

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

ANDRÉ HENRIQUE CORREIA PEREIRA

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA NA INTERAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS E AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* e *L. major***

São José dos Campos – SP

2021

ANDRÉ HENRIQUE CORREIA PEREIRA

AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA NA INTERAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS E AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* e *L. major*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira Strixino

São José dos Campos,  
21 de setembro de 2021.

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

Pereira, André Henrique Correia  
Ação da terapia fotodinâmica com curcumina na interação de macrófagos e amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* / André Henrique Correia Pereira; orientadora, Profa. Dra. Juliana Ferreira-Strixino . - São José dos Campos, SP, 2021.  
1 CD-ROM, 70 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. Fotoquimioterapia. 3. Curcumina. 4. Leishmaniose . I. Ferreira-Strixino , Profa. Dra. Juliana , orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, André Henrique Correia Pereira, 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, 8 de Dezembro de 2021.



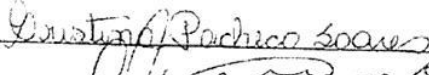

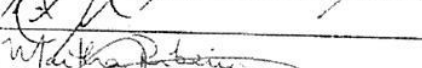
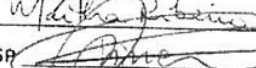

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 21 / 09 / 2021

ANDRÉ HENRIQUE CORREIA PEREIRA

“AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM CURCUMINA NA INTERAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS E AMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* e *L. 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   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO   
PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MARTHA SIMÕES RIBEIRO - USP   
PROF. DR. JOSÉ ANGELO LAURETTA LINDOSO - USP 

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Lúcia Vieira  
Diretora do IP&D – Univap  
São José dos Campos, 21 de setembro 2021.

*Esse trabalho é dedicado ao garoto mineiro e a garota paranaense que, mesmo sem condições e oportunidades e mesmo com todas as adversidades que passaram na vida, mostraram para os filhos o valor do trabalho e o poder transformador da educação. Vocês são meu maior orgulho, amo vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para seguir em frente, por me abençoar com oportunidades e por colocar todas as pessoas que serão citadas abaixo na minha vida.

Agradeço ao meu pai, José, à minha mãe, Fátima, e ao meu irmão, Thiago, que são minha fortaleza, meu porto seguro e por quem eu daria a vida. Espero honrá-los para sempre.

Esse trabalho, além do fechamento do meu doutorado, é o encerramento de um longo ciclo de mais de 10 anos na Universidade do Vale do Paraíba. Serei eternamente grato e honrado por ter feito parte dessa instituição. Obrigado.

Agradeço a CAPES e a FAPESP pelo financiamento do projeto que proporcionou essa tese e pela bolsa de estudos sem a qual eu não conseguiria me dedicar ao desenvolvimento dessa e de outras pesquisas durante todo o período do doutorado.

Agradeço ao antigo laboratório de terapia fotodinâmica e atual FOTOBIOIS pela oportunidade, acolhimento e por todos os anos em que foi minha casa. Lembro do primeiro dia em que conheci o laboratório, olhei os equipamentos, me empolguei com as linhas de pesquisa. Lembro de cada mudança, de cada época, de cada melhoria e tenho orgulho de ter feito parte disso. Esse lugar me trará belas recordações para sempre.

Em minha primeira semana de faculdade me lembro de entrar na minha primeira aula da disciplina de Biologia Celular e lá encontrei a pessoa que seria fundamental para minha construção como pessoa e profissional, a Prof.<sup>a</sup> Juliana Ferreira. Serei eternamente grato pelos seus puxões de orelha, pelo seu incentivo, pela sua confiança e por ser uma referência para mim. Muito obrigado por ter feito parte da minha vida e por todas as oportunidades e confiança que depositou em mim.

Aos meus amigos mais que especiais, meus verdadeiros irmãos, Juliana, Letícia, Luciana e João. Vocês são especiais. Juliana Guerra é uma amiga sem igual, me inspiro em você como pessoa e pesquisadora. Letícia é a irmã que a faculdade me trouxe, admiro sua força, seu empenho, sua inteligência e capacidade.

A Luciana Maria é uma fortaleza, admiro demais sua história e sua dedicação com tudo aquilo que você faz. João é meu irmão, pessoa que me ajudou em diversos momentos, um cara que é puro coração. Muito obrigado a todos vocês pelos dias de risadas, pelo companheirismo nos dias tristes, pelas brincadeiras e pelos ensinamentos. Vocês são parte da minha família.

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha jornada na UNIVAP desde a graduação, professores Marco Antônio, Sonia Khouri, Leoberto de Lima, Milton Beltrame, Newton Soares, e em especial à Prof.<sup>a</sup> Cristina Pacheco, que sempre foi muito disposta a ajudar e a compartilhar o conhecimento. Vocês são grandes inspirações.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante minha passagem no laboratório. Pablo Zambrano, Mirian Freitas, Daniel Guilherme, Rainara Sanches, Caio Stachelis, Vitória Tonini, Gabrielle Vitória, Beatriz Muller, Pablo Ramires, Bruno Godoi, Maíra Garcia, Isabelle Ferreira, Juliana Pedroso. Obrigado por toda ajuda e todos os bons momentos juntos.

Agradeço aos amigos queridos da minha nova casa, Matheus Salgado, Carla Souza, Gustavo Henrique. Vocês são pessoas incríveis!

Agradeço também aos meus amigos de sempre, em especial ao Marcelo, Caue, Filipe e Rafael. Obrigado pela amizade desde os 14 anos de idade!

Por fim, agradeço a todos que contribuíram durante minha caminhada até aqui, cada pessoa e cada lugar vão ter um espaço reservado no meu coração e na minha memória. Obrigado.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença negligenciada que está entre as 10 doenças infecciosas mais importantes do mundo. O tratamento convencional é feito com antimoniais pentavalentes e anfotericina, medicamentos que apresentam diversos efeitos colaterais e contraindicações. A terapia fotodinâmica (TFD) com curcumina surge como alternativa no tratamento da LT, visto que se baseia em aplicação local, não invasiva e seletiva, enquanto utiliza um composto natural de baixo custo como fotossensibilizador. Esse trabalho teve por objetivo a avaliação, *in vitro*, da TFD aplicada sobre amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* em interação com macrófagos por meio de análise de viabilidade, morfologia, internalização do FS, atividade e potencial de membrana mitocondrial e recuperação de parasitos pós-TFD. Foram utilizadas concentrações de curcumina em diluições seriadas, de 500 a 7,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e irradiação com luz azul (450 nm), irradiância de 36  $\text{mW}/\text{cm}^2$  e fluência de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Os resultados demonstram ampla inativação e baixa citotoxicidade da TFD com curcumina em macrófagos infectados e não infectados nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A internalização do FS demonstrou localização do composto em todo o citoplasma da célula, além de concentração no núcleo, e nos amastigotas intracelulares. A morfologia pós-tratamento se mostrou alterada, exibindo destruição celular nos grupos submetidos à TFD, enquanto os grupos não tratados permaneceram com a morfologia dos macrófagos preservada. Foi observada elevação do potencial de membrana mitocondrial e diminuição da atividade mitocondrial nos grupos que receberam a terapia. Além disso, a contagem de parasitos recuperados pós-TFD demonstrou que houve diminuição do número de parasitos viáveis, indicando que a terapia pôde inativar não só os macrófagos, mas também os amastigotas intracelulares para as duas espécies de *Leishmania* estudadas. Os testes realizados demonstraram potencial da TFD com curcumina nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , promovendo a inativação de macrófagos infectados com *Leishmania*, bem como alterações celulares morfológicas e no potencial de membrana e atividade mitocondrial.

**Palavras-chave:** terapia fotodinâmica, curcumina, amastigotas, leishmaniose tegumentar.

## Action of photodynamic therapy with curcumin in the interaction of macrophages and amastigotes of *L. braziliensis* and *L. major*

### ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected disease that ranks among the 10 most important infectious diseases in the world. Conventional treatment is done with pentavalent antimonials and anfotericin, drugs that have many side effects and contraindications. Photodynamic therapy (PDT) with curcumin appears as an alternative in the treatment of CL, considering that it is based on local, non-invasive and selective application, while using a low-cost natural compound as a photosensitizer. This work aimed to evaluate, in vitro, the PDT applied to amastigotes of *L. braziliensis* and *L. major* interacting with macrophages, evaluating the viability, morphology, FS internalization, mitochondrial membrane activity and potential, and parasite recovery after PDT. The results demonstrate broad inactivation and low cytotoxicity of PDT with curcumin in infected and uninfected macrophages at concentrations of 15.6 and 7.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Internalization of FS demonstrated localization of the compound throughout the cell cytoplasm, and concentration of curcumin in the nucleus and intracellular amastigotes. The post-treatment morphology was altered, exhibiting cell destruction in the groups submitted to PDT, while the untreated groups remained with preserved macrophage morphology. Increased mitochondrial membrane potential and decreased mitochondrial activity were observed in groups receiving therapy. Furthermore, the count of parasites recovered after PDT showed that there was a decrease in the number of viable parasites, indicating that the therapy could inactivate not only macrophages, but also intracellular amastigotes for the two *Leishmania* species studied. The tests performed demonstrated the potential of PDT with curcumin at concentrations of 15.6 and 7.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , promoting the inactivation of *Leishmania*-infected macrophages, as well as morphological cell changes and in the membrane potential and mitochondrial activity.

**Keywords:** Photodynamic therapy, curcumin, amastigotes, cutaneous leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ulcerações observadas nas manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar .....	19
<b>Figura 2:</b> <i>Leishmania</i> spp. forma promastigota (A) e forma amastigota (B).....	20
<b>Figura 3:</b> Flebotomíneo vetor da Leishmaniose.....	21
<b>Figura 4:</b> Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da LT (A) e distribuição das espécies de <i>Lutzomyia</i> vetores da LT (B) .....	22
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	24
<b>Figura 6:</b> Distribuição Leishmaniose. A- Casos de leishmaniose por município, 2015; B- Densidade de casos de leishmaniose tegumentar por município, 2015. ....	25
<b>Figura 7:</b> Diagrama de Jablonski descrevendo o processo fotoquímico da TFD. ....	29
<b>Figura 8:</b> Espectro de absorção da curcumina, obtido em espectrofotômetro UV-Visível (Denovix DS-11). ....	31
<b>Figura 9:</b> Internalização da curcumina por macrófagos não infectados, macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e macrófagos infectados com <i>L. major</i> nas concentrações de 31,3, 15,6 e 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Setas indicam os núcleos dos macrófagos, enquanto as pontas de seta indicam amastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> internalizados nos macrófagos.....	43
<b>Figura 10:</b> Viabilidade celular por teste de exclusão por Azul de Trypan. (a) macrófagos RAW 264.7 não infectados, (b) macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e (c) macrófagos infectados com <i>L. major</i> . Os valores estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística significativa ( $p\leq 0,01$ ) entre o grupo controle e os outros grupos indicados pelo mesmo símbolo. A linha horizontal representa a comparação com todos os grupos localizados abaixo dela.....	46
<b>Figura 11:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos não infectados. Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.....	48
<b>Figura 12:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. braziliensis</i> . Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.....	50
<b>Figura 13:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. major</i> . Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.....	51
<b>Figura 14:</b> Quantificação da fluorescência de Rho 123 emitida por (a) macrófagos não infectados, (b) macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e (c) macrófagos infectados com <i>L. major</i> . Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística significativa ( $p\leq 0,01$ ) entre os grupos indicados pelo símbolo e o	

controle não irradiado. O símbolo ● representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o grupo irradiado e não irradiado na concentração de curcumina de  $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O símbolo ○ representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o grupo irradiado e não irradiado na concentração de curcumina de  $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O símbolo “ns” indica que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle não irradiado e os grupos abaixo da linha horizontal..... 52

**Figura 15:** Porcentagem de atividade mitocondrial obtida a partir de dosagem de absorbância pós teste de MTT. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o controle não irradiado e os grupos indicados pelo símbolo. .... 54

**Figura 16:** Comparação quantitativa entre os grupos controle e grupos submetidos à TFD com curcumina nas concentrações de  $15,6$  e  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *L. braziliensis* e *L. major*. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os símbolos \* e ● representam diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre os grupos indicados por eles e os controles não irradiados para *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente. .... 56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Divisão de grupos amostrais para desenvolvimento dos experimentos .....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIações

ALA - ácido-5-aminolevulínico

AlPcCl - cloro-alumínio ftalocianina

AlPcOH - hidróxi-alumínio ftalocianina

AM - Azul de metileno

DMEM - Meio Dulbecco's Modified Eagle's

DMSO - Dimetilsulfoxido

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FS - Fotossensibilizador

H2DCF-DA - 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

HMDS - Hexadimetilsilazane

LED – Light Emission Diode (Diodo Emissor de Luz)

LIT – Liver Infusion Triptose (Infusão de triptose e fígado)

LPG - Lipofosfolípidos

LT - Leishmaniose tegumentar

MET - Microscópio Eletrônico de Transmissão

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PpIX - Protoporfirina IX

PSG - Gel secretor de promastigotas

Rho 123 - Rodamina Trimetilada

SFB - Soro fetal bovino

SFM - Sistema Fagocitário Mononuclear

TFD - Terapia Fotodinâmica

ZnPc – Ftalocianina de Zinco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	LEISHMANIOSES .....	18
3.1.1	<i>Agentes Etiológicos</i> .....	19
3.1.2	<i>Vetor</i> .....	21
3.1.3	<i>Ciclo biológico do parasito e fisiopatologia da LT</i> .....	22
3.1.4	<i>Epidemiologia da leishmaniose tegumentar</i> .....	24
3.1.5	<i>Tratamentos e diagnóstico</i> .....	26
3.2	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	28
3.2.1	<i>Fotossensibilizadores</i> .....	30
3.2.2	<i>Curcumina</i> .....	30
3.2.3	Terapia fotodinâmica aplicada no tratamento da LT.....	31
4	JUSTIFICATIVA.....	34
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
5.1	CULTIVO DOS PARASITOS.....	36
5.2	CULTIVO DOS MACRÓFAGOS.....	36
5.3	INTERAÇÃO DOS MACRÓFAGOS RAW 264.7 COM <i>L. braziliensis</i> E <i>L. major</i> .....	36
5.4	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE CURCUMINA.....	37
5.5	APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	37
5.6	INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM LEISHMANIA .....	38
5.7	TESTE DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRYPAN .....	39
5.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	39

5.9	AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE COM RODAMINA TRIMETILADA.....	40
5.11	RECUPERAÇÃO DE <i>Leishmanias</i> APÓS TRATAMENTO COM TERAPIA FOTODINÂMICA .....	41
6	RESULTADOS .....	43
6.1	INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS...	43
6.2	ENSAIO DE VIABILIDADE PELO TESTE DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRYPAN .....	45
6.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 INFECTADOS SUBMETIDOS À TFD COM CURCUMINA.....	48
7	DISCUSSÃO.....	57
8	CONCLUSÃO .....	62
	REFERÊNCIAS .....	63
	ANEXO A - Publicação de artigo .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença típica de países tropicais e comumente presente em ambientes pouco desenvolvidos com população carente, caracterizando-a como uma doença negligenciada (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; GONTIJO; CARVALHO, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) coloca a LT como uma das 10 doenças infecciosas mais importantes do mundo, presente em 92 países, causando danos econômicos e psicológicos nos indivíduos afetados. No mundo estima-se que 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas, e no Brasil foram registrados mais de 95 mil casos nos últimos 5 anos, sendo as regiões Norte e Centro-Oeste as mais afetadas pela doença (DATASUS, 2021; BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O agente etiológico causador da doença é a *Leishmania* spp., parasito com duas formas evolutivas, promastigota presente no intestino do vetor artrópode do gênero *Lutzomyia*, e amastigota que se desenvolve no interior dos macrófagos, células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) humano. Durante o repasto sanguíneo, o vetor regurgita os parasitos na forma promastigota metacíclicos (infecciosos), os quais ao penetrar o tecido cutâneo são fagocitados pelas células do SFM, especialmente macrófagos e células dendríticas. Uma vez fagocitados os promastigotas, estimulados pelo ambiente desfavorável do interior dos macrófagos, adquirem a forma de resistência, amastigotas, na qual conseguem se reproduzir por fissão binária até o rompimento da célula hospedeira, liberando os amastigotas para o tecido e gerando processo inflamatório característico da doença (REY, 2007).

A LT é caracterizada pela presença de ulcerações de bordas elevadas e inflamadas, as quais se espalham pelo corpo, gerando deformações comprometendo a saúde física e mental do paciente. O diagnóstico é feito por pesquisa das células parasitárias no tecido afetado ou por testes imunológicos os quais, muitas vezes, são inconclusivos (ARONSON *et al.*, 2016; STEBUT, 2015).

O tratamento da LT é feito com a administração de antimoniais pentavalentes como o Pentosan® e o Glucantime®, ou até mesmo com a uso de Anfotericina B em casos mais graves, porém nenhum desses medicamentos é efetivo na eliminação do parasito, bem como apresentam diversos efeitos colaterais como náusea, vômitos, distúrbios cardíacos, dentre outros, além de terem restrições para uso por pacientes com problemas cardíacos ou gestantes (ABADIR; PATEL; HAIDER, 2010).

A terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma alternativa para o tratamento convencional da LT, destacando-se por ser não invasiva, não ter restrições de aplicação para os pacientes e não apresentar efeitos colaterais como os medicamentos comumente empregados. A TFD se baseia na inativação das células infectadas por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) oriundas do processo fotoquímico decorrente da interação entre um fotossensibilizador (FS) e luz em um comprimento de onda adequado para excitá-lo (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011; KHATAMI *et al.*, 2007; SNOEK *et al.*, 2008).

Slape e colaboradores em 2019 relataram um caso demonstrando a eficácia da TFD no tratamento de um paciente paquistanês infectado com *Leishmania tropica*. Observou-se a recuperação da lesão após quatro aplicações da TFD utilizando metil-ALA e irradiação pelo tempo de oito minutos em cada lesão, distribuídas em 8 dias de tratamento. Foi possível observar a eliminação do tecido afetado na área lesionada, além da presença de inflamação local que pode ter contribuído para a reconstituição do tecido local (SLAPE *et al.*, 2019).

Uma necessidade relacionada a aplicação da TFD como alternativa terapêutica para a LT é a acessibilidade da terapia, uma vez que a doença é típica de regiões subdesenvolvidas. Para tal, o uso de fontes de luz a base de LEDs é uma interessante alternativa para reduzir os custos do equipamento de aplicação, além disso o uso de FS derivados de compostos naturais e de fácil acesso, como a Curcumina, é uma opção para tornar essa modalidade terapêutica acessível à população mais carente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a resposta da TFD com curcumina sobre a forma amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*, avaliando o efeito fototóxico em co-cultivo com macrófagos, as possíveis alterações de potencial e atividade de membrana mitocondrial, alterações morfológicas e a viabilidade de parasitos recuperados após tratamento.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito fototóxico em amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* em co-cultivo com macrófagos por teste de exclusão por azul de Trypan.
- Avaliar a internalização da curcumina em macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major* por microscopia confocal.
- Avaliar possíveis alterações morfológicas pós-TFD nos macrófagos infectados por microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos após a TFD, utilizando o marcador Rodamina trimetilada por microscopia confocal.
- Avaliar a atividade mitocondrial dos macrófagos infectados após a TFD utilizando teste de MTT.
- Avaliar quantitativamente o crescimento de parasitos recuperados após tratamento.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 LEISHMANIOSES

As infecções determinadas como leishmaníases ou leishmanioses são aquelas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem pela picada de insetos flebotomíneos. Essas patologias afetam o sistema fagocítico mononuclear (SFM), mas, por apresentarem características clínicas diferentes são consideradas doenças distintas, podendo ser divididas em: **Leishmaniose tegumentar**, que produz numerosas lesões cutâneas, ulcerosas ou não; **Leishmaniose muco-cutânea**, que frequentemente apresentam lesões ulcerosas nas mucosas do nariz, boca e faringe; **Leishmaniose Visceral**, caracterizada pelo acentuado tropismo dos parasitos pelo SFM do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides; **Leishmaniose cutâneo-difusa**, uma forma tardia e não-ulcerosa da doença, que se apresentam em indivíduos anérgicos aos antígenos parasitários (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017)

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é considerada uma doença endêmica em mais de 92 países, dentre os quais o Brasil que apresenta a maior prevalência da doença. Apesar das manifestações clínicas da LT apresentarem geralmente ulcerações benignas, ela pode causar mal-estar nos âmbitos psicológico e social, visto que pode desfigurar os indivíduos infectados, comprometendo sua convivência e trabalho (FABER *et al.*, 2012; BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

ZAps algumas semanas de infecção, o paciente desenvolve um pequeno nódulo que progride para uma ulceração com bordas elevadas (Figura 1). Na maioria dos pacientes que não são imunologicamente comprometidos a recuperação ocorre entre 6 e 18 semanas, porém em algumas lesões atípicas podem ocorrer lesões com eritemas e eczemas (STEBUT, 2015).

**Figura 1:** Ulcerações observadas nas manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.



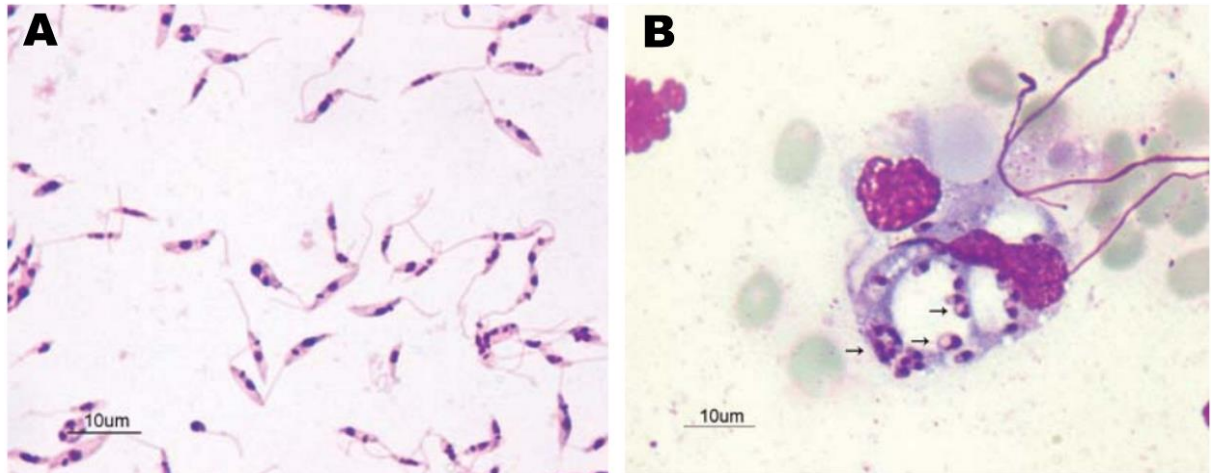
**Fonte:** Manual de Vigilância Epidemiológica LT, (2017).

### 3.1.1 Agentes Etiológicos

O agente etiológico causador da leishmaniose é um protozoário, unicelular, pertencente a classe *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*. Esse parasito é caracterizado por apresentar duas formas durante seu ciclo evolutivo, uma forma amastigota, quando estão no interior das células do hospedeiro vertebrado, e uma forma promastigota, que se desenvolve no interior do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (insetos flebotomíneos) (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

As formas promastigotas (Figura 2-A) são evidenciadas pela característica fusiforme das células, contendo flagelo aparente. Já as formas amastigotas (Figura 2-B), são morfológicamente caracterizadas por formato ovalado, medindo entre 3 a 6,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e não apresentam flagelo livre, isso porquê o mesmo encontra-se dentro da bolsa flagelar do parasito (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; OPAS, 2019).

**Figura 2:** *Leishmania* spp. forma promastigota (A) e forma amastigota (B)



Fonte: (OPAS, 2019).

As espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem estão divididas em alguns complexos de acordo com suas principais características. Dentre elas, se destacam o complexo *L. braziliensis* da região neotropical da América, parasitos com cerca de 2,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro na fase amastigotas que não tendem a invadir tecidos viscerais ou nasofaríngeos, porém apresentam alta tendência à metástase. O complexo de Leishmaníases cutâneas do velho mundo é caracterizada por infecções locais sem metástase e inclui espécies como *L. major*, comumente utilizada em pesquisas científicas acerca do tema (AOUN; BOURATBINE, 2014; PALUMBO, 2009; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017)

Para que esses parasitos possam sobreviver no inóspito ambiente intracelular dos macrófagos, foram necessários mecanismos evolutivos que permitiram tal adaptação. Dentre as estratégias encontradas, pode-se destacar a expressão de moléculas na superfície celular, denominadas LPG (lipofosfoglicanos) e a metaloprotease gp63, que protegem o parasito das enzimas hidrolíticas do macrófago. Além disso, adaptações que permitem adesão ao intestino do vetor, migração das formas promastigotas para a cavidade bucal do inseto e a secreção PSG (*promastigote secretory gel*) que facilita a transmissão dos parasitos para o hospedeiro vertebrado são fundamentais para a sobrevivência e transmissão do parasito (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

### 3.1.2 Vetor

O hospedeiro invertebrado vetor das leishmanioses nas Américas (Figura 3), popularmente conhecido como “mosquito-palha”, “birigui” ou “cangalinha”, é um díptero da família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*. Cerca de 30 espécies de *Lutzomyia* são vetores da leishmaniose, sendo as espécies *Lutzomyia whitmaní*, *L. wellcomei*, *L. pessoai*, *L. intermedia*, *L. umbratilis* e *L. flaviscutellata* as principais encontradas no Brasil (NEVES *et al.*, 2005; PETERSON; SHAW, 2003; STEBUT, 2015).

Os flebotomíneos geralmente transmitem a leishmaniose em áreas de floresta e suas proximidades. Entretanto, é comum encontrar esses mosquitos em áreas de habitação humana, uma vez que eles podem se reproduzir em lixo orgânico como esterco, fezes, e dejetos de roedores (ORYAN; AKBARI, 2016).

**Figura 3:** Flebotomíneo vetor da leishmaniose

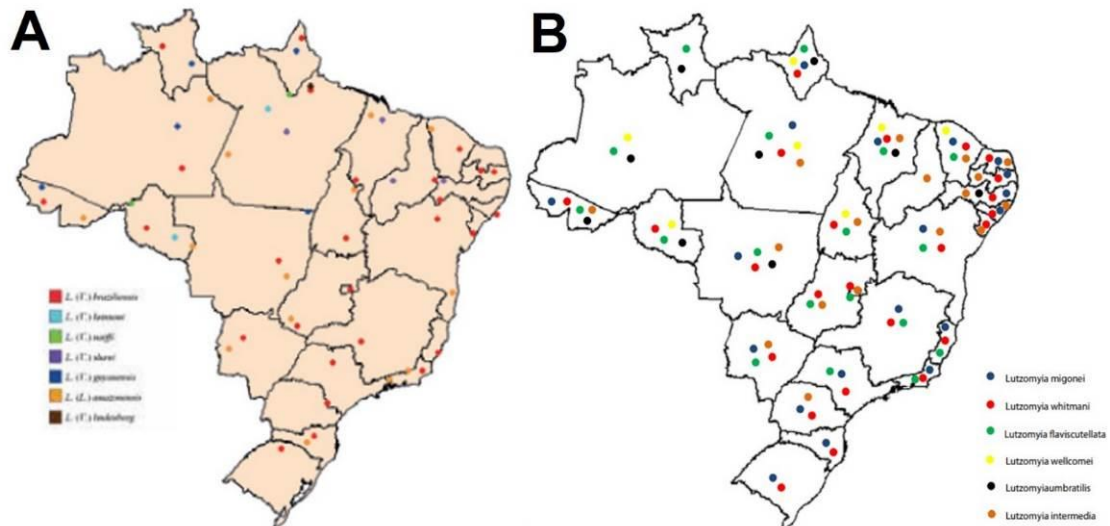


**Fonte:** Stebut (2015)

Esses insetos são tipicamente encontrados em regiões tropicais onde a temperatura, geralmente, não chega a valores inferiores a 10°C, portanto, sua distribuição inclui principalmente a América. Porém, considerando que a presença desses vetores é afetada por temperatura, precipitação, umidade, entre outros, as alterações climáticas decorrentes do aquecimento global podem expandir a distribuição geográfica desses mosquitos, aumentando a probabilidade da transmissão de doenças como as leishmanioses. No Brasil, como demonstrado na figura 4, as espécies de *Lutzomyia* se distribuem por todo território nacional, bem

como as espécies de *Leishmania* causadoras da LT (MCMICHAEL *et al.*, 2003; STEBUT, 2015).

**Figura 4:** Distribuição de espécies de *Leishmania* causadoras da LT (A) e distribuição das espécies de *Lutzomyia* vetores da LT (B)



**Fonte:** Adaptado de Brasil. Ministério da Saúde (2017).

### 3.1.3 Ciclo biológico do parasito e fisiopatologia da LT

A infecção por *Leishmania* ocorre quando a fêmea do flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, regurgita as formas promastigotas do parasito no tecido cutâneo do hospedeiro vertebrado, processo favorecido pela presença de vasodilatadores produzidos pelo inseto. Na pele são encontradas algumas células do sistema imune como linfócitos, macrófagos, células de Langerhans e mastócitos. Os parasitos, por sua vez, têm a propriedade de aderirem à membrana dessas células, sendo fagocitados para o meio intracelular das células de defesa (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Uma vez fagocitados, os parasitos passam por mudanças bioquímicas e estruturais que os diferenciam numa forma de resistência, a forma amastigota. Nos macrófagos, as amastigotas ficam separadas do citoplasma celular, dentro de um vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam por fissão binária até que se rompa a membrana celular dos macrófagos, liberando as amastigotas no meio, onde serão novamente fagocitados. Essa situação demonstra que a *Leishmania* apresenta

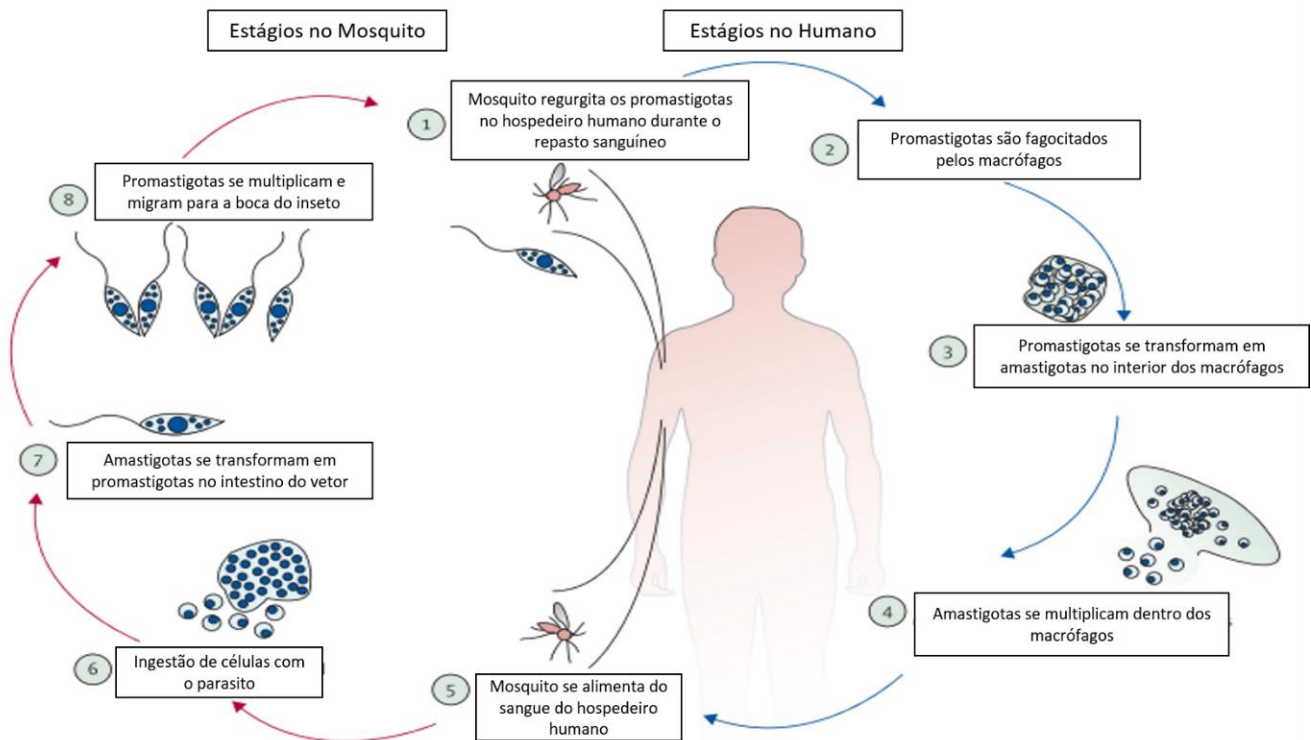
diversas modificações evolutivas que garantem sua sobrevivência ao inóspito ambiente intracelular das células de defesa humanas (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

O processo inflamatório desencadeado pela resposta imune celular decorrente da infecção do parasito gera as diversas lesões cutâneas observadas na manifestação clínica típica da LT, bem como a gravidade da doença está relacionada com a intensidade dessa resposta imune. Além disso, algumas células parasitárias podem atingir linfonodos, onde sofrem modificações que permitem sua migração pelo tecido (REITHINGER *et al.*, 2007).

Ao ingerir sangue de um hospedeiro infectado com a *Leishmania*, o flebotomíneo ingere as amastigotas livres e internalizadas nos macrófagos, que chegam até o intestino do inseto. As amastigotas tornam-se promastigotas procíclicas, que se multiplicam por fissão binária, aumentando seu número. As promastigotas procíclicas sofrem alterações morfológicas e metabólicas, produzindo moléculas como os lipofosfoglicanos (LPG) que permitem a migração dos mesmos até a parte anterior do tubo digestivo do vetor, tornando-se infectivas. Esse processo é denominado metaciclogênese (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A fêmea flebotomíneo, uma vez infectada pode, durante o próximo repasto sanguíneo, transferir os parasitos presentes em sua cavidade bucal para um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo do protozoário (Figura 5) (REITHINGER *et al.*, 2007).

**Figura 5:** Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*.



**Fonte:** Adaptado de Reithinger *et al.*, (2007).

### 3.1.4 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar

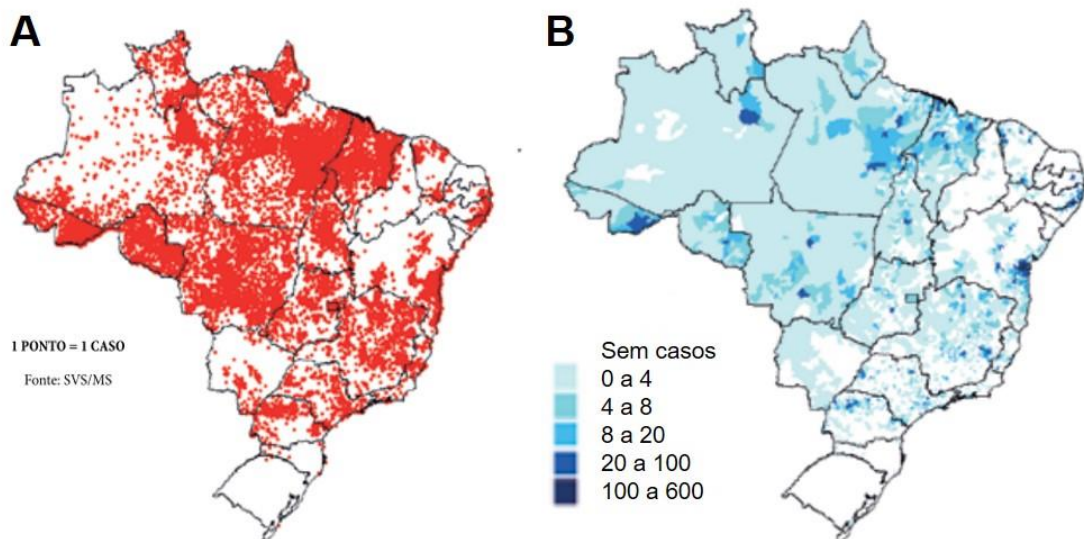
A leishmaniose tegumentar (LT) é considerada um problema de saúde pública em 92 países, distribuídos nos continentes da América, Europa, África e Ásia, com cerca de 700 mil a 1,3 milhão de novos casos ao ano. A LT é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das dez mais importantes doenças infecciosas, pelo alto índice de detecção e produção de deformidades nos pacientes acometidos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) pelo informe epidemiológico de leishmanioses, datado de dezembro de 2020, a América do Sul notifica uma média de 54.108 casos por ano, considerando os últimos 20 anos. No ano de 2019, último ano avaliado pelo informe, o Brasil foi o país com o maior número absoluto de casos notificados, totalizando 15.484 novos casos. A OPAS destaca como pontos de foco o diagnóstico laboratorial da LT e a completa cura e recuperação de indivíduos acometidos pela doença, a fim de obter redução de mortes em mais de 90% até 2022 (OPAS, 2020).

A LT é uma das mais importantes afecções dermatológicas, visto sua magnitude e o risco de produzir deformidades que causam envolvimento psicológico e reflexos no campo social e econômico, uma vez que também pode ser considerada uma doença ocupacional. Ainda, considerando que essa é uma doença negligenciada, frequente em países pobres e em desenvolvimento, o acometimento pela doença tende a ser na população mais carente de determinada região, visto que o acesso a condições de habitação e saneamento impactam diretamente na prevalência da doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Segundo o Manual de Vigilância da leishmaniose Tegumentar, no Brasil foram registrados uma média anual de 25,7 mil novos casos, cerca de 14,7 casos/100 mil habitantes. Nos últimos 15 anos a LT expandiu sobre o território brasileiro, causando ampla dispersão por todos os estados (Figura 6). Segundo a base de dados do DATASUS, entre 2013 e 2017 foram notificados 95.390 casos de leishmaniose tegumentar em todo o país, dentre os quais estão principalmente nos estados do Pará, Bahia, Mato Grosso, Amazonas e Maranhão e sendo os municípios de Pres. Tancredo Neves na Bahia e Manaus no Amazonas os primeiros em número de notificações de casos de leishmaniose tegumentar (DATASUS, 2021; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

**Figura 6:** Distribuição leishmaniose. A- Casos de leishmaniose por município, 2015; B- Densidade de casos de leishmaniose tegumentar por município, 2015.



**Fonte:** Adaptado de Brasil. Ministério da Saúde. (2017). Modificado.

Um dos principais fatores relacionados a incidência das leishmanioses é a situação econômica das regiões afetadas. Baixa renda *per capita*, baixa qualidade das moradias, além da defasagem do sistema sanitário de regiões periurbanas, são agravantes que tendem a aumentar os índices de prevalência da doença, reafirmando a característica de doença negligenciada da LT, que afeta principalmente indivíduos de baixa renda em países pobres ou emergentes como Brasil, Colômbia, Afeganistão, Peru e Bolívia (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2018) .

### 3.1.5 *Tratamentos e diagnóstico*

A principal dificuldade do diagnóstico das leishmanioses está na sintomatologia clínica que, muitas vezes, é pouco específica para doença, além de apresentar ampla gama de manifestações clínicas, podendo ser mais ou menos severas em cada caso. Ulcerações na pele, nódulos não ulcerosos, inflamações em mucosas, bem como infecções disseminadas no caso da leishmaniose visceral, podem ser alguns dos sintomas (BHARGAVA; SINGH, 2012).

As leishmanioses podem ser diagnosticadas a partir de testes clínicos e laboratoriais, avaliando-se a anamnese do paciente, característica das lesões e dados epidemiológicos da região onde o paciente se encontra, porém, o diagnóstico final é sempre quando se encontra o parasito em material isolado das lesões ou por testes imunológicos. Para obtenção do material das lesões é realizado escarificação, aspiração ou biopsia das bordas das ulcerações típicas da doença, ou ainda, cultivo de fragmentos do tecido lesionado em meios de cultura próprios para o crescimento do parasito, evidenciando sua presença (BHARGAVA; SINGH, 2012; RANAWAKA; ABEYGUNASEKARA; WEERAKOON, 2012).

A resposta imune contra a *Leishmania* pode ser avaliada utilizando o teste de Montenegro, que consiste na injeção de um antígeno derivado do parasito que serve para detectar a imunidade do paciente dentro de 48 a 72 horas, porém esse teste não diferencia se o paciente está com a infecção no momento do teste ou se o paciente já não está infectado e apenas imunizado. Além disso, a reação que ocorre nesse teste cutâneo pode ser apenas um marcador parcial para leishmaniose, ou seja, pode resultar em número elevado de falsos negativos (HANDLER *et al.*, 2018).

O diagnóstico molecular da leishmaniose seria a técnica mais sensível para a detecção da infecção pelo parasito. A partir de técnicas como PCR e PCR em tempo real, pode-se detectar pequenas quantidades de DNA da *Leishmania*, obtendo uma sensibilidade e especificidade muito maior que os testes já mencionados. A limitação dessas técnicas moleculares ainda se encontra na dificuldade de se obter preço acessível para os testes e, uma vez que a doença é comum em países pobres, esse investimento é muito defasado (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Os antimotinais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses devido sua baixa acumulação tecidual e rápida excreção via sistema renal. Antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio são os antimoniais mais comuns utilizados, porém ambos apresentam toxicidade, além da necessidade de longos períodos de tratamento e, por vezes, não são suficientes para promover a cura do paciente, principalmente em casos de indivíduos imunodeprimidos ou com tratamento descontinuado (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006; MAYRINK *et al.*, 2006).

Apesar do seu amplo emprego no tratamento das leishmanioses, os antimoniais apresentam diversos efeitos colaterais que limitam sua utilização ou comprometem a recuperação do paciente. Efeitos colaterais como náuseas, vômitos, mialgia, alterações cardíacas são frequentemente reportadas. Nesses casos, geralmente pode-se administrar as pentamidinas ou até mesmo a Anfotericina B na tentativa do controle da doença, porém ambos os tratamentos podem não apresentar resultados relevantes (MINODIER; PAROLA, 2007; SANTOS *et al.*, 2008).

A Miltefosina é um medicamento que foi inicialmente utilizado para o tratamento do câncer, porém vem sendo aplicado no tratamento de leishmanioses. Apesar de ainda não ter sido totalmente elucidado, o mecanismo de ação do composto pode estar relacionado com a promoção de alterações nos lipídios de membrana e na função mitocondrial das espécies de *Leishmania* (DORLO *et al.*, 2012). O estudo promovido por Ware e colaboradores em 2021 demonstrou uma taxa de cura de 77% dos 26 pacientes tratados com Miltefosina. Apesar da taxa de cura observada, efeitos adversos do uso do medicamento foram comuns, como sintomas gastrointestinais, principalmente náusea, perda de apetite e vômito. Além disso, também foram encontradas alterações laboratoriais durante o tratamento,

como elevados níveis de creatinina e alterações nos níveis de transaminases, mas que regrediram após o término do uso contínuo da droga (WARE *et al.*, 2021).

Visto as limitações dos tratamentos convencionais para a leishmaniose, terapias alternativas têm sido estudadas para atuar como substitutivas ou adjuvantes à prescrição de tratamento convencional. A terapia fotodinâmica (TFD) se destaca nesse cenário por ser uma terapia com um baixo custo relativo de implementação, a facilidade da aplicação da técnica, podendo ser utilizada por diversos profissionais da saúde e, além disso, em comparação com o tratamento convencional da LT, a TFD destaca-se por não apresentar efeitos colaterais sistêmicos, uma vez que sua aplicação pode ser tópica e seletiva (COPELAND; ARONSON, 2015; MINODIER; PAROLA, 2007).

### 3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

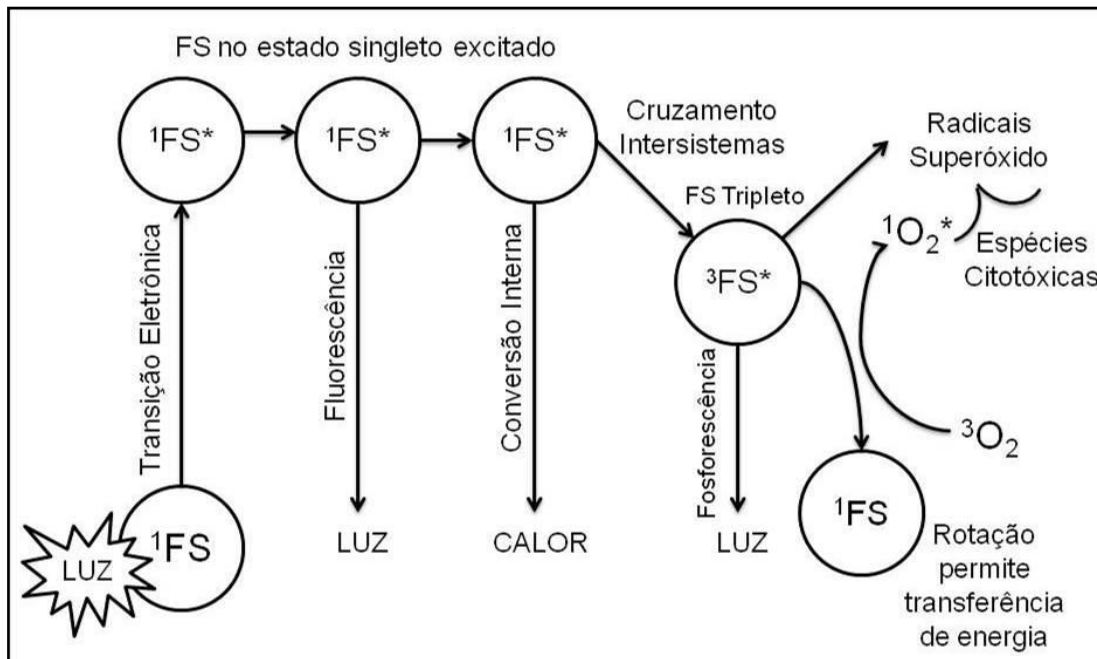
A TFD consiste na interação entre um fotossensibilizador (FS), luz visível em comprimento de onda adequado e oxigênio molecular, que interagem num processo fotoquímico capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO's) como o oxigênio singlete e hidroxilas, compostos altamente reativos com biomoléculas constituintes das células como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, podendo induzir a inativação das mesmas (DA HORA MACHADO, 2000; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

A TFD foi inicialmente estudada por Raab e Hermann von Tappeiner em 1900 e, de acordo com seus achados, microrganismos quando submetidos à luz após interação com determinados corantes eram destruídos em pouco tempo, diferente daqueles organismos que eram apenas expostos à luz ou apenas tratados com o corante. Dessa forma, os pesquisadores observaram que a inativação encontrada deveria estar relacionada à interação da luz com o corante (DA HORA MACHADO, 2000; WAINWRIGHT, 2012).

O processo fotoquímico da TFD pode ocorrer por dois mecanismos, reações do tipo 1 e reações do tipo 2, onde as transformações e transferência de energia estão representadas pelo diagrama de Jablonski exposto na Figura 7. Após absorver a energia cedida pela luz em comprimento de onda adequado, o FS alcança um estado energético chamado estado singlete excitado, e nesse estado pode perder energia na forma de luz, calor ou chegar a outro estado energético, o estado tripleto, após sofrer cruzamento intersistemas. O FS tripleto pode transferir elétrons ao

substrato gerando radicais superóxidos, que por sua vez podem formar espécies reativas como íons hidroxila, caracterizando uma reação do tipo 1, ou ainda interagir com o oxigênio tripleto molecular, transferindo energia e dessa forma gerar oxigênio singleto, mecanismo característico das reações do tipo 2 (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

**Figura 7:** Diagrama de Jablonski descrevendo o processo fotoquímico da TFD.



**Fonte:** Adaptado de Castano; Demidova e Hamblin (2004).

A TFD destaca-se por ser uma terapia minimamente invasiva, apresentar poucos efeitos colaterais e possibilidade de ser aplicada topicamente, principalmente para lesões de pele causadas por microrganismos ou cânceres superficiais (KÜBLER, 2005; PLAETZER *et al.*, 2013).

As fontes de luz empregadas na TFD são as mais variadas. Dentre elas, destacam-se os lasers, lâmpadas de amplo espectro, dispositivos à base de diodo (LED), e até mesmo a luz solar, sendo a escolha do tipo de fonte de luz dependente da localização da lesão de interesse, da quantidade de energia que se pretende aplicar no local e das características do FS (BRANCALEON; MOSELEY, 2002; TOMAZINI *et al.*, 2007).

### 3.2.1 Fotossensibilizadores

O FS é um composto capaz de absorver fótons ao interagir com a luz, e a escolha desse composto depende do tipo de tecido que será o alvo da terapia, das características físico-químicas e da cinética e distribuição do composto pelo organismo do paciente. Um FS ideal deve apresentar características como hidrossolubilidade, alta absorção de luz dentro do espectro visível e de preferência em comprimentos de onda que apresentem boa penetração no tecido, baixa citotoxicidade no escuro, baixa taxa de agregação em soluções, além de apresentar mínimo ou nenhum efeito adverso ao paciente. Tais características garantem que o FS poderá desempenhar seu papel sem causar grandes efeitos colaterais durante o tratamento (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Alguns compostos utilizados na TFD funcionam como precursores de compostos fotossensíveis, como o ácido-5-aminolevulínico (ALA) e o metil-ALA, que são precursores da Protoporfirina IX (PpIX) capaz de absorver a energia da irradiação, porém esse composto pode apresentar limitação quando aplicado no tratamento das leishmanioses, uma vez que a PpIX não apresenta grande acumulação nos parasitos intracelulares em co-cultivo com macrófagos (LECHUGA; PEREIRA; BOURGUIGNON, 2019; MATEUS; VALDIVIESO; HERNÁNDEZ, 2014).

Em 1990, o derivado de hematoporfirina conhecido comercialmente como Photofrin® foi o primeiro FS utilizado na aplicação clínica da TFD, sendo esse um composto da primeira geração de FS. Já a segunda geração desses compostos concentrou-se as clorinas, que possuem estrutura semelhante às porfirinas, mas com modificações que beneficiam sua solubilização. Ainda dentro da segunda geração de FS encontram-se as ftalocianinas, que agem em baixíssimas concentrações, e os fenotiazínicos, corantes amplamente acessíveis e usuais, porém que apresentam certa toxicidade no escuro (ORMOND; FREEMAN, 2013).

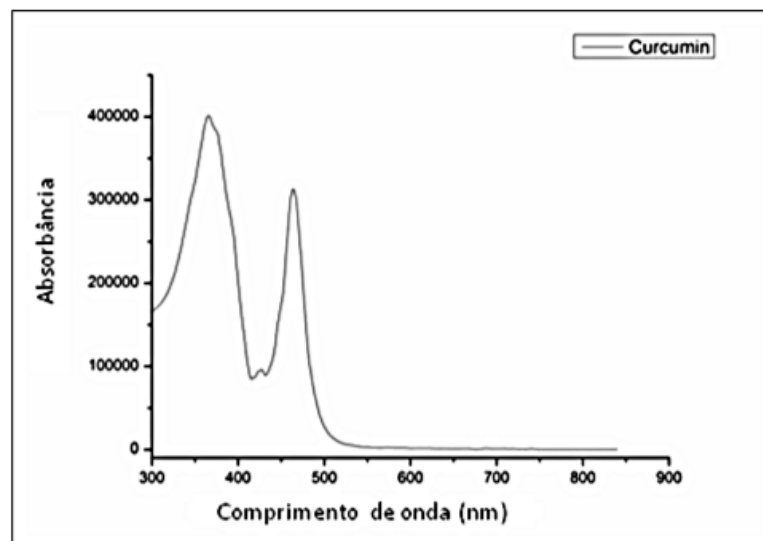
### 3.2.2 Curcumina

A curcumina é um pigmento alaranjado extraído da raiz do açafrão da terra (*Curcuma longa*) e suas propriedades médicas vêm sendo estudadas há mais de dois séculos. Dentre as aplicações, destacam-se as propriedades anticancerígenas,

de controle de microrganismos e o caráter anti-oxidativo e anti-inflamatório desse composto que vem sendo estudado inclusive como alternativa no tratamento do Alzheimer (LEITE *et al.*, 2014; PRIYADARSINI, 2014; VENIGALLA; GYENGESI; MÜNCH, 2015).

O espectro de absorção de luz da curcumina exibe picos entre comprimentos de onda de 300 nm e 400 nm e entre 430 e 500 nm (Figura 8), sendo esse último o de interesse para aplicação da TFD com curcumina. Comprimentos de onda menores são considerados mais energéticos em comparação a outros frequentemente utilizados na TFD, como 660 nm (clorinas) e 630 nm (pofirinas), porém apresentam menor penetração no tecido. Uma vez que as lesões causadas pela LT são tipicamente superficiais, essa característica não seria uma limitação para o tratamento com a TFD.

**Figura 8:** Espectro de absorção da curcumina, obtido em espectrofotômetro UV-Visível (Denovix DS-11).



**Fonte:** Pinto (2016).

### 3.2.3 Terapia fotodinâmica aplicada no tratamento da LT

A TFD tem sido pesquisada como tratamento alternativo para diversos tipos de infecções superficiais de pele e boca, por sua facilidade em inativar bactérias patogênicas que, geralmente, são resistentes ao tratamento atual (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009). Além disso, destaca-se por ser uma terapia no combate ao câncer, uma vez que os tratamentos convencionais, como a quimioterapia e

radioterapia, apresentam diversos efeitos colaterais (LIU; MENG; BU, 2019; WU; MINAMIDE; YANO, 2019).

Nesse mesmo cenário, a TFD tem sido interessante alternativa no tratamento da LT, visto que é uma doença em que o tratamento convencional conta com diversas restrições, presença de efeitos colaterais e, muitas vezes, não apresenta adequada efetividade na eliminação do parasito. Oliveira e colaboradores, em 2017, observaram redução de 62% de macrófagos infectados após 48 horas de infecção nos grupos submetidos à TFD com azul de metileno, demonstrando que a terapia pode diminuir significativamente a quantidade de células infectadas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A TFD aplicada no tratamento da LT têm se utilizado de diversos tipos de FS, como as clorinas, corantes fenotiazínicos e ftalocianinas (PINTO *et al.*, 2017; PINTO; PACHECO-SOARES; MITTMANN, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Nesi-Reis e colaboradores, em 2017, realizaram estudo, *in vitro*, para avaliar a resposta de promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses* à TFD com cloro-alumínio ftalocianina (AIPcCl) e hidróxi-alumínio ftalocianina (AIPcOH). Obtiveram redução significativa na viabilidade dos parasitos com os dois FS testados e, além disso, não encontraram citotoxicidade desses compostos contra os macrófagos não infectados indicando a possibilidade do uso dessas ftalocianinas no tratamento da LT (NESI-REIS *et al.*, 2017). Enquanto os estudos de Pinto e colaboradores em 2017 (PINTO *et al.*, 2017), e em 2016 (PINTO *et al.*, 2016a) obtiveram inativação de promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis*, *in vitro*, utilizando azul de metileno e clorina e6, respectivamente, demonstrando o potencial desses FS como possíveis opções para a TFD contra a LT.

Sbeghen e colaboradores em 2015 compararam a resposta de hamsters infectados com *L. braziliensis* à TFD com azul de metileno intradérmico, TFD com azul de metileno aplicado topicamente e tratamento com Anfotericina B. Os resultados demonstraram que a TFD com AM tópico foi capaz de promover a diminuição da extensão das lesões da mesma forma que o tratamento com Anfotericina B e, além disso, promoveu recuperação do tecido lesionado estimulando a reconstrução do epitélio e a formação de fibras colágenas (SBEGHEN *et al.*, 2015).

A TFD não precisa ser necessariamente uma terapia substitutiva para o tratamento convencional da LT, já que ela pode ser combinada com o tratamento

convencional. Estudos desenvolvidos por Ribeiro e colaboradores em 2016 e 2019, demonstraram eficácia da TFD utilizando cloro-alumínio ftalocianinas lipossomais quando associadas a Miltefosina e a N-metil glucamina (composto utilizado na formulação da Miltefosina). O tratamento combinado nesses trabalhos, foi capaz de reduzir a carga parasitária, promover recuperação do local da lesão, e ainda não foi observada reinfecção pelos parasitas 60 dias após o tratamento, indicando que os parasitos não se multiplicaram novamente (RIBEIRO *et al.*, 2016, 2019).

Apesar dos estudos promissores com a TFD, é importante que se busque por opções para baratear essa terapia, uma vez que a leishmaniose ocorre tipicamente em locais de subdesenvolvimento, infectando pacientes pobres e carentes. Portanto, tornar a TFD mais acessível à população carente é de fundamental importância para sua incorporação como modalidade terapêutica e para utilizá-la como tratamento para LT (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; STAHL *et al.*, 2018). A curcumina surge como uma opção de FS para esse cenário, visto que é um composto natural, de fácil acesso e têm apresentado resultados promissores na desinfecção bacteriana, principalmente de bactérias bucais cariogênicas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2014; PASCHOAL *et al.*, 2013). Porém, as pesquisas com esse composto aplicadas a leishmaniose ainda são muito escassas, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que abordem essa temática.

## 4 JUSTIFICATIVA

O tratamento convencional para a LT tem apresentado diversos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, mialgia e acometimento cardíaco, tornando a necessidade do desenvolvimento de tratamentos alternativos para o tratamento da doença. Além disso, deve-se levar em consideração a limitação do tratamento via antimoniais para pacientes com doença cardíaca e gestantes (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006; KHATAMI *et al.*, 2007).

Outro ponto agravante em relação a LT está no caráter desfigurante das lesões causadas. Essa situação tem impacto direto na qualidade de vida e bem-estar físico e mental do paciente acometido que, em muitas situações, pode deixar de trabalhar em decorrência da doença, sendo possível considerá-la também uma patologia que causa limitações ocupacionais (REITHINGER *et al.*, 2007).

Como consequência provocada pelo aquecimento global, a presença do vetor da LT tem sido cada vez mais abrangente no território nacional. Com as altas temperaturas que perduram pela maior parte do ano, o mosquito pôde atingir áreas anteriormente livres do vetor. Dessa forma, poderão existir cada vez mais regiões endêmicas para essa doença, aumentando consideravelmente o número de casos espalhados por todo o país (GRADONI, 2018).

A LT está diretamente relacionada à pobreza das regiões afetadas. A doença é considerada uma doença negligenciada, portanto, tende a afetar a parcela mais pobre da população que têm mais dificuldades para se manter no mercado de trabalho depois do acometimento da doença. Baixo acesso a serviços de saúde, precariedade no saneamento básico e baixo poder aquisitivo das famílias acometidas são exemplos de situações que estão ligadas à incidência da doença. Pesquisas que procurem oportunizar o acesso ao diagnóstico e tratamento da LT são fundamentais para o controle e minimização dos impactos sociais e econômicos causados pela doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; OKWOR; UZONNA, 2016; SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2018).

A TFD pode ser interessante alternativa no tratamento da LT, considerando que não apresenta efeitos colaterais como o tratamento convencional feito por antimoniais pentavalentes. Além disso, pode-se citar que a TFD pode ser um tratamento de fácil acesso, uma vez que os equipamentos a base de LEDs têm barateado a aplicação e democratizado o acesso a essa modalidade terapêutica.

Estudos têm relatado resultados promissores da TFD combinada com tratamento convencional, reduzindo as doses de medicamentos que normalmente são administradas nos pacientes. Nesse contexto, a TFD utilizando a curcumina como FS pode ser ainda mais interessante, uma vez que o baixo valor de aquisição do composto e a facilidade na extração e isolamento da curcumina, sendo um processo que pode ser realizado no próprio país, sem a necessidade de complexos processos de síntese bem como necessidade de importação do FS pode contribuir para o acesso a terapia.

Outra característica importante para a diminuição do custo da TFD é a utilização de compostos baratos e acessíveis para serem utilizados como FS, tendo se destacado o Azul de Metileno (AM) e a Curcumina nesse cenário (*OLIVEIRA et al., 2017; PINTO et al., 2017*).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, especificamente no Laboratório FOTOBIO, responsável Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira Strixino, Laboratório de Dinâmica e Compartimento Celular, responsável Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristina Pacheco Soares, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, responsável Prof. Dr. Newton Soares da Silva e Central de Laboratórios Multiusuários.

### 5.1 CULTIVO DOS PARASITOS

As cepas utilizadas para o trabalho foram *L. braziliensis* M2904 e *L. major* LV39. O cultivo foi realizado inicialmente com a manutenção das formas promastigotas dos parasitos, mantendo-os em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB), 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina, 2 mM de Glutamina, 1% de Urina e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> de Hemina e repicados semanalmente de acordo com a fase logarítmica de crescimento.

### 5.2 CULTIVO DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos de camundongo 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>.

### 5.3 INTERAÇÃO DOS MACRÓFAGOS RAW 264.7 COM *L. braziliensis* E *L. major*

O processo de infecção dos macrófagos foi realizado pela interação dos promastigotas de *Leishmania* com os macrófagos, na proporção de 10:1 parasitos por célula. Inicialmente foram contados e transferidos 1x10<sup>4</sup> macrófagos por poço em placas de 24 ou 96 poços, deixando para adesão, por 12 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período foi realizada a contagem dos parasitos e

adicionados  $1 \times 10^5$  promastigotas por poço contendo macrófagos, e o período de internalização foi de 24 horas em estufa  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Por fim, a avaliação da internalização foi feita por visualização em microscópio invertido Zeiss Axio Vert. A1.

#### 5.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE CURCUMINA

Foi preparada uma solução estoque de Curcumina diluída em DMSO/Álcool na concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As soluções de uso experimental foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em solução salina tamponada com fosfato (PBS), mantendo uma proporção de DMSO nas soluções de trabalho menor do que 1%.

#### 5.5 APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Para aplicação do tratamento, os grupos experimentais foram divididos de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1:** Divisão de grupos amostrais para desenvolvimento dos experimentos

<b>Grupos amostrais</b>			
<b>Curcumina (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>		<b>Curcumina (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	
S/ Curcumina (Controle)		s/ Curcumina (LED)	
Não irradiado	500		500
	250	Irradiado	250
	125	10 $\text{J/cm}^2$	125
	62,5		62,5
	31,3		31,3
	15,6		15,6
	7,8		7,8

**Fonte:** O autor.

Os grupos experimentais apresentados foram realizados em três situações distintas, na primeira situação foram avaliados apenas os macrófagos não infectados, na segunda os macrófagos infectados com *L. braziliensis* e na terceira, macrófagos infectados com *L. major*. Essa divisão foi reproduzida para todos os

testes realizados, com exceção da avaliação morfológica, onde foram selecionadas apenas três concentrações de curcumina que apresentaram baixa citotoxicidade no escuro e inativação dos macrófagos quando irradiados.

Os grupos amostrais foram dispostos em duas placas de 96 poços, uma placa irradiada e outra não irradiada, adicionando número de macrófagos RAW 264.7 e de parasitos como descritos na sessão 5.3. Após período de incubação necessário para infecção dos macrófagos, foi retirado o meio de cultura e adicionada solução de curcumina nas concentrações descritas, sendo que para àqueles grupos sem fotossensibilizador foram adicionados mesmo volume de PBS. Procedeu-se incubação 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 para a placa irradiada e meio DMEM para placa não irradiada. A irradiação foi realizada utilizando dispositivo a base de 48 LED's, Biotable Irrad/LED450 (Biopdi), 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 4 minutos e 38 segundos.

Após a aplicação da TFD, foi retirado o sobrenadante de PBS e adicionado o mesmo volume de meio DMEM, como realizado para a placa não irradiada. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas antes das análises.

Para assegurar a confiabilidade dos resultados, foram realizados três experimentos independentes em triplicata, além dos grupos amostrais estarem protegidos da luz durante todo o processo para minimizar as possíveis variações causadas pela iluminação ambiente.

Como forma de se obter um controle da resposta apenas dos macrófagos ao tratamento, foram conduzidos experimentos apenas com células RAW 264.7 não infectadas com *Leishmanias*, preservando todos os grupos amostrais citados.

## 5.6 INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM LEISHMANIA

Inicialmente foram adicionados 1x10<sup>5</sup> macrófagos RAW 264.7 sobre lamínulas de vidro colocadas em placas de 24 poços, sendo incubados durante 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, em alguns poços foram adicionados 1x10<sup>6</sup> parasitos, mantendo grupos de macrófagos não infectados, macrófagos

infectados com *L. braziliensis* e macrófagos infectados 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 foi adicionada curcumina nas concentrações de 31,2, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A incubação com curcumina foi de 1 hora, seguida de uma lavagem com PBS e fixação com Paraformaldeído 4% durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação as lamínulas foram novamente lavadas com PBS e montadas em lâminas de vidro. A análise foi realizada utilizando microscópio confocal Zeiss LSM 700 com excitação em 405 nm e captação em 450 nm.

### 5.7 TESTE DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRYPAN

O teste de exclusão por azul de Trypan é uma técnica utilizada para avaliar o número de células vivas e mortas após determinado tratamento. Baseia-se fundamentalmente na propriedade das células vivas conseguirem expulsar o corante utilizado, enquanto as células mortas perdem a propriedade seletiva de membrana e tendem a acumular o composto no meio intracelular.

O procedimento foi realizado a partir da interação dos grupos amostrais, 18 horas após a aplicação da TFD, com solução de Azul de Trypan 0,2% e incubação de cinco minutos. Após esse tempo a solução foi retirada e adicionado PBS. Posteriormente, os grupos foram avaliados contando o número de macrófagos vivos e mortos em 10 campos aleatórios diferentes para cada poço. Para tal foi utilizado o microscópio invertido Zeiss Axio Vert. A1.

### 5.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Das concentrações de Curcumina avaliadas no teste de viabilidade, foram utilizadas as três menores para avaliação do aspecto morfológico dos macrófagos após TFD.

Para a avaliação em MEV, o procedimento de infecção dos macrófagos foi realizado em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de vidro estéreis. Procedeu-se a aplicação da TFD e posteriormente os grupos foram fixados com Paraformaldeído 2,5% diluído em PBS e pH 7,4. Após a fixação e pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio, foi realizada a desidratação, imergindo as lamínulas

por 10 minutos sucessivamente em banhos de etanol a 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, sendo esse último repetido por duas vezes. Para finalizar o procedimento foi adicionada uma gota de Hexadimetilsilazane (HMDS), seguido de secagem em temperatura ambiente.

Antes da visualização das lâminas foi realizada metalização das lamínulas com ouro, seguindo da análise utilizando microscópio eletrônico de varredura ZeissEVO MA 10.

### 5.9 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE COM RODAMINA TRIMETILADA

A Rodamina Trimetilada (Rho 123) é um corante catiônico verde-fluorescente que tende a se acumular nas mitocôndrias presentes nas células sem causar efeito citotóxico nas mesmas, sendo um composto utilizado para avaliação do potencial de membrana mitocondrial em células apoptóticas.

Esse ensaio foi realizado utilizando a Rho 123 como marcador fluorescente avaliado por microscopia confocal. Para tal,  $10^5$  macrófagos/mL foram aderidos e cultivados sobre lamínulas circulares durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e posteriormente foram infectados com  $10^6$  parasitos/mL na fase promastigota, prosseguindo uma nova incubação de 24 horas e subsequente aplicação da TFD. Decorrente um período de incubação de 18 horas pós-TFD, os grupos foram marcados com 20,0 µg.mL<sup>-1</sup> de Rho 123 (Sigma-Aldrich), interagindo por 40 minutos em temperatura ambiente.

Após o período de interação, as lâminas foram preparadas utilizando *Prolong Gold Antifade with DAPI* (Thermofisher) e avaliadas em microscópio confocal Zeiss LSM 700 com excitação em 491 nm e emissão 530 nm. A quantificação da fluorescência emitida foi realizada a partir de triplicatas de fotos usando o software Image J e mantendo as especificações de aquisição do microscópio durante todo o processo de obtenção de imagens.

## 5.10 TESTE DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL COM MTT

Foi avaliada a atividade mitocondrial dos controles (claro e escuro), dos grupos que interagiram com curcumina no escuro e dos grupos submetidos à TFD nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para tal, foi utilizado o teste de MTT, que se baseia na degradação do sal de MTT (3- [4,5- dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazoliumbromide) em cristais de formazan pela mitocôndria. Portanto, mitocôndrias que apresentam alta atividade tendem a metabolizar mais o sal de MTT e conseqüentemente formar mais cristais de formazan, reação que pode ser detectada por solubilização do formazan em DMSO e posterior quantificação por espectrofotometria.

Para o procedimento do experimento, foi realizado o cultivo dos macrófagos infectados em placas de 96 poços, aplicação da terapia e posterior incubação de 18 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados aos grupos 100  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração de 5 mg/mL, seguido de incubação em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação o composto foi retirado e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de DMSO e, em sequência, foi determinada a absorbância dos grupos em equipamento Biotek® Synergy HT com filtro de 570 nm. Os valores de absorbância encontrados foram convertidos em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle. Para tal, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Mitocondrial (\%)} = \frac{(\text{Absorbância dos grupos} - \text{branco})}{(\text{Absorbância do controle} - \text{branco})} \times 100$$

## 5.11 RECUPERAÇÃO DE *Leishmanias* APÓS TRATAMENTO COM TERAPIA FOTODINÂMICA

A fim de se avaliar a capacidade de proliferação dos parasitos após a aplicação da TFD, os parasitos remanescentes dos grupos submetidos à terapia com concentrações de curcumina de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram recuperados, quantificados e comparados com o grupo controle. Para tal, os macrófagos foram lisados em solução de 0,05% de dodecil sulfato de sódio (SDS) dissolvido em meio LIT suplementado (descrito no item 5.1) e posteriormente incubados em estufa a

27°C durante 48 horas. Após o tempo de incubação, os parasitos obtidos foram contados em câmara de Neubauer.

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

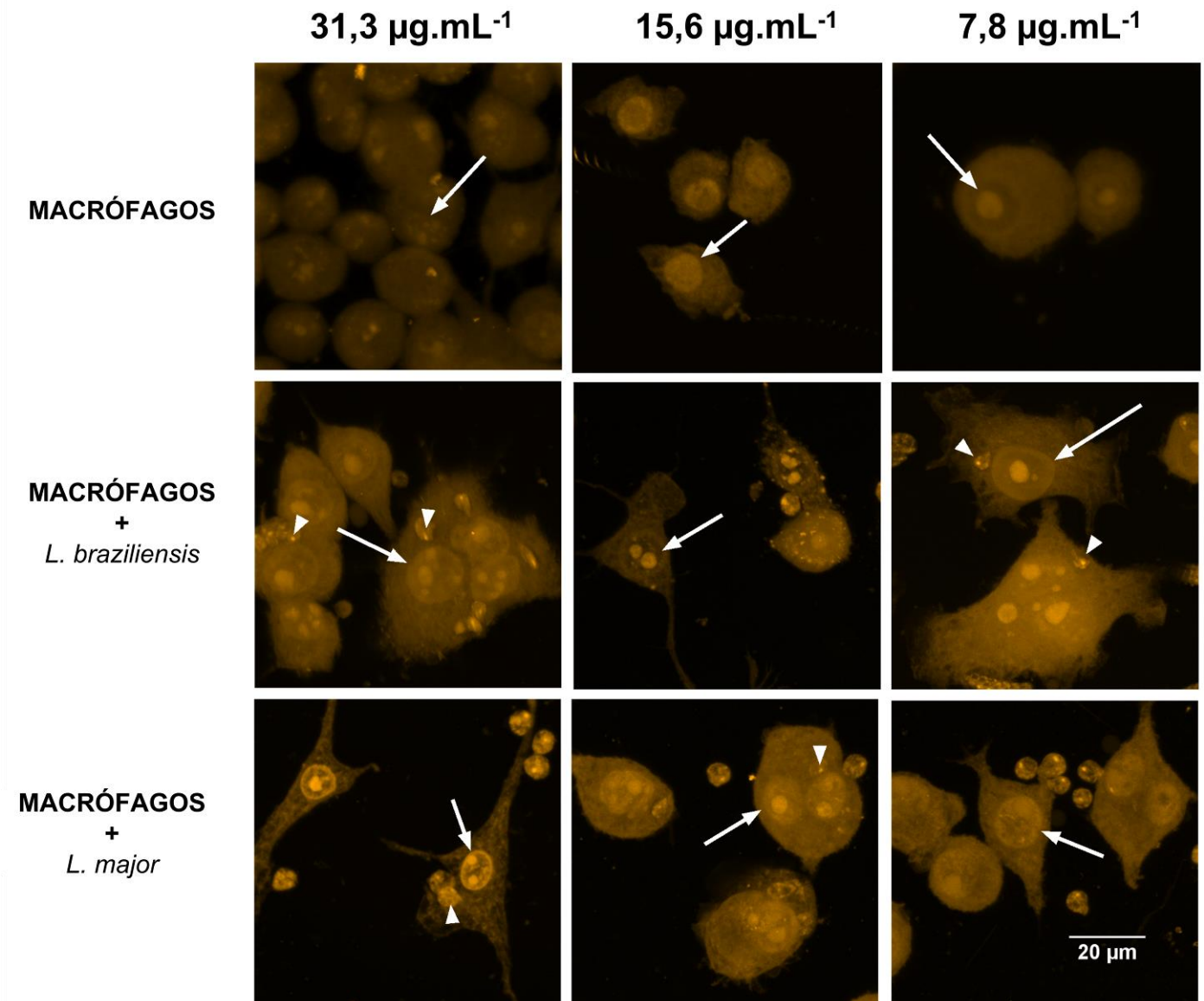
Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram avaliados e submetidos ao teste ANOVA com teste tukey, utilizando o software *BioEstat 5.0* (*Instituto Mamirauá*). Todos os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos dois experimentos independentes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

A fim de se obter imagens que indicassem a distribuição da curcumina pelos macrófagos não infectados e infectados pelas duas espécies de *Leishmania spp.* avaliadas, foi realizado experimento de internalização do FS por microscopia confocal (Figura 9). Foram avaliadas as concentrações de curcumina que apresentaram melhor resposta no teste de viabilidade por azul de Trypan, ou seja, aquelas que apresentaram pouca ou nenhuma citotoxicidade no escuro e, ao mesmo tempo, foram capazes de causar a morte celular quando irradiadas, evidenciando efeito da TFD e não apenas do FS.

**Figura 9:** Internalização da curcumina por macrófagos não infectados, macrófagos infectados com *L. braziliensis* e macrófagos infectados com *L. major* nas concentrações de 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Setas indicam os núcleos dos macrófagos, enquanto as pontas de seta indicam amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* internalizados nos macrófagos.



**Fonte:** O autor.

A análise das imagens permite observar que nas três concentrações apresentadas houve internalização do FS nas células, uma vez que a fluorescência emitida é referente apenas a curcumina, já que não foram utilizados outros marcadores fluorescentes no experimento. Além disso, é interessante observar que, mesmo internalizados pelos macrófagos, o sinal da curcumina está presente nos amastigotas internalizados de *L. braziliensis* e *L. major*.

## 6.2 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO TESTE DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRYPAN

A viabilidade após a aplicação da TFD foi avaliada por meio do teste de exclusão por azul de Trypan, onde foi observado que, nas maiores concentrações de curcumina avaliadas (500, 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), houve efeito citotóxico tanto para os macrófagos infectados, quanto para os não infectados, indicando que essas concentrações não são interessantes para aplicação *in vitro*, uma vez que apenas a curcumina no escuro pôde promover a morte celular. Contudo, nas menores concentrações testadas, foi observada viabilidade acima dos 80% (diferença significativa,  $p \leq 0,01$ ) nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  no escuro e, quando submetidos à TFD, os grupos tratados mantiveram viabilidade abaixo dos 5%, chegando até mesmo à completa inativação dos macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major* (Figura 10).

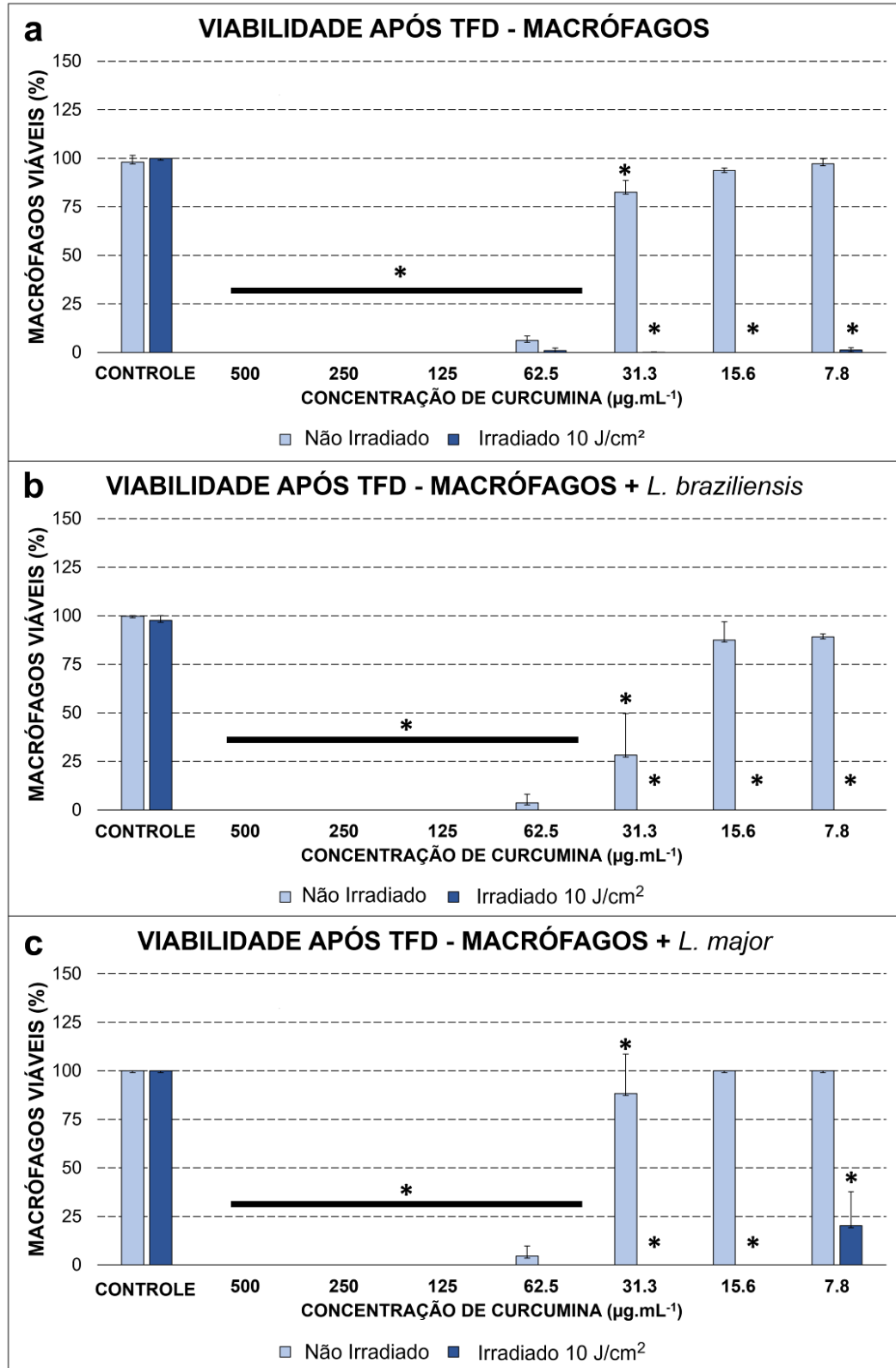
A concentração de 31,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de curcumina apresentou baixa (menos de 20%) citotoxicidade no escuro para macrófagos não infectados e para macrófagos infectados por *L. major*. Porém, quando avaliada a viabilidade celular para macrófagos infectados com *L. braziliensis*, foi observada citotoxicidade maior que 70%, indicando que essa não foi uma concentração adequada de FS para essa situação experimental, já que o efeito inibitório observado não se trata de efeito fotodinâmico.

Em contrapartida, as concentrações de 15,1 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  demonstraram inativação das células infectadas por efeito fotodinâmico, visto a alta viabilidade desses grupos quando não irradiados e baixa viabilidade quando submetidos à terapia. Apenas os macrófagos infectados com *L. major* apresentaram maior resistência ao tratamento com TFD na menor concentração de curcumina utilizada (7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando que diferentes espécies do parasito podem apresentar maior ou menor sensibilidade ao tratamento, sendo necessárias possíveis adaptações de protocolo em aplicações *in vivo* e clínicas a depender da espécie de *Leishmania* estudada.

Considerando os dados obtidos no teste de exclusão por azul de Trypan, foram selecionadas as concentrações de 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para realizar os experimentos de análise morfológica por MEV e internalização do FS por microscopia confocal. e foram selecionadas as concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

para realizar os testes de avaliação do potencial de membrana mitocondrial por marcação do Rho 123 e recuperação de parasitos após TFD.

**Figura 10:** Viabilidade celular por teste de exclusão por Azul de Trypan. (a) macrófagos RAW 264.7 não infectados, (b) macrófagos infectados com *L. braziliensis* e (c) macrófagos infectados com *L. major*. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o grupo controle e os outros grupos indicados pelo mesmo símbolo. A linha horizontal representa a comparação com todos os grupos localizados abaixo dela.



Fonte: O autor.

### 6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 INFECTADOS SUBMETIDOS À TFD COM CURCUMINA

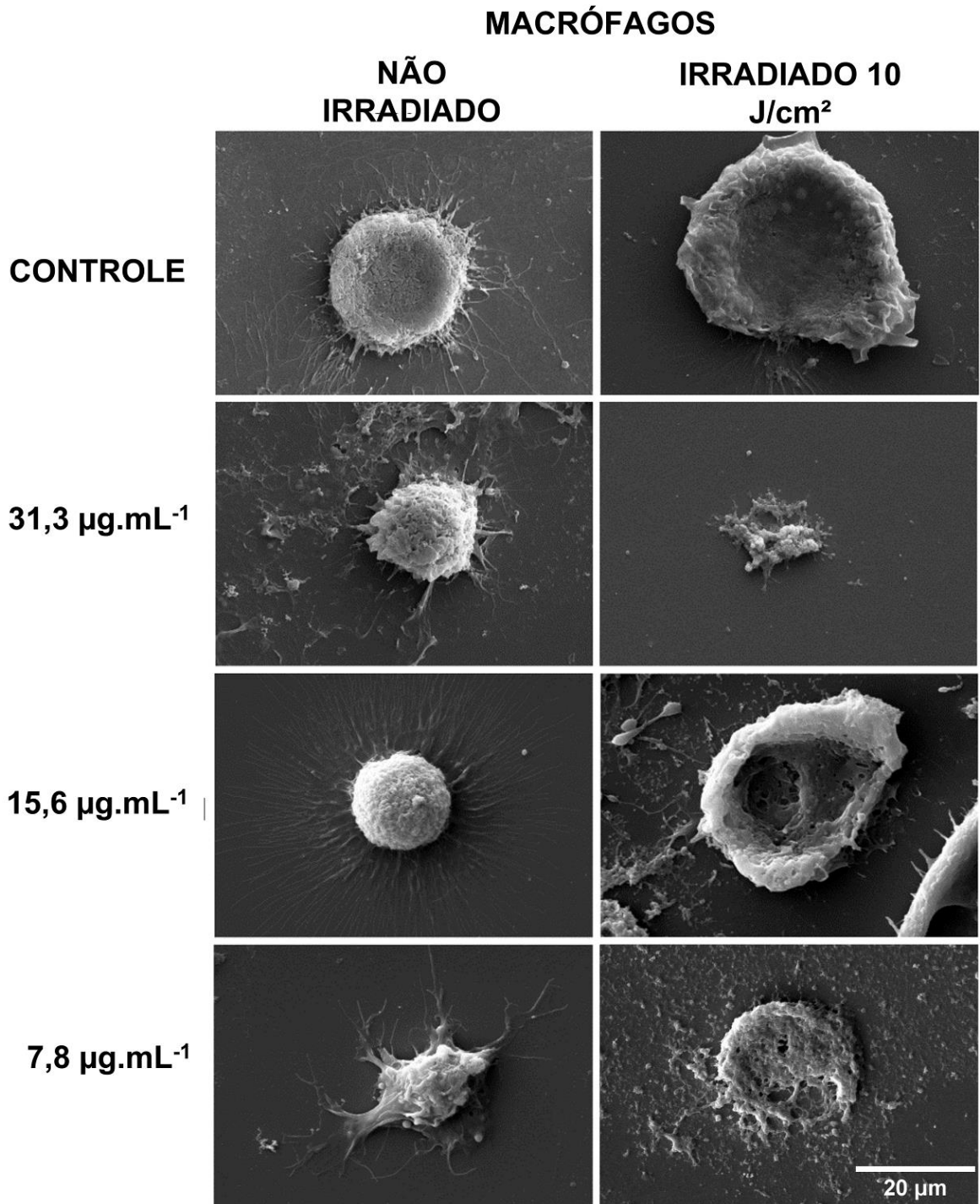
Considerando os resultados obtidos no teste de viabilidade por azul de Trypan foram selecionadas as concentrações de 31,2, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para proceder os experimentos de avaliação de morfologia celular. Foi realizada a análise morfológica dos macrófagos utilizando a Microscopia Eletrônica de varredura (MEV). Observou-se que os macrófagos em cultura foram afetados pela TFD com curcumina, mesmo em concentrações baixas (Figura 11). Os grupos irradiados e com curcumina mantidos no escuro, não apresentaram alterações morfológicas significativas.

As alterações na morfologia celular dos macrófagos indicam estresse sofrido pela aplicação da terapia que resultou na destruição das células como observado nos grupos submetidos à TFD. Houve aparente lise da membrana celular do macrófago, com extravasamento de seu conteúdo intracelular.

A análise morfológica por MEV dos macrófagos permitiu observar comportamento semelhante dos macrófagos não infectados com àqueles infectados com *L. braziliensis* e *L. major*, ou seja, todos os grupos experimentais foram afetados pela TFD com curcumina, mesmo em concentrações baixas do FS (figuras 12 e 13).

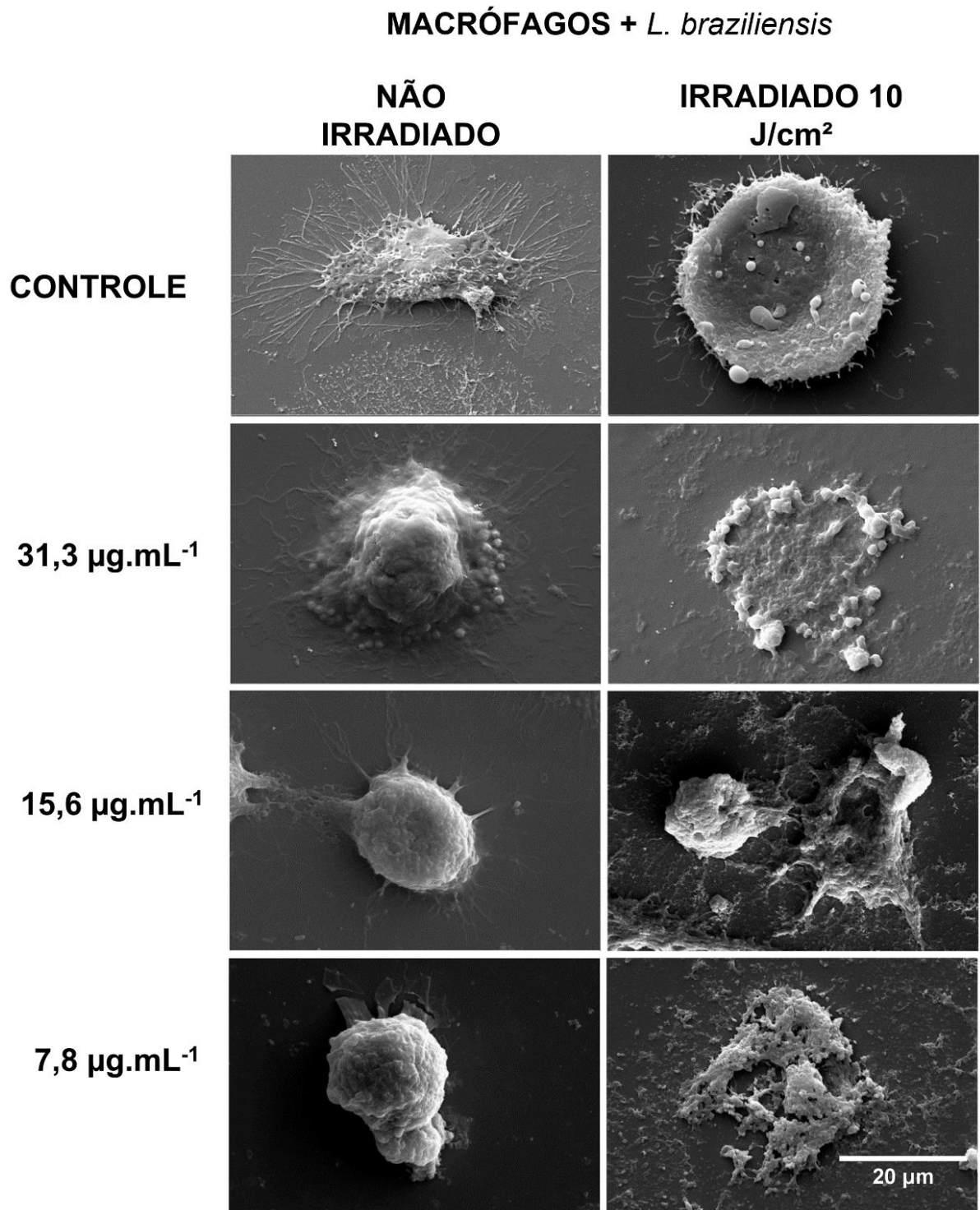
Outra situação observada foi a ausência de parasitos livres após a destruição dos macrófagos via TFD, o que pode indicar que essas amastigotas tenham sido erradicadas juntamente com a destruição dos macrófagos comprometidos. Tal situação é favorável, visto que os parasitos livres poderiam ser fagocitados novamente desencadeando processo inflamatório característico da LT.

**Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos não infectados. Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.



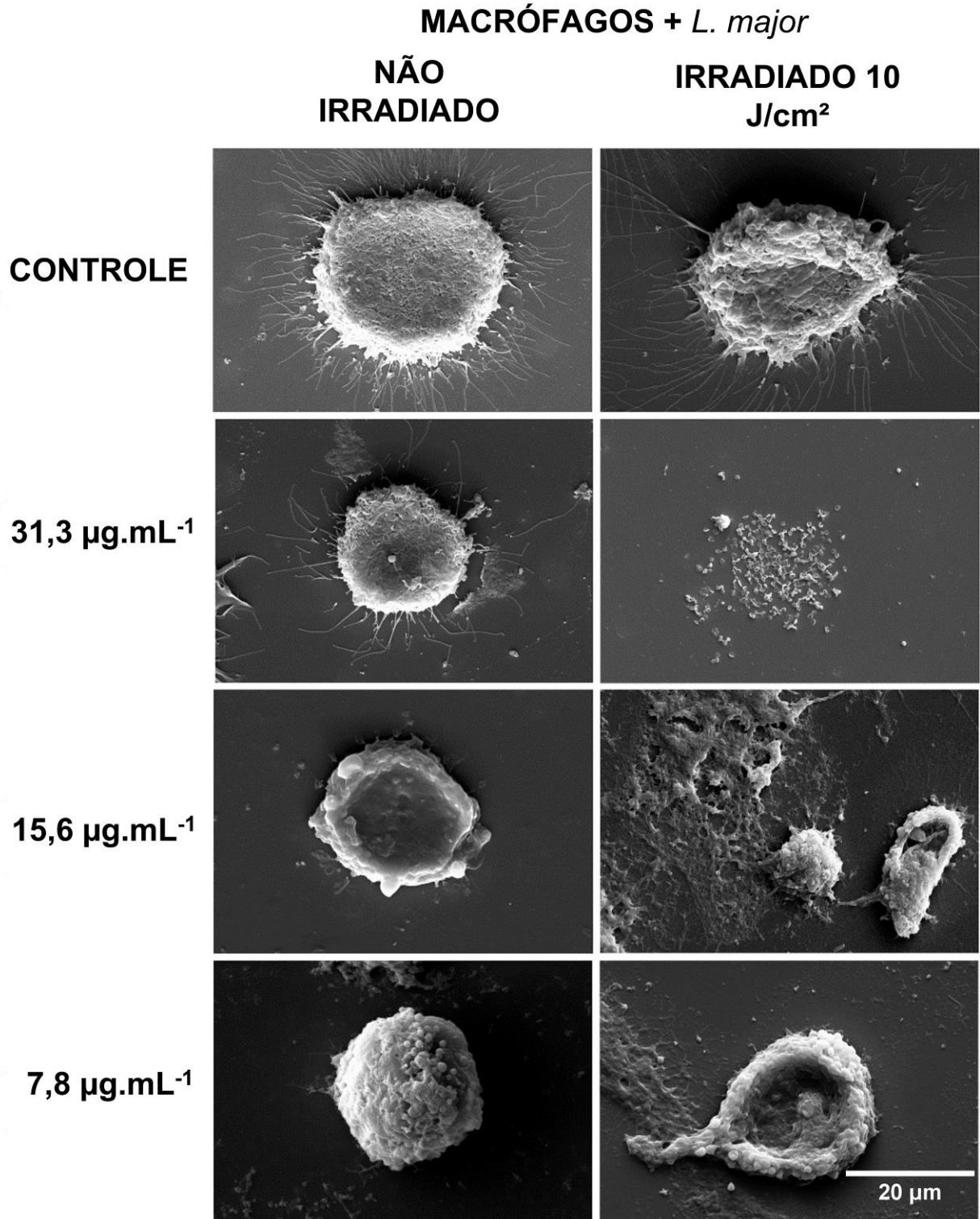
Fonte: O autor.

**Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. braziliensis*. Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.



Fonte: O autor.

**Figura 13:** Microscopia eletrônica de varredura dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. major*. Controle: células não incubadas com curcumina. Os valores 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indicam as concentrações de curcumina com as quais os respectivos grupos foram incubados. A coluna da esquerda indica os grupos não irradiados, enquanto a coluna da direita indica os grupos irradiados. Aumento de 2000 vezes.



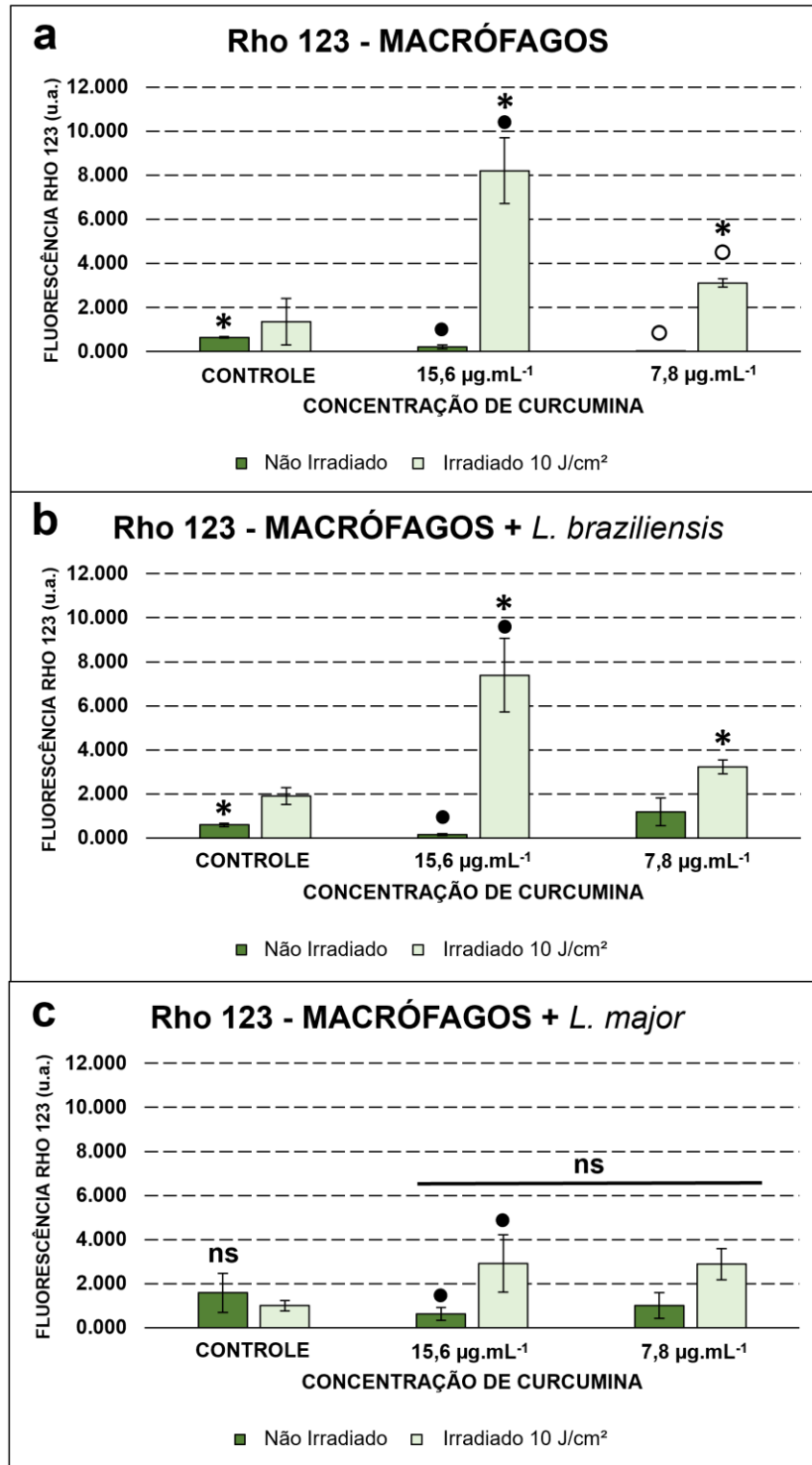
Fonte: O autor.

#### 6.4 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR MARCAÇÃO COM RHO 123

A Rho 123 é um composto que interage ativamente com a membrana mitocondrial, apresentando alta emissão de fluorescência em membranas amplamente ativas e baixa fluorescência em membranas pouco ativas. Nos resultados deste estudo (Figura 14) observamos que os controles apresentam menor atividade de mitocôndria em relação aos grupos submetidos à TFD ( $p \leq 0,05$ ), tanto para os macrófagos não infectados quanto para os infectados com *L. braziliensis*. A fluorescência emitida pelo controle não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação aos grupos de macrófagos infectados por *L. major*, considerando os grupos que apenas interagiram com as duas concentrações de curcumina e grupos submetidos à TFD para essa espécie.

Quando analisados apenas os grupos submetidos à TFD, a polarização mitocondrial por Rho 123 foi concentração dependente ( $p \leq 0,05$ ), exibindo maior fluorescência na TFD com  $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de curcumina do que com  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do FS. Esse comportamento foi observado para macrófagos não infectados e macrófagos infectados com *L. braziliensis* (Figura 14a, 14b).

**Figura 14:** Quantificação da fluorescência de Rho 123 emitida por (a) macrófagos não infectados, (b) macrófagos infectados com *L. braziliensis* e (c) macrófagos infectados com *L. major*. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre os grupos indicados pelo símbolo e o controle não irradiado. O símbolo • representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o grupo irradiado e não irradiado na concentração de curcumina de  $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O símbolo ◦ representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o grupo irradiado e não irradiado na concentração de curcumina de  $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O símbolo “ns” indica que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle não irradiado e os grupos abaixo da linha horizontal.



Fonte: O autor.

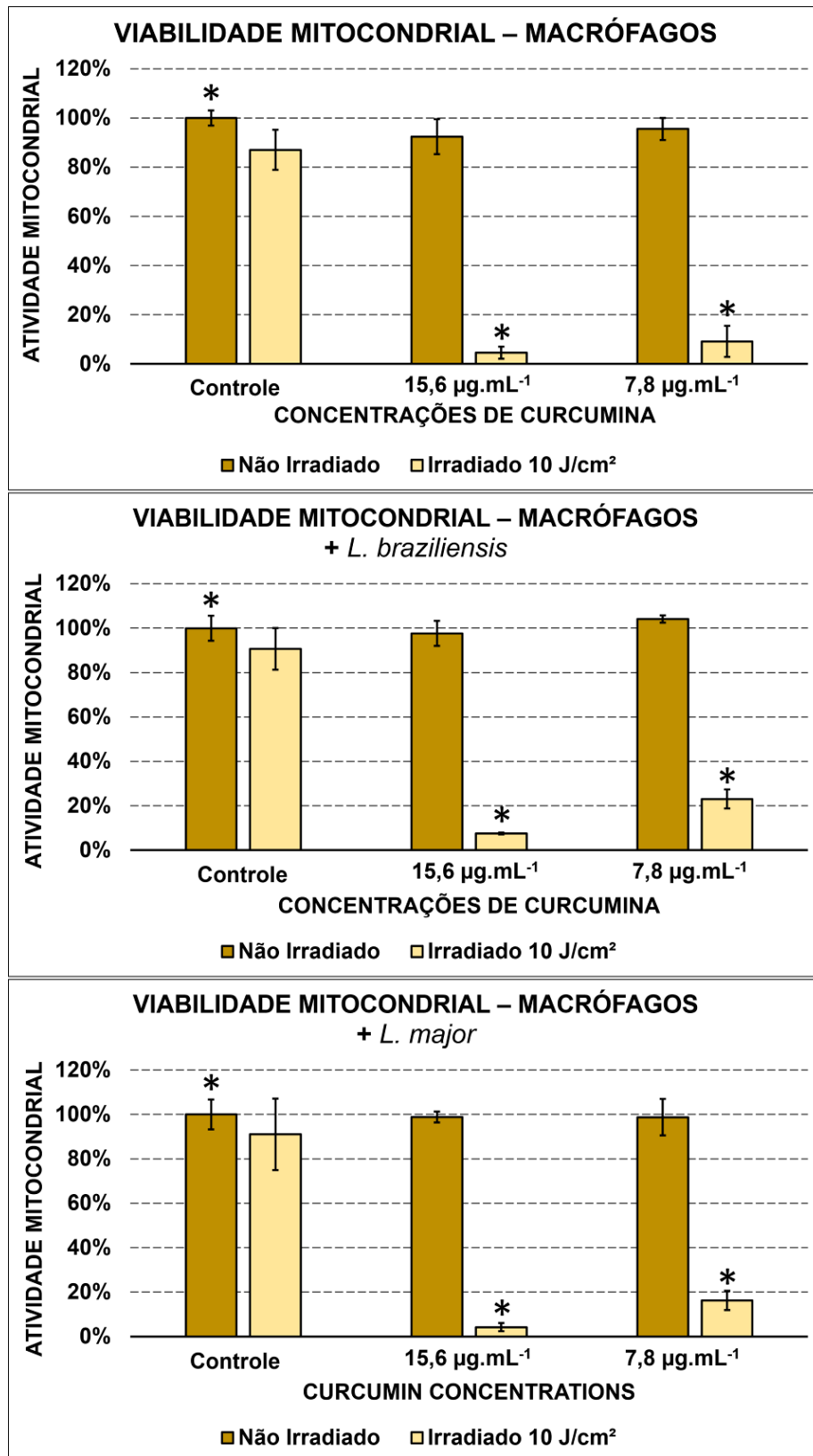
## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL VIA TESTE DE MTT

A figura 16 indica os resultados da porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle não irradiado para macrófagos RAW 264.7 não infectados e infectados com *L. braziliensis* e *L. major*. É possível observar que os grupos apenas irradiados, apesar de apresentarem ligeira diminuição da atividade mitocondrial, não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, indicando que a luz azul por si só não apresentou efeitos relevantes sobre a atividade mitocondrial. Esse resultado foi observado para os macrófagos infectados e não infectados.

Quando analisados os grupos que interagiram com curcumina nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  é possível observar que não houve diferenças significativas em relação ao controle, portanto a curcumina não foi capaz de causar alterações na atividade mitocondrial quando não combinada com a luz, mantendo a atividade mitocondrial próxima aos 100% tanto para macrófagos não infectados quanto para macrófagos infectados com as duas espécies de *Leishmania* avaliadas.

Quando comparado ao controle não irradiado, os grupos TFD nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram diferenças significativas para os grupos com macrófagos infectados e não infectados. Não houve diferença significativa entre os grupos TFD nas concentrações testadas, seja para macrófagos infectados ou não infectados com as espécies de *Leishmania* testadas. O resultado demonstrou diminuição da atividade mitocondrial nos grupos TFD, indicando que o processo de inativação fotodinâmica dos macrófagos promovido pela terapia pode ser capaz de diminuir as capacidades metabólicas das mitocôndrias dessas células.

**Figura 15:** Porcentagem de atividade mitocondrial obtida a partir de dosagem de absorbância pós teste de MTT. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* representa diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre o controle não irradiado e os grupos indicados pelo símbolo.

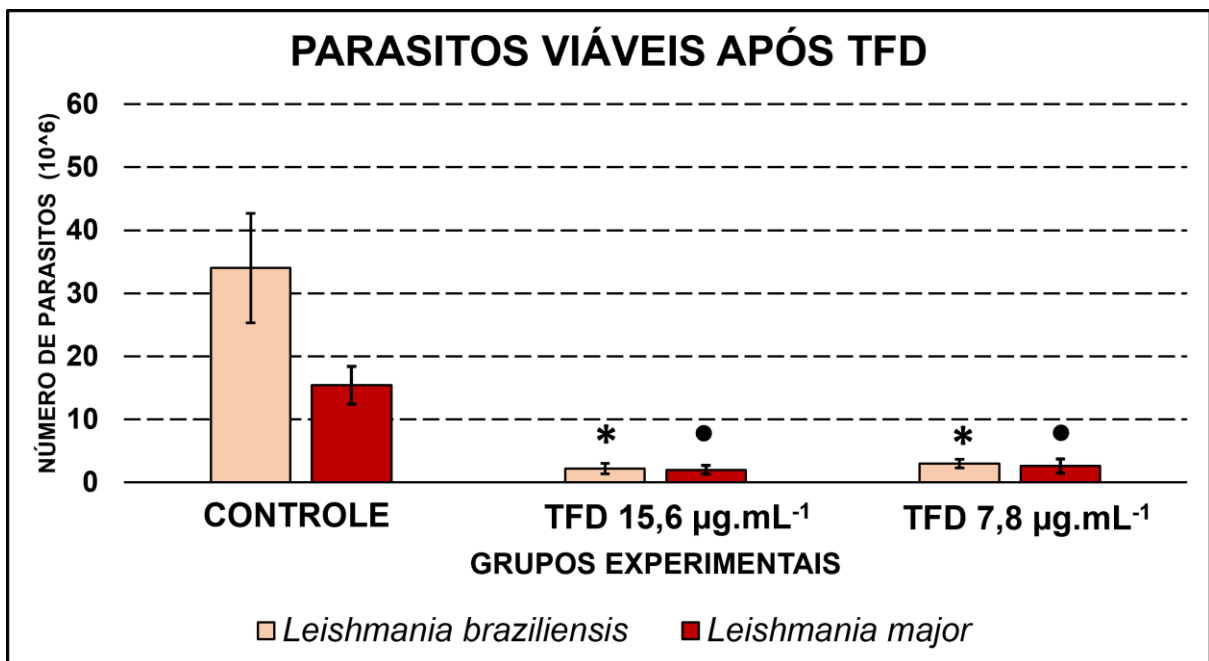


Fonte: O autor.

## 6.5 RECUPERAÇÃO DE PARASITOS APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

O ensaio de recuperação de parasitos após aplicação da TFD avaliou o efeito da terapia no crescimento de *L. braziliensis* e *L. major*. A figura 16 representa o número de parasitos recuperados após 48 horas de incubação. É possível observar que os controles para *L. braziliensis* e *L. major*  $35 \times 10^6$  e  $15 \times 10^6$  respectivamente, enquanto os grupos submetidos à TFD apresentaram menos de  $5 \times 10^6$  (diminuição com diferença estatística,  $p \leq 0,05$ ). Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na quantificação dos parasitos pós-TFD quando comparadas as diferentes concentrações de curcumina ( $15,6$  e  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), condição observada para ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas.

**Figura 16:** Comparação quantitativa entre os grupos controle e grupos submetidos à TFD com curcumina nas concentrações de  $15,6$  e  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *L. braziliensis* e *L. major*. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os símbolos \* e • representam diferença estatística significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre os grupos indicados por eles e os controles não irradiados para *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente.



Fonte: O autor.

## 7 DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que a TFD reduziu a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. braziliensis* e *L. major*, além de demonstrar alterações morfológicas e do potencial de membrana mitocondrial nos macrófagos infectados. Enquanto é possível encontrar considerável número de estudos *in vitro* que envolvem a aplicação da TFD em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, especialmente utilizando FS como azul de metileno e diferentes tipos de ftalocianinas (ANDRADE *et al.*, 2018; AURELIANO *et al.*, 2018; NESI-REIS *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2017; PINTO; PACHECO-SOARES; MITTMANN, 2011; SILVA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2011), trabalhos que estudem a aplicação da TFD com curcumina ainda são escassos, especialmente quando se trata de ensaios com macrófagos infectados. A realização de experimentos em amastigotas internalizados em células de defesa é um modelo que se assemelha mais à situação clínica encontrada na fisiopatologia da doença, sendo, portanto, um diferencial e importante contribuição desse trabalho para a área de estudo.

As imagens obtidas a partir do experimento de avaliação da internalização da curcumina por macrófagos infectados, reforçou o potencial de inativação fotodinâmica de macrófagos infectados e amastigotas internalizados. Esse fato pode ser comprovado pela captação do sinal de fluorescência da curcumina observado tanto nos macrófagos quanto nos amastigotas intracelulares. Considerando a baixa capacidade de difusão e a curta meia-vida das EROS formadas no processo fotoquímico da TFD, a localização do FS está intimamente relacionada com seu lugar de ação (AWAD *et al.*, 2016; OGILBY, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, o resultado observado reitera o que foi encontrado em trabalho anterior (PINTO *et al.*, 2016b), a ligação da curcumina ao núcleo da célula devido à sua afinidade com DNA, conforme também proposto em outros estudos (BASU; KUMAR, 2013; GUPTA *et al.*, 2011; NAFISI *et al.*, 2009).

O presente estudo demonstrou redução significativa em relação aos controles especialmente nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisas demonstrou que os macrófagos infectados com *Leishmania* eram mais sensíveis ao tratamento utilizando baixas concentrações de FS quando comparados com parasitos isolados na forma promastigota (PINTO; MARCOLINO; FERREIRA-STRIXINO, 2021). Visando a manutenção do tecido

adjacente às lesões provocadas pela LT, a efetividade da terapia em baixas concentrações de curcumina é um resultado promissor, uma vez que diminui o risco de citotoxicidade e dano celular ao tecido circundante.

Além disso, as células infectadas com *L. braziliensis* foram mais sensíveis ao tratamento em comparação com as células infectadas com *L. major*. Esse resultado foi similar ao observado por Silva e colaboradores em 2015, onde registraram maior eficiência da terapia em promastigotas de *L. braziliensis* em comparação com promastigotas de *L. amazonensis* (SILVA *et al.*, 2015). Esse achado é positivo para países da América do Sul, especialmente o Brasil, pois a maioria dos casos de LT são causados pela espécie *L. braziliensis*. Contudo, o achado reforça a ideia de que poderão ser necessários diferentes protocolos de aplicação da TFD com curcumina para diferentes espécies do parasito.

As imagens obtidas por MEV exibiram morfologia celular típica nos macrófagos dos controles e grupos que apenas interagiram com curcumina (sem irradiação), enquanto nos grupos onde foi aplicada a TFD, foram observadas alterações morfológicas intensas e destruição celular. Lise celular, perda das projeções citoplasmáticas típicas dos macrófagos, bem como a intensa presença de fragmentos celulares indicam danos celulares provocados pela ação da TFD. Outros trabalhos que avaliaram alterações morfológicas pós terapia em promastigotas de *Leishmania* spp. observaram perda da característica fusiforme e alterações ou até mesmo perda de importantes anexos celulares, como os flagelos, porém ainda eram escassos trabalhos que avaliassem morfologia após terapia para macrófagos infectados (PINTO *et al.*, 2016b, 2016a; SOUZA *et al.*, 2021). Entretanto, a literatura ainda carece de trabalhos com o mesmo tipo de avaliação utilizando macrófagos infectados e TFD com curcumina. É também importante considerar que a curcumina por si só não foi capaz de causar alterações morfológicas nas células nas concentrações de 31,3, 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , corroborando o comportamento observado no teste de exclusão por azul de Trypan, onde as menores concentrações apresentaram menor citotoxicidade.

Uma preocupação decorrente dos resultados obtidos neste estudo foi avaliar se os macrófagos destruídos liberariam amastigotas viáveis após o tratamento. O teste de recuperação de parasitas após a TFD mostrou menor taxa de crescimento para esses parasitos em comparação com o controle não tratado, indicando que a terapia foi capaz de, em grande parte, inativar tanto os macrófagos parasitados

quanto os amastigotas internalizados. Andrade e colaboradores (2018) observaram uma redução de 40% no número de parasitas amastigotas intracelulares após tratamento com TFD. A zinco-porfirina foi usada como um FS e a irradiação foi fixada em um comprimento de onda de  $455 \pm 20$  nm, com uma fluência de 90 e 180 J/cm<sup>2</sup>. Eles também demonstraram que a viabilidade das amastigotas internalizadas foi comprometida durante a ação da TFD (ANDRADE *et al.*, 2018).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) foi feita a partir da marcação com Rho 123, e apresentou maior intensidade nos grupos tratados com a TFD. Esse marcador apresentará alto  $\Delta\psi_m$  em membranas mitocondriais amplamente ativas, enquanto que em membranas danificadas ou pouco ativas o  $\Delta\psi_m$  é baixo (DI LISA; BERNARDI, 1998; HUANG *et al.*, 2007; PETIT *et al.*, 1990).

Fedyeva e colaboradores em 2014 encontraram correlação entre o aumento da produção mitocondrial de EROS e a hiperpolarização da membrana mitocondrial durante o aumento de temperatura (FEDYAEVA *et al.*, 2014). As EROS são produzidas fisiologicamente por via mitocondrial a fim de sinalizar e ativar mecanismos celulares antioxidantes. No entanto, a alta produção dessas espécies pode acabar resultando na estimulação da via de morte celular por apoptose (MURPHY, 2009). Considerando tais fundamentos, o tempo de 18 horas usado neste estudo para avaliar as amostras, pode ter coincido com a elevação do potencial de membrana mitocondrial em resposta a um dano celular, não descartando a morte celular subsequente por apoptose, uma vez que a maioria das células não eram viáveis no teste de viabilidade do azul Trypan.

Nos resultados obtidos pelo teste de atividade mitocondrial por MTT, os grupos tratados com a TFD apresentaram diminuição da atividade mitocondrial, comportamento que se repetiu para macrófagos não infectados e infectados pelas duas espécies de *Leishmania* testadas. Esse resultado, apesar de parecer contraditório ao resultado observado quando avaliado o  $\Delta\psi_m$ , pode complementar a hipótese de morte por apoptose subsequente à terapia. A mitocôndria é uma organela diretamente envolvida com processos de morte celular, especialmente a apoptose. Esse processo de morte pode ser causado quando a organela perde sua estabilidade e libera sinalizadores pró-apoptóticos no citoplasma da célula. A presença de curcumina por todo o citoplasma celular indica que esse FS também pode estar presente nas mitocôndrias causando a produção de EROs. Uma vez que essas espécies são capazes de elevar a permeabilidade da membrana mitocondrial,

esse poderia ser um iniciador para o processo de apoptose, visto que quanto mais permeável a mitocôndria, maior a chance de liberar fatores pró-apoptóticos bem como elevar a liberação de cálcio pela mitocôndria, que por sua vez, estimula a ação de proteases e lipases citoplasmáticas, podendo levar a morte celular (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002).

Outra hipótese que explicaria o aumento da  $\Delta\psi_m$  e diminuição da atividade mitocondrial se baseia nas propriedades da Rho123 como um corante para determinação do  $\Delta\psi_m$ . Apesar de ser amplamente utilizada para esse fim, a Rho 123 pode ainda assim ser inespecífica para a mitocôndria, especialmente em situações em que a polaridade da membrana plasmática se encontra alterada (CHEN, 1988). A diminuição da atividade mitocondrial pode estar diretamente relacionada à incapacidade da célula produzir ATP e, como consequência, a ausência da energia química proveniente do ATP pode ser limitante para a ação das bombas de íons que fazem a manutenção da polaridade da membrana plasmática, indicando que a correlação entre os resultados observados pode indicar a inatividade da célula, visto o teste de MTT, bem como uma possível alteração de polaridade de membrana plasmática evidenciada pela marcação com Rho 123.

Os resultados também indicaram que os macrófagos infectados com *L. major* não apresentaram diferenças de  $\Delta\psi_m$  em comparação com o controle. Essa resposta pode estar relacionada às diferentes capacidades antioxidantes de cada espécie de *Leishmania*, visto que os macrófagos infectados com *L. major* também foram menos suscetíveis à TFD em concentrações mais baixas de curcumina. Um estudo realizado por Tasbihi e colaboradores em 2020, demonstrou a presença de diferentes taxas de expressão de proteínas mitocondriais em *L. tropica* em comparação com *L. braziliensis*, uma característica que, segundo eles, garante resistência aos medicamentos usados rotineiramente contra a leishmaniose (TASBIHI *et al.*, 2020). Além disso, a enzima superóxido dismutase (SOD), descrita como diferencial na sobrevivência do parasito no ambiente intracelular do macrófago, apresenta capacidade antioxidante para as células, podendo estar relacionada com a resistência a diferentes medicamentos (GHOSH; GOSWAMI; ADHYA, 2003; HORÁCIO *et al.*, 2021; YUE *et al.*, 2020). Portanto, diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar diferentes taxas de expressão de proteínas mitocondriais e consequentemente diferentes capacidades antioxidantes, podendo esse ser um diferencial para sua susceptibilidade à TFD.

Embora a curcumina tenha apresentado citotoxicidade para macrófagos em concentrações acima de 15,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o achado de maior resistência em macrófagos infectados com *L. major* foi também observado anteriormente no estudo de Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2015). A menor taxa de viabilidade foi observada após o tratamento em macrófagos infectados por *L. braziliensis* em comparação com aqueles infectados por *L. amazonensis*. No presente estudo, observou-se que as mudanças na viabilidade celular foram confirmadas pelas mudanças morfológicas observadas pelas imagens de MEV. A intensa destruição da célula provavelmente está ligada à ampla distribuição de curcumina em seu citoplasma e núcleo, e sua possível interação com as mitocôndrias é revelado pela mudança nos padrões de Rho 123.

O grande número de parasitos internalizados que foram mortos após a TFD em aplicação única, foi um achado importante. Caso a terapia afetasse apenas os macrófagos hospedeiros, haveria o risco de liberação de parasitas viáveis para infectar novas células. No entanto, este estudo mostrou que a terapia pôde reduzir o número de amastigotas viáveis em uma aplicação única, apesar de ainda ser observada uma carga parasitária residual viável. Portanto, a despeito de ser promissora em aplicação única, a TFD com curcumina poderia ser potencializada utilizando aplicações seriadas, a fim de se diminuir ou até mesmo erradicar os amastigotas residuais viáveis.

## 8 CONCLUSÃO

A TFD com curcumina apresentou resultado promissor na inativação de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. major*, exibindo inativação das células nas menores concentrações de FS testadas (15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sem que houvesse citotoxicidade no escuro. A curcumina, avaliada nesse estudo como FS, apresentou distribuição citoplasmática, no núcleo e nos parasitos internalizados pelos macrófagos. Além disso, foi possível observar diminuição da proliferação de parasitos recuperados após a TFD, indicando que o tratamento além de inativar os macrófagos infectados, pôde inativar os parasitos intracelulares, reduzindo a carga parasitária.

A polaridade de membrana mitocondrial foi avaliada por marcação com Rho 123, indicando elevação nos grupos submetidos à TFD com curcumina nas concentrações de 15,6 e 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em contrapartida, a atividade mitocondrial para os mesmos grupos foi reduzida drasticamente em relação ao controle, resultado que corrobora a inativação celular promovida pela TFD e detectada pelo teste de viabilidade por Azul de Trypan.

Outra evidencia que resguarda a tese da inativação celular promovida pela TFD nas menores concentrações de curcumina avaliada nesse estudo são as alterações morfológicas evidenciadas pela microscopia eletrônica de varredura, onde foram encontradas intensa destruição celular e perda de morfologia característica dos macrófagos nos grupos que receberam o tratamento. Além disso, esse trabalho observou que houve inativação dos parasitos intracelulares após a TFD, demonstrado pela quantificação dos parasitos recuperados após a terapia.

Os resultados obtidos nesse estudo congrega evidências de que a TFD com curcumina pode ser uma interessante alternativa para futuro tratamento da LT, uma vez que demonstrou indícios de que, mesmo em baixas concentrações de FS, é possível inativar macrófagos e parasitos intracelulares tipicamente encontrados no desenvolvimento da patologia. Novos estudos que avaliem os parâmetros sugeridos nesse trabalho, com enfoque em aplicação in vivo e clínica, além de considerar a aplicação de terapia combinada com os tratamento convencionais podem ser interessantes alternativas futuras.

## REFERÊNCIAS

- ABADIR, A.; PATEL, A.; HAIDER, S. Systemic therapy of New World cutaneous leishmaniasis : A case report and review article. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 79–84, 2010.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, p. 347–364, 2016.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, 2006.
- ANDRADE, C. G. *et al.* Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 482–490, 2018.
- AOUN, K.; BOURATBINE, A. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: A review. **Parasite**, v. 21, p.14-14, 2014.
- ARAÚJO, N. C. *et al.* Photodynamic Effects of Curcumin Against Cariogenic Pathogens. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 7, p. 393–399, 2012.
- ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis : Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America ( IDSA ) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene ( ASTMH ). **Clinical infectious diseases**, v.63, n. 12, p.1539-e264, 2016..
- 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, n. October 2017, p. 1–8, 2018.
- AWAD, M. M. *et al.* Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7679–7688, 2016.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 1–10, 2011.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Biophysical studies on curcumin – deoxyribonucleic acid interaction : Spectroscopic and calorimetric approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 257–264, 2013.
- BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 13, 2012.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173–186, 2002.
- 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.

CHEN, L. B. Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, n. 4, p. 155–181, 1988.

COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis : treatment updates and clinical practice guidelines review. **Tropical and travel-associated diseases**, v. 28, n. 5, p. 426–437, 2015.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian journal of medical research**, New Delhi, v.123, n.3, p.399, 2006.

DA HORA MACHADO, A. E. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

DAI, T.; HUANG, Y. 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, 2009.

DATASUS. **Leishmaniose tegumentar americana - Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação, Brasil**. 2021. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>.

DI LISA, F.; BERNARDI, P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 184, n. 1–2, p. 379–391, 1998.

DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.11, p.2576-2597, 2012.

FABER, W. R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis acquired in Jura, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 183–184, 2012.

FEDYAEVA, A. V. *et al.* Heat Shock Induces Production of Reactive Oxygen Species and Increases Inner Mitochondrial Membrane Potential in Winter Wheat Cells. **Russian in Biokhimiya**, v. 79, n. 11, p. 1202–1210, 2014.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84, p. 131–141, 2002.

GHOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage. **Biochemical Journal**, v. 369, n. 3, p. 447–452, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71–80, 2006.

GRADONI, L. A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology. In: BRUSCHI, Fabrizio; GRADONI, Luigi.. **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. Switzerland: Springer Nature, 2018. p. 1–13.

GUPTA, S. C. *et al.* Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, n. 12, p. 1937-1955, 2011..

HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of American Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2018.

- HORÁCIO, E. C. A. *et al.* Perspectives From Systems Biology to Improve Knowledge of Leishmania Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–8, Apr. 2021.
- HUANG, M. *et al.* Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1276–1285, 2007.
- 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. 501–511, 2010.
- JIANG, Y. *et al.* Photodynamic Action of LED-Activated Curcumin against Staphylococcus aureus Involving Intracellular ROS Increase and Membrane Damage. **International journal of photoenergy**, v. 2014, p. 9–11, 2014.
- KHATAMI, A. *et al.* Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis : **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 2, p. 335e1-355e20, 2007.
- KÜBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2005.
- LECHUGA, G. C.; PEREIRA, M. C. S.; BOURGUIGNON, S. C. Heme metabolism as a therapeutic target against protozoan parasites. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 7, p. 767–779, 9 ago. 2019.
- LEITE, D. P. V. *et al.* Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection : **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 11, p. 627–632, 2014.
- LIU, Y.; MENG, X.; BU, W. Upconversion-based photodynamic cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v.379, p.82-98, 2019.
- MATEUS, J. E.; VALDIVIESO, W.; HERNÁNDEZ, I. P. Cell accumulation and antileishmanial effect of exogenous and endogenous protoporphyrin IX after photodynamic treatment. **Biomédica**, v. 34, p. 589–597, 2014.
- MAYRINK, W. *et al.* Immunotherapy , immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment Imunoterapia , imunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.14-21, 2006.
- MCMICHAEL, A. *et al.* **Climate change and human health: Risks and Responses**. Geneva: World Health Organization, 2003. 322 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, p. 150–158, 2007.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.
- NAFISI, S. *et al.* Curcumin Binding to DNA and RNA. **DNA Cell Biol.**, v. 28, n. 9, p. 469-77, 2009. doi: 10.1089/dna.2009.0894.v. 28, n. 4, p. 201–208, 2009.

NESI-REIS, V. *et al.* Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania (l.) amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 239–245, 2017.

NESI-REIS, V. *et al.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania ( l .) amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 239–245, Aug. 2018.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

OGILBY, P. R. Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 3181–3209, 2010.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–833, 2011.

OLIVEIRA, S. *et al.* Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy — ApPDT on infected macrophages. **Lasers in Medical Science**, v. 32, p. 1959–1964, 2017.

OPAS - Organização Pan-Americada da Saúde. **Leishmanioses**: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>.

OPAS - Organização Pan-Americada da Saúde. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington: OPAS, 2019.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817–840, 2013.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

PAIVA-CAVALCANTI, M. DE *et al.* Leishmaniasis diagnosis : an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v.5, n.1, p.31-31, 2015.

PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: A review. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 178–182, 2009.

PASCHOAL, M. A. *et al.* Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, 2013.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: Ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 919–931, 2003.

PETIT, P. X. *et al.* Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. **European Journal of**

**Biochemistry**, v. 194, n. 2, p. 389–397, 1990.

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, 2016a.

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, p. 883–890, 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.; PACHECO-SOARES, C.; MITTMANN, J. 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.

PLAETZER, K. *et al.* New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

PRIYADARSINI, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, p. 20091–20112, 2014.

RANAWAKA, R. R.; ABEYGUNASEKARA, P. H.; WEERAKOON, H. S. Correlation of clinical, parasitological and histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic region in Sri Lanka. **Ceylon medical journal**, v.57, n.4, p.149-152, 2012.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, Sep. 2007. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.

REY, L. Bases da parasitologia médica. In: **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 391 p.

RIBEIRO, J. B. P. *et al.* Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 282–290, 2016.

RIBEIRO, J. B. P. *et al.* Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (SbV) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 261–269, 2019.

SANTOS, D. O. *et al.* Leishmaniasis treatment — a challenge that remains : a review. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1–10, 2008.

- SBEGHEN, M. R. *et al.* Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 106–111, 2015.
- 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, p. 347–354, 2015.
- SLAPE, D. R.-M. *et al.* *Leishmania tropica* successfully treated with photodynamic therapy. **Australas J Dermatol.**, v. 60, n. 1, p. e64-e65, Feb. 2019. doi: 10.1111/ajd.12862.
- SNOEK, E. M. VAN DER *et al.* A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 8, p. 918–922, 2008.
- 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.
- SOUZA, C. DE *et al.* Polyelectrolytic gelatin nanoparticles as a drug delivery system for the promastigote form of *Leishmania amazonensis* treatment. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 1, p. 1–21, 2021. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1815495>
- STAHL, H. C. *et al.* Health economic evaluation of moist wound care in chronic cutaneous leishmaniasis ulcers in Afghanistan. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2018.
- STEBUT, E. VON. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.13, n. 3, p. 191-201, 2015.
- SUNYOTO, T.; BOELAERT, M.; MEHEUS, F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, p. 14787210.2019.1555471, 2018. DOI: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7460645.v1>
- TASBIHI, M. *et al.* Comparative mitochondrial proteomics of *Leishmania tropica* clinical isolates resistant and sensitive to meglumine antimoniate. **Parasitology Research**, v. 119, n. 6, p. 1857–1871, 2020.
- TOMAZINI, M. V. *et al.* Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 6, p. 535–341, 2007.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis : a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.
- VENIGALLA, M.; GYENGESI, E.; MÜNCH, G. Curcumin and Apigenin – novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer ' s disease. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 8, p. 1181–1185, 2015.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic medicine and infection control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 787–788, 2012.

WARE, J. M. *et al.* Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Clinical infectious diseases, v. 73, n. 7, p.e2457-e2562, 2021.

WU, H.; MINAMIDE, T.; YANO, T. The role of photodynamic therapy in the treatment of esophageal cancer. **Digestive Endoscopy**, v.31, n. 5, p.508-516, 2019.

YUE, J. *et al.* Revealing Mitochondrial Microenvironmental Evolution Triggered by Photodynamic Therapy. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 8, p. 6081–6087, 2020.

## ANEXO A - Publicação de artigo – Maio 2021.



Article

# Evaluation of the Photodynamic Therapy with Curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* Amastigotes

André Henrique Correia Pereira, Luciana Maria Cortez Marcolino, Juliana Guerra Pinto and Juliana Ferreira-Strixino \*

Photobios–Photobiology Applied to Health, University of Vale do Paraiba, Urbanova, São José dos Campos 2911, SP, Brazil; andre\_gcp@hotmail.com (A.H.C.P.); lumaria.cortez@hotmail.com (L.M.C.M.); jgbiomd@hotmail.com (J.G.P.)  
\* Correspondence: juferreira@univap.br; Tel.: +55-0-123-947-1112

**Abstract:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected disease prevalent in tropical countries with the ability to cause skin lesions. Photodynamic therapy (PDT) represents a specific and topical option for the treatment of these lesions. This study evaluated the response of macrophages infected with *L. braziliensis* and *L. major* to PDT with curcumin. Curcumin concentrations were evaluated in serial dilutions from 500.0 to 7.8 µg/mL using LED ( $\lambda = 450 \pm 5$  nm), with a light dose of 10 J/cm<sup>2</sup>. The Trypan blue viability test, ultrastructural analysis by scanning electron microscopy (SEM), mitochondrial polarity by Rhodamine 123 (Rho 123), curcumin internalization by confocal microscopy, and counting of the recovered parasites after the PDT treatment were performed. The lowest concentrations of curcumin (15.6 and 7.8 µg/mL) presented photodynamic inactivation. Cell destruction and internalization of curcumin in both macrophages and intracellular parasites were observed in microscopy techniques. In addition, an increase in mitochondrial membrane polarity and a decrease in the number of parasites recovered was observed in the PDT groups. This study indicates that PDT with curcumin has the potential to inactivate infected macrophages and might act as a basis for future in vivo studies using the parameters herein discussed.

**Keywords:** photodynamic therapy; curcumin; amastigotes; macrophages; cutaneous leishmaniasis



**Citation:** Pereira, A.H.C.; Marcolino, L.M.C.; Pinto, J.G.; Ferreira-Strixino, J. Evaluation of the Photodynamic Therapy with Curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* Amastigotes. *Antibiotics* **2021**, *10*, 634. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060634>

Academic Editor: Kristjan Plaetzer

Received: 31 March 2021  
Accepted: 29 April 2021  
Published: 25 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania* spp., typical of tropical regions and commonly present in underdeveloped countries. WHO places CL as one of the 10 most important infectious diseases worldwide, being present in more than 85 countries, and worsening the situation of people who, due to the development of the disease, may have to leave their professional occupations due to the physical and psychosocial disorders they face [1–3].

The treatment of CL is done through the administration of pentavalent antimonials such as Pentosan<sup>®</sup> and Glucantime<sup>®</sup>, or even with the use of Amphotericin B in more severe cases. However, these drugs present several side effects such as nausea, vomiting, and cardiac disorders, among others, besides presenting restrictions on their use by patients with heart problems or pregnant women [4,5].

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative to the conventional treatment for CL, standing out for being non-invasive and presenting very few application restrictions for the patients. PDT is based on the inactivation of infected cells through the production of reactive oxygen species (ROS) from the photochemical process that results from the interaction between a photosensitizer (PS) and light at a wavelength suitable to it releasing oxygen [6,7].

CL is potentially more harmful to the most impoverished populations in developing countries, since its transmission usually affects individuals with poor access to health conditions, basic sanitation, and low purchasing power. Therefore, PDT may represent an