre elas a Terapia Fotodinâmica (TFD).

A TFD, um método que combina a utilização de um fotossensibilizador (FS) não tóxico, com luz em comprimento de onda capaz de excitar esse fotossensibilizador. Esta reação forma espécies reativas de oxigênio (EROs), altamente tóxico para os parasitas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004), as quais podem reagir com variedade de moléculas, incluindo o colesterol, lipídeos das membranas, proteínas, bem como bases de ácidos nucleicos (TESSAROLLO *et al.*, 2010; RAGÀS *et al.*, 2013). Ela pode causar danos nas biomoléculas provocando a perda da funcionalidade biológica apropriada, levando a inativação da célula do parasito.

A TFD vem se mostrando uma alternativa eficaz para o tratamento de lesões dermatológicas, pois não é invasiva e não apresenta efeitos colaterais como o tratamento convencional com antimoniais pentavalentes. Além disso, a TFD pode ser uma modalidade terapêutica de fácil acesso, com algumas substâncias de baixo custo. No que se refere ao FS, a curcumina tem-se mostrado uma alternativa para aplicação da TFD, pois tem alto potencial de estimular a produção de EROs e possui a capacidade de interação com moléculas do material genético (NAFISI *et al.*, 2009; OGIWARA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2016a).

Outra modalidade que vem sendo aplicada para otimizar a ação da TFD é a associação do FS a nanopartículas, pois a utilização das nanopartículas tem demonstrado a capacidade de otimizar a ação dos fármacos, aumentando a eficácia da TFD, melhorando a solubilidade e a entrega seletiva do FS (DEBELE; PENG; TSAI, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a resposta da TFD com Curcumina em promastigota de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* e Curcumina nanoencapsulada em macrófagos infectados.

### 2.2 Específico

- ✓ Verificar a viabilidade dos promastigotas imediatamente após a TFD por método de exclusão com azul de tripan;
- ✓ Avaliar produção de Espécies Reativas de Oxigênio;
- ✓ Verificar a via de morte celular utilizando os marcadores Anexina e iodeto de propídio;
- ✓ Avaliar o efeito genotóxico pelo teste cometa;
- ✓ Verificar alterações morfológicas causadas logo após a TFD;
- ✓ Avaliar as alterações no potencial de membrana mitocondrial imediatamente e após 18 horas utilizando o marcador JC-1;
- ✓ Verificar a viabilidade dos macrófagos e macrófagos infectados com amastigotas 18 horas após a TFD com nanopartículas BSA-Curcumina catiônica e aniônica, por método de exclusão com azul de tripan;
- ✓ Verificar a viabilidade de fibroblastos após 18 horas após a TFD com nanopartículas BSA-Curcumina catiônica e aniônica, por método de exclusão com azul de tripan;
- ✓ Verificar a internalização de nanopartículas BSA-Curcumina catiônica e aniônica em macrófagos e macrófagos infectados com *Leishmanias*;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à Família Trypanosomatidae, da ordem Kinetoplastida. A característica que o faz pertencer a essa ordem é a presença do cinetoplasto, estrutura derivada da mitocôndria e que armazena o DNA mitocondrial denominado de kDNA (SOUZA, 2008).

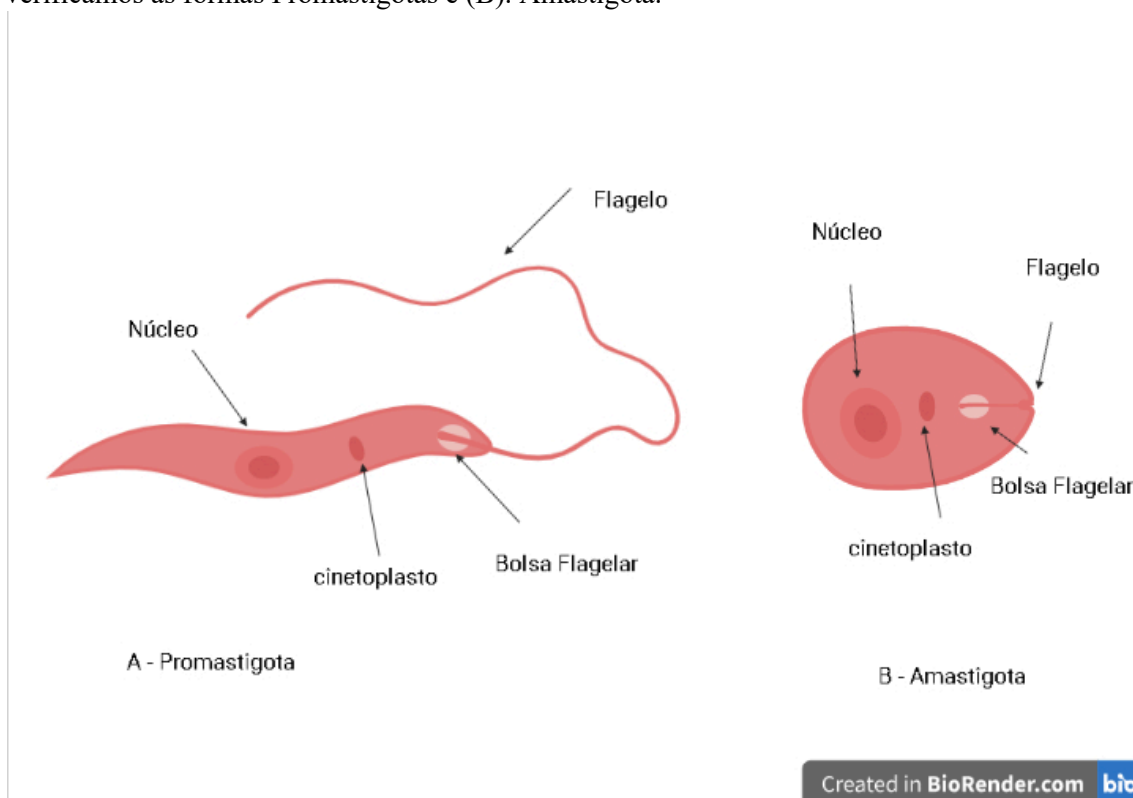
O kDNA é composto de dois tipos de moléculas circulares conectados formando uma rede, os minicírculos - codificam pequenos RNAs-guias que atuam na edição de RNA e o maxicírculos que codificam rRNAs e proteínas mitocondriais (MORRIS *et al.*, 2001). Sua composição é aproximadamente 5.000 - 10.000 de minicírculos com aproximadamente 1,5 kb com sequências altamente variáveis (SHLOMAI, 2004; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011), entretanto existe uma região bem conservada entre as espécies (cerca de 200pb) que pode ser utilizado em diagnósticos (DISCH *et al.*, 2005; SATOW *et al.*, 2013; GRAÇA *et al.*, 2012). Os maxicírculos são compostos por 40 – 50 cópias de 20 a 40 kb (SHLOMAI, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Além do cinetoplasto e outras organelas presentes em todas as células eucarióticas convencionais, as *Leishmanias* possuem outras estruturas características, como megassomos, acidocalcissomos, glicossomos e bolsa flagelar (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Essas organelas estão envolvidas em atividades metabólicas como endocitose e exocitose, replicação e obtenção de energia. Algumas estruturas, como a bolsa flagelar e megassomo, também podem conferir a esses parasitos a função de defesa nos processos da resposta imune do seu hospedeiro durante uma infecção (SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

De acordo com Neves *et al* (2011) o tamanho da célula varia de acordo com as espécies, mas as formas amastigotas são arredondadas e seu tamanho fica em torno de 1,5 - 3,0x3,0 - 6,5 µm. As formas promastigotas apresentam comprimento entre 16,0 e 40,0 µm de comprimento por 1,5 - 3,0 µm (largura) e o flagelo, frequentemente, é maior que o comprimento da célula.

A figura 1 apresenta a morfologia do protozoário e a identificação de algumas das principais estruturas.

Figura 1 - Principais estruturas intracelulares das formas evolutivas de *Leishmania*. Em (A) verificamos as formas Promastigotas e (B). Amastigota.



Fonte: Autor – Criado no BioRender.com

### 3.2 Ciclo de vida

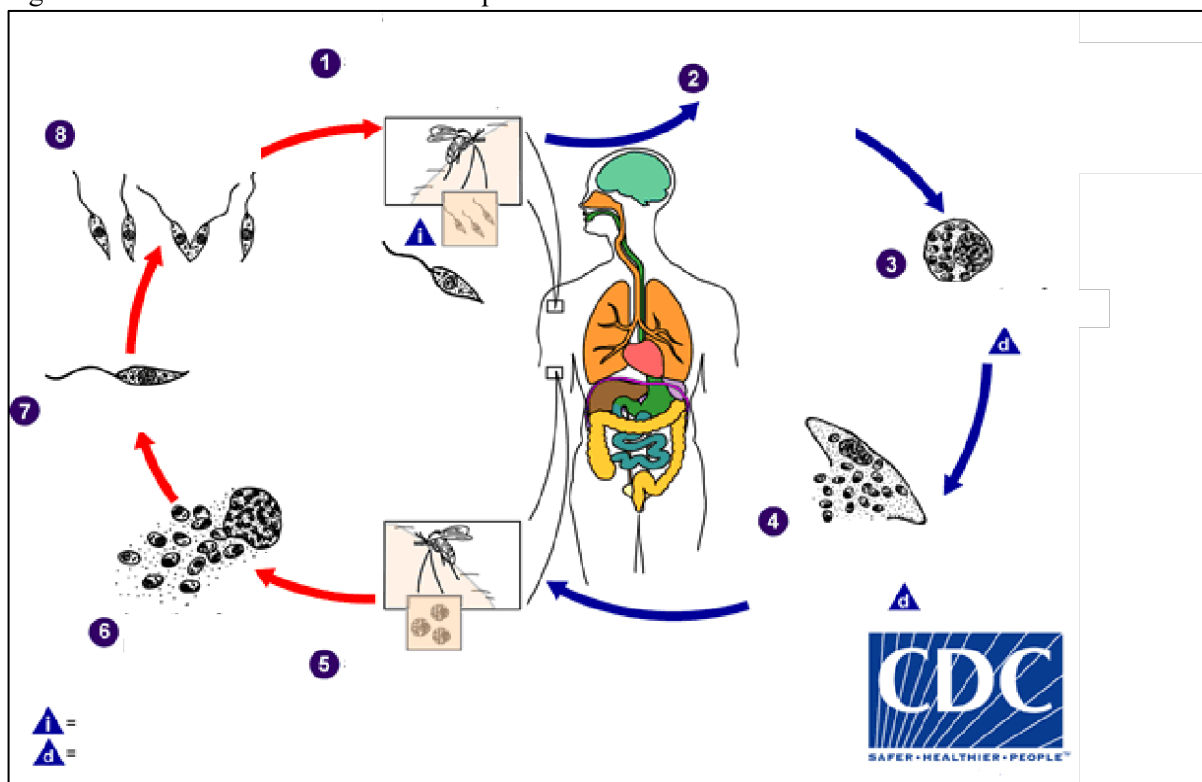
Os protozoários *Leishmania* são considerados heteroxenos, isto é, precisam de dois hospedeiros diferentes para completar o seu ciclo biológico: (1) fêmeas de insetos vetores hematófagos da família dos flebotomíneos e (2) hospedeiro definitivo, (mamíferos), entre eles os seres humanos (KAYE; SCOTT 2011).

Essa diferença de hospedeiros confere aos parasitos diferenças morfológicas e bioquimicamente distintas. De acordo com Cavalcanti *et al.* (2008) as posições das estruturas do cinetoplasto e da bolsa flagelar podem definir as diferenças entre as duas formas. Nos insetos encontramos as formas promastigotas, estas vivem no lúmen do tubo

digestório e apresentam formas alongadas, possuem o flagelo fixado na bolsa flagelar. São células móveis e é a forma infectante. Nos hospedeiros vertebrados encontramos as formas amastigotas, que são células arredondadas sem flagelo aparente e que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do seu hospedeiro (NEVES *et al.*, 2011).

A figura 2 mostra o processo de infecção entre os dois hospedeiros. No invertebrado a infecção se dá quando a fêmea de flebotomíneos pica o vertebrado infectado e durante o repasto sanguíneo ingere macrófagos infectados por amastigotas, esses se diferenciam e multiplicam-se. A transmissão do inseto infectado para o mamífero é realizada por meio da alimentação, que ocorre durante o processo de ingestão de sangue, as formas promastigotas que vivem em seu interior são regurgitadas e introduzidas no local da picada, dando início ao processo de fagocitose pelos macrófagos (REY, 2008; NEVES, 2011).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Leishmania* sp.



Fonte: Figura adaptada de Global Health – Division of Parasitic Diseases, atualizada em 2020.

### 3.3 Leishmaniose Tegumentar e vias de infecção

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença do sistema fagocítico mononuclear causada por diferentes espécies de *Leishmania*. As células alvo dos parasitas de *Leishmania* são as células do sistema mononucleares fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado, principalmente os macrófagos (NEVES *et al.*, 2011).

*Leishmania major* é uma das responsáveis pela leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Há estudos em países como Afeganistão, Irã, Paquistão, entre outros, nas regiões da Ásia e norte da África. Seu principal vetor é *Phlebotomus papatasi*. *L. braziliensis* é uma espécie presente no Brasil e considerada importante, pois atinge diversas regiões brasileira e vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do país, o principal vetor são flebotomíneos do gênero *Lutzomia* (ROUGERON *et al.*, 2009; POSTIGO, 2010; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010; NEVES *et al.*, 2011; BRASIL, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2018; MIRAHMADI *et al.*, 2018).

A LT é considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente nos países tropicais com populações de baixo nível socioeconômico (FEASEY *et al.*, 2010; DE VRIES *et al.* 2015) sendo considerada uma doença negligenciada. Segundo dados do Brasil (2017) a distribuição mundial da LT é ampla e os registros de casos nas Américas se estendem desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, exceto Chile.

No mundo estima-se que em média, a cada ano cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair a leishmaniose (BENTES *et al.*, 2015). No Brasil, anualmente são notificados aproximadamente 35.000 novos casos e merece especial atenção por ser uma infecção dermatológica que pode produzir deformidades e ter um reflexo na vida psicológica, social e econômica do indivíduo (BRASIL, 2017).

O processo de infecção no hospedeiro vertebrado, se inicia com a inoculação das formas promastigotas durante o repasto sanguíneo do inseto e substâncias presentes em sua saliva favorecem a infecção. Após o processo de fagocitose as células, partículas antigênicas são levadas aos linfonodos e apresentadas às células do sistema imune. Elas, então, são estimuladas e migram para o sítio da infecção participando então do processo inflamatório. Os parasitos internalizados pelos macrófagos, ficam dentro de um vacúolo parasitóforo, entretanto as *Leishmanias* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de

driblar sua capacidade destrutiva, conseguindo sobreviver neste ambiente hostil e multiplicam-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos (FORESTIER *et al.*, 2011; LIU; UZONNA, 2012). Os promastigotas não internalizados são destruídos no meio extracelular e as partículas antigênicas apresentadas ao sistema imune. A evolução da doença para cura espontânea, formas autolimitadas ou formas progressivas pode estar relacionada com a intensidade e qualidade da resposta imune do hospedeiro (BRASIL, 2017).

Diversos são os mecanismos que facilitam a interação dos promastigotas com as células hospedeiras. Entre eles estão, principalmente, estruturas presentes na membrana como, por exemplo, as lipofosfoglicanos (LPG) e a glicoproteína de superfície principal (gp63). Essas estruturas facilitam a sua adesão às células e o processo de fagocitose (OLIVEIR *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2012; LIU; UZONNA, 2012).

Neves *et al.* (2011) destaca ainda que os LPG fornecem ao parasita a capacidade de protegê-lo contra a produção de espécies reativa de oxigênio (ERO) pelas células hospedeiras e auxilia o processo de adaptação ao novo ambiente onde está localizado e também a protease gp63 pode atuar também degradando enzimas lisossomais. Além desses processos a *Leishmania* ativa uma resposta imunológica mediada por linfócitos TCD4 e TH1 (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014) e para garantir sua sobrevivência no macrófago a *Leishmania* pode suprimir a produção de IL-12 (GRAZIA *et al.*, 2001; LIU; UZONNA, 2012).

Existem outras características que favorecem a invasão e permanência dos parasitos nas células hospedeiras. Alguns genes presentes nas *Leishmanias* atuam conferindo resistência ao estresse oxidativo promovido pela célula hospedeira, como por exemplo o *Argininosuccinate Synthase (ASS)* (SARDAR *et al.*, 2016) e *LABCG2* (SALINAS *et al.*, 2013). Há também o gene *Ferro Superóxido Dismutase FeSO*, (MITTRA *et al.*, 2017) esse gene além de promover a proteção oxidativa, confere virulência dos parasitos.

A leishmaniose apresenta uma variedade de manifestações clínicas associadas, e está relacionada à resposta imune do hospedeiro e das diferentes espécies de *Leishmania* (SCOTT; NOVAIS, 2016), podendo ser classificadas de acordo com aspectos clínicos, patológicos e imunológicos.

A lesão pode variar de Leishmaniose Cutânea (LC) caracterizada por formação de úlceras únicas ou múltiplas na derme que evoluem para formas verrucosas e a densidade de parasitas no início da infecção é alta nas bordas da úlcera, diminuindo com o passar do tempo, quando a úlcera se torna crônica. Os principais agentes promotores de LC é a *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. laissez* (DESJEUX, 2004; NEVES *et al.*, 2011).

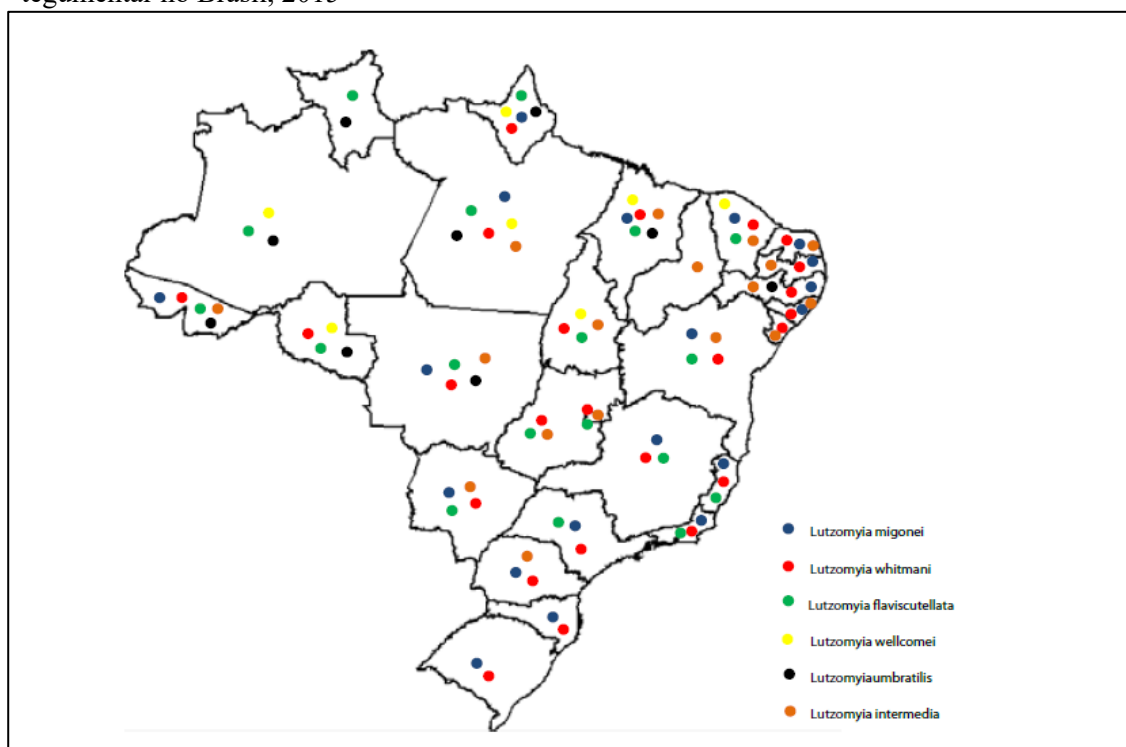
A variação de Leishmaniose Mucocutânea (LMC) caracteriza-se por lesões primárias, como as causadas por LC e depois evolui agredindo a mucosa das regiões do nariz, boca e laringe. Essa forma de manifestação pode levar meses ou anos após a lesão inicial primária (COSTA *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2011), outra característica relacionada a manifestação de LCM é o exagero das respostas imunológicas das células contra a *Leishmania* e a escassez de parasitos, esse processo pode promover a destruição de tecido onde houver depósito de partículas antigênicas (BRASIL, 2017).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) acontece quando úlceras derivadas da LC evoluem sem a resposta celular específica para os antígenos de *Leishmania*. Isso faz com que haja proliferação dos parasitos e disseminação da infecção. Na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, este se multiplica sem controle, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal (BRASIL, 2017).

Autores como Oliveira (2004) afirmam que a relação estabelecida entre parasito-hospedeiro é fator importante na manifestação e gravidade da leishmaniose. Outro fator importante para se levar em conta é a distribuição geográfica dos vetores de leishmaniose.

Os vetores de LT, são fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomya* apresentando ampla distribuição no território brasileiro, conforme observa-se na figura 3.

Figura 3 - Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da leishmaniose tegumentar no Brasil, 2015



Fonte: Brasil, 2017.

### 3.4 Diagnóstico e Tratamento

Não há um método que seja considerado padrão para diagnosticar a LT. Vários são os métodos, entre eles os aspectos clínicos e laboratoriais (VEJA-LÓPEZ, 2003; LEMRANI *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010). O primeiro passo é o clínico (GARCIA *et al.*, 2004), onde são observadas as características da lesão e dados da anamnese do paciente. O diagnóstico laboratorial consiste no método parasitológico, visualizando os parasitos nas amostras coletadas, como escarificação, aspiração ou biópsia da lesão, por meio de lâminas coradas com Giemsa (BRASIL, 2017). Esses métodos se mostram pouco sensíveis, não fornecendo maiores detalhes sobre a espécie e tempo da lesão (MARFURT *et al.*, 2003 SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2007).

Outros métodos utilizados são o isolamento do parasito por cultura em meio artificial ou animais experimentais. Análises imunológicas, como intradermoreação de Montenegro (IDRM), imunofluorescência indireta (IFI) e teste enzimático (ELISA) (BRASIL, 2017), mas estes também apresentam pouca especificidade.

Outros testes estão sendo pesquisados para garantir a eficiência do diagnóstico de LT. Estes testes baseiam-se na técnica de biologia molecular, que possui alta sensibilidade, pois utiliza o material genético da célula em questão (FLOETER-WINTER, 2004; REITHINGER, DUJARDIN, 2007; DEPLEDGE *et al.*, 2009; VRIES *et al.*, 2015; TIWAN *et al.*, 2017).

Entretanto, a escolha do teste de diagnóstico dependerá muitas vezes da infraestrutura disponível e recursos da instalação de diagnóstico e não na precisão do diagnóstico (VRIES *et al.*, 2015).

No Brasil, o tratamento para LT foi iniciado pelo médico Gaspar Vianna, no ano de 1912 (NEVES, 2011). O uso de medicação independe da espécie causadora (GOTO; LINDOSO, 2010). Hoje em dia ainda faz uso da medicação adotada por ele e são chamadas de drogas de primeira escolha. Fazem parte os antimoniais pentavalentes. Existem dois no mercado, o N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato sódico (Pentostam®).

Há um protocolo estipulado pela OMS que define uma dosagem calculada em mg/Kg/dia/Sb+5e não deve ultrapassar 3 ampolas e também varia de acordo com o tipo de lesão. A aplicação é por via endovenosa (BRASIL, 2017).

Essa droga interfere no mecanismo bioenergético das formas amastigotas, inibindo processos energéticos, reduzindo a produção de ATP e GTP (CHAI *et al.*, 2005), entretanto oferece muitas desvantagens e contraindicações como o uso em mulheres grávidas e em pacientes com: insuficiência renal, cardíaca ou hepática (BRASIL, 2017).

Foram desenvolvidos os antimoniais encapsulados em lipossomos na tentativa de atenuar os efeitos e melhorar a ação do fármaco, sua ação é direta nos fagolisossomos dos macrófagos após a internalização por endocitose (NEVES, 2011; BRASIL, 20017).

Os antimoniais pentavalentes, embora tóxicos, ainda são utilizados como fármacos de primeira escolha, e novas formulações farmacêuticas estão sendo exploradas (BASTOS *et al.*, 2016).

Nas situações em que o uso de antimoniais pentavalentes não são indicados, fazem a escolha da chamada drogas de segunda escolha, que são as anfoterecinas, pentamedinas, a miltefosina e a paromomicina (BRASIL, 2017).

O protocolo estipulado pela OMS é que essa droga deve ser aplicada por infusão intravenosa lenta, num intervalo de 2 a 6 horas, A concentração recomendada para infusão é de 0,1 mg/mL (1 mg/10 mL) (BRASIL, 2017).

A anfotericina foi inicialmente utilizada como antifúngico. Na *Leishmania*, atua na associação ao ergosterol da membrana celular, provocando alterações na permeabilidade da membrana do parasito, o que resulta a saída de íons que causam a morte celular (DAMIANO *et al.*, 2006; WILCOCK *et al.*, 2013). Assim como os antimoniais pentavalentes, foi desenvolvido também a anfotericina B lipossomal (NEVES, 2011). Deve-se observar alguns cuidados para utilização de anfotericina B para mulheres grávidas e a tolerância individual de cada paciente.

De acordo com Bastos *et al.* (2016) os mecanismos de ação das pentamedinas, a miltefosina e a paromomicina ainda não estão bem elucidados, ainda há vários estudos sendo conduzidos.

Baseados nos tratamentos convencionais que apresentam alto custo e alta toxicidade ao organismo do hospedeiro e as dificuldades operacionais, há necessidade de buscar novas alternativas para combater a leishmaniose tegumentar (NEVES *et al.*, 2011).

Vários estudos vêm sendo realizados envolvendo terapias alternativas, como a utilização da crioterapia, apresentado por Layegh e colaboradores (2009), o estudo de genes envolvidos na resistência aos medicamentos como os trabalhos de Tessarollo (2015) e Kulshrestha (2014); Oliaee e colaboradores 2018, utilizando produtos naturais como a quercetina demonstrada nos trabalhos de Neves (2016).

Outra alternativa que vem sendo muito explorada é a terapia fotodinâmica (TFD). Os resultados, tanto dos estudos *in vivo* (PELOI *et al.*, 2011) como *in vitro* (CHANG *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2016a; 2016b), entre outros, apontam a TFD como um tratamento promissor, visto que apresenta bons resultados.

### **3.5 Terapia fotodinâmica - TFD**

Os primeiros experimentos utilizando a Terapia fotodinâmica (TFD) foram realizados em meados de 1900 e a técnica vem sendo aperfeiçoada e se fortalecendo como uma das mais importantes técnicas médicas – terapêuticas, utilizadas para tratar diversas

enfermidades, principalmente na área dermatológica (AKILOV *et al.*, 2008; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2010; HÖNIGSMANN *et al.*, 2012).

É uma modalidade de tratamento que representa uma alternativa interessante, pois, mesmo após várias aplicações não apresenta resistência ao fármaco utilizado (ENK *et al.*, 2003). Por se tratar de uma terapia não invasiva e que vem ganhando grande interesse no mundo todo por oferecer ao paciente fatores que aumentam sua qualidade de vida, apresenta bons resultados na área dermatológica, como tratamento de acne, ceratose actínica, fotorejuvenescimento, também se iniciou os estudos da sua aplicação para o tratamento de LT (THISSEN; KUIJPERS; NEUMANN, 2005; XIANG WEN *et al.*, 2017). A TFD é realizada em duas etapas, primeira ocorre a aplicação do FS e depois a irradiação para ativação do mesmo (ANDREEVA *et al.*, 2010; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; LOPEZ *et al.*, 2010; GARDNER *et al.*, 2010; DUTTA; WAKI; CHANG, 2011).

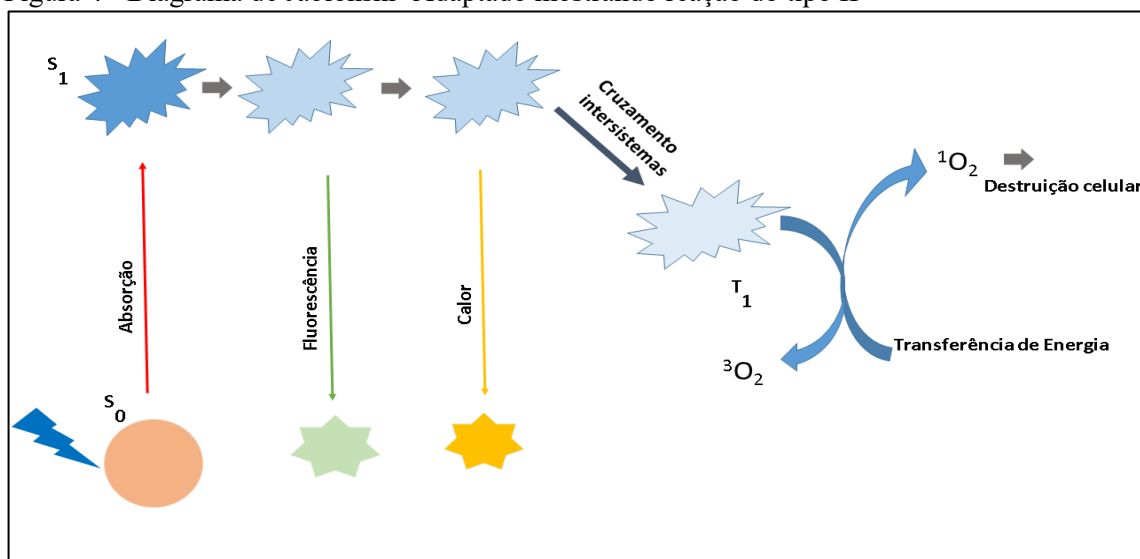
A associação de um fármaco fotossensível (FS), uma fonte de luz e o oxigênio molecular é o princípio básico da TFD. Após absorver luz em comprimentos de onda específica, o FS é excitado transferindo energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio por dois mecanismos distintos. Esses dois mecanismos possuem o início do seu processo semelhante, em que o FS ao entrar na célula alvo e recebendo a irradiação é convertido do estado de energia fundamental do singleto (S<sub>0</sub>) para o estado singleto excitado (S<sub>1</sub>), parte da energia é perdida em forma de luz, calor e a outra parte direciona uma molécula fotossensibilizadora para o estado tripleto excitado (T<sub>1</sub>) após sofrer cruzamento intersistemas. (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Reação do tipo I, onde o FS excitado (T<sub>1</sub>) transfere energia para as biomoléculas próximas levando à formação de radicais livres como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, levando ao estresse oxidativo, resultando na destruição das células. Na reação tipo II (Figura 4), o FS no seu estado tripleto (T<sub>1</sub>) transfere energia para o oxigênio molecular que está no estado tripleto fundamental (T<sub>0</sub>), ao absorver essa energia o oxigênio molecular faz uma transição para oxigênio singleto excitado (S<sub>1</sub>), altamente citotóxico. Supõe-se que a reação tipo II é o processo que condiciona a eficiência da TFD, pois ocorre de forma mais rápida que a reação do tipo I, entretanto nos dois tipos de mecanismos dependem de alguns fatores importantes, como concentração de oxigênio, pH e estrutura do fotossensibilizador (CASTANO; DEMIDOVA.;

HAMBLIN, 2006; ANAND *et al.*, 2009; AGOSTINIS *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2012; BAPTISTA *et al.*, 2017, KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas nos dois mecanismos interagem com moléculas biológicas causando destruição celular. De acordo com Fonseca *et al.* (2006) grande parte dos compostos orgânicos está no estado singlete básico ( $S_0$ ). Devido ao fato de o oxigênio molecular encontrar-se no estado tripleto, partículas do fotossensibilizador excitadas não danificam as estruturas das células e reagem apenas com moléculas de oxigênio dissolvidas no citoplasma.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski- Adaptado mostrando reação do tipo II



Fonte: Autor.

Diversos estudos vêm sendo realizados, tanto *in vitro* como *in vivo* buscando elucidar a ação e mecanismos da TFD como terapia alternativa para o tratamento de leishmaniose cutânea. Estudos como o de Dutta *et al.* (2005) com alumínio cloro ftalocianina – AlPhCl; Akilov *et al.* (2006); Aureliano *et al.* (2018) com o Azul de Metileno – AM; Souza *et al.* (2017) com o ácido 5-aminolevulínico – ALA; e Viana (2018) utilizando aminoftalocianina 2 (PC2) para sensibilização exógena antes da exposição a luz vermelha observou a diminuição da viabilidade dos parasitas após irradiação, notaram também nesse estudo que cepas de *L. amazonensis* geneticamente modificadas acumularam uroporfirina 1 (URO1) e quando em contato com ácido 5-aminolevulínico (ALA) ocorreu a fotoinativação endógena de *L. amazonensis*, ou seja,

uma fotoinativação induzida pelo acúmulo de porfirina nessas células. Entretanto abordam a importância de maiores estudos para a eficiência da TFD.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Song *et al.* (2011) e Pinto *et al.* (2011) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Pinto e colaboradores, em 2016ab, publicaram resultados positivos da TFD, observando boa internalização do FS testado e após ser submetido a irradiação observaram alteração na viabilidade e morfologia do parasito.

Entretanto, são necessários estudos que busquem elucidar a interação do FS com a célula e a ação da TFD, para que a sua eficiência seja sobre os parasitas e não sobre as células hospedeiras. Além disso, é importante também que a ativação dos processos imunológicos seja esclarecida (AKILOV *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009).

Outros autores, utilizando porfirinas e seus derivados em tratamento clínico, relatam o sucesso na evolução de lesões em pacientes tratados com TFD, como por exemplo Gardlo *et al.* (2003); Enk *et al.* (2003); Asilian e Davami, 2006 e de Sohl *et al.* (2007).

Embora diversos estudos apresentem pontos positivos, Van Der Snoek *et al.* (2008), afirma que nem toda a manifestação de leishmaniose pode ser tratada com TFD e que estudos sobre o mecanismo de ação devem ser realizados.

Mesmo apresentando sucesso na aplicação, a TFD convencional pode apresentar alguns obstáculos, como local específico, equipamento entre outros. Nesse contexto, alguns trabalhos buscam alternativas para estabelecer protocolos que utilizam a luz natural para ativar o FS. Autores como Wiegell *et al.* (2008) e Enk *et al.* (2014) obtiveram sucesso sem seus testes, utilizando a luz solar para ativar o FS.

Estudos de Nesi-Reis *et al.* (2017) descreveram que se o FS tiver um poder de penetração celular e não se acumular no tecido, o efeito da TFD pode se tornar mais eficaz. Então, conhecer as características do FS e sua interação com o tecido, isto é, sua especificidade e conhecer também a célula com a qual vai realizar a interação, auxilia na escolha do mesmo, visto que esclarecer a interação do FS com a célula alvo, comprimento de onda ideal e produzir produtos citotóxicos para otimizar a TFD bem como o processo de indução da morte celular, é fundamental para a escolha do mesmo (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; AKILOV *et al.*, 2008; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

As porfirinas (p.e. PpIX), fazem parte da primeira geração de FS utilizado em TFD, ela apresenta prolongada fotossensibilização e absorção na região de 630 nm proporcionando menor penetração no tecido. Por isso foram desenvolvidas as clorinas, que são derivados da porfirina reduzida, a fim de otimizar a TFD, pois as clorinas absorvem em comprimentos de ondas maiores (660 a 690 nm) e apresentam rápida eliminação do organismo. Há destaque também para o ácido-5-aminolevulínico(ALA), precursor natural da protoporfirina IX, que possui boa metabolização pelas células. Outro FS muito utilizado na TFD para inativação de micro-organismos e parasitos são os corantes, como ftalocianinas e Azul de Metileno (AM). O AM, além de possuir baixo custo, é um corante orgânico que apresenta absorção no comprimento de onda de 660 nm (RESHETNICKOV *et al.*, 2000; IVANOV *et al.*, 2000; WAINWRIGHT, 2004; EVANGELOU *et al.*, 2011; AURELIANO *et al.*, 2018).

A curcumina é um tipo de corante e vem sendo testada como fotossensibilizador. Ela é um pigmento amarelo-alaranjado extraído do rizoma da *Curcuma longa*, conhecido popularmente no Brasil por açafrão da terra e é amplamente utilizado na culinária como conservante e corante. Suas características medicinais, como por exemplo, controle microbiológico, propriedades antioxidativa e anti-inflamatória, faz com que vários estudos sejam realizados, inclusive sua ação fotodinâmica (AMMON; WAL, 1990; DOVIGO *et al.*, 2011; ARÚJO *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2014; PRIYADARSINI, 2014; SORIA-LOZANO *et al.*, 2015; VENIGALLA; GYENGESI; MUNCH, 2015; WIKENE; BRUZELL; TØNNESEN, 2015).

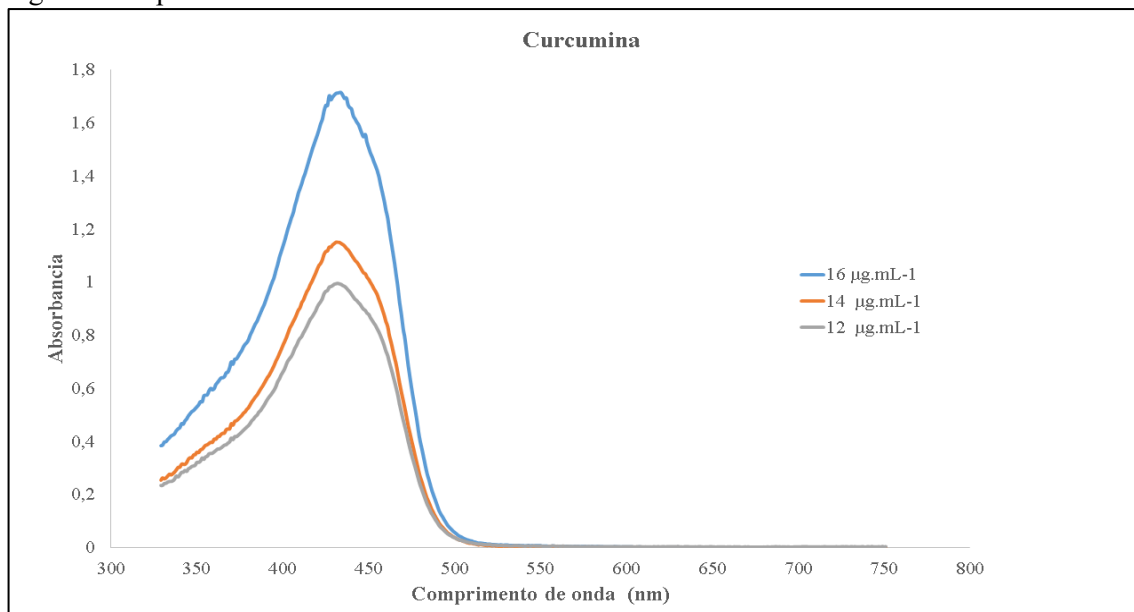
A curcumina possui características que faz com que ela seja utilizada também para o tratamento de câncer, como antimicrobiano e contra *Leishmanias* (ELLERKAMP *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2016a; BLANCO *et al.*, 2017; SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018). Os estudos apresentados no tratamento de LT se mostraram uma boa alternativa terapêutica, inviabilizando as células, promovendo danos morfológicos entre outros (ARAÚJO *et al.*, 2012; MENDONÇA, 2012; CAMPOS *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2016a).

Outra característica que vem sendo explorada com a utilização da curcumina é sua capacidade de interagir com o material genético das células. Nafisi *et al.* (2009) que observou a agregação do ácido nucleico após a interação com a curcumina, Pinto (2016a) também observou acumulação da curcumina no núcleo e no cinetoplasto. Interação

também observada por Ogiwara *et al.* (2013) que ao testar a ação da curcumina verificou que o sistema de reparo da célula da linhagem HeLa (Câncer cervical), U20S (osteosarcoma), HT 1080 (fibrosarcoma) e HCT 116 (câncer colo retal) foi reprimido. Outros estudos também foram realizados para se estabelecer a ação de danos no DNA das células alvos, Kumar e Bora (2013) descreveram em um estudo de revisão que a curcumina é capaz de se ligar ao sulco maior do DNA e pode agir como agente genotóxico e antígenotóxico, dependendo do tempo e da concentração utilizados. Além disso, a curcumina também é capaz de induzir a formação de ERO (YOSHINO *et al.*, 2004), o que faz com que os efeitos da TFD sejam potencializados.

O espectro de absorção da curcumina está na região espectral do azul, entre 375 – 475 nm (Fig. 5), que corresponde à luz azul (NASCIMENTO; SELLERA; RIBEIRO, 2016) e o comprimento de onda de sua fotoativação corresponde ao mesmo absorvido por biomoléculas implicando na sua utilização em lesões superficiais, característica adequada à TFD (HEGGE *et al.*, 2011). Seu produto de degradação não apresenta fotossensibilidade e é rapidamente excretado pelo corpo promovendo menor toxicidade sistêmica possível e apresentando alta eficiência quântica para o evento fotoquímico (FICKWEILER *et al.*, 1999; ACKROYD *et al.*, 2001; DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004; KARMAKOVA *et al.*, 2006), e alto coeficiente de absorção, onde o comprimento de onda da luz permanece energético o suficiente para produzir oxigênio singleto (OCHSNER, 1997), podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio.

Figura 5 - Espectro de absorbância da Curcumina Livre



Fonte: Autor

**CAPÍTULO 1: UTILIZAÇÃO DA CURCUMINA LIVRE EM  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

## 4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde do IP&D – UNIVAP, em parceria com o Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares e com o Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, ambos na UNIVAP.

### 4.1 Cultivo dos parasitos

As cepas de *Leishmania braziliensis* (CTCP393) e *Leishmania major* (LV39), foram mantidas em meio LIT (Liver infusion tryptose) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2,5 mg. mL<sup>-1</sup> de hemina, 2% de urina estéril e 1% de Solução de Penicilina/Estreptomicina. As cepas foram mantidas em estufa de crescimento a 26°C.

### 4.2 Fotossensibilizador

A curcumina, proveniente da empresa PDT-PHARMA<sup>®</sup>, Cravinhos-SP, cedida pelo Laboratório de Biofotônica Instituto de Física de São Carlos (IFSC), USP São Carlos, foi dissolvida inicialmente em dimetilsulfóxido - DMSO (0,1% do volume final) em uma solução estoque de 10 mg. mL<sup>-1</sup>. A partir dessa concentração e de acordo com estudos anteriores, foram realizadas diluições em solução salina tampão fosfato (PBS) de 1,35 mol L<sup>-1</sup>, 339 µM. mL<sup>-1</sup> e 85 µM. mL<sup>-1</sup> para utilização nos testes.

### 4.3 Terapia fotodinâmica

Para os ensaios da terapia fotodinâmica (TFD) os promastigotas foram incubados com a curcumina diluída em PBS, por um período de uma hora, de acordo com os testes realizados anteriormente, ao abrigo da luz, nas concentrações citadas. Depois as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. Para irradiação foi utilizada uma Biotable (Biopdi/Irrad-Led) constituída de 48 LEDs, com potência de 3 W por LED, no comprimento de onda de 450 nm, na dose de 8 J.cm<sup>-2</sup>, irradiância de 36 mW.cm<sup>-2</sup>, durante 222 segundos.

Para os testes os grupos foram divididos em:

- Grupo controle (GC): que não recebeu nenhum tratamento
- Grupo Irradiado (GI): irradiado, sem a presença do fotossensibilizador
- Grupo Escuro (GE): incubado com o fotossensibilizador e sem irradiação
- Grupo TFD: incubado com o fotossensibilizador e irradiado

Foram realizados três ensaios e cada ensaio realizado em triplicata.

Após os respectivos tratamentos foram realizados os testes de viabilidade pelo método de exclusão por Azul de Tripán; dosagem da produção de espécie reativa de oxigênio por fluorescência; identificação de apoptose e necrose com Anexina V/Iodeto de propídio; verificação de danos no DNA pelo teste do Cometa; análise morfológica utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando o teste JC-1.

#### **4.4 Método de viabilidade por exclusão com Azul de Tripán**

Foram utilizados 10 µl da cultura de parasitos dos grupos GC, GI, GE e TFD, sendo adicionado à 90 µl do Azul de Tripán 0,2% (Sigma®), interagindo por 10 minutos. Após homogeneização os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Esse teste permite separar os parasitos vivos dos mortos, pois células viáveis não permanecem coradas pelo azul de tripán, já as células mortas ficam coradas. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três ensaios separados e a porcentagem de células vivas foi obtida pela equação 1:

Equação 1 Cálculo para obter a viabilidade celular:

$$\frac{\text{Total de célula vivas} * 100}{\text{Total de células contadas}}$$

#### **4.5 Avaliação da viabilidade por atividade mitocondrial por teste MTT**

A atividade mitocondrial dos promastigotas e das células infectadas, foi verificada pelo teste de MTT, que consiste na degradação do sal de MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]) em cristais de Formazan, pelas células viáveis. Após a interação com o FS, e os tratamentos de TFD foi adicionado a cada poço 200 µL de MTT diluído em PBS (5 mg/mL), suavemente agitado e incubado por 4h a 26°C.

Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas e retirada a solução de MTT e então adicionado 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan e distribuídos em placa de 96 poços agitada vigorosamente. O teste foi finalizado medindo a densidade óptica em um leitor Espectrofotômetro (Biotek® Synergy HT) em 570 nm. Os ensaios foram realizados em quintuplicatas em dois ensaios separados e os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle utilizando a seguinte fórmula 2:

Equação 2 Cálculo para verificar a atividade mitocondrial:

$$\textit{Atividade mitocondrial} = \frac{(\textit{células tratadas} - \textit{branco})}{(\textit{controle} - \textit{branco})} * 100$$

#### 4.6 Dosagem da produção de espécies reativa de oxigênio

Para medir a produção de espécies reativas pelos promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* foi realizado o seguinte procedimento:

Após o experimento da TFD, os grupos foram divididos em grupos marcados com H<sub>2</sub>DCF-DA (Molecular Probes®-Thermo Fisher) e grupos não marcados com H<sub>2</sub>DCF-DA, apenas mantidos em PBS. As amostras foram então incubadas por 30 minutos com uma solução de 20 µM do H<sub>2</sub>DCF-DA previamente preparada em DMSO e depois diluída em PBS. Depois desse intervalo, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para ser realizada a irradiação. Os grupos GC e GE foram marcados nas mesmas condições citadas e mantidos ao abrigo da luz. A intensidade de fluorescência foi medida em unidades arbitrárias, usando o equipamento Synergy HT Leitor de microplacas multi-deteção com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm. Para o cálculo da intensidade de fluorescência subtraiu-se o valor emitido do grupo marcado pelo valor emitido do grupo não marcado. A diferença de intensidade da fluorescência foi considerada diretamente proporcional à EROs acumulado.

#### 4.7 Identificação de morte celular com Anexina V e Iodeto de Propídio

A identificação de células apoptóticas e necróticas foi avaliada qualitativamente por microscopia confocal utilizando microscópio confocal Zeiss LSM 700, com menor interferência do sinal da curcumina. Para tal, após a TFD foi realizada marcação com Anexina V, marcador que se liga em membranas tipicamente desorganizadas durante o processo apoptótico, e iodeto de propídio (IP) que é capaz de penetrar células com permeabilidade alterada, situação comumente observada no processo de necrose.

Para esse teste foi realizada a TFD na concentração de 339 e 82  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  e após 18 horas, os parasitos foram marcados com kit Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (ThermoFisher) segundo protocolo do fabricante e incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de ligação diluído 1x por 5 minutos e após centrifugadas e ressuspensas em paraformaldeído 4%. As lâminas foram montadas com ProLong™ Live Antifade Reagent, for live cell imaging (ThermoFisher) e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 700, considerando para a Anexina V excitação em 494 nm e emissão em 518 nm e para o Iodeto de propídio a excitação em 535 nm e emissão em 617 nm. As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ, quantificando a fluorescência emitida pelo marcador.

#### 4.8 Ensaio do Cometa

A técnica do Cometa é um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA induzidos por compostos mutagênicos e genotóxicos. Como o DNA tem carga negativa, ao aplicar uma corrente elétrica, se o mesmo estiver danificado ele migra para fora do núcleo, ficando com um aspecto de cometa (cauda), pois DNA íntegro não consegue migrar para fora do núcleo (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

Para isso, 18 horas após tratamento as células foram diluídas e inclusas em gel de agarose (baixo ponto de fusão 0,8%) sobre uma base também de agarose (ponto de fusão normal 1,5%). Depois as amostras foram mantidas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO; pH 10) e mantidas a 4°C e

protegidas da luz. Após esse período foi realizada três lavagens com tampão de corrida gelado (10M NaOH, 0,2 M EDTA – pH 13,5), então as bases com as amostras foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com tampão de corrida a um nível superior às amostras e mantidas por 30 minutos à 4°C, e em seguida foi realizada a corrida.

Depois as amostras foram lavadas três vezes, cinco minutos cada lavagem, em tampão neutralizante à 4°C (0,4 M Tris com pH 7,5). As lâminas foram montadas com os recortes de gel com as amostras e coradas com DAPI (5 µg.ml<sup>-1</sup>) e levadas ao microscópio confocal. Utilizando o programa *Open Comet* foram analisadas um total de 100 células de cada grupo e analisadas pelo padrão de scores (de 0 a 4) de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação do DNA, indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

#### **4.9 Análise morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Após a realização da TFD os grupos foram fixados em uma solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, tampão cacodilato 0,1 M, cloreto de cálcio 1 mM e água de osmose reversa. Posteriormente foi realizado o preparo das amostras.

Tratou-se as lamínulas com poli-L-lisina por 30 minutos, para a adesão das células. As amostras fixadas foram centrifugadas por 10 minutos e ressuspensas em tampão cacodilato 0,1 M e centrifugadas novamente. O tampão foi retirado, deixando apenas um volume suficiente para as amostras serem espalhadas sobre as lamínulas onde permaneceram *overnight*, então as lamínulas foram colocadas em uma placa de 24 poços.

As placas foram centrifugadas e lavadas com tampão cacodilato três vezes. Depois as amostras foram pós fixadas com solução de ósmio. Em seguida, foram lavadas novamente com tampão cacodilato 0,1 M por três vezes com intervalo de 10 minutos entre cada lavagem. Foi então realizada a desidratação com álcool por 15 minutos na sequência de 70%, 90% e 100%, sendo a última por quatro vezes. Para finalizar foi adicionado uma gota de Hexamethyldisilazane (HDMS) e as placas foram colocadas na estufa a 50°C para secagem das amostras.

As lamínulas foram montadas em suportes de alumínio (Stubs) e metalizadas no equipamento K550X Emi-Tech, promovendo a cobertura das amostras por uma fina

camada de ouro para promover a condutividade dos feixes de elétrons do microscópio. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio da Zeiss - EVO MA10.

#### 4.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial com JC-1

O corante JC-1 é utilizado como um indicador de alteração no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e utilizado como uma sonda que separa, por código de cor, duas populações, evidenciando mitocôndrias de alto potencial de membrana, em vermelho – onde são formados os agregados J, e as de baixo potencial em verde – onde encontramos os monômeros do corante JC-1, e as de baixo potencial em verde (CARREIRA, 2008).

A avaliação do potencial de membrana com JC-1 foi realizada utilizando reagente JC-1 Dye - Mitochondrial Membrane Potential Probe (Thermofisher) na concentração de  $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$  durante o período de 15 minutos em temperatura ambiente. Após a marcação as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em paraformaldeído 4% e colocadas em lamínulas com poli-l-lisina e montadas com ProLong™ Live Antifade Reagent, for live cell imaging (Thermofisher) e imediatamente avaliadas em microscópio confocal Zeiss LSM 700, considerando para o monômero a excitação de 488 nm e emissão 530 nm e para o agregado J excitação 555 nm e emissão 590 nm A quantificação da fluorescência do marcador foi realizada pelo *software* ImageJ. Foram realizadas leituras imediatamente após a TFD e após 18 horas de tratamento.

#### 4.11 Análise de fluorescência

Para realizar as leituras de fluorescência emitidas pelos marcadores Anexina V, Iodeto de Propídio e o JC-1, as imagens obtidas no microscópio confocal foram analisadas pelo *software* ImageJ. Seguindo os seguintes comandos: Image – Overlay – Flatten, para realizar a sobreposição e achatamento das imagens; depois é necessário selecionar cada célula individualmente para obtenção da média da fluorescência de cada marcador que é obtido pelo comando: Image – crop comando Analyse – Histogram – RGB.

Anotar o valor da média da fluorescência emitida, onde *Green* para analisar fluorescência verde e *Red* para fluorescência vermelha.

#### **4.12 Análise Estatística**

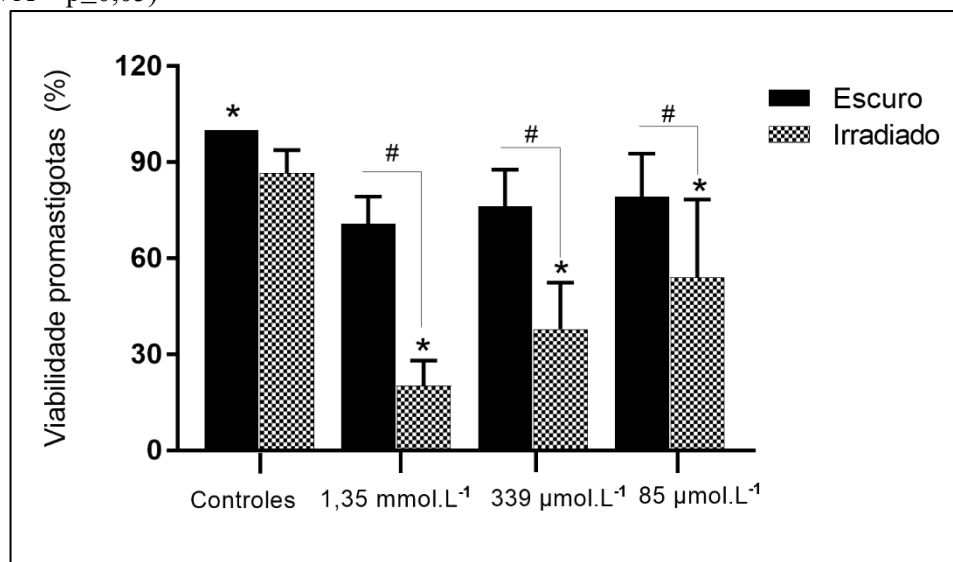
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad, versão 7.04 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, EUA). As comparações dos grupos foram feitas usando ANOVA de um fator e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média aritmética  $\pm$  desvio padrão. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi  $\leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán

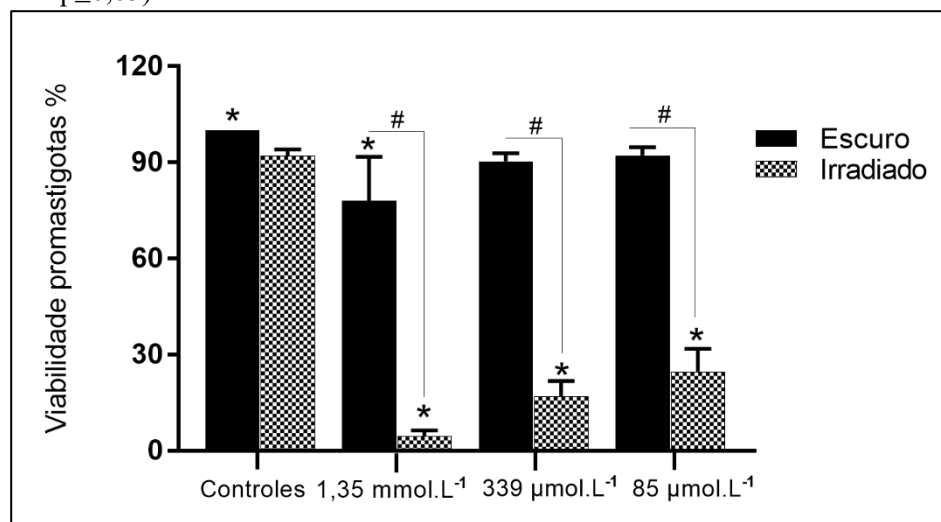
O teste de exclusão foi realizado imediatamente após a terapia. Verificou-se que em todas as concentrações testadas nos grupos TFD houve uma redução na viabilidade celular quando comparados com o grupo controle e a diferença foi estatisticamente significativa em ambas as espécies ( $p \leq 0,05$ ). Na cepa de *L. braziliensis* (Fig.6) verificou-se diminuição de 60,61% na concentração de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> após TFD; nas concentrações 339  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  e 85  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ , houve uma diminuição de 51,56% e 35,51% respectivamente. Na cepa de *L. major* (Fig. 7) foi verificado diminuição na viabilidade nas concentrações de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> de 91,77%, e nas concentrações de 339  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  e 85  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  uma redução de 79,33% e 71,7%, respectivamente, no grupo TFD. Nos grupos apenas tratados com o FS não foi verificado diferença estatística na viabilidade celular dos parasitos quando comparados com o grupo controle, assim como o grupo apenas irradiado

Figura 6 - Análise da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão assinaladas com símbolos: (\*) para comparação dos grupos com o controle; os símbolos (#) mostram as diferenças dos grupos com os seus respectivos controles. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ )



Fonte: Autor

Figura 7 - Análise da viabilidade de promastigotas de *L. major* imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão assinaladas com símbolos: (\*) para comparação dos grupos com o controle; os símbolos (#) mostram as diferenças dos grupos com os seus respectivos controles. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ )

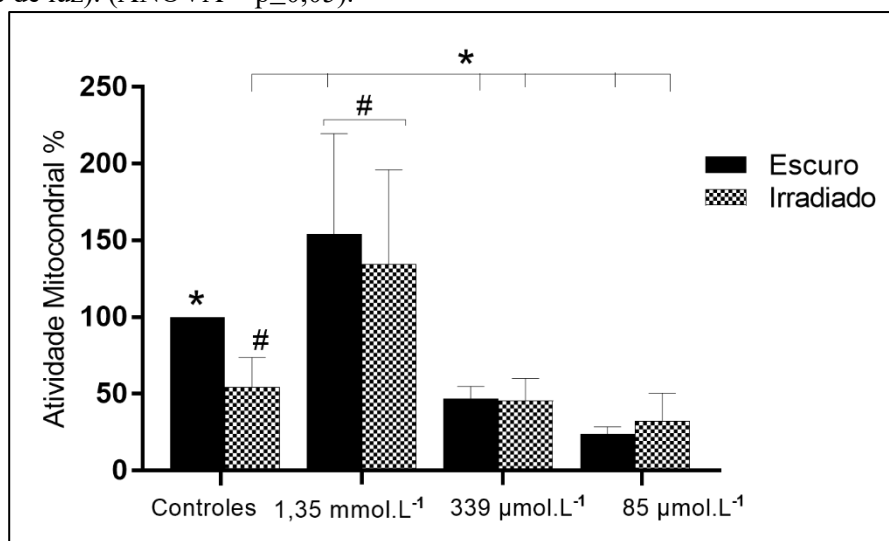


Fonte: Autor.

## 5.2 Análise da Atividade Mitocondrial pelo teste MTT

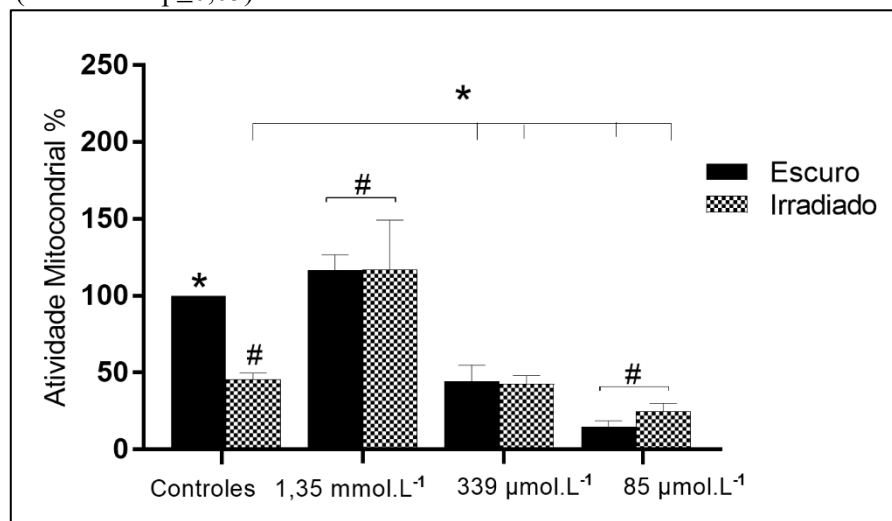
A análise do MTT (fig. 8 e 9) mostrou que em ambas as espécies incubadas com a concentração de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> (escuro e irradiado), a atividade mitocondrial foi maior e estatisticamente significativa em relação aos grupos controle. O grupo controle irradiado apresentou baixa atividade mitocondrial, assim como os grupos escuro e irradiado, a 339 e 85 μmol. L<sup>-1</sup>

Figura 8 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de MTT, imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina, em promastigotas de *L. braziliensis*. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz). (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor.

Figura 9 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de MTT, imediatamente após a terapia fotodinâmica com curcumina, em promastigotas e *L. major*. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz). (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



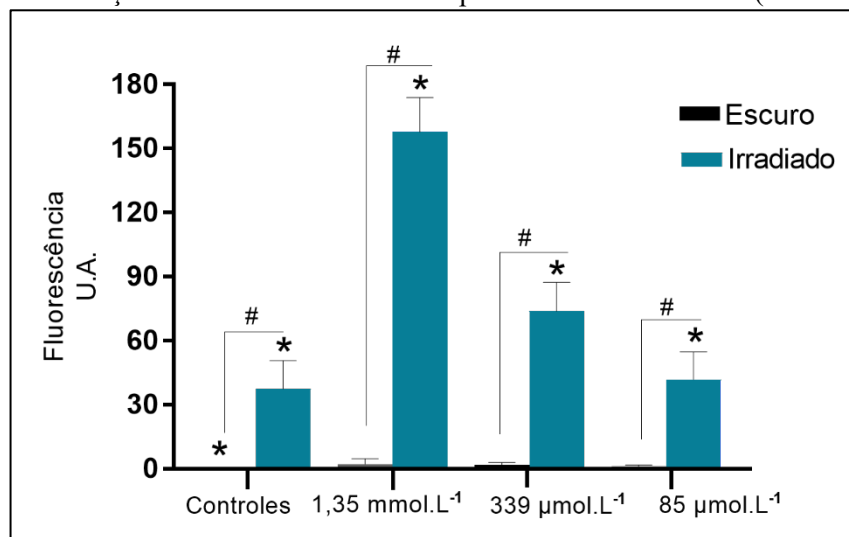
Fonte: Autor.

### 5.3 Dosagem da produção de espécie reativa de oxigênio

Esse teste demonstrou alta produção de espécie reativa na maior concentração do FS utilizado, mostrando efeito dose dependente, com a captação de fluorescência decrescendo com as menores concentrações. No grupo controle e os grupos escuros não houve emissão da fluorescência.

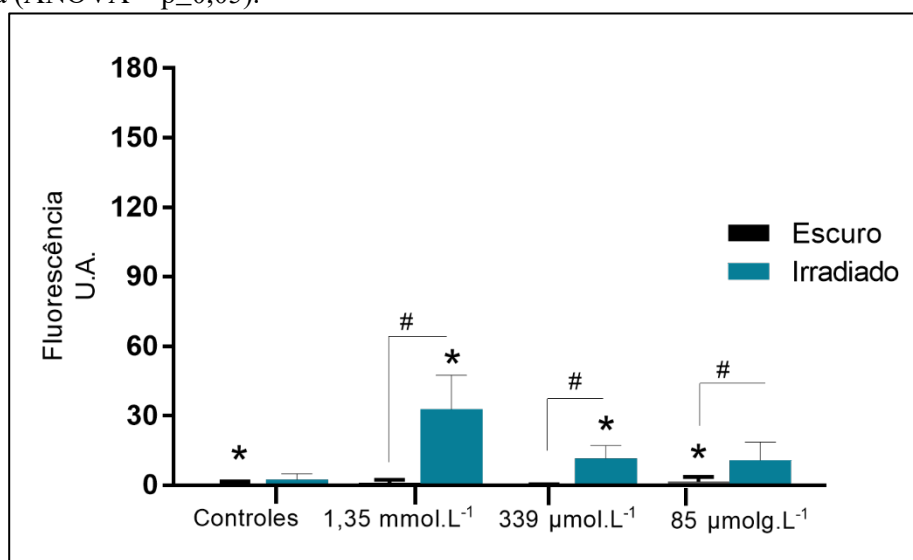
Essa resposta mostra que a TFD associada a curcumina causa o aumento do nível de produção de espécies reativas de oxigênio. Verificou-se que na espécie *L. braziliensis* (Fig. 10) houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle na TFD e também no grupo apenas irradiado, mostrando a produção de ERO. Demonstrando que a luz interfere no processo oxidativo da célula. Já em *L. major* (Fig. 11) os níveis de fluorescência foram menores que em *L. braziliensis*, entretanto o comportamento foi o mesmo, com exceção do grupo apenas irradiado, que não apresentou diferença em relação ao controle.

Figura 10 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. braziliensis* após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão sinalizadas com o símbolo \* comparando com o grupo controle e # comparando o grupo escuro com o grupo irradiado. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor.

Figura 11 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. major* após a terapia fotodinâmica com curcumina. As diferenças estatísticas estão sinalizadas com o símbolo \*, comparando com o grupo controle. As diferenças estatísticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor

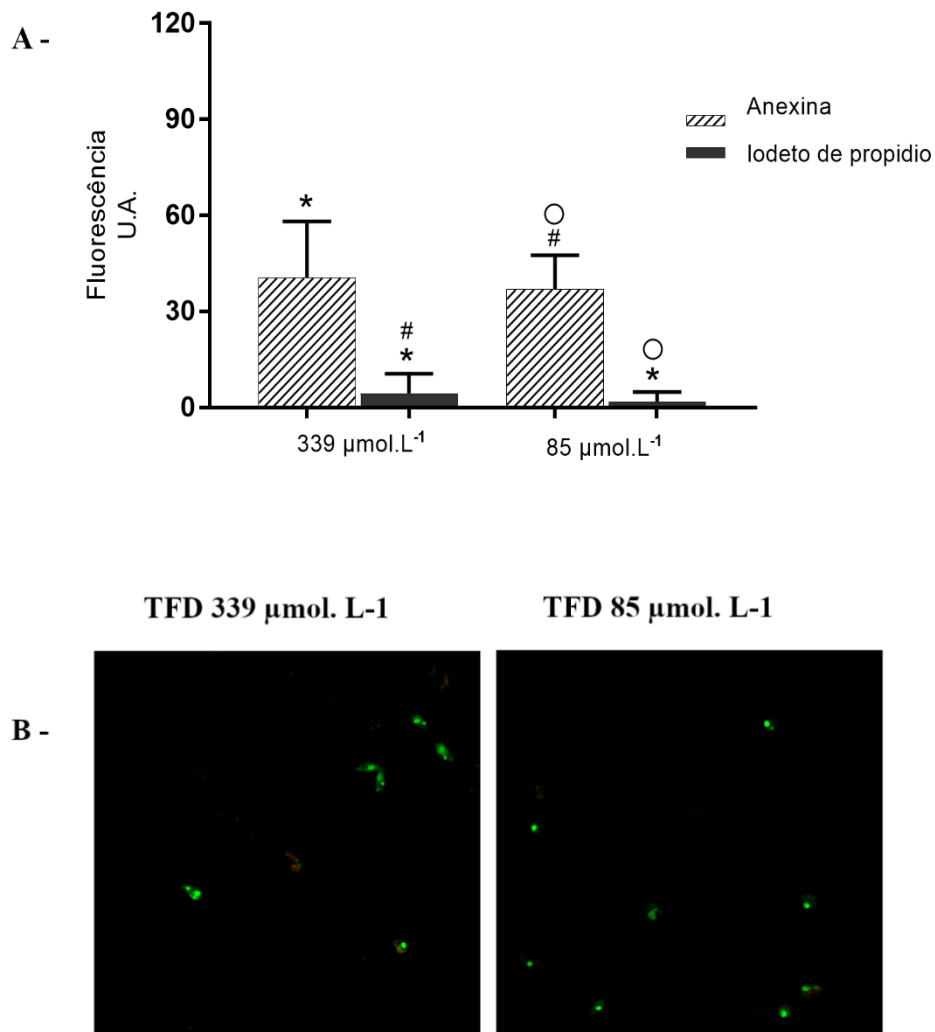
#### 5.4 Identificação de morte celular com Anexina V e Iodeto de Propídio

O teste de exclusão com azul de tripan demonstrou redução na viabilidade celular, após a TFD e também se verificou que a produção de espécies reativas de oxigênio é

proporcional à concentração do FS, portanto, foi realizado o teste de análise das vias de morte celular por Anexina V e Iodeto de Propídio.

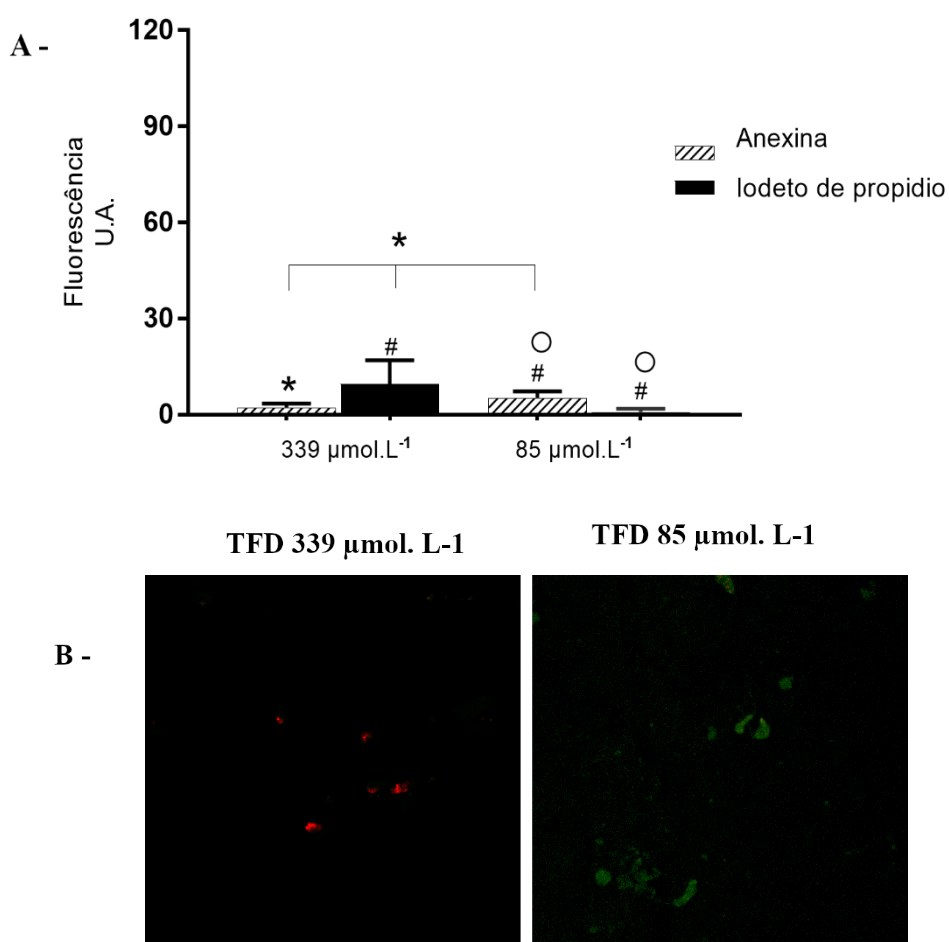
A análise foi feita nos grupos TFD nas concentrações de 339 e 85  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ , que apresentaram menor interferência da fluorescência da curcumina, pois esta possui o espectro de emissão muito próximo ao marcador utilizado. Por meio dos valores obtidos pelo *software* ImageJ (Fig.12A) e por imagens do microscópio confocal (Fig. 12B) foi possível verificar que na espécie *L. braziliensis* houve predomínio de morte celular por apoptose, marcado pela Anexina V em ambas as concentrações. O comportamento de *L. major* (Fig. 13A e 13B) foi diferente, demonstrando que na concentração de 339  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  predominou morte celular por necrose, marcado pelo Iodeto de Propídio e na concentração de 85  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  houve morte celular por apoptose, apesar dos valores da fluorescência emitida serem discretos.

Figura 12 Avaliação da morte celular por marcação com Anexina V e IP em promastigotas de *L. braziliensis* após terapia fotodinâmica com curcumina. Em (A) é apresentado os valores obtidos pelo software ImageJ e em (B) as imagens obtidas pelo microscópio confocal Zeiss LSM 700. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: (\* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz; ° em relação a em relação à mesma concentração) (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor.

Figura 13 - Avaliação da morte celular por Anexina V e coloração de PI em promastigotas de *L. major*, após terapia fotodinâmica com curcumina. Em (A) é apresentado os valores obtidos pelo software ImageJ e em (B) as imagens obtidas pelo microscópio confocal Zeiss LSM 700. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: (\* em comparação com o controle de escuridão; # em comparação com o controle de luz; ° em relação a em relação à mesma concentração) (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor

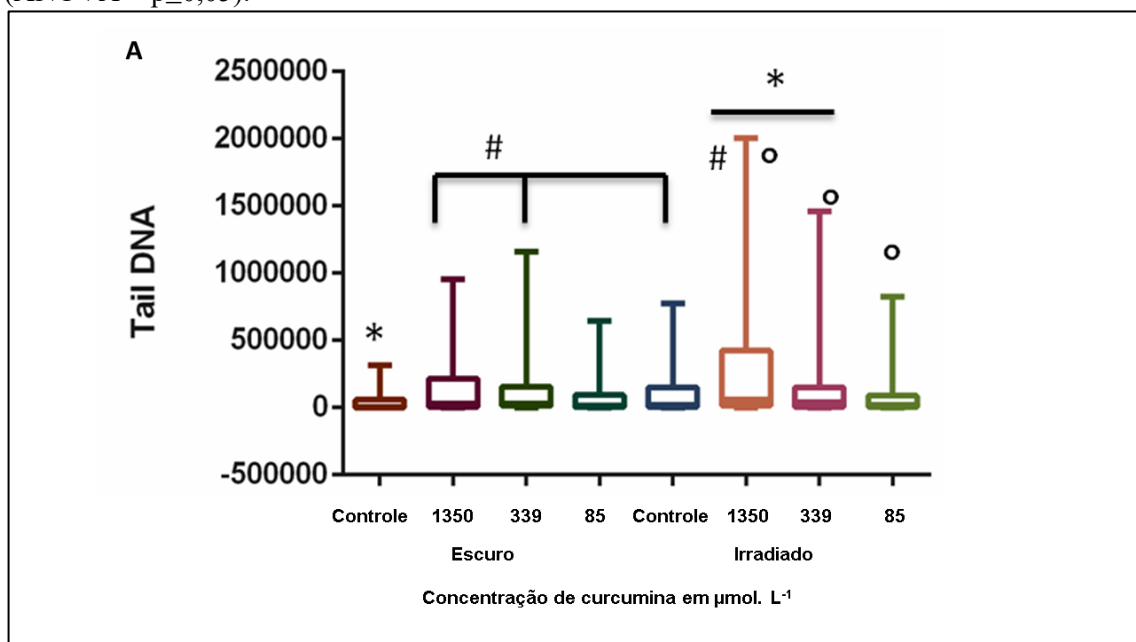
### 5.5 Teste do Cometa

Por meio do teste do cometa pode-se verificar que na espécie *L. braziliensis* (Fig. 14) houve arraste nos grupos tratados apenas com o FS e nos grupos submetidos à TFD é possível notar que o arraste foi maior.

Em *L. major* (Fig. 15) o maior arraste aconteceu nos grupos submetidos à TFD. No grupo apenas com o FS não é observado diferença estatística em relação ao

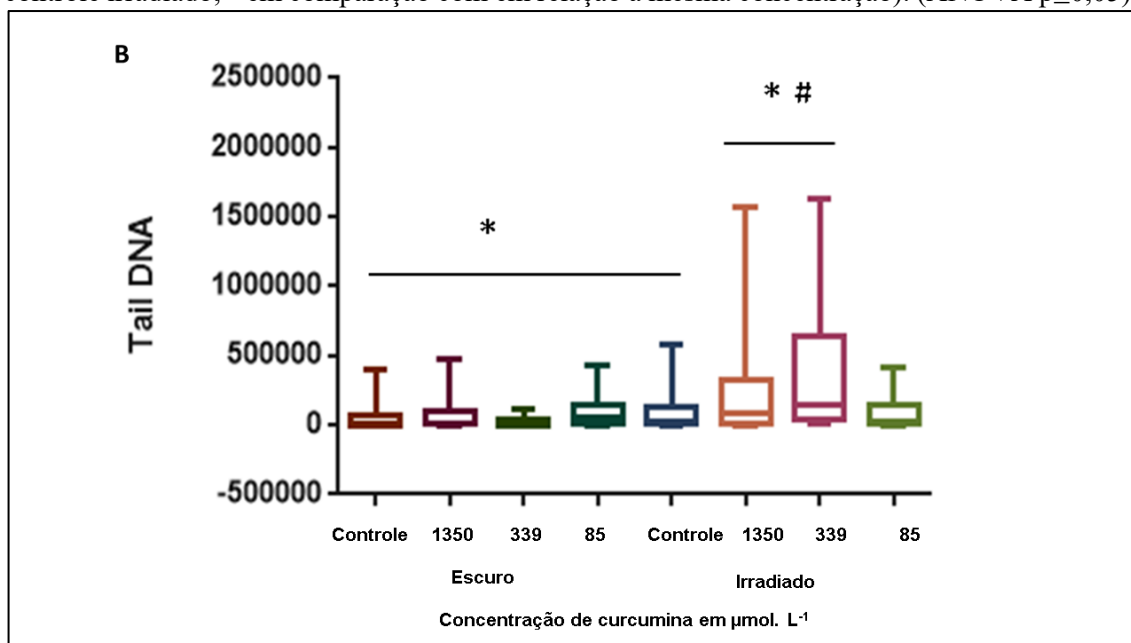
controle. Esses resultados corroboram com os estudos realizados pelo grupo (PINTO *et al.*, 2016a) que demonstra agregação da curcumina com o material genético.

Figura 14 - Avaliação da fragmentação do material genético pelo teste do cometa em promastigotas de *L. braziliensis* após exposição à TFD com curcumina. Os parâmetros de comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda foram analisados. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle irradiado; ° em comparação com em relação à mesma concentração). (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor

Figura 15 - Avaliação da fragmentação do material genético pelo teste do cometa em promastigotas de *L. major* após exposição à TFD com curcumina. Os parâmetros de comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda foram analisados. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle irradiado; ° em comparação com em relação à mesma concentração). (ANOVA  $p \leq 0,05$ ).

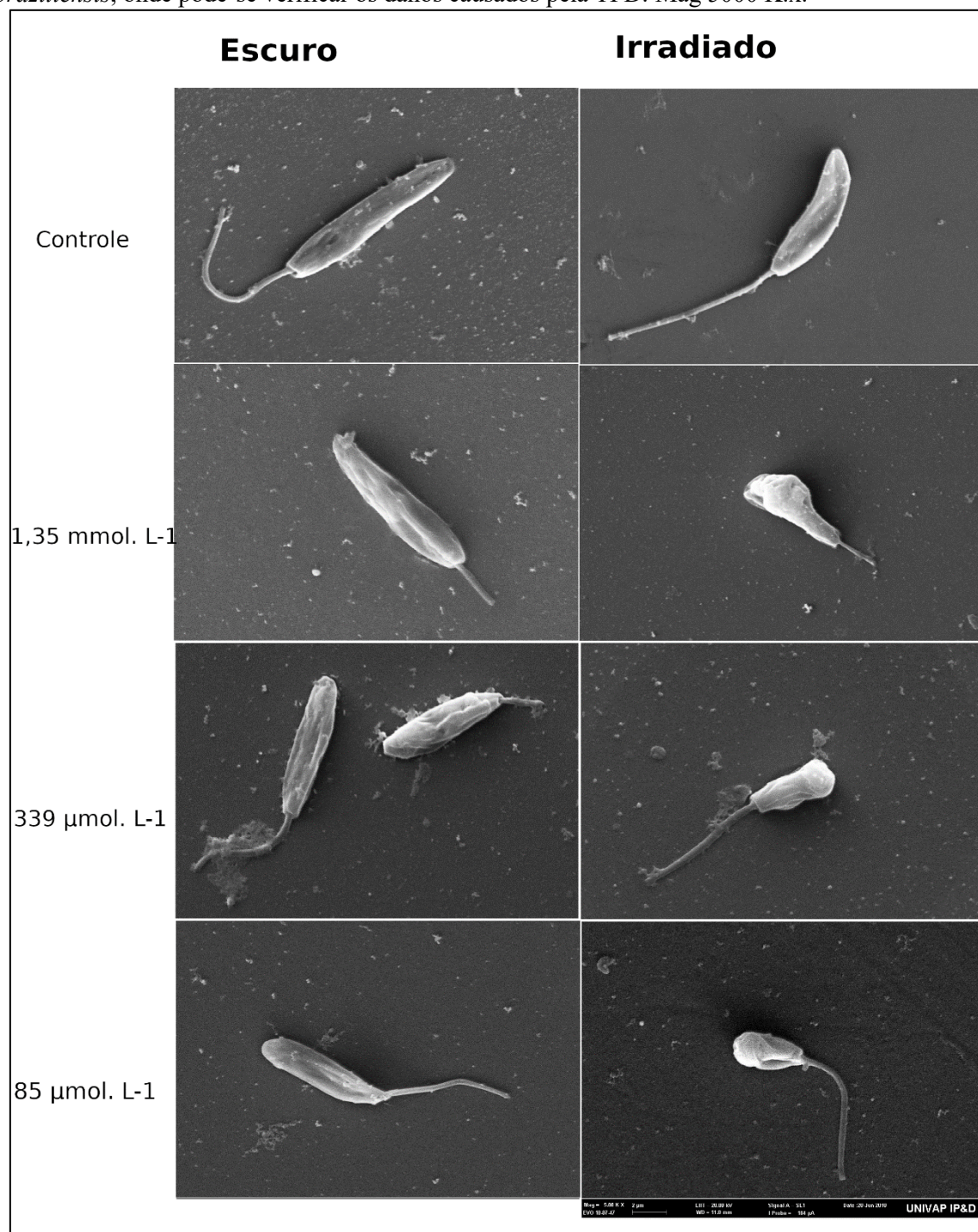


Fonte: Autor

## 5.6 Análise morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

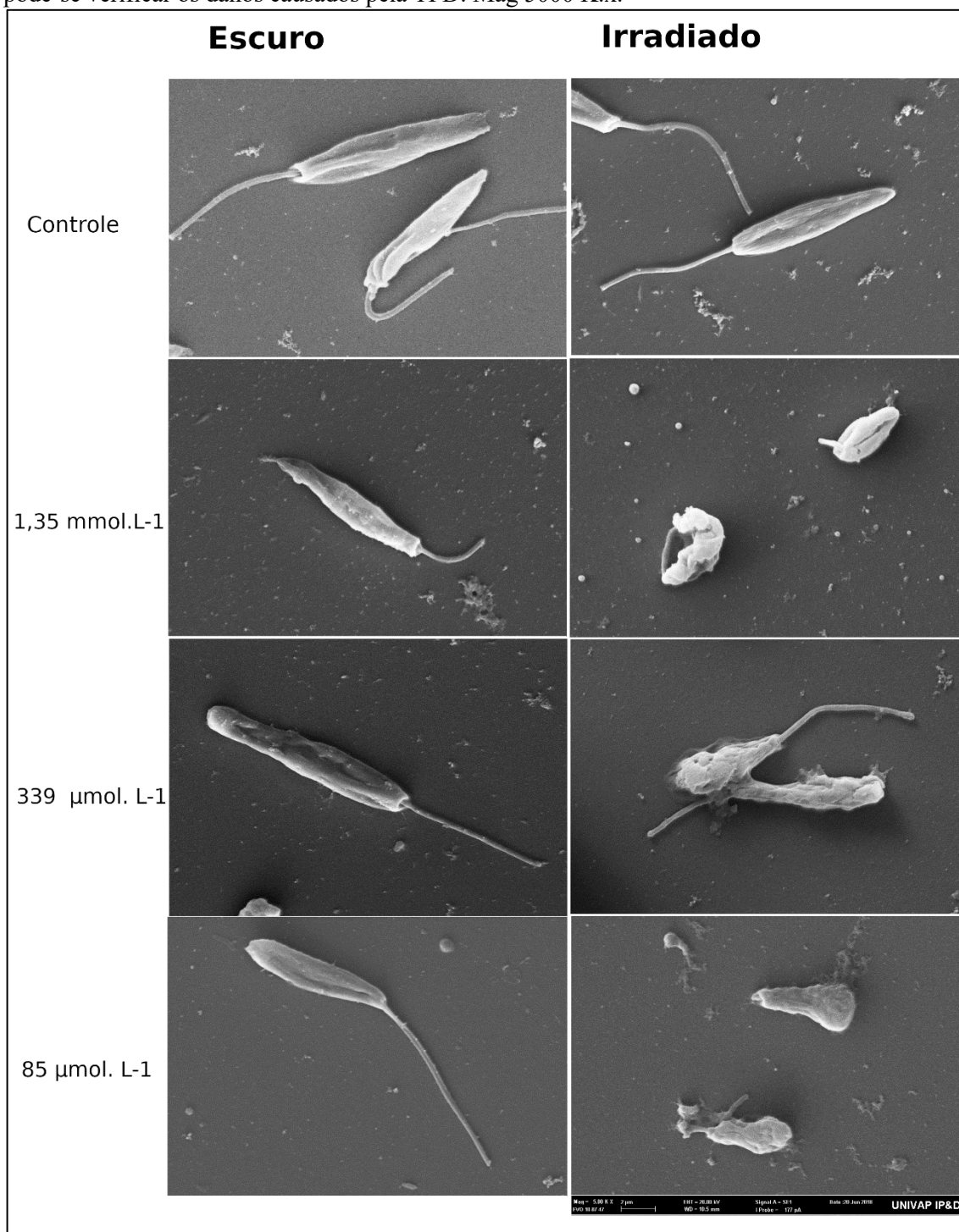
Na análise morfológica realizada após a TFD utilizando imagens obtidas pela técnica de MEV pode-se observar que todos os grupos tratados com TFD apresentaram alterações morfológicas. Nos grupos tratados apenas com FS e no grupo apenas irradiado a morfologia manteve-se semelhante ao grupo controle. Esse resultado pode ser observado nas duas espécies de *Leishmania*. Em *L. braziliensis* (Fig. 16) verifica-se que na concentração de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> do grupo TFD o parasita apresentou maiores alterações, além do tamanho reduzido apresentou característica disforme e encolhimento do flagelo. Em *L. major* (Fig. 17) nota-se que em todos os grupos tratados com TFD a morfologia do parasita foi afetada de maneira mais acentuada, pois todas as células desses grupos apresentam-se irregulares, com tamanho reduzido assim como diminuição ou ausência do flagelo.

Figura 16 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L. braziliensis*, onde pode-se verificar os danos causados pela TFD. Mag 5000 K.x.



Fonte: Autor

Figura 17 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de promastigotas de *L. major*, onde pode-se verificar os danos causados pela TFD. Mag 5000 K.x.

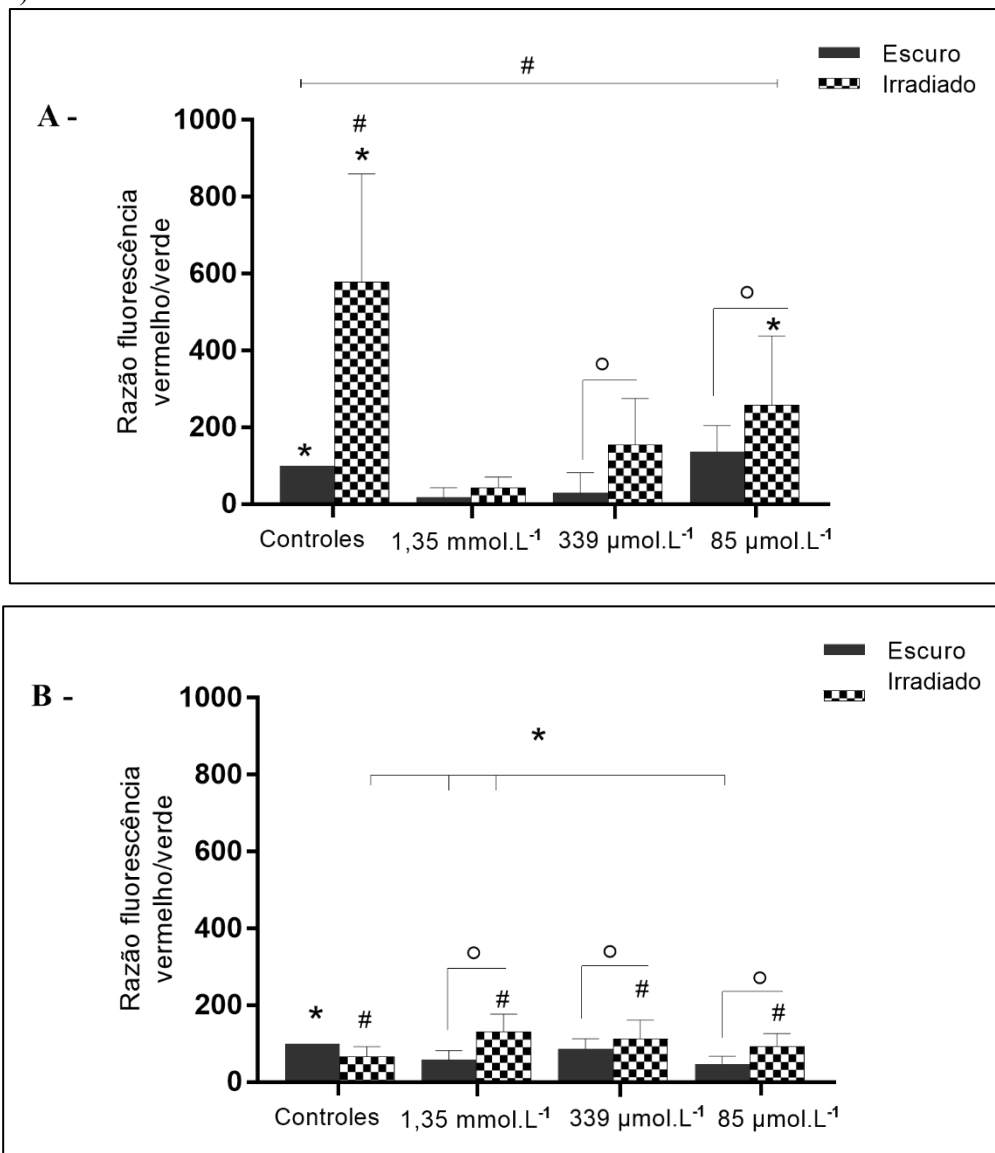


Fonte: Autor

## 5.7 Análise do Potencial de Membrana por JC-1

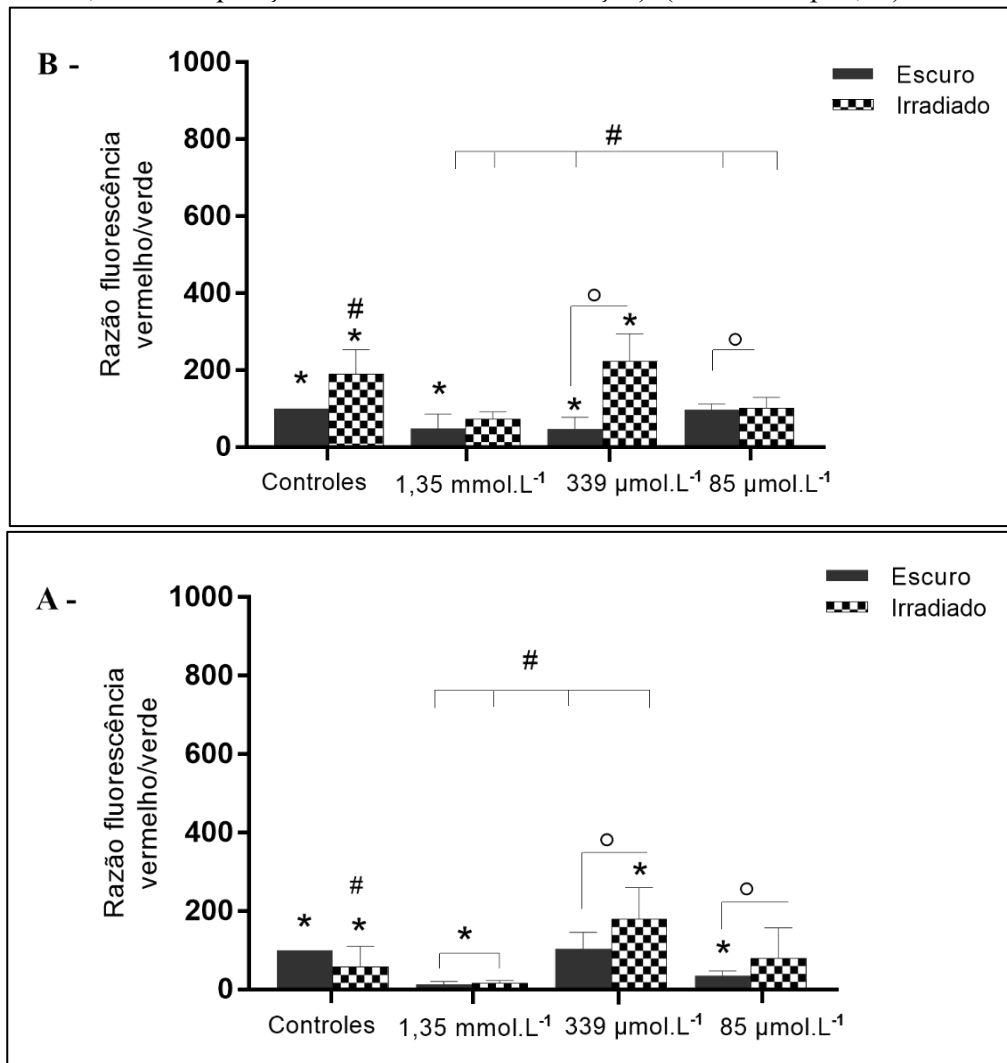
Para avaliar o efeito da TFD nos promastigotas, foi realizada a análise do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) utilizando o marcador JC-1 em dois momentos distintos: imediatamente após a TFD e 18 horas após. A análise do  $\Delta\psi_m$  foi realizada medindo a razão de fluorescência vermelho/verde do marcador JC-1, considerando o controle não tratado como 100% (MONZOTE *et al.*, 2015; SEGAT *et al.*, 2019). Em *L. braziliensis* houve perda de  $\Delta\psi_m$  nas promastigotas expostas a 1,35 mmol. mL<sup>-1</sup> (escuro/irradiado) e curcumina 339  $\mu$ M. mL<sup>-1</sup> controle escuro, quando a análise foi realizada imediatamente após a TFD. No entanto, a hiperpolarização foi detectada no controle irradiado (razão de fluorescência foi cerca de 5 vezes maior do que o controle) e nos tratamentos TFD com curcumina a 339  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup> e 85  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup> (Fig. 18A). Em *L. major* (Fig. 19A) o tratamento com curcumina a 1,5 mmol. mL<sup>-1</sup> e 85  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup> reduziu  $\Delta\psi_m$  independentemente da irradiação, e nos tratamentos com curcumina a 339  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup>, a TFD resultou em um aumento de  $\Delta\psi_m$  em comparação com o controle escuro da curcumina. Em *L. braziliensis*, os resultados da análise feita 18 horas após a TFD (Fig. 18B) mostraram que no controle irradiado o  $\Delta\psi_m$  foi menor do que no controle não tratado, o que também ocorreu em todos os tratamentos com curcumina no escuro e também no 85  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup> grupo irradiado. Nos grupos TFD, a razão de fluorescência vermelho/verde foi maior do que o respectivo controle escuro da curcumina, sugerindo que as mitocôndrias das células restantes estavam ativas e exibindo hiperpolarização da membrana. Esse padrão também foi encontrado em *L. major* (Fig. 19B), com exceção dos tratamentos com curcumina a 1,35 mmol. L<sup>-1</sup>, que induziu a despolarização da membrana mitocondrial mesmo após 18 horas de tratamento. Além disso, em *L. major*, o tratamento de controle de luz induziu a hiperpolarização da membrana.

Figura 18 - Avaliação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) com JC-1 em *L. braziliensis*. Imediatamente após a TFD: em (A) e 18 horas após a TFD: em (B). As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle de luz; ° em comparação com a mesma concentração). (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor

Figura 19 - Avaliação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) com JC-1 em *L. major*. Imediatamente após a TFD: em (A) e 18 horas após a TFD em (B). As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos (\* em comparação com o controle escuro; # em comparação com o controle de luz; ° em comparação com a mesma concentração). (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autor

## 6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi observado que a TFD associada à curcumina foi capaz de causar morte das células nas duas espécies de *Leishmania* tratadas e com resultado concentração-dependente como demonstrado pelo teste de exclusão por azul de tripan. Nesse teste verificamos que a espécie *L. braziliensis* se mostrou mais resistente que a espécie *L. major* quando analisadas imediatamente após o tratamento. Em ambas as espécies nas concentrações de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> a viabilidade foi afetada significativamente ficando em torno de 20,20 % para *L. braziliensis* e 4,5 % de *L. major*. Esses dados demonstram que imediatamente após a TFD os parasitos entram em processo de morte, entretanto os resultados são diferentes quando analisados após 18 horas de tratamento, como demonstrado por Pinto e colaboradores (2016a), com taxa de morte próxima de 0 % para a mesma concentração em *L. braziliensis* e 10 % para *L. major*. Leite *et al.* (2014), também demonstraram a ação antimicrobiana da curcumina e que sua associação com a luz traz excelentes resultados. Os benefícios da ação da TFD foram verificados independente do FS utilizado, utilizando Clorina E6 (PINTO *et al.*, 2016b) e Azul de Metileno (PINTO *et al.*, 2017), sendo que em ambos os testes *L. braziliensis* se mostrou mais sensível que *L. major*.

É conhecido que a curcumina tem demonstrado um produto leishmanicida por suas diversas características farmacológicas, mas se destaca por sua ação oxidativa. Basmacıyan e Casanova (2019) demonstrou sua capacidade de atuar na produção de EROs e causar efeitos danosos às células dos protozoários, incluindo a alteração na permeabilidade da membrana e liberação de proteínas pró-apoptóticas. No presente estudo observou-se maior produção de EROs nos grupos submetidos à TFD e, assim como no teste de viabilidade por azul de tripan, o efeito foi dose-dependente enquanto, nos outros grupos não houve ou foi muito baixa a produção de EROs. Nota-se ainda que na espécie *L. braziliensis* os níveis de EROs foram muito mais evidentes do que em *L. major*. Diferentes espécies, embora morfológicamente semelhantes, apresentam particularidades, inclusive causando diferentes manifestações clínicas, com *L. major* causando manifestação cutânea e *L. braziliensis*, mucocutânea. Dessa forma, por causa das diferenças metabólicas e fisiológicas, espera-se observar respostas diferentes, como observado nesse estudo. Na literatura foi descrito como diferentes

espécies modulam, por exemplo, a resposta de macrófagos à TFD (SILVA *et al.*, 2015; NEGRÃO *et al.*, 2019) ou mesmo a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados, (MAKSOURI *et al.*, 2017) além de evidências em estudos utilizando estratégia metabolômica evidenciarem que diferentes espécies de *Leishmania* apresentam diferentes respostas metabólicas (VICENT *et al.*, 2015; WESTROP *et al.*, 2015). Rogers *et al.* (2011) estudando o genoma de populações de *Leishmanias*, demonstraram que as mutações cromossômicas, como aneuploidia, podem estar relacionadas à resposta ao estresse sofrido pelos protozoários enquanto SILVA *et al.* (2017) observaram que o estresse oxidativo causa a morte de parasitas, no entanto, como as células sobreviventes proliferam, isso indica que as *Leishmanias* possuem um sistema eficiente contra danos oxidativos. Os dados obtidos nesse estudo permitem inferir que níveis elevados de EROs podem causar danos nas células, que estão envolvidos na redução da viabilidade celular, alterações morfológicas, alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), entre outros. Segundo Basmacıyan e Casanova (2019), diferentes estímulos como espécie reativas de oxigênio podem induzir quadro similar a apoptose em mamíferos, podendo causar arredondamento das células, encolhimento, alterações mitocondriais e fragmentação do DNA. Essas informações podem ajudar a entender os resultados obtidos neste estudo, onde observamos a morte dos parasitos por apoptose e também alguns traços de necrose, como aconteceu com *L. major* no grupo TFD na concentração de 85  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  utilizando de estímulos como a TFD, formando espécies reativas de oxigênio e modificando as características fenotípicas das células como a alteração mitocondrial, encurtamento celular, fragmentação do material genético.

A Anexina V não é um marcador específico para verificar apoptose em *Leishmania*, mas um marcador de alterações na membrana plasmática. A Anexina V liga-se à fosfatidilserina, uma molécula que nas células não apoptóticas está localizada no lado interno da membrana plasmática. (KATHURIA *et al.*, 2014) e o IP penetra na célula quando a permeabilidade da membrana plasmática é afetada, situação observada na necrose. Segundo Basmacıyan e Casanova (2019), aobserva-se morte celular por apoptose quando há presença de pelo menos dois sinais de apoptose, como fragmentação do DNA, arredondamento celular, despolarização mitocondrial. Essas características sugeridas pelo autor são verificadas nesse estudo, pois nos dados morfológicos são visíveis as alterações da forma alongada do parasito para uma forma mais arredondada e

fragmentação do DNA. Quando se analisa os dados obtidos pelo teste com Anexina V e iodeto de propídio pode-se sugerir o processo de apoptose na cepa de *L. braziliensis*, enquanto em *L. major* houve diferenças, de acordo com a concentração da curcumina empregada na TFD. Com curcumina a  $339 \mu\text{mol. L}^{-1}$  o tipo de morte verificado pela análise da fluorescência emitida foi de necrose, enquanto com a curcumina a  $85 \mu\text{mol. L}^{-1}$  prevaleceu a apoptose. Miranda *et al.* (2017), demonstraram aumento nos marcadores de apoptose após TFD com Feoforbídeo A em *L. amazonensis* e a quantificação de EROs foi correlacionada ao mecanismo de morte celular. Empregando trans-Dibenzalacetona (DBA), um composto análogo à curcumina, Chauhan *et al.* (2018) observaram que promastigotas de *L. dovani* sofreram morte por necrose, como observado para *L. major*, neste trabalho.

A curcumina tem afinidade pelo DNA (NAFISI *et al.*, 2009), e em estudos anteriores do grupo (PINTO *et al.*, 2016a), essa substância foi encontrada no cinetoplasto e no núcleo. Isso poderia contribuir para induzir a produção de EROs nessas localizações subcelulares, desencadeando morte por apoptose (PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013; AURELIANO *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2018), bem como fragmentação no DNA, detectados pelo teste do cometa, conforme observado naquele estudo. Outros estudos têm demonstrado a fragmentação do DNA quando associado a TFD e ALA, como por Chen *et al.* (2020) em conídios de *S. globosa*; por Postiglione *et al.* (2016) com células cancerosas; e por Abo-Zeid *et al.* (2018) em adenocarcinoma, que descobriram que a TFD resultou em dano ao DNA que era maior na concentração mais alta do fotossensibilizador. O estudo de Szlasa *et al.* (2020), que também utilizou a curcumina em diferentes linhagens celulares, constatou que a curcumina induziu as células à apoptose e também a fragmentação no DNA, inclusive no grupo tratado apenas com curcumina, entretanto, no grupo TFD a indução de dano foi maior.

Os danos desencadeados por ação dos altos níveis de EROs nas células de *Leishmania* também são observados na morfologia celular quando analisada imediatamente após tratamento, sendo observado o encurtamento da célula, podendo ser causado por danos nos microtúbulos, como sugerido em trabalho de Pinto, Marcolino e Ferreira-Strixino (2021) e diminuição ou ausência do flagelo, principalmente na maior concentração testada que foi de  $1,35 \text{ mmol. L}^{-1}$ . Há diversos estudos que corroboram com os dados encontrados em nossos estudos sobre a relação da alta produção de EROs

associado a TFD causando danos morfológicos (KATHURIA *et al.*, 2014; AWASTHI *et al.*, 2018; MALLICK *et al.*, 2018; DIMMER *et al.*, 2019).

Há trabalhos que apontam a mitocôndria como alvo promissor para inativação desses protozoários, por ser uma organela única e responsável por toda atividade respiratória, fornecendo energia e por isso sendo uma organela essencial para sua sobrevivência do parasita. Dessa forma, a alteração do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é um fator importante da função mitocondrial, podemos utilizá-lo como um indicador da saúde celular, uma vez que as mitocôndrias são organelas envolvidas no processo apoptótico das células (AWASTHI *et al.*, 2018; MALLICK *et al.*, 2018; SINCLAIR; GRAFFENRIED, 2019).

A curcumina pode ser encontrada na mitocôndria de *Leishmania*, como verificado por Pinto *et al.*, (2016a), em estudos com as mesmas espécies utilizadas no presente estudo, altos níveis de EROs produzidos durante a TFD com curcumina podem levar à perda de função; depleção de ATP e até mesmo induzir a morte celular (SEM; MAJUMDER, 2008; ZOROVA *et al.*, 2018; AWASTHI *et al.*, 2018; DIMMER *et al.*, 2019). Esse fato nos ajuda a entender o comportamento celular demonstrado em nosso trabalho, como a desestabilização dessa organela pode levar a morte celular. O equilíbrio da função mitocondrial é baseado no potencial de membrana gerado pelo gradiente eletroquímico que está envolvido na síntese de ATP. Qualquer anormalidade sofrida pela célula pode causar mudanças no  $\Delta\psi_m$  e perda da viabilidade celular (AWASTHI *et al.*, 2016; ZOROVA *et al.*, 2018; SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019; CHAKRABORTI *et al.*, 2019).

Para verificar os níveis de  $\Delta\psi_m$  utilizamos marcador fluorescente JC-1 (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019) e seguimos os parâmetros de análise de acordo com protocolo descrito no trabalho realizado por Segat *et al.* (2019). Foi observado alteração do  $\Delta\psi_m$  diferente entre as espécies, independentemente do tempo de análise e que a concentração de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup> tanto escuro quanto irradiado apresentou despolarização da membrana mitocondrial, principalmente na análise imediatamente após TFD, principalmente na espécie *L. major* que teve uma razão 590/530 baixa, indicando baixo potencial de membrana mitocondrial e também quando se analisa a formação de agregados e monômeros de JC-1 separadamente nota-se que a formação de monômeros foi maior. Em estudos realizados por Kathuria *et al.* (2014) eles verificaram, tanto por

microscopia confocal quanto por citometria de fluxo, que após tratamento com diterpeno clerodano em *L. dovani* que a fluorescência verde foi mais alta, indicando despolarização de membrana. Na análise imediatamente após o tratamento o grupo apenas irradiado da espécie *L. braziliensis* apresentou uma hiperpolarização, mostrando que a luz causou alterações na atividade mitocondrial, conforme observado no teste de MTT, mas não induziu a morte do protozoário, avaliada pelo teste de viabilidade. Esse fato pode ser explicado pela interação da luz com a célula e possível ativação da mitocôndria, uma vez que esta organela possui um cromóforo que pode reagir com a luz azul, como descrito por Godley *et al.* (2005), causando alterações na atividade mitocondrial.

Na análise realizada pelo teste do MTT a presença da curcumina na concentração de 1,35 mmol. L<sup>-1</sup>, tanto no escuro quanto irradiada, levou a um aumento da atividade mitocondrial, mas não na viabilidade celular. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto *et al.* (2016a), que na análise realizada após de 18 horas mostrou que as células apresentam atividade mitocondrial. Entretanto, isso pode ser um sinal de que as células remanescentes estão na sua última tentativa de evitar a morte (JIMÉNEZ-RUIZ *et al.*, 2010). Avaliar viabilidade celular pelo teste MTT é considerado um processo dificultoso em células em suspensão, pois muitos fatores como por exemplo, tempo do potencial de membrana e fluxos de transporte de elétrons, a quantidade do corante (JASZCZYSZY; GASIOROWSKI, 2008; VAN TONDER *et al.*, 2015; NGA *et al.*, 2020).

Podemos sugerir que houve interferência da TFD na atividade da mitocôndria, pois qualquer perturbação nessa organela pode induzir a ativação de algumas proteínas que então são liberadas podendo ocasionar a fragmentação do DNA levando a célula à morte (AWASTHI *et al.*, 2018; CHAKRABORTI *et al.*, 2019). A fim de verificar os danos causados, realizamos análise da integridade do DNA das espécies de *Leishmanias* pelo teste do cometa. Este teste detectou fragmentação de DNA, especialmente em tratamentos TFD, como relatado por Escobar *et al.* (2018). É importante destacar que a luz azul pode induzir a produção de EROs na mitocôndria levando a fragmentação no DNA (GODLEY *et al.*, 2005; WHEELAND; KORECK, 2012; DEL OLMO-AGUADO; NÚÑEZ-ÁLVAREZ; OSBORNE, 2016). Estudos realizados por Roy *et al.* (2008) constataram que o bloqueio da avaliação da ação da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase pode levar à alta produção de EROs e conseqüentemente despolarização da membrana mitocondrial causando depleção dos níveis de ATP e conseqüentemente morte celular, principalmente

devido à apoptose. Outros autores analisaram substâncias leishmanicida e também descrevem correlação entre a fragmentação do DNA e a produção de EROs e morte celular, principalmente por apoptose (KATHURIA *et al.*, 2014; MALLICK *et al.*, 2018; AWASTHI *et al.*, 2016; AWASTHI *et al.*, 2018; CHAUHAN *et al.*, 2018; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019).

Os dados obtidos neste estudo mostraram que a TFD com curcumina teve um efeito imediato nas células e que mesmo após 18 horas esses efeitos persistiram apesar das diferenças entre as espécies quanto às respostas à terapia utilizada. Assim como esse estudo, trabalhos publicados por Leite *et al.* (2014) também demonstraram que a curcumina possui ação antimicrobiana e que seu uso como FS produz excelentes resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados neste estudo demonstraram que a curcumina não tem ação citotóxica no escuro para os promastigotas. No entanto, a TFD associada à curcumina reduziu a viabilidade de promastigotas das duas espécies de *Leishmania*, promovendo alterações morfológicas, afetando o tipo de morte celular de maneira diferente nas duas espécies analisadas. Podemos observar também que a formação de ERO causados pela TFD levou as células a fragmentação do DNA e alterações no potencial de membrana mitocondrial.

**CAPÍTULO 2: AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA-CURCUMINA  
CATIÔNICA E ANIÔNICA EM AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e  
*Leishmania major***

## 8 INTRODUÇÃO

Outra modalidade que vem sendo aplicada para otimizar a ação da curcumina é a utilização de nanopartículas. Num artigo de revisão, Rai *et al.* (2020) descreve a curcumina associada à diferentes formulações, como por exemplo, curcumina com ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) contra plasmódios, nanopartículas de curcumina à base de lipídios contra parasitas da malária e todas as formulações apresentadas causaram a inviabilidade das células testadas. Huang *et al.* (2018) também pode verificar a eficiência da curcumina associada a nanopartículas de BSA, causando inibição da proliferação de células HepG2, mesmo resultado foi encontrado por Amani, Mohamadnia e Mahdavi (2019) e Kalhor *et al.* (2019) ao verificarem o efeito anticâncer a curcumina encapsulada com BSA. A associação da curcumina a nanopartículas de BSA também foi avaliada em estudos de Nosrati *et al.* (2020), que verificaram resultados promissores no efeito radioprotetor da curcumina em fibroblastos da linhagem celular HFFF2 e também de animais submetidos a irradiação por Raio-X.

A utilização de nanopartículas na TFD demonstra a capacidade de otimizar a ação dos fármacos, aumentando a eficácia da TFD, melhorando a solubilidade e a entrega seletiva do FS (DEBELE; PENG; TSAI, 2015). Por exemplo, nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) com zinco (Zn), podem ser consideradas uma alternativa valiosa ao tratamento tradicional da leishmaniose cutânea (SEPÚLVEDA *et al.*, 2020), pois se mostrou com capacidade de diminuir o número de parasitas, tanto *in vitro* como *in vivo* e alta eficiência na entrega. Estudos *in vitro* de Mazzilli *et al.* (2020) utilizando BSA com di-hidróxido de silício ftalocianina (SiPc(OH)<sub>2</sub>) se mostraram eficientes, pois exibiram perfis de liberação controlada do fármaco e com ação fototóxica. A BSA é uma nanopartícula formada por albumina de soro bovino. Ela é uma proteína sérica, semelhante a albumina humana e está sendo amplamente utilizada em sistema de entrega de fármacos, por apresentar características de biocompatibilidade e não toxicidade (KARIMI *et al.*, 2016). Além disso, os autores descrevem a propriedade da BSA poder ser preparada por vários métodos, apresentar mecanismos que permitem a modificação da superfície, permitindo alteração da carga superficial e direcionamento para locais específicos.

Estudos realizados pelo grupo mostraram a capacidade da curcumina diminuir a viabilidade dos amastigotas dentro do macrófago (PEREIRA *et al.*, 2021). Seu potencial pode ser aumentado quando ela é incorporada a nanopartículas, tornando-se interessante a sua utilização na TFD no tratamento da LT.

## 9 METODOLOGIA

### 9.1 Cultivo de macrófagos

Os macrófagos da linhagem RAW (264.7) obtidos do Banco de células do Rio de Janeiro, foram mantidos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de SFB 2 mM de glutamina e 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 9.2 Infecção dos macrófagos RAW com *L. braziliensis* e *L. major*

O processo de infecção dos macrófagos foi realizado pela interação dos promastigotas de *Leishmania* na proporção de 10:1 parasitos por célula. Inicialmente os macrófagos foram transferidos em placas de poços, deixando para adesão, por 12 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os parasitos foram adicionados aos macrófagos e o período de internalização foi de 24 horas em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Por fim, as placas foram observadas no microscópio invertido Zeiss Axio Vert. A1 para a avaliação da internalização dos parasitos pelos macrófagos.

### 9.3 Fotossensibilizador

As nanopartículas de BSA-Curcumina (Fig. XX) foram preparadas pelo método de dessolvatação de uma etapa, conforme mencionado por Abreu *et al.* (2019) com modificações, pelo Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba

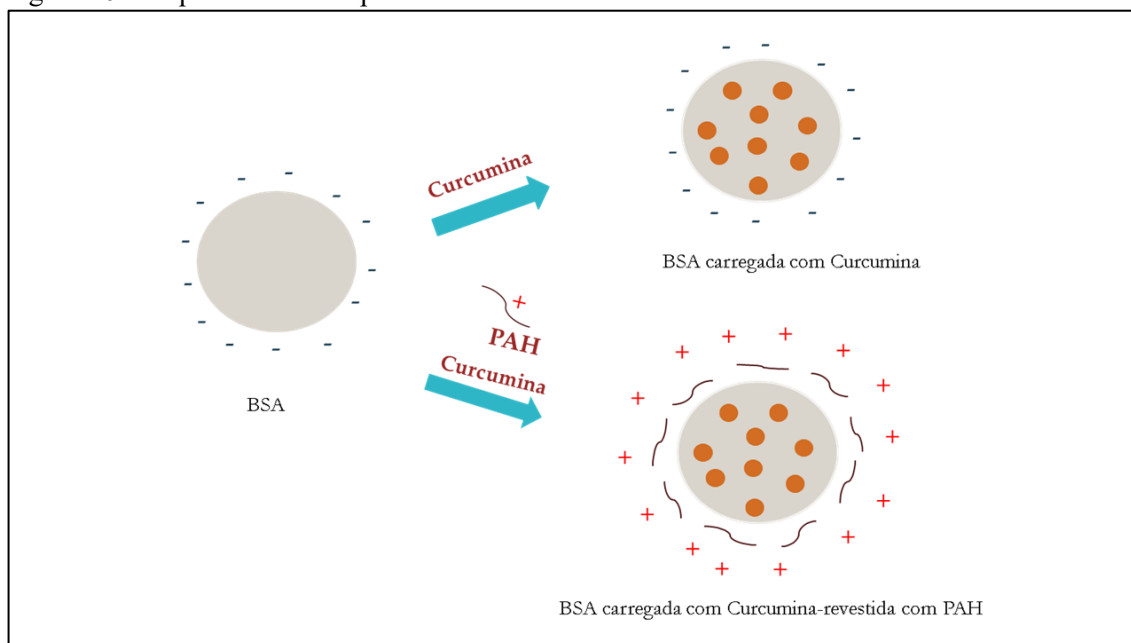
A BSA em pó foi dissolvida em água MilliQ a uma concentração final de 1% de BSA (m/m) e seu pH foi ajustado 9,0 com NaOH 0,1 mol. L<sup>-1</sup> e agitado com um agitador magnético durante 30 min.

Todas as soluções continham 0,01% de azida de sódio como conservante. As nanopartículas foram formadas por adição gota a gota do agente de dessolvatação (acetona/etanol) sob agitação constante. Imediatamente após a adição de acetona/etanol, adicionou-se 0,2 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (25%) à mistura e agitou-

se durante 1 h para promover a reticulação das nanopartículas. Após a dessolvatação, a suspensão foi diluída (1:100) em água MilliQ para reduzir a concentração do agente de dessolvatação para menos de 1%.

Solução de poli(alilamina hidroclorada) (PAH) ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi utilizada para a montagem da camada polieletrólítica e preparada em água deionizada (DI). As nanopartículas de BSA foram suspensas em água DI por meio de sonicação durante 10 min antes da montagem da camada polieletrólítica. As partículas foram revestidas com uma camada de PAH em que o tempo de reação da etapa de adsorção foi de 20 min, seguido por lavagem tripla com água deionizada. Para o carregamento da curcumina nas nanopartículas de BSA, 1 mL de curcumina a  $5,0 \text{ mg. mL}^{-1}$  dissolvida em DMSO foi adicionado na solução por 48 horas.

Figura 20 - Esquema das nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica e aniônica



Fonte: Autor

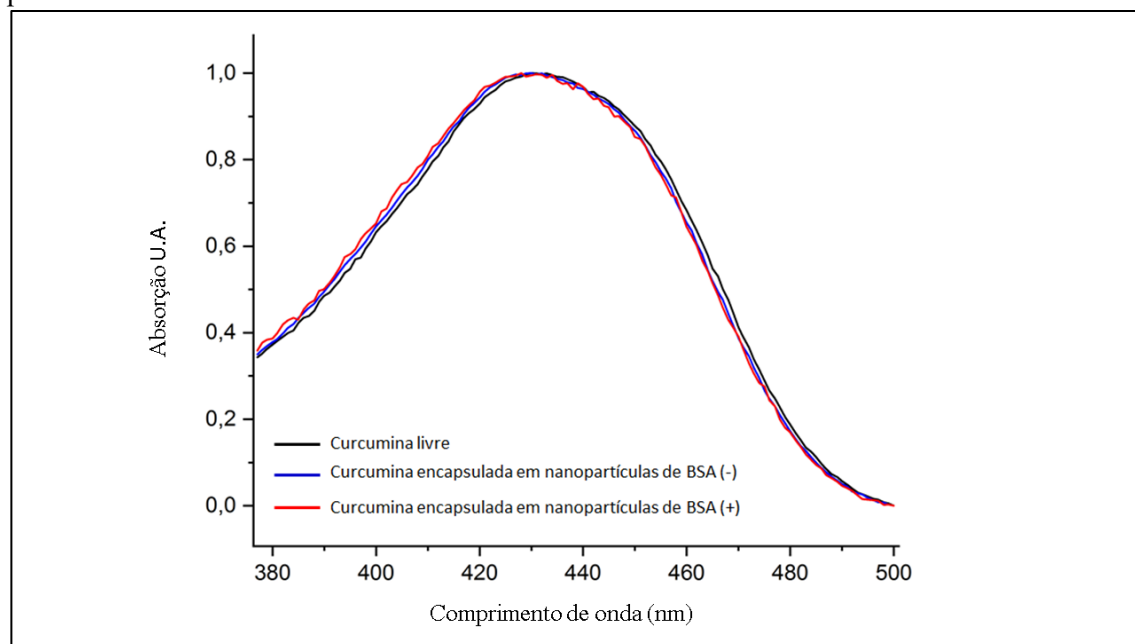
Para utilização nos testes a BSA-Curcumina foram diluídas em PBS nas concentrações  $0,08$ ,  $0,1$  e  $0,7 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$  para utilização nos testes.

#### 9.4 Caracterização das nanopartículas de BSA

As nanopartículas foram inicialmente caracterizadas no estado estacionário por espectroscopia de absorção. As propriedades fotofísicas das nanopartículas de BSA-Curcumina foram investigadas por espectroscopia de absorção de UV-vis usando um espectrofotômetro Varian Cary 50 em temperatura ambiente.

O espectro de absorção do padrão Curcumina ( $0,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ ) e extraído das nanopartículas de BSA é ilustrado na Figura 21. O pico máximo da curva é observado a 432 nm no BSA-Curcumina

Figura 21 - Espectros de absorção da curcumina ( $0,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ ) padrão e extraída de nanopartículas de BSA.



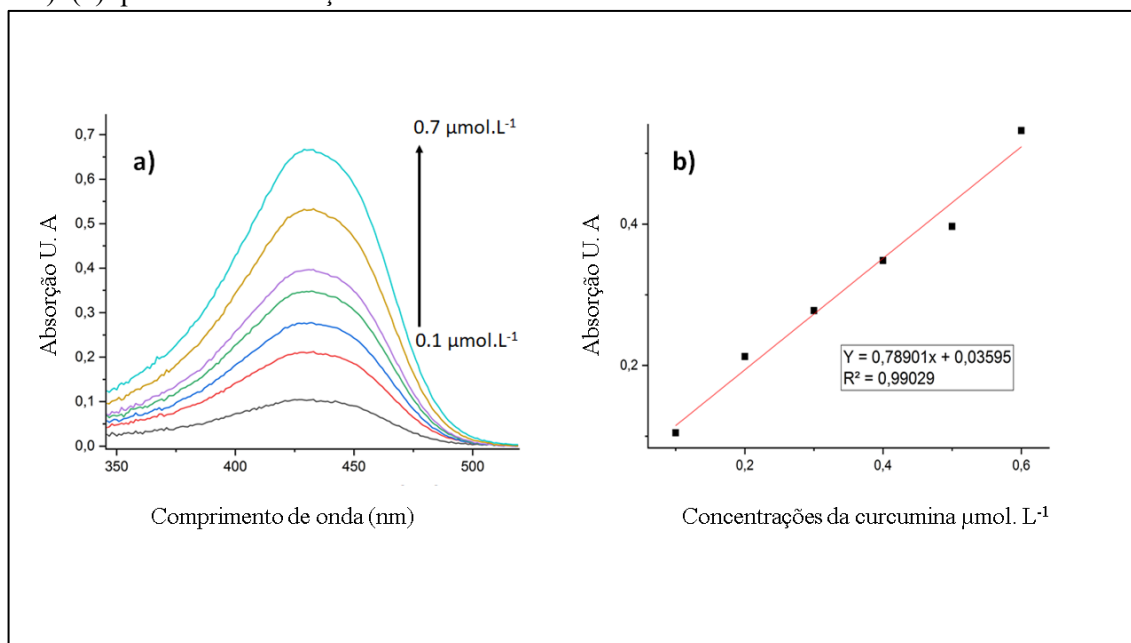
Fonte: Autor

A curva de calibração foi construída em sete níveis de concentração no intervalo de  $0,1-0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o método espectrofotométrico para estabelecer a linearidade do método proposto e avaliar a lei de Beer. A análise de regressão do mínimo quadrado foi feita para os dados. A análise de variância unilateral (ANOVA) e um teste de falta de ajuste ( $p = 0,05$ ) foram usados para determinar se o modelo linear explica adequadamente os dados obtidos.

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados de teste que são diretamente proporcionais à concentração do analito. As

análises de regressão linear foram realizadas traçando a intensidade de absorbância versus a concentração de Curcumina ( $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ) e foi determinada por espectroscopia UV-Visível registrando uma curva de calibração (Fig. 22a). A Linearidade foi detectada para o método espectrofotométrico na faixa de concentração de 0,1– 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  (Fig. 22b).

Figura 22 (a): Espectros de absorção da curcumina em diferentes concentrações (0,1–0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ). (b): plot da concentração de curcumina vs. absorbância



Fonte: Autor

O tamanho de partícula e o potencial zeta das nanopartículas de BSA foram medidos usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido). Para a medição do DLS, as partículas foram dispersas em água destilada e medidas em um ângulo de dispersão de  $173^\circ$  à temperatura ambiente.

O Índice de Polidispersidade (PDI), que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos e o diâmetro hidrodinâmico médio de volume estão descritos na Tabela 1. Nessa mesma tabela estão descritos os valores obtidos nas análises de potencial zeta, que avalia a carga na superfície das nanopartículas, indicaram a obtenção de partículas de carga negativa em BSA e BSA-Curcumina e carga positiva nas nanopartículas decorrentes da presença da PAH. Os valores do potencial de superfície da partícula antes do carregamento e após o carregamento com a curcumina demonstram que o potencial zeta das nanopartículas carregadas ou não com curcumina estão próximos.

Tabela 1 - Dados da caracterização físico-química das nanopartículas de BSA encapsulada com curcumina.

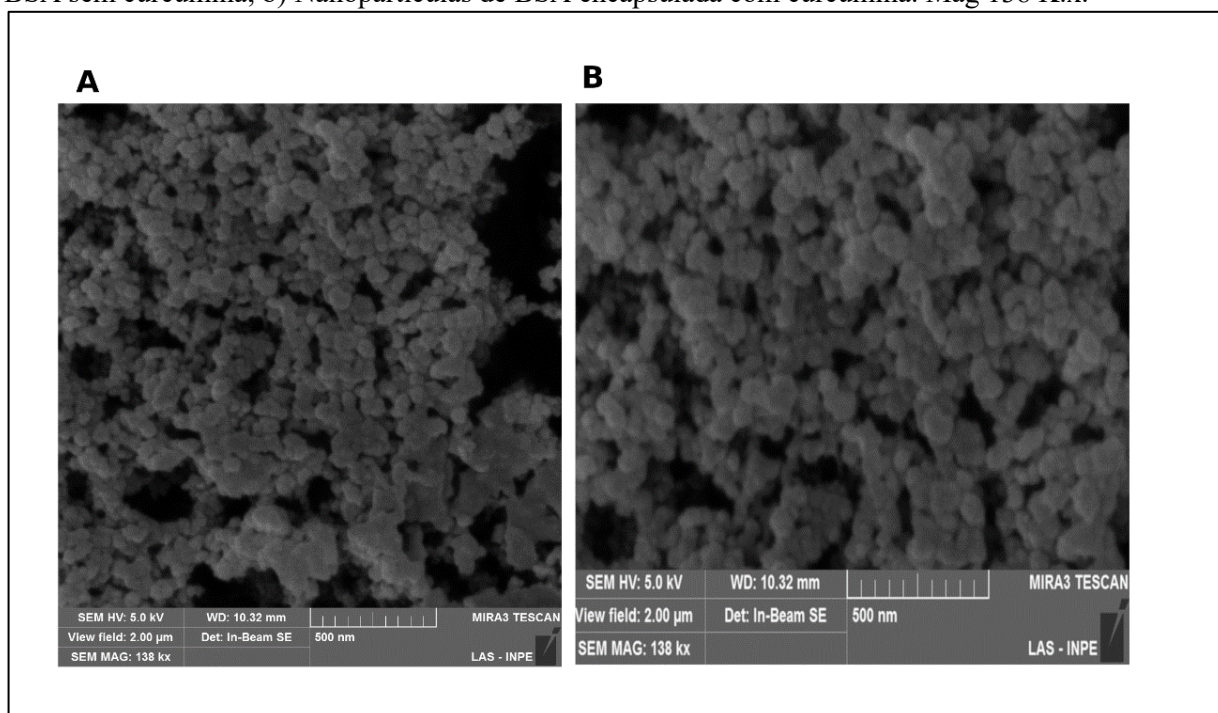
<b>AMOSTRA</b>	<b>DIAMETRO MÉDIO (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>POTENCIAL ZETA (mV)</b>
BSA	128 ± 22,3 nm	0,072	- 25,6
BSA + curcumina	134 ± 32 nm	0,162	- 25,8
BSA + curcumina + PAH	136 ± 34 nm	0,177	+ 24,9

Fonte: Autor.

A morfologia das nanopartículas de BSA foi estudada com microscopia eletrônica de varredura pelo Microscópio da marca Tescan modelo VEGA3, com capacidade de análise de energia dispersiva por raios X, da marca Oxford, modelo X-ACT, detector de 10 mm<sup>2</sup> localizado no INPE.

A análise morfológica permite afirmar que as nanopartículas vazias e carregadas com curcumina se apresentaram uniformes, com forma esférica e superfície lisa e regular (Fig. 23)

Figura 23 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura: a) Nanopartículas de BSA sem curcumina; b) Nanopartículas de BSA encapsulada com curcumina. Mag 138 K.x.



Fonte: Autor

## 9.5 Terapia fotodinâmica

Para realização da TFD os grupos foram divididos em: Raw; Raw infectados com *L. braziliensis* e *L. major*. Todos na seguinte distribuição:

- Grupo controle (GC): que não recebeu nenhum tratamento
- Grupo Irradiado (GI): irradiado, sem a presença do fotossensibilizador
- Grupo Escuro (GE): incubado com o fotossensibilizador e sem irradiação: - Nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica nas concentrações de 0,7; 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; nanopartículas de BSA-Curcumina aniônicas nas concentrações de 0,7; 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ .
- Grupo TFD: incubado com o fotossensibilizador e irradiado: - Nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica nas concentrações de 0,7; 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; nanopartículas de BSA-Curcumina aniônicas nas concentrações de 0,7; 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ .

Os grupos foram dispostos em duas placas de 96 poços, uma placa irradiada e outra que permaneceu no escuro. Foram então adicionados aos macrófagos já aderidos nas placas, o número de parasito na proporção de 10:1. Após período de 24 horas, tempo

necessário para infecção dos macrófagos, foi retirado o meio de cultura e adicionada solução das nanopartículas de BSA-Curcumina nas concentrações descritas, e para os grupos sem fotossensibilizador foram adicionados o mesmo volume de PBS e foi incubado pelo período de 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, a curcumina foi retirada e foi adicionado o mesmo volume de PBS nas placas irradiadas e não irradiadas. A placa irradiada foi submetida à irradiação utilizando dispositivo a base de 48 LED's, Biotable (Biopdi/Irrad-Led) com irradiância de 36 mW.cm<sup>-2</sup>, potência de 3 W por LED e fluência de 10 J.cm<sup>-2</sup>, com comprimento de onda de 450 nm. O tempo de irradiação foi de 278 segundos.

Após a aplicação da TFD, o PBS das duas placas foi retirado e adicionado o meio DMEM. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas antes das análises. Os experimentos foram feitos em triplicata e os grupos foram protegidos da luz durante o processo. Foram realizados três ensaios e cada ensaio realizado em triplicata. Após os respectivos tratamentos foram realizados os testes de viabilidade pelo método de exclusão por Azul de Tripán e internalização das nanopartículas pelos macrófagos infectados.

Foram realizados testes com fibroblastos da linhagem celular L929. Para esse teste os padrões de irradiação e acondicionamento das células pós TFD foram os mesmos e os grupos foram divididos em:

- Grupo controle (GC): que não recebeu nenhum tratamento
- Grupo Irradiado (GI): irradiado, sem a presença do fotossensibilizador
- Grupo Escuro (GE): que recebeu apenas as nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica na concentração de 0,7 µmol. L<sup>-1</sup> e aniônica na concentração de 0,08 µmol. L<sup>-1</sup>. Bem como nas concentrações de 42 e 21 µmol. L<sup>-1</sup> de curcumina livre, correspondendo as concentrações mais baixas utilizadas no estudo de Pereira *et al.* (2021).
- Grupo Terapia Fotodinâmica (TFD): que recebeu apenas as nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica na concentração de 0,7 µmol. L<sup>-1</sup> e aniônica na concentração de 0,08 µmol. L<sup>-1</sup>. Bem como nas concentrações de 42 e 21 µmol. L<sup>-1</sup> de curcumina livre, seguidas de irradiação.

As células foram dispostas em duas placas de 96 poços, uma placa irradiada e outra que permaneceu no escuro. Após a adesão das células, que se deu após 24 horas, foi retirado o meio de cultura e adicionada solução das nanopartículas de BSA-Curcumina

nas concentrações descritas, e para os grupos sem fotossensibilizador foram adicionados o mesmo volume de PBS e foi incubado pelo período de 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, a curcumina foi retirada e foi adicionado o mesmo volume de PBS nas placas irradiadas e não irradiadas.

### **9.6 Viabilidade das células tratadas com a curcumina nanoencapsulada com método de exclusão com azul de tripan**

O procedimento foi realizado após 18 horas da aplicação da TFD, com solução de Azul de Tripan 0,2% (Sigma®), e incubação de cinco minutos. Após esse tempo a solução foi retirada e adicionado PBS. Posteriormente, os grupos foram analisados por meio do microscópio invertido Zeiss Axio Vert. A1, avaliando o número de células vivas e mortas em 10 campos aleatórios diferentes para cada poço. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três ensaios separados e a porcentagem de células vivas foi obtida pela equação:

Equação 3: Viabilidade celular dos macrófagos e macrófagos infectados com Leishmanias

$$\frac{\text{Total de célula vivas} * 100}{\text{Total de células contadas}}$$

$$\text{Total de células contadas}$$

### **9.7 Internalização da curcumina nanoencapsulada em macrófagos infectados com *Leishmania***

Inicialmente os macrófagos foram aderidos em lamínulas de vidro distribuídas em placas de 24 poços, sendo incubados durante 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e com *L. major*, prosseguindo uma nova incubação de 24 horas para a internalização dos parasitos. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e então adicionada nanopartículas de BSA-Curcumina na concentração de 0,7 µmol L<sup>-1</sup>, incubando por 1 hora, seguida de uma lavagem com PBS e fixação com Paraformaldeído 4% durante 15 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com ProLong™ Live Antifade

Reagent, for live cell imaging (Thermofisher) e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 700.

## **9.8 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad, versão 7.04 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, EUA). As comparações dos grupos foram feitas usando ANOVA de um fator e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média aritmética  $\pm$  desvio padrão. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi  $\leq 0,05$ .

## 10 RESULTADOS

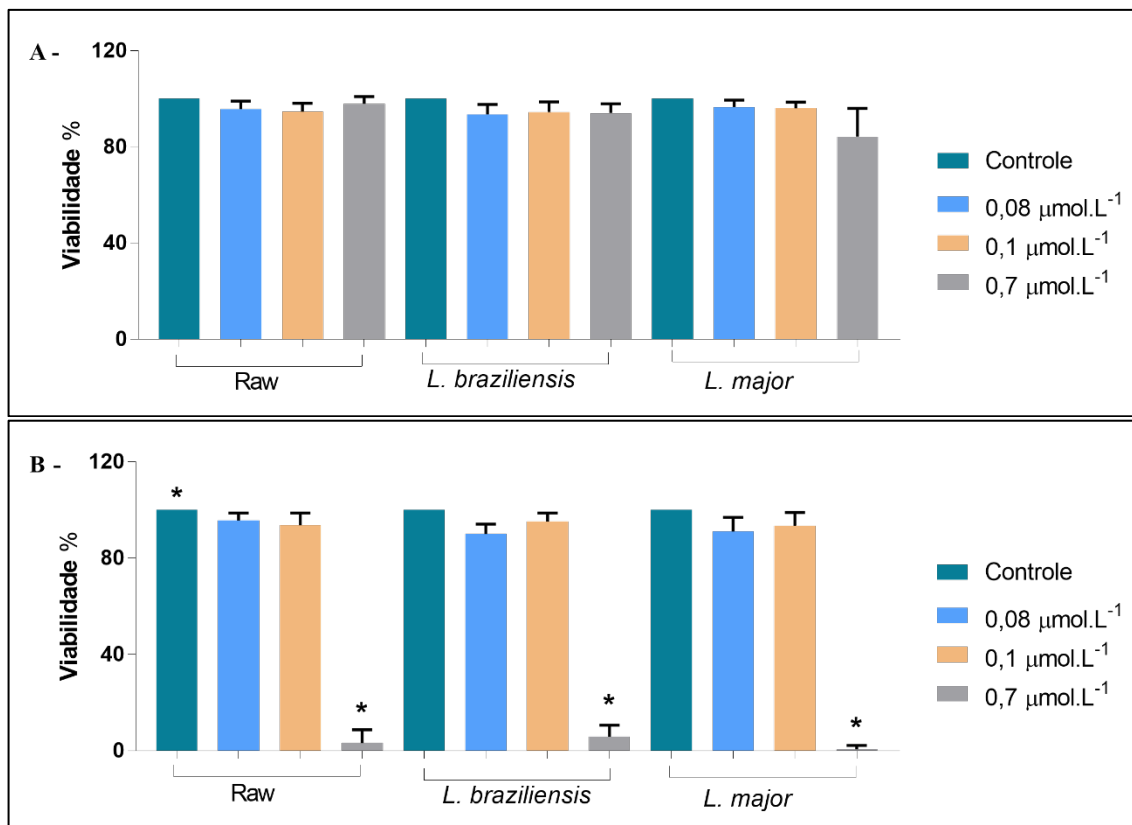
### 10.1 Viabilidade das células tratadas com curcumina nanoencapsulada pelo método de exclusão por azul de tripan

Foram realizados testes apenas com a BSA para verificar sua toxicidade e isso não foi demonstrado pela nanopartícula tanto para a linhagem dos macrófagos RAW (264.7) quanto para os fibroblastos (L929).

Foram testadas as concentrações de 0,08; 0,1; 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  tanto das nanopartículas BSA-Curcumina com cargas positiva quanto a negativa. A nanopartícula BSA-Curcumina catiônica (Fig. 24A) não se mostrou citotóxica em nenhuma das concentrações testadas. Já no grupo Irradiado (Fig. 24B) a concentração de 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  reduziu a viabilidade dos parasitos em 94 % para espécie *L. braziliensis*, 99,4 % para espécie *L. major*. Entretanto, foi fototóxica para os macrófagos reduzindo sua viabilidade em 97 %. Nas concentrações 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  não se mostraram eficientes, pois não diminuíram a viabilidade das células no grupo TFD.

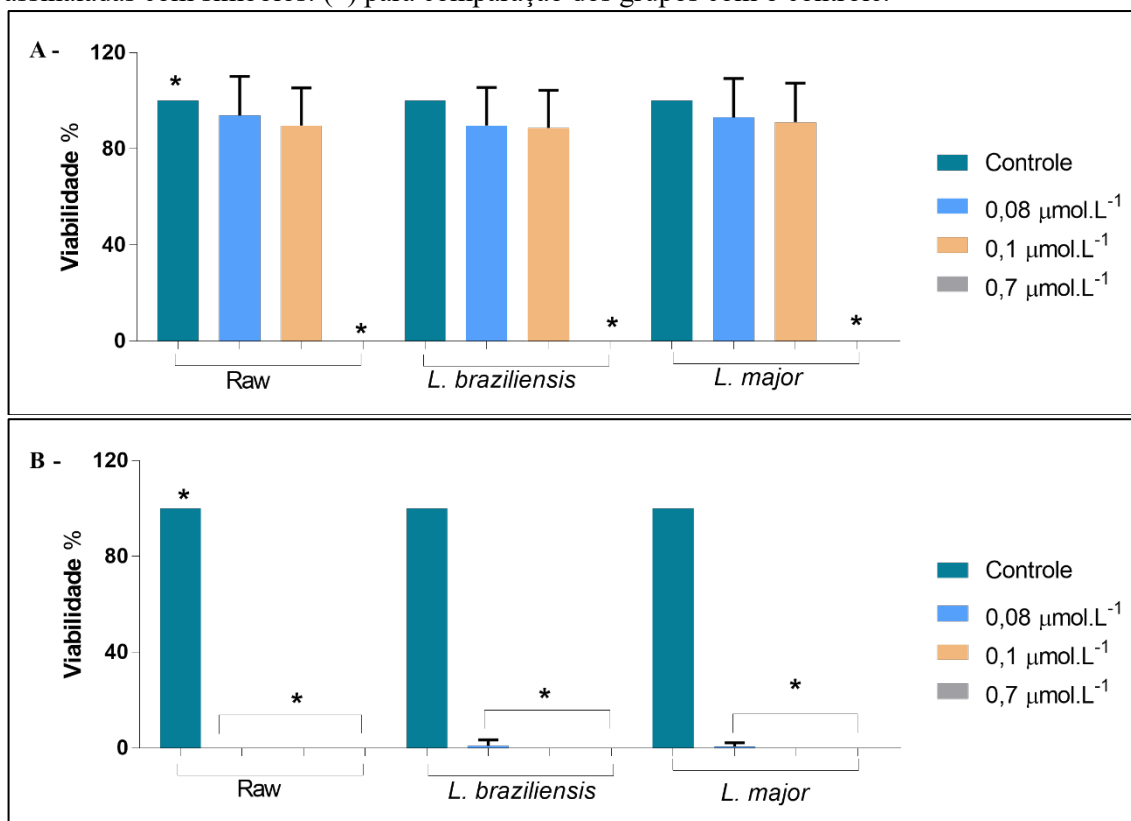
Na análise realizada com a nanopartícula BSA-Curcumina aniônica (Fig. 25A) os resultados na concentração de 0,7  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  se mostrou citotóxica, pois a viabilidade das células foi 0 % tanto no grupo escuro. Já nas concentrações 0,1 e 0,08  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  mostrou-se eficiente, pois houve diminuição na viabilidade das células apenas no grupo TFD, sendo uma redução 99,1 % para a espécie *L. braziliensis* e 99,6 % para a espécie *L. major*, porém para os macrófagos no grupo TFD a viabilidade foi 0%, demonstrando também que foi fototóxica para essa linhagem celular (Fig. 25B).

Figura 24: Análise da viabilidade de macrófagos e macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major* 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica. Em A é apresentado o gráfico do grupo escuro; em B é apresentado o grupo irradiado. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ) e estão assinaladas com símbolos: (\*) para comparação dos grupos com o controle.



Fonte: Autor

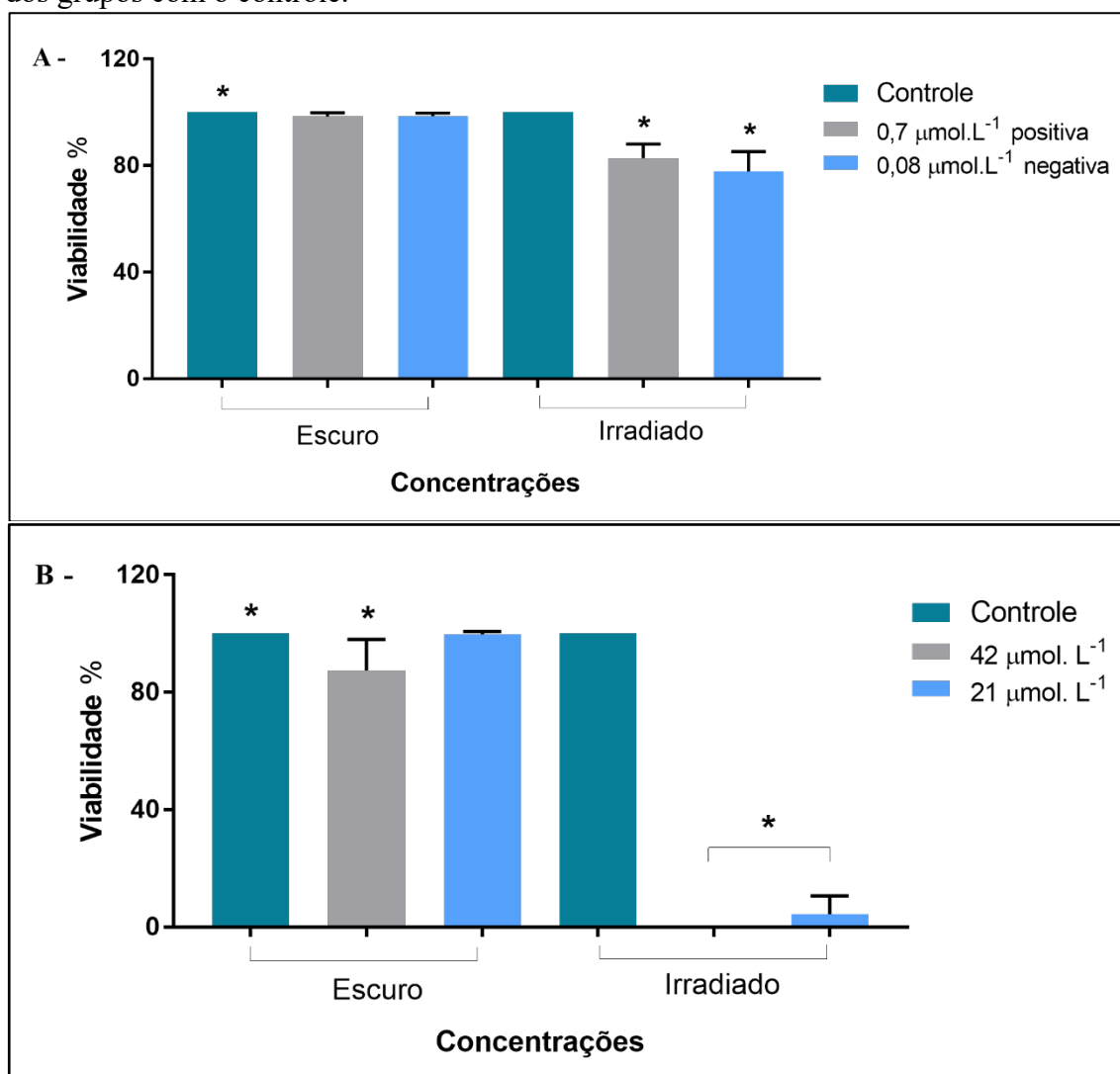
Figura 25: Análise da viabilidade de macrófagos e macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major* 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina aniônica. Em A é apresentado o gráfico do grupo escuro; em B é apresentado o grupo irradiado. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ) e estão assinaladas com símbolos: (\*) para comparação dos grupos com o controle.



Fonte: Autor

O teste de viabilidade com os fibroblastos (L929) foi realizado apenas nas concentrações de  $0,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  catiônica e  $0,08 \mu\text{mol.L}^{-1}$  aniônica. Essas concentrações foram escolhidas após resultados apresentados com os testes dos macrófagos e macrófagos infectados. Foi demonstrado que, apesar da diferença estatística apresentada pelo teste estatístico aplicado, a viabilidade celular se manteve entre 82% para a nanopartícula catiônica e 77% para a nanopartícula aniônica, conforme verificado na figura 26A. A viabilidade dos fibroblastos após o tratamento com a curcumina livre foi de 0% para a concentração de  $42 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e na concentração de  $21 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a viabilidade foi de 4,43%. Demonstrando assim que a nanopartícula de BSA com a curcumina não foi citotóxica para essa linhagem celular.

Figura 26: Análise da viabilidade dos fibroblastos 18 horas após a terapia fotodinâmica com nanopartículas de BSA-Curcumina catiônica  $0,7 \mu\text{mol. L}^{-1}$  e aniônica  $0,08 \mu\text{mol. L}^{-1}$  em **A** e Curcumina livre  $42$  e  $21 \mu\text{mol. L}^{-1}$  em **B**. As diferenças estáticas foram obtidas pela análise de variância (ANOVA =  $p \leq 0,05$ ) e estão assinaladas com símbolos: (\*) para comparação dos grupos com o controle.

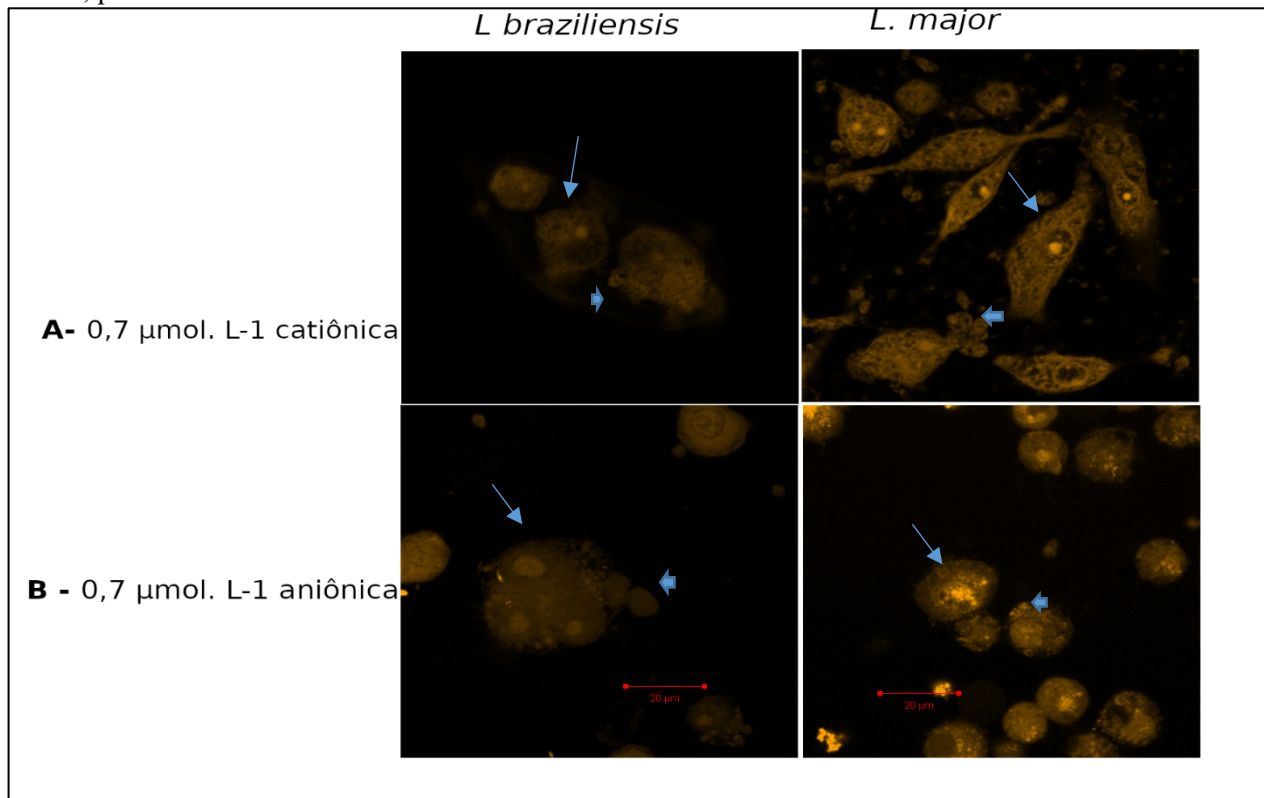


Fonte: Autor

## 10.2 Internalização da curcumina nanoencapsulada

Observando as imagens foi possível notar que as nanopartículas BSA-Curcumina tanto catiônica quanto a aniônica estão presentes no citosol dos macrófagos e também nos *Leishmanias* internalizadas e não internalizadas pelos macrófagos. Na figura 27A analisamos as imagens das células com a nanopartícula BSA-Curcumina catiônica e na figura 27B as imagens são das células com a nanopartícula BSA-Curcumina aniônica.

Figura 27: Micrografia obtida por microscopia confocal de fluorescência, indicando internalização das nanopartículas BSA-Curcumina catiônica em (A) e nanopartículas BSA-Curcumina aniônica (B) em macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major*. Setas indicam núcleo; ponta de seta indicam Leishmanias.



Fonte: Autor

## 11 DISCUSSÃO

A caracterização das nanopartículas demonstrou que o processo de síntese foi bem-sucedida pela técnica utilizada e exibindo características fotofísicas e fotobiológicas favoráveis, como espectro de UV-vis, distribuição de tamanho, PDI e potencial zeta e morfologia esférica, características interessantes em nanopartículas de acordo com o artigo de revisão realizado por Prasanna *et al.* (2021) que descreve que a forma, tamanho e potencial da carga superficial interfere na ação das nanopartículas e células alvos. Nosrati *et al.* (2020) avaliando as propriedades físicas e químicas da BSA-Curcumina concluíram que o desenvolvimento da nanopartícula foi bem concluída, demonstrando características como estabilidade e biocompatibilidade e um método eficaz na entrega de fármacos nas células.

A BSA é uma nanopartícula de fácil manejo, pois ela fornece muitas propriedades favoráveis para aplicações de entrega de fármacos, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, modificação de superfície fácil e melhoria na solubilidade em água de fármacos pouco solúveis em água, como é o caso da curcumina. Vários métodos de preparação, mecanismos de modificação de superfície e diferentes estruturas de nanopartículas de albumina foram explorados para entregar cargas e direcionar para locais específicos (KARIMI *et al.*, 2016).

Como já foi verificado neste estudo e confirmado pela literatura, a utilização da TFD para inviabilizar células parasitárias é uma boa alternativa terapêutica, por não apresentar citotoxicidade e não ser invasiva. Podemos verificar com esse estudo que as nanopartículas de BSA-Curcumina mostraram ser eficientes, pois utilizando baixas concentrações de curcumina houve diminuição da viabilidade celular no grupo TFD. Também foi possível verificar que a nanopartícula de BSA-Curcumina é internalizada pelos macrófagos e também pelas espécies de *Leishmania*. Em trabalhos realizados por Pereira *et al.* (2021) foi demonstrado que a curcumina livre possui o efeito fototóxicos nas concentrações entre 31,3 e 6,8  $\mu\text{g. L}^{-1}$  diminui a viabilidade das células, entretanto essas concentrações são altas quando comparamos com o presente estudo, visto que na concentração de 0,08  $\mu\text{g. L}^{-1}$  da BSA-Curcumina aniônica já promoveu a inviabilização das células. É descrito por estudos de Fröhlich (2012) que as nanopartículas catiônicas causam mais danos à integridade da membrana plasmática, danos mitocondriais e

lisossomais, já as células fagocíticas tem preferência por nanopartículas aniônica. Isso é uma característica dessa célula pois a carga negativa presente na membrana plasmática das *Leishmanias* é considerada um fator importante para sua fixação aos macrófagos (FADOK *et al.*, 2011; BALANÇO *et al.*, 2001).

Nesse estudo, com exceção da concentração de 0,7  $\mu\text{g. L}^{-1}$  aniônica, as demais concentrações, independente da carga superficial, não apresentaram citotoxicidade no escuro, somente após a irradiação. Zhang *et al.* (2016) realizou um experimento comparando a ação da curcumina livre e nanopartículas de BSA-Curcumina em várias linhagens celulares, incluindo a RAW 264.4 e pode verificar que a viabilidade celular com a exposição a curcumina livre foi menor que a BSA-Curcumina e além disso a BSA-Curcumina apresentou maior acúmulo intracelular nessa linhagem celular do que a curcumina livre. Outra característica observada neste estudo é a capacidade da BSA-Curcumina de suprimir citotoxicidade de nanomateriais à base de metal como por exemplo o Oxido de Cobre (CuO), testado nesse estudo.

O teste realizado com fibroblastos (L929) a BSA-Curcumina não demonstrou ação fototóxica, pois a viabilidade dessas células se manteve entre 77 e 82 %, diferente do teste realizado com a curcumina livre, onde houve viabilidade de 0 e 4,43 % para as concentrações de 42 e 21  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  respectivamente. Esses dados são importantes, pois demonstram o processo de seletividade apontado em diversos estudos sobre a utilização de nanopartículas, assim como é apresentado por Kalhor *et al.* (2019) que demonstraram que a viabilidade de fibroblastos da linhagem HFFF2 não foi afetada após a administração de nanopartículas de BSA com 2,6-divanilidenociclohexanona (BSA-DVH) e o efeito do DVH em células tumorais foi aumentado quando associado a BSA. Trabalhos de Amani, Mohamadnia e Mahdavi (2019) demonstram que a associação da BSA-Curcumina, torna a molécula mais estável e eficiente contra células tumorais da linhagem MCF-7.

Alguns estudos como de Oyama *et al.* (2019), verificaram ação antiparasitária de outros tipos de moléculas carreadoras de fármacos, como por exemplo a associação de Pluronic® P-123 e F-127 diminui a sobrevivência de amastigotas de *L. amazonensis*. Outro estudo que mostra a importância da utilização de nanopartículas é de Sepúlveda *et al.* (2020), que utilizaram nanopartículas de TiO<sub>2</sub> carregadas com Zn (TiO<sub>2</sub>/Zn) mostraram a otimização da TFD contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Nesse estudo pode-se verificar a eficiência das nanopartículas de BSA associada a curcumina, independentes da carga superficial, promovendo a inviabilização das células, entretanto se faz necessário estudos mais aprofundados para verificar se as nanopartículas interferem no processo de reinfecção, ou seja, se elas alteram a capacidade das *Leishamni* invadir ou não novos macrófagos para que possa ser indicado em possíveis tratamentos.

## 12 CONCLUSÃO

As nanopartículas de BSA-Curcumina demonstraram ótimos resultados, apresentando características físico-químicas e fotobiológicas favoráveis. As nanopartículas foram internalizadas pelas células de macrófagos e *Leishmanias* e promoveu a redução da viabilidade da célula. Nessa primeira análise a BSA-Curcumina aniônica demonstrou maior eficiência, se considerarmos a concentração, pois as menores concentrações foram fototóxica. Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar o mecanismo de ação das nanopartículas de BSA-Curcumina.

## REFERÊNCIAS

ABO-ZEID, M. A. M. *et al.* Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 351–356, 2018.

ABREU, A. da S. *et al.* Synthesis, photophysical and photobiological characterization of BSA nanoparticles loaded with chloroaluminium phthalocyanine by one-step desolvation technique for photodynamic therapy action, **Journal of Biomaterials Science**, v. 30, n. 16, p. 1559-1573, 2019.

ACKROYD, R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem photobiol.**, v. 74, n. 5, p. 656-69, 2011.

AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. **Ca Cancer J Clin.**, v. 61, p. 250–281, 2011.

AKILOV, O. E. *et al.* Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: The effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1067–1075, 2007.

AKILOV, O. E. *et al.* Prospects for the use of differentiation-modulating agents as adjuvant of photodynamic therapy for proliferative dermatoses. **The Journal of Dermatology**, v. 35, n. 4, p. 197–205, abr. 2008.

AKILOV, O. E. *et al.* The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy Against Leishmania Parasites. **Chemistry and Biology**, v. 13, n. 8, p. 839–847, 2006.

AMANI, S.; MOHAMADNIA, Z.; MAHDAVI, A. pH-responsive hybrid magnetic polyelectrolyte complex based on alginate/BSA as efficient nanocarrier for curcumin encapsulation and delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 1258–1270, 2019.

AMMON, H. P. T.; WAL, M. A. Pharmacology of curcuma longa. **Planta medica**, n. 57, p.1-7, 1990.

ANAND, S. *et al.* Low-dose Methotrexate Enhances Aminolevulinic acid-based Photodynamic Therapy in Skin Carcinoma Cells In vitro and *in vivo*. **Clin Cancer Res.**, v.15, n. 10, p3333–3343, 2009.

ANDRADE, C. G. *et al.* Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of: Leishmania braziliensis. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 482–490, 2018.

ANDREEVA, E. R. *et al.* Effects of photodynamic exposure on endothelial cells in vitro. **Bulletin of experimental Biology and Medicine**, v. 149, n. 2, p. 262–4, 2010.

ARAÚJO, N. C. *et al.* Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomed laser surg.**, v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012.

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. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 29, n. 173, p. 2971–2977, 2006.

AURELIANO, D. P. *et al.* Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 1–8, 2018.

AWASTHI, B. P. *et al.* In vitro leishmanicidal effects of the anti-fungal drug natamycin are mediated through disruption of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 23, n. 7–8, p. 420–435, 2018.

AWASTHI, B. P. *et al.* Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. **Apoptosis**, v. 21, n. 8, p. 941-953, 2016.

BALANCO, J. M. F. *et al.* Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11 p. 1870–1873. 2001.

BAPTISTA, M. S. *et al.* M. Photochem Photobiol. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways † HHS Public Access Author manuscript. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912–919, 2017.

BARROS, M. P. *et al.* Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 13, n. 20, p. 01-19, 2012.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in *Leishmania*. **Parasite.**, v. 71, n. 26, p. 1-13, 2019.

BASTOS, M. M. *et al.* The use of porphyrins in photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2012.

BASTOS, M. M. E. *et al.* Antileishmanial chemotherapy: A literature review. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072–2104, 2016.

BENTES, A. A., *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: um desafio diagnóstico na prática pediátrica. **Rev Med Minas Gerais**, v. 25, supl. 6, p. S83-7, 2015.

BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 5, n. 3, p. 158–165, 2019.

BLANCO, K. C. *et al.* Antimicrobial efficacy of curcumin formulations by photodynamic therapy. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 5, p. 506-511, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico** Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim\\_especial\\_doencas\\_negligenciadas.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf). Acesso em: 26 abr. 2021.

CALVO-ÁLVAREZ, E. *et al.* Appraisal of a Leishmania major Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both In Vitro and In Vivo Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1–11, 2012.

CAMPOS, G. N. *et al.* The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. **Lasers med sci**. v. 28, n. 1, p. 317-24, 2013.

CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões in vitro de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal**. 2008. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2008.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CAVALCANTI, D. P. *et al.* The Kinetoplast ultrastructural organization of the endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol.**, v.130, n. 6, p. 1177-85, 2008.

CHAI, Y. *et al.* Complexation of antimony (Sb(V)) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-D-mannose: formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2257-63, 2005.

CHAKRABORTI, S. *et al.* **Oxidative stress in microbial diseases**. [s.l]: Springer, 2019.

CHANG, C. C. *et al.* Selective photodynamic therapy based on aggregation-induced emission enhancement of fluorescent organic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 3, p. 897-906, 2012.

CHAUHAN, I. S. *et al.* Chemoprevention of Leishmaniasis: In-vitro antiparasitic activity of dibenzalacetone, a synthetic curcumin analog leads to apoptotic cell death in *Leishmania donovani*. **Parasitology International**, v. 67, n. 5, p. 627–636, 2018.

CHEN, R. *et al.* 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy has effective antifungal activity against *Sporothrix globosa* in vitro. **Mycoses**, v. 63, n. 12, p. 1311–1320, 2020.

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

COSTA, S. M. *et al.* Environmental suitability for *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) and the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 155, 2018

COSTA, J. M. L. *et al.* Clinical Modalities, Diagnosis e Therapeutic Approach of the Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Medica da Bahia**, v. 79, n. 5, p. 70-83, 2009

DAI, T.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170–188, 2010.

DAMIANO, M. *et al.* Amphotericin B: 50 Years of chemistry and biochemistry **Review. Synthesis**, n. 6, p. 914-942, 2006.

DEBELE, T. A.; PENG, S.; TSAI, H. C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy, **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 22094-22136, 2015.

DEL OLMO-AGUADO, S.; NÚÑEZ-ÁLVAREZ, C.; OSBORNE, N. N. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 9, p. 2324–2335, 2016.

DEPLEDGE, D. P. *et al.* Comparative Expression Profiling of *Leishmania*: Modulation in Gene Expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 7 p476. 2009

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

DETTY, M. R; GIBSON, S. L; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.

DIMMER, J. *et al.* Natural anthraquinones as novel photosensitizers for antiparasitic photodynamic inactivation. **Phytomedicine**, v. 61, 2019.

DISCH, J. *et al.* Leishmania (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 3, p. 185–190, 2005.

DOVIGO, L. N. *et al.* Investigation of the photodynamic effects of curcumin against candida albicans. **Photochem. Photobiol.**, v. 87, n. 4, p. 895-903, 2011.

DUTTA, S. *et al.* Photodynamic Sensitization of Leishmania amazonensis in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4474-4484, 2005.

DUTTA, S.; WAKI, K.; CHANG, K. P. Combinational sensitization of Leishmania with uroporphyrin and aluminum phthalocyanine synergistically enhances their photodynamic inactivation in vitro and in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 620–625, 2012.

ELLERKAMP, V. *et al.* Photodynamic therapy potentiates the effects of curcumin on pediatric epithelial liver tumor cells. **Anticancer Research.**, n. 36, p. 3363-3372, 2016.

ENK, C. D. *et al.* Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Photodynamic Therapy. **Arch. Dermatol.**, v. 139, p. 432-434, 2003.

ESCOBAR, P. *et al.* Photodynamic therapy using ultradeformable liposomes loaded with chlorine aluminum phthalocyanine against L. (V.) braziliensis experimental models. **Experimental Parasitology**, v. 194, p. 45–52, 2018.

EVANGELOU, G. *et al.* Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional aminolevulinic acid photodynamic therapy photodermatol. **Photoimmunol. Photomed.**, v. 27, n. 5, p. 254–6, 2011.

FADOK, V. A. *et al.* Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts, **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 1071–1077, 2001

FEASEY, N. *et al.* Neglected Tropical Diseases. **British Medicals Bullentin**, v. 93, p. 179-200, 2010.

FICKWEILER, S. *et al.* Photosensitization of human skin cell lines by atmpn (9- acetoxy-2,7,12,17, tetrakis-(beta- methoxyethyl)- porphycene) in vitro: mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology b: biology**, v. 48, p. 27-35, 1999.

FLOETER-WINTER, L. M. New horizon in the identification and taxonomu of the leishmania and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. **Res.adv. In Microbioloy**, p. 63-79, 2004.

FONSECA, S. M. *et al.* Triplet-state and singlet oxygen formation in fluorene-based alternating copolymers. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 16, p. 8278–8283, 2006.

FORESTIER, C. L. *et al.* Imaging Host Cell-Leishmania Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host & Microbe.*, v. 9, p. 319-330, 2011.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomed.*, v.7, p. 5577–5591. 2012

GARCIA, L. *et al.* Culture-independent species typing of neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.*, v. 42, p. 2294-7, 2004.

GARDLO, K. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 48, n. 6, p. 893-896, 2003.

GARDNER, D. M. *et al.* Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the Photodynamic treatment of leishmaniasis. *Photochemistry and Photobiology*, v. 86, n. 3, p. 645–652, 2010.

GLOBAL HEALTH. Division of Parasitic Diseases and Malaria. **Center for Disease Control and Prevention.** Disponível: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 18 dez. 2020.

GODLEY, B. F. *et al.* Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 22, p. 21061–21066, 2005.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Serological reactivity of different antigenic preparations of Leishmania (Leishmania) amazonensis and the Leishmania braziliensis complex. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 135–141, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, v. 8, n. 4, p. 419-33, 2010.

GRAÇA, G. C. *et al.* Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.

GRAZIA, C. M. *et al.* Suppression of Il-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. *J. Immunol.*, v 166, p. 4498-4506, 2001.

HEGGE, A. B. *et al.* Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides xlii. *J Pharm Sci.*, v. 100, n. 1, p. 174–185, 2011.

HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2012.

HUANG, Y. *et al.* Curcumin-loaded galactosylated BSA nanoparticles as targeted drug delivery carriers inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8309–8323, 2018.

HUSSAIN M. *et al.* Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Outbreak, Waziristan, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 159-161, 2018

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–11, 2010.

IVANOV, A. V. *et al.* **One more pdt application of chlorin e6. Proc. Spie 3909, Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy ix.** [s.l.: s.n.], 2000.

JASZCZYSZYN, A.; GASIOROWSKI, K. Limitations of the MTT assay in cell viability testing. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, n. 5, p. 525–529, 2008.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. *et al.* Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites and Vectors**, v.3, 2010.

KALHOR, N. F. *et al.* Interaction, cytotoxicity and sustained release assessment of a novel anti-tumor agent using bovine serum albumin nanocarrier. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 9, p. 2546–2558, 2020.

KARIMI, M. *et al.* Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. **Expert Opin Drug Deliv.** v. 13, n. 11, p. 1609–1623, 2016.

KARIMKHANI, C. *et al.* Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 584–591. 2016.

KARMAKOVA, T. *et al.* Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[n-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(n-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. **Journal of photochemistry and photobiology b: biology**, v. 82, p. 28–36, 2006.

KATHURIA, M. *et al.* Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in leishmania donovani by orally active clerodane diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916–5928, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KULSHRESTHA, A. *et al.* Validation of a Simple Resazurin-Based Promastigote Assay for the Routine Monitoring of Miltefosine Susceptibility in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 825-828, 2013.

KUMAR, A.; BORA, U. Interactions of curcumin and its derivatives with nucleic acids and their implications. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 256-264, 2013.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 106, p. 1098 – 1107, 2018.

LAYEGH, P. *et al.* Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 172–5, 2009.

LEITE, D. P. V. *et al.* Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: A randomized controlled trial. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 11, p. 627–632, 2014.

LEMIRANI, M. *et al.* Pcr Detetion of Leishmania in Skin Biopsie. **J. Infect. Developing Coutries.**, v. 3, n. 2, p. 115-122, 2009.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p1-8, 2012.

LOPEZ, T. *et al.* Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO<sub>2</sub> for photodynamic therapy applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 777–85, 2010.

MAKSOURI, H. *et al.* Moroccan strains of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* differentially impact on nitric oxide production by macrophages. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

MALLICK, A. *et al.* Cerberus Nanoparticles: Cotargeting of Mitochondrial DNA and Mitochondrial Topoisomerase  $\alpha$  in Breast Cancer Cells. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 5, p. 2195–2205, 2018.

MARFURT, J. *et al.* Identification and differentiation of leishmania species in clinical samples by pcr amplification of the minexon sequence and subsequent restriction fragment lenght polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3147-3153, 2003.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. **Revista de saúde pública**, v. 44, n. 3, p. 571–574, 2010.

MAZZILLI, M. R. F. *et al.* Polyelectrolytic BSA nanoparticles containing silicon dihydroxide phthalocyanine as a promising candidate for drug delivery systems for anticancer photodynamic therapy. **Journal of Biomaterials Science**, v. 31, n. 11, p. 1457–1474, 2020.

MENDONÇA, L. M. **Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores in vitro e in vivo, e identificação de alterações na expressão do gene tp53** avaliação de uma preparação hidro. 2012. 53f. Tese (doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MIRAHMADI, H. *et al.* Detection of species and molecular typing of Leishmania in suspected patients by targeting cytochrome b gene in Zahedan, southeast of Iran. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 700-705, 2018.

MIRANDA, N. *et al.* The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in Leishmania amazonensis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 342–354, 2017.

MITTRA, B. *et al.* The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes Leishmania virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 292, n. 29, p. 12324-12338, 2017.

MONZOTE, L. *et al.* Role of mitochondria in the leishmanicidal effects and toxicity of acyl phloroglucinol derivatives: nemorosone and guttiferone A. **Parasitology**, p. 1239–1248, 2015.

MOREIRA, L. M. *et al.* **Phenothiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms.** [s.l.: s.n.], 2002. p. 393-422.

MORRIS, J. C. *et al.* Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 453-8. 2001.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as na unappreciated pathogen-driven escape mechanism. **Front Immunol.**, v. 5, 2014

NAFISI, S. *et al.* Curcumin binding to DNA and RNA. **DNA Cell Biol.**, v. 28, p. 201-208, 2009.

NASCIMENTO, C. L.; SELLERA, F. P.; RIBEIRO, M. S. How to enter pdt in clinical practice? *In*: SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. **Photodynamic therapy in veterinary medicine: from basics to clinical practice.** Switzerland: Springer, 2016, p111-123.

NEGRÃO, F. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Murine Cutaneous Lesions Induced by *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1295–1305, 2019.

NESI-REIS, V. *et al.* Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing: A Systematic REVIEW. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 21, p. 294-305, 2017.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NEVES, L. O. *et al.* A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1092-101, 2011.

NEVES, P. G. R. **Avaliação in vitro da quercetina como potencial agente anti-leishmania**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

NGA, N. T. H. *et al.* Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, v. 610, p. 113937, 2020.

NOSRATI, H. *et al.* Evaluation radioprotective effect of curcumin conjugated albumin nanoparticles. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, n. April, p. 103891, 2020.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol.**, v. 39, p. 1-18, 1997.

OGIWARA, H. *et al.* Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 11, p. 2486–2497, 2013.

OLIVEIRA, C. C. *et al.* Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. **Acta Trop.**, v. 90, n. 2, p. 155-62, 2004.

OLIVIER, M. *et al.* Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1377-1389, 2012.

OYAMA, J. *et al.* Potential of Pluronic® P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-Leishmania chemotherapy. **Acta Tropica**, v. 192, p. 11–21, 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO. Informe epidemiológico das Américas. **Leishmaniasis**, n. 9, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>. Acesso em: 26 abr. 2021.

PELOI, L. S. *et al.* Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 353-356, 2011

PEREIRA, A. H. C. *et al.* Evaluation of the photodynamic therapy with curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* amastigotes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, 2021.

PINTO, J. G. *et al.* In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 883–890, 2016a.

PINTO, J. G. *et al.* Chlorin E6 phototoxicity in *L. major* and *L. braziliensis* promastigotes-In vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 19–24, 2016b.

PINTO, J. G. *et al.* Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 325–330, 2017.

PINTO, J. G.; MARCOLINO, L. M. C.; FERREIRA-STRIXINO, J. Photodynamic activity of Photogem® in *Leishmania* promastigotes and infected macrophages. **Future Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 95–106, 2021.

PINTO, J. G. *et al.* Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS4). **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 300-307, 2011.

POSTIGO, J. A. R. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. suppl. 1, p. S62–S65, 2010.

POSTIGLIONE, I.; BARRA, F.; ALOJ, S. M.; PALUMBO, G. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: unravelling roles of p53 and ABCG2. **Cell Proliferation**, v. 49, n. 4, p. 523–538, 2016. <https://doi.org/10.1111/cpr.12274>.

PRASANNA, P. *et al.* Current status of nanoscale drug delivery and the future of nanovaccine development for leishmaniasis – A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111920, 2021.

PRIYADARSINI, K. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Mottram. Cell death in parasitic protozoa: Regulated or incidental? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11 p. 58–66, 2013.

RAGÀS, X. *et al.* Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: Photosensitizer- dependent production and decay in *E. coli*. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2712–2725, 2013.

RAI, M. *et al.* Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 18, n. 4, p. 367-379, 2020.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

RESHETNICKOV, A. V. *et al.* Novel drugs of chlorin e6 in: In Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic. **Therapy ix, Thomas J. Dougherty**, v. 3909 2000. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie>. Acesso em: 20 fev. 2021.

REY, L. **Parasitologia médica** 3. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

ROGERS, M. B. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2011.

ROUGERON, V. *et al.* Extreme inbreeding in Leishmania braziliensis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 25, p. 10224–10229, 2009.

ROY, A. *et al.* Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of FOF1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite Leishmania donovani. **Molecular Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 1292–1307, 2008.

SALINAS, J. C. *et al.* LABCG2, a New ABC Transporter Implicated in Phosphatidylserine Exposure, Is Involved in the Infectivity and Pathogenicity of Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. D. Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections-a review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409-415, 2018.

SARDAR, A. H. *et al.* Genetic Manipulation of Leishmania donovani to Explore the Involvement of Argininosuccinate Synthase in Oxidative Stress Management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-25, 2016.

SATOW, M. M. *et al.* Aplicação do kDNA-PCR para diagnóstico de rotina de leishmaniose tegumentar americana em um hospital de referência. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 6, p. 393–399, 2013.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. Genotoxicidade Como Atividade De Ensino Para Graduação. **Revista Destaques acadêmicos**, v. 5, n. 3, p. 49–60, 2013.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **NATURE. Reviews. Immunology and Advance on line publication**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SEGAT, G. C. *et al.* A new series of acetohydroxamates shows in vitro and in vivo anticancer activity against melanoma. **Investigational New Drugs**, v. 38, n. 4, p. 977–989, 2019.

SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of Protozoan Parasite Emerges as Potent Therapeutic Target: Exciting Drugs are on the Horizon. **Curr Pharm Des.**, v. 14, n. 9, p. 839 – 846, 2008

SEPÚLVEDA, A. A. L. *et al.* Efficacy of photodynamic therapy using TiO<sub>2</sub> nanoparticles doped with Zn and hypericin in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, 2020.

SHLOMAI, J. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 623–647, 2004.

SILVA, E. P. DE O. *et al.* Photodynamic effects of zinc phthalocyanines on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 347–354, 2015.

SILVA, M. S. *et al.* Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 138–150, 2017.

SINCLAIR, A. N.; GRAFFENRIED, C. L. More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 10, p. 760–777, 2019.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent **Probe. Bio-Protocol**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

SOHL, S. *et al.* Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. **Journal of the German Society of Dermatology: JDDG**, v. 5, n. 2, p. 128-130, 2007.

SONG, D. *et al.* Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p. 711–715, 2011.

SORIA-LOZANO, P. *et al.* In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiol.**, v. 15, n. 187, p. 2-8, 2015.

SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Curr. Pharm.**, v. 14, n. 9, p. 822-838, 2008.

SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress In Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67–124, 2009.

SOUZA, D. M. *et al.* 5-ALA-mediated photodynamic therapy reduces the parasite load in mice infected with *Leishmania braziliensis*. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 3, p. e12403, 2017.

SZLASA, W. *et al.* Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32) – in vitro studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 132, 2020.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, 2011.

TESSAROLLO, N. G. *et al.* Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasitology International**, v. 64, p. 125-129, 2015.

THISSEN, M. R. T. M.; KUIJPERS, D. I. M.; NEUMANN, H. A. M. Ruimere toepassing van fotodynamische therapie in de dermatologie. **Ned Tijdschr Geneeskd**, v. 149, p. 232-237, 2005.

TIWAN, N. *et al.* Identification and Characterization of miRNAs in Response to *Leishmania donovani*. Infection: Delineation of Their Roles in Macrophage Dysfunction. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p 1-11, 2017.

VAN DER SNOEK, E. M. *et al.* A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 22, n. 8, p. 918-22, 2008.

VAN TONDER, A. *et al.* Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

VEJA-LOPEZ, F. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VENIGALLA, M.; GYENGESI, E.; MUNCH, G. Curcumin and apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 18, p. 1696–1702, 2015.

VIANA, S. M. *et al.* Photodynamic Vaccination of BALB/c Mice for Prophylaxis of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. **Front. Microbiol.**, v. 9, 2018.

VICENT, I. M.; BARRET, M. P. Metabolomic-Based Strategies for Anti-Parasite Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 44–55, 2015.

VRIES, Henry J.C. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

XIANG WEN, M. D. *et al.* Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: an update. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? *Journal of Chemotherapy*, v. 14, n. 5, p. 431–443, 2002.

WESTROP, G. D. *et al.* Metabolomic analyses of *Leishmania* reveal multiple species differences and large differences in Amino Acid Metabolism. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

WHEELAND, R. G.; KORECK, A. Safety and effectiveness of a new blue light device for the self-treatment of mild-to-moderate acne. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 5, n. 5, p. 25–31, 2012.

WIEGELL, S. R. *et al.* Continuous activation of PpIX by daylight is as effective as and less painful than conventional photodynamic therapy for actinic keratoses; a randomized, controlled, single-blinded study. *Br J Dermatol*, v. 158, n. 4, p. 740-6, 2008.

WIKENE, K. O.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80 p. 26-32, 2015.

WILCOCK, B. C. *et al.* The C2-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human But Not Yeast Cells. **J Am Chem Soc.**, v. 135, n. 23, p. 8488-8491, 2013.

YOSHINO, M. *et al.* Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death *in vitro*. **Toxicol.**, v. 18, p. 783-789, 2004.

ZHANG, W. *et al.* Suppressing the cytotoxicity of CuO nanoparticles by uptake of curcumin/BSA particles. **Nanoscale**, v. 8, n. 18, p. 9572–9582, 2016.

ZOROVA, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2018.

**ANEXO - PUBLICAÇÃO**

Publicou o artigo:

**CELLULAR AND METABOLIC CHANGES AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY IN LEISHMANIA PROMASTIGOTES** - Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.

Participação como coautora nos artigos:

Evaluation of the Photodynamic Therapy with Curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* Amastigotes - <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060634> (2021) Antibiotics Basel

Biochemical changes in *Leishmania braziliensis* after photodynamic therapy with methylene blue assessed by the Fourier transform infrared spectroscopy - <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03110-2> (2021) Lasers in Medical Science

Photodynamic activity of Photogem® in *Leishmania* promastigotes and infected macrophages - <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0019> (2021) - Future Microbiology

Zinc Pthalocyanine loaded poly (lactic acid) nanoparticles by double emulsion methodology for photodynamic therapy against 9 L/LacZ gliosarcoma cells. J Biomater Sci Polym Ed. 2021 Sep 13:1-13. doi: 10.1080/09205063.2021.1980359. Epub ahead of print. PMID: 34517784.



## CELLULAR AND METABOLIC CHANGES AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY IN LEISHMANIA PROMASTIGOTES

Luciana Maria Cortez Marcolino<sup>a</sup>, André Henrique Correia Pereira<sup>a</sup>, Juliana Guerra Pinto<sup>a</sup>, Leandro Ariel Mamone<sup>b</sup>, Juliana Ferreira Strixino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Photobiology Applied to Health - Universidade do Vale do Paraíba, Av. Sthelton Riffoni, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones sobre Parásitos y Parasitosis (CIPP), CONICET and Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Córdoba 2251 Teresacoque, Ciudad de Buenos Aires CP1280AA5, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

curcumin  
PDT  
Leishmania  
reactive species  
mitochondrial membrane potential

### ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease, regarded by WHO as a public health problem that has presented a significant increase in the recent years. Conventional treatment is toxic and leads to serious side effects. Photodynamic therapy has been studied as a treatment to cutaneous leishmaniasis. This study aimed to evaluate the cell viability, morphological changes, type of cell death, production of reactive oxygen species, and changes in the mitochondrial membrane and DNA fragmentation in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major* promastigotes. Confocal microscopy was used to quantify the fluorescence emitted by JC-1, Annexin V, and propidium iodide reagents. The trypan blue exclusion test was used to evaluate the viability of the cells, the mitochondrial activity was verified with MTT, and the morphological changes were analyzed for SEM and DNA damage using the comet assay. PDT using curcumin at 500, 125, and 31.25 µg/mL decreased the viability of the parasites and induced changes in the mitochondrial membrane potential. The production of reactive oxygen species was dose-dependent and was observed only in the groups submitted to PDT. DNA damage was also observed in the parasite cells. The morphology of the cells was affected mainly at the highest curcumin concentration, resulting in rounded cells with a shortened flagellum. When the type of cell death was analyzed, the prevalence of apoptosis was noted. The results support the use of curcumin as photosensitizer in PDT against *Leishmania* promastigotes in the treatment for cutaneous leishmaniasis.

### Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic disease regarded by the World Health Organization (WHO) [1] as a worldwide public health problem present in several countries. In 2018, 92 countries were considered endemic or reported cases of cutaneous leishmaniasis. The number of cases and the distribution of the disease have increased in recent years, especially in developing countries. This increase may be the result of deforestation, environmental changes, human migration, among other factors [2]. In Latin America, about 940,396 new cases were recorded in the period from 2001 to 2017. In 2019, 15,484 new cases of cutaneous leishmaniasis [3,4] occurred in Brazil, with *L. braziliensis* being the most important species due to its wide distribution in the Brazilian territory [4, 5–8]. The conventional treatment for cutaneous leishmaniasis is contraindicated in patients with heart and kidney diseases, since it presents several side effects. In addition, it is a long-term treatment that can fail if

not followed up strictly [4,9]. In order to overcome these drawbacks, several treatment strategies are being studied, including the Photodynamic Therapy (PDT), which has proved to be an effective alternative for the treatment of local dermatological lesions. PDT is a treatment that combines the use of a non-toxic photosensitizer (PS) and visible light with a wavelength capable of exciting the PS, thus generating reactive oxygen species (ROS) that are highly toxic to cells [10]. ROS can react with various molecules, including cholesterol, membrane lipids, proteins, as well as nucleic acid bases [11], leading to cell death. Curcumin has proven to be a promising PS for application in PDT, since it has a high potential to stimulate the production of ROS and the ability to interact with nucleic acids [12–14].

Leishmaniasis is considered a neglected disease, lacking surveillance systems and whose common incidence in remote areas affects mainly marginalized populations. It requires additional in-depth knowledge about the disease, its vectors, and forms of contagion; the adoption of

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [lucmaria.cortez@hotmail.com](mailto:lucmaria.cortez@hotmail.com) (L.M.C. Marcolino), [jferreira@univap.br](mailto:jferreira@univap.br) (J.F. Strixino).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpt.2021.102403>

Received 4 March 2021; Received in revised form 20 May 2021; Accepted 11 June 2021

Available online 20 June 2021

1572-1000/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.