

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

LUCAS TOBIAS RODRIGUES MACIEL

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA COM CURCUMINA EM  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* E *Leishmania amazonensis***

São José dos Campos – SP

2021

**LUCAS TOBIAS RODRIGUES MACIEL**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA COM CURCUMINA EM  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* E *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

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

São José dos Campos – SP

2021

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

Maciel, Lucas Tobias Rodrigues

Efeito da terapia Fotodinâmica seriada com curcumina em promastigotas de *Leishmania braziliensis* E *Leishmania amazonensis* / Lucas Tobias Rodrigues Maciel; orientadora, Juliana Ferreira Strixino. - São José dos Campos, SP, 2021.

1 CD-ROM, 49 p.

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

Inclui referências

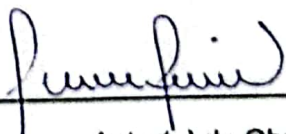
1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Leishmaniose Tegumentar Americana. 4. Curcumina. I. Strixino, Juliana Ferreira, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Lucas Tobias Rodrigues Maciel, 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, 27 de Setembro de 2021.

  
\_\_\_\_\_  
Autor(a) da Obra

Data da defesa: 27 / 09 / 2021

**LUCAS TOBIAS RODRIGUES MACIEL**

**“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA COM CURCUMINA EM  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, 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> EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA \_\_\_\_\_

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> LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA – UNESP \_\_\_\_\_

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

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 30 de agosto 2021.

---

## DECLARAÇÃO

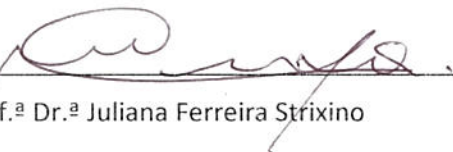
Declaramos que o aluno **Lucas Tobias Rodrigues Maciel**, matrícula nº01800082 regularmente matriculado no Curso de Engenharia Biomédica Mestrado, efetuou todas as correções solicitadas pelos membros de sua Banca, no texto final de sua dissertação.

São José dos Campos, 08 de setembro 2021.

Presidente da Banca: \_\_\_\_\_

  
Prof.ª Dr.ª Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Orientadora: \_\_\_\_\_

  
Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter permitido que esta conquista fosse alcançada, por toda dificuldade vencida, paciência e sabedoria para finalizar este projeto.

A minha amada esposa Fernanda Bueno Sant'Anna Pereira por ter me apoiado, incentivado e contribuído em diversas etapas durante a execução deste trabalho.

Aos meus pais Ari Tobias de Souza Maciel e Rosemary Rodrigues Maciel, por todo incentivo, amor e cuidado que tiveram por mim até hoje.

A minha irmã Thaiana Rodrigues Maciel, por toda parceria e carinho por mim.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Ferreira Strixino, por ter me recebido em sua equipe, pelo incentivo e orientação durante este projeto.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Guerra Pinto, por toda ajuda e disposição prestada durante este projeto.

A toda equipe do Laboratório de Fotobiologia Aplicado à Saúde, por toda parceria durante todos esses anos.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A CAPES, pela bolsa recebida durante os anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, por ter me recebido muito bem em seu laboratório no início do curso.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Matheus Diniz Gonçalves Coêlho, por toda amizade e parceria construída desde o primeiro ano de faculdade, por toda motivação e apoio deste então.

Ao Me. Bruno Henrique Godoi, por toda ajuda, disposição em tirar minhas dúvidas muito antes de ingressar no programa e pela força no início da “familiarização” no laboratório e instituto.

*“Pois eu sou o Senhor, o seu Deus, que o segura pela mão direita e diz a você: Não tema; eu o ajudarei”*

**Is. 41:13**

## EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA COM CURCUMINA EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis* E *Leishmania amazonensis*

### RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na utilização de uma fonte de luz e um fármaco fotossensível em comprimento de onda adequado e oxigênio molecular desencadeando a morte celular por meio da formação de espécies reativas de oxigênio. Por se tratar de uma terapia utilizada de forma localizada, a TFD mostra-se ideal para doenças cutâneas. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma protozoose de elevada prevalência mundial que apresenta diferentes evoluções clínicas podendo resultar em ulcerações e lesões desfigurativas em pele e cartilagens. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito *in vitro* da TFD de forma seriada com duas aplicações utilizando curcumina como fotossensibilizador. Para isto, utilizou-se a concentração de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de curcumina em cepas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, com fluência de luz de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  e irradiância de  $110 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Os testes realizados foram a análise da viabilidade, pelo teste de exclusão com Azul de Tripán, análise da internalização do FS por Microscopia Confocal e as alterações morfológicas, por coloração de Giemsa/May-Grunwald. Observou-se que houve internalização do FS antes da primeira e segunda aplicação de TFD, com mortalidade de 92% e 82% das cepas de *L.braziliensis* e *L. amazonensis*, respectivamente, após a segunda aplicação, e indução de alterações na conformação estrutural, como tamanho da célula e não evidenciação de núcleo e flagelo, demonstrando-se que a TFD foi efetiva. Conclui-se que a TFD seriada apresentou-se efetiva na indução de mortalidade *in vitro* de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* destacando-se assim o seu potencial para tratamento da leishmaniose.

**Palavras-chave:** *Terapia fotodinâmica; Leishmaniose tegumentar americana; Curcumina.*

## EFFECT OF SERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH CURCUMIN ON *Leishmania braziliensis* AND *Leishmania amazonensis* PROMASTIGOTES

### ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) consists of using a light source and a photosensitive drug at the appropriate wavelength and molecular oxygen triggering cell death through the formation of reactive oxygen species. As it is a therapy used in a localized way, PDT proves to be ideal for skin diseases. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a protozoan disease with a high worldwide prevalence that presents different clinical evolutions and may result in ulcerations and disfiguring lesions in the skin and cartilage. The present study aimed to evaluate the *in vitro* effect of PDT serially with two applications using curcumin as a photosensitizer. For this, a concentration of 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of curcumin was used in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* strains, with light fluence of 10  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  and irradiance of 110  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The tests performed were a viability analysis, by the Tripán Blue exclusion test, analysis of FS internalization by Confocal Microscopy and as morphological changes, by Giemsa/May-Grunwald staining.. It was observed that there was internalization of the PS before the first and second application of PDT, with mortality of 92% and 82% of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* strains, respectively, after the second application, and induction of alterations in the structural conformation, as cell size and no evidence of nucleus and flagellum, demonstrating that PDT was effective. It is concluded that serial PDT was effective in inducing *in vitro* mortality of promastigote forms of *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, thus highlighting its potential for treating leishmaniasis.

**Key-words:** *Photodynamic therapy; American tegumentary leishmaniasis; Curcumin.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. (A) amastigotas e (B) promastigotas.....	16
Figura 2. Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> .....	17
Figura 3. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (A) e sua densidade (B), por município no Brasil no ano de 2015.....	18
Figura 4. Manifestações Clínicas da Leishmaniose. (A) Forma cutânea; (B) Forma Muco-cutânea; (C) Forma Cutânea Difusa; (D) Forma Visceral.....	19
Figura 5. Princípio da Terapia Fotodinâmica .....	23
Figura 6. Espectro de emissão e excitação da curcumina .....	26
Figura 7. Curva de crescimento de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i> durante 7 dias consecutivos. ....	31
Figura 8. (A1) Presença do fotossensibilizador no interior de <i>L. amazonensis</i> após a primeira incubação, sendo 1 – Flagelo e 2 - Citoplasma (A2) <i>L. amazonensis</i> após a segunda incubação, com presença de curcumina no interior do citoplasma e baixa fluorescência no flagelo. (B1) Curcumina presente no flagelo (1) e citoplasma (2) de <i>L. braziliensis</i> , após primeira incubação. (B2) <i>L. braziliensis</i> após segunda incubação, evidenciando citoplasma, com baixa fluorescência no flagelo.....	32
Figura 9. Porcentagem de promastigotas viáveis de <i>L. braziliensis</i> : Primeira e segunda aplicação de TFD com curcumina na concentração de 125 µg.mL <sup>-1</sup> .....	33
Figura 10. Porcentagem de promastigotas viáveis de <i>L. amazonensis</i> : Primeira e segunda aplicação de TFD com curcumina na concentração de 125 µg.mL <sup>-1</sup> .....	33
Figura 11. Morfologia de <i>L. braziliensis</i> em todos os grupos experimentais, escuro e luz na fluência de 10 J.cm <sup>-2</sup> - 110 mW.cm <sup>-2</sup> , após duas aplicações de TFD. ....	34
Figura 12. Morfologia de <i>L. amazonensis</i> em seus respectivos grupos experimentais, escuro e luz na fluência de 10 J.cm <sup>-2</sup> e 110 mW.cm <sup>-2</sup> após duas aplicações de TFD. ....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AlPcS4 - Alumínio Ftalocianina Tetrasufonada
- ALA - Ácido 5-aminolevulínico
- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DMSO - Dimetil sulfóxido
- ERO - Espécie Reativa de Oxigênio
- FS - Fotossensibilizador
- FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
- LED - Diodo emissor de luz
- LIT - Liver triptose infusion – Infusão de fígado e triptose
- LTA - Leishmaniose tegumentar americana
- MS - Ministério da Saúde
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - Tampão fosfato salino
- PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
- Pp-IX - Protoporfirina IX
- SFB - Soro Fetal Bovino
- SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear
- RNA - Ácido Ribonucleico
- RPM - Rotações por Minuto
- RIFI - Imunofluorescência Indireta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVO.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1. LEISHMANIOSE .....	15
3.2. CICLO BIOLÓGICO.....	16
3.3. EPIDEMIOLOGIA.....	17
3.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	19
3.5. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO .....	20
3.6. TERAPIA FOTODINÂMICA .....	22
3.7. FOTOSSENSIBILIZADOR.....	24
3.8. CURCUMINA.....	25
3.9. TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1. PREPARO DAS CEPAS DE <i>Leishmania</i> .....	28
4.2. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITOS EM CULTURA.....	28
4.3. PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR.....	28
4.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	28
4.5. ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	29
4.6. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DOS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. amazonensis</i> PELO DO MÉTODO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN .....	29
4.7. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR COLORAÇÃO DE GIEMSA/MAY-GRUNWALD .....	30
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS .....	31
5.1. DETERMINAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA.....	31
5.2. INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA .....	31
5.3. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DOS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. amazonensis</i> PELO TESTE DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN .....	32
5.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS PROMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO SERIADO COM CURCUMINA .....	34

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma protozoose infecciosa negligenciada, não contagiosa, causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo uma enfermidade com potencial desfigurativo. A transmissão ocorre por picada durante o repasto sanguíneo de dípteros flebotomíneos, levando a manifestações clínicas de pele e mucosa (SULAIMAN *et al.*, 2019).

A LTA é uma doença endêmica em mais de 98 países e estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao protozoário, com aproximadamente dois milhões de novos casos ao ano, tornando-se um grave problema de saúde pública (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). A doença está difundida por todos os estados da federação brasileira, havendo casos de transmissão autóctones em 1.600 municípios (ALVAR *et al.*, 2012; ANVERSA *et al.*, 2018). De acordo com o Ministério da Saúde (MS), o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos notificados de LTA na América Latina (BRASIL, 2021).

Entre as espécies de maior prevalência que induzem a LTA está a *L. braziliensis* pertencente ao subgênero *Viannia*. Esta espécie é a mais prevalente no homem e é responsável pela forma cutânea mais agressiva dentre as demais espécies, estando presente em todas as regiões do país. Já entre as espécies do subgênero *Leishmania* destaca-se *L. amazonensis*, capaz de manifestar as formas cutânea e cutânea difusa (SILVA *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2018).

Há escassez de terapias disponíveis para essa enfermidade, sendo os antimoniais pentavalentes (Sb 5+) considerado padrão ouro, devido a rápida depuração nos rins e baixo acúmulo nos tecidos. Porém, a necessidade de sucessivas administrações parenterais e a evidenciação de resistência do parasito a estes medicamentos têm influenciado negativamente na evolução para um prognóstico de cura (AURELIANO *et al.*, 2018), trazendo à tona a necessidade da introdução de terapias secundárias e adjuvantes, como forma de auxiliar e ampliar o leque de tratamento para esta enfermidade (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Tratando-se de um protozoário intracelular obrigatório e que possui elevada porcentagem de infecção na pele e mucosa, terapias inovadoras, tais como a Terapia Fotodinâmica (TFD), vêm se destacando de forma promissora, como tratamento menos invasivo, proporcionando diminuição de reações adversas, uma vez que os tratamentos alopáticos convencionais promovem inúmeros efeitos indesejados em seus pacientes (CALVOPÍÑA *et al.*, 2017).

Esta modalidade inovadora de tratamento, baseia-se na excitação de um fármaco fotossensível sob exposição de luz em comprimentos de onda adequados (FAKHAR-E-ALAM *et al.*, 2017), e na presença de oxigênio molecular, para destruir tecidos ou células alvo mediante a geração de espécies reativas de oxigênio, dentre eles o oxigênio singleto, que pode ocasionar danos oxidativos a substrato biológicos induzindo a morte celular (BERNDT-PAETZ *et al.*, 2019).

A curcumina é uma substância comumente utilizada como corante e conservante alimentar, extraído do pó da raiz da cúrcuma ou Açafrão-da-Terra (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; YANG; LI; ZHAO, 2017). Além de apresentar efeitos terapêuticos, a curcumina também vem sendo estudada como FS na TFD, demonstrando grande potencial em estudos *in vitro* frente a diversas espécies de *Leishmania* (PINTO *et al.*, 2016; MARCOLINO *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica de forma seriada, utilizando curcumina como fotossensibilizador, em promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a internalização do fotossensibilizador por microscopia confocal;
- Avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular por meio do método de exclusão com Azul de Tripan;
- Avaliar morfologia dos promastigotas por coloração de Giemsa/May-Grunwald.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma enfermidade antroponóptica, não contagiosa de grande importância para saúde pública de forma global, devido a sua ampla distribuição e elevada prevalência, tratando-se de uma doença negligenciada (GERMANÓ *et al.*, 2020). A leishmaniose possui como agente etiológico o protozoário unicelular e digenético, que pertence ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (ROSS, 1903), no qual se diferencia por conter em sua morfologia uma organela específica, denominada de cinetoplasto, localizado no interior da célula e rica em Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020).

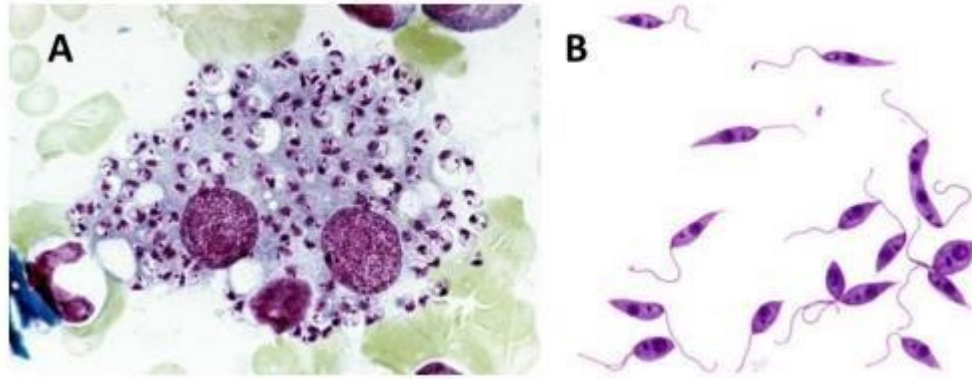
Esse gênero está classificado e dividido em três subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* prevalente nos mamíferos e *Sauroleishmania*, que infecta apenas répteis (SAF'JANOVA, 1982; CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997; KAUFER *et al.*, 2017).

Existem aproximadamente 53 espécies já descritas do gênero *Leishmania*, sendo 31 capazes de parasitar mamíferos e cerca de 20 espécies de importância médica já identificados por todo o mundo, que se manifestam por duas formas distintas, tais como cutânea e visceral (AKHOUNDI *et al.*, 2016; HORNEMANN *et al.*, 2017). Durante seu ciclo biológico, esses parasitos necessitam de um hospedeiro vertebrado (ocasionalmente o homem) e um hospedeiro invertebrado (inseto vetor), caracterizando-se como um parasito heteroxênico.

Esses protozoários, ao serem observados por microscópio de luz e corados por métodos derivados de *Romanovsky* como *Leishman*, panótico rápido ou Giemsa, apresentam duas formas evolutivas distintas: Forma promastigota ou flagelada, medindo entre 10,0 – 40,0 x 1,5 – 3,0  $\mu\text{m}$ , encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e em meios de cultura artificial. Possui corpo alongado com flagelo livre e extenso, emergindo do corpo do parasito na sua porção anterior. O núcleo é oval ou arredondado e o cinetoplasto em forma de bastão, presente na porção mediana entre a extremidade anterior e o núcleo. Já a forma aflagelada ou amastigota, mede aproximadamente cerca de 1,5 – 3 x 3 – 6,5  $\mu\text{m}$  e apresenta um corpo pequeno, oval, esférico ou fusiformes e sem motilidade. Em seu citoplasma é encontrado um núcleo grande e arredondado, cinetoplasto em forma de bastão, vacúolos, podendo ser visíveis ou não, e flagelos não apresentados de forma livre (Figura 1) (NEVES, 2016).

Estes protozoários são obrigatoriamente encontrados no interior das células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), células dendríticas, cuja maior frequência ocorre nos macrófagos de hospedeiro vertebrado (animais ou humanos). Após a fagocitose, as formas amastigotas começam a se multiplicar e assim, após rompimento da célula parasitada, fica livre para poder infectar novas células (CARVALHO, 2012).

Figura 1. Formas evolutivas de *Leishmania* spp. (A) amastigotas e (B) promastigotas.



Fonte: Moreira, 2017.

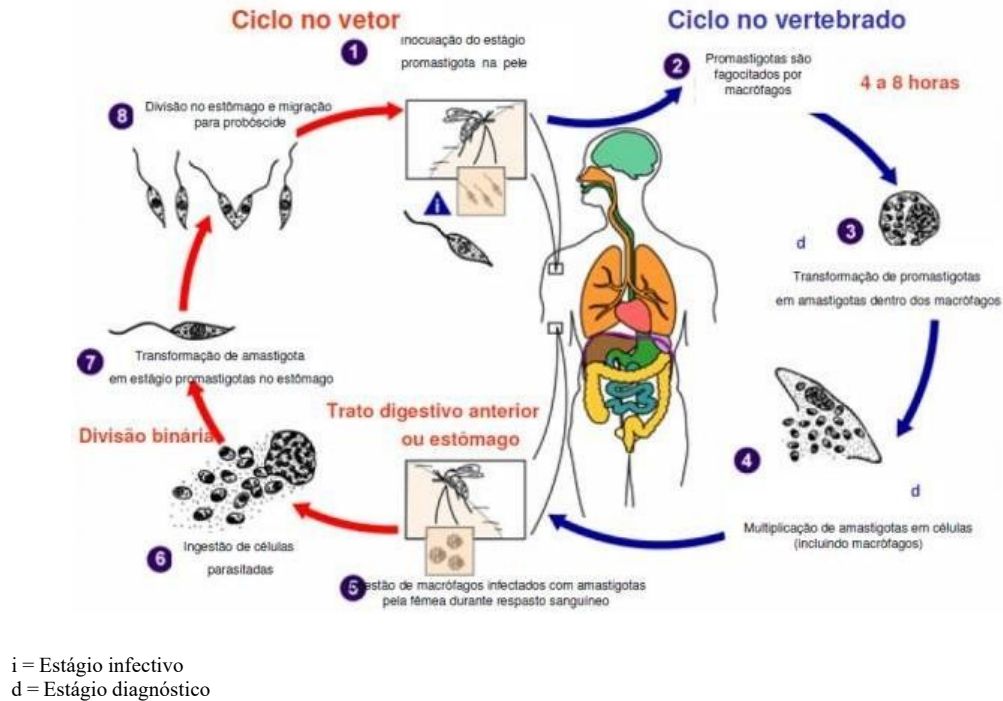
### 3.2 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida do gênero *Leishmania* é heteroxênico (Figura 2), necessitando de hospedeiro vertebrado, entre eles os seres humanos, e um hospedeiro invertebrado, neste caso o mosquito vetor, transmitindo o parasito durante o repasto sanguíneo (ROQUE; JANSEN, 2014).

A transmissão ocorre quando uma fêmea infectada do mosquito da subfamília Phlebotominae, conhecido popularmente como mosquito-palha, cangalha ou cangalhinha, se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado saudável e pela saliva presente na probóscide do inseto, liberando a forma promastigota metacíclica (forma infectante) na corrente sanguínea (ARAÚJO *et al.*, 2014). No organismo, a forma promastigota é fagocitada por macrófagos e outras células fagocíticas mononucleares, e, durante o processo de fagocitose, se diferenciam em amastigotas e começam a se multiplicar por divisão binária. Após atingir uma grande quantidade de amastigotas no meio intracelular, as células fagocíticas se rompem e liberam as amastigotas no meio extracelular ficando livres para infectar outras células ou podendo ser ingeridas por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. O ciclo no hospedeiro invertebrado se inicia quando o flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, ingere células fagocitárias contendo as formas amastigotas

no seu interior, as quais migram para o intestino médio do mosquito e se diferenciam em promastigotas, onde se multiplicam, desenvolvem e migram para a probóscide para realizar um novo ciclo (REY, 2008).

Figura 2. Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.



Fonte: Quinete, 2013.

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose é uma enfermidade endêmica e cosmopolita, sendo a forma visceral presente em 76 países, destes, 12 no continente americano. Segundo o MS, dos casos registrados na região da América Latina, 90% estão presentes no Brasil, dado registrado pela primeira vez em 1913, em um paciente proveniente do estado do Mato Grosso, região Centro-Oeste do país. Desde então, novos casos vêm sendo descritos em diversos municípios brasileiros, apresentando importantes mudanças em relação a sua forma de transmissão, uma vez que a doença era primordialmente transmitida em áreas rurais e silvestres, e vem se alastrando para área urbana. Os registros apresentam aumento de 3.500 novos casos por ano, obtendo aumento do coeficiente de dois casos para 100 mil habitantes. Segundo relatórios recentes, a letalidade da doença aumentou de 3,1% no ano de 2000 para 7,1% em 2012 (BRASIL, 2021).

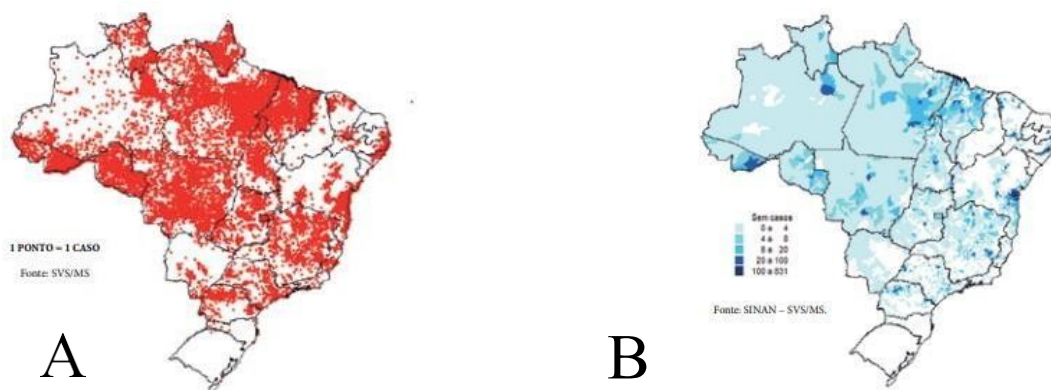
Apesar de menos letal, a forma tegumentar é considerada um grande problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais, estando presente em 85 países dos quatro continentes do mundo (Europa, África, Américas e Ásia) e obtendo registro anual de 0,7 a 1,3 milhões

de casos por ano. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido ao seu alto potencial de detecção e capacidade em produzir deformidades. Além de proporcionar riscos de ocorrências de deformidades no homem, tal enfermidade também afeta não somente o físico como o psicológico, gerando reflexos no campo econômico e social, visto que na maioria dos casos pode se tornar uma doença ocupacional (BRASIL, 2017).

Na América Latina, o Brasil é o país que mais apresenta casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Em 1909 foi descrito o primeiro caso de LTA no Brasil, com a presença de lesões nasobucofaríngeas e úlceras cutâneas em trabalhadores que construíam uma rodovia no interior de São Paulo. Desde então, a enfermidade vem sendo relatada por diversos municípios do país. São registrados em média, cerca de 21.000 casos por ano, apresentando coeficiente de incidência de 8,6 casos para 100.000 mil habitantes nos últimos cinco anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente, seguido das regiões Centro-Oeste e Nordeste com 46,4 casos/100.000 habitantes, 17,2 casos/10.000 habitantes e 8 casos/100.000 habitantes, respectivamente (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Foram registrados casos de LTA em 19 estados durante a década de 80. Após 23 anos, o Brasil já apresentava casos autóctones registrados em todos os estados. Demonstrando desta forma que a enfermidade vem aumentando e se expandindo conforme os anos. De acordo com as imagens fornecidas pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (figura 3), é possível visualizar a ampla dispersão de casos de LTA no país (BRASIL, 2017).

Figura 3. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (A) e sua densidade (B), por município no Brasil no ano de 2015.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, 2017.

### 3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Essa enfermidade possui um grande espectro de manifestações clínicas, e essas diferenças estão relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, podendo se manifestar de maneira cutânea ou visceral.

As manifestações clínicas da leishmaniose (Figura 4) dependem do agente etiológico em questão, uma vez que a espécie é fator determinante para designar qual será a maneira que a doença irá se manifestar, podendo ser dividida em quatro grupos (NEVES, 2016):

- Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea: Infecção limitada na derme, com ulcerações na epiderme. Espécies causadoras: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni*.
- Leishmaniose Muco-cutânea ou Cutâneo-mucosa: Infecção presente na derme com ulcerações. Podem ocorrer lesões metastáticas, com invasão de mucosa e destruição da cartilagem. Espécies causadoras: *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.
- Leishmaniose Cutânea difusa: Infecção presente na derme, com formação de nódulos não ulcerados. Podendo se disseminar por todo o corpo. Espécie causadora: *L. amazonensis*.
- Leishmaniose Visceral ou Calazar: Infecção presente em células do SMF do baço, fígado, medula óssea e dos tecidos linfóides, levando a crescimento atípico desses órgãos. Espécies causadoras: *L. donovani* e *L. infantum*.

Figura 4. Manifestações Clínicas da Leishmaniose. (A) Forma cutânea; (B) Forma Muco-cutânea; (C) Forma Cutânea Difusa; (D) Forma Visceral.



Fonte: Brasil, 2017.

As manifestações cutâneas apresentam bom prognóstico, quando diagnosticadas precocemente e tratadas de forma correta, proporcionando elevada porcentagem de cura.

As formas muco-cutâneas, dependendo do progresso da doença, podem levar a deformações na face. Porém, das manifestações clínicas apresentadas, a forma visceral é considerada a mais grave e de alta mortalidade, quando não tratada de forma correta (REY, 2008; PACE, 2014; VON STEBUT, 2015; PINTO *et al.*, 2016).

### 3.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A avaliação clínica da LTA baseia-se nas características da lesão que o paciente apresenta, em conjunto com a anamnese e dados epidemiológicos daquela região, a fim de auxiliar no diagnóstico, contudo, é necessário realizar diagnósticos diferenciados, uma vez que outras enfermidades apresentam manifestações clínicas semelhantes à LTA, entre elas, tuberculose cutânea, blastomicose, esporotricose, hanseníase, neoplasmas e úlcera tropical (NEVES, 2016). Todavia, o resultado positivo só pode ser confirmado com a presença do parasito, pelos exames direto e indireto.

O exame direto visa realizar análises por esfregaços de material oriundos de escarificações, biópsia de borda de lesão ou aspiração corada por técnicas derivadas de Romanowsky, Giemsa ou Leishman, para evidenciar a presença do parasito (GOTO; LINDOSO, 2010; BHARGAVA; SINGH, 2012; RANAWAKA; ABEYGUNASEKARA; WEERAKOON, 2012).

Outras formas de exame direto empregado na procura do parasito são: o exame histopatológico, utilizando fragmentos de pele obtidos de biópsia e avaliada por um patologista a procura das formas amastigotas; meio de cultura, que semelhante ao histopatológico também utiliza fragmentos de pele ou aspirados das bordas da lesão e de linfonodo infartados ou de áreas próximas. O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de *Leishmania* é o meio Neal, Novy, Nicolle (NNN) associado ao meio *Liver Infusion Triptose* (LIT), suplementado com soro fetal bovino e antibiótico, para que não ocorra contaminação. A cultura então é mantida por três repiques seguidos com intervalo de 10 dias. A inoculação em animais, também é uma forma de exame, porém restrita a instituições de pesquisa, devido ao seu elevado custo (NEVES, 2016).

Os métodos moleculares vêm crescendo e surgindo como uma nova opção para a detecção da LTA. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) torna-se promissora, devido a sua grande sensibilidade e suprimindo eventuais deficiências de outras técnicas, revelando o agente

etiológico e dependendo do protocolo utilizado, torna-se possível identificar a espécie envolvida (SANTOS *et al.*, 2019).

Já no que concerne o exame indireto, os métodos imunológicos são bastante utilizados no diagnóstico da LTA, dentre eles, o método para a avaliação da resposta celular como o teste de Montenegro e métodos para avaliação da resposta humoral, como Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), sendo utilizado para as formas cutâneas, mucosas e difusas (ALVES *et al.*, 2008; BHARGAVA; SINGH, 2012).

A forma visceral da doença pode ser diagnosticada pelas mesmas técnicas da LTA já supracitada, tais como, a análise histológica de biópsia ou punção aspirativa de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, meios de cultura, testes imunológicos de aglutinação direta, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Contudo, no Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina são a RIFI e ELISA (ALMEIDA; SANTOS, 2011; BHARGAVA; SINGH, 2012).

O tratamento da leishmaniose foi inicialmente introduzido pelo médico Gaspar Vianna, no ano de 1912, com uso do antimonial tártaro emético. Por muito tempo, este foi o único tratamento disponível para todo mundo. De modo geral, atualmente os tratamentos de primeira escolha utilizados para leishmaniose são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ), sendo os medicamentos, Glucantime® - Antimoniato de N-metilglucamina e Estibogluconato de sódio, vendido comercialmente como Pentostam®, os mais utilizados. A via de administração geralmente é intramuscular, mas também pode ser feita de forma endovenosa. Portanto, é realizada injeção de 17 mg  $Sb^{5+}$ /kg peso/dia, por um período de dez dias, em seguida um intervalo de dez dias para que, novamente seja realizada uma série de 10 dias de tratamento. O processo de cura determina o protocolo a ser utilizado. Por causa dos seus efeitos adversos, os antimoniais pentavalentes não são recomendados para pacientes cardíacos, por provocar alterações eletrocardiográficas, e gestantes, por ser abortivo (ABADIR; PATEL; HAIDER, 2010; MURRAY, 2012).

O tratamento estabelecido com os antimoniais pentavalentes, apesar de ser eficaz contra o protozoário, apresenta diversos efeitos colaterais devido a sua alta toxicidade, tais como, dores articulares, dores musculares, náusea e vômito, cefaléia, febre, anorexia, alterações nos testes de função hepática (elevação das transaminases e fosfatase alcalina), níveis de lipase e amilase, leucopenia, anormalidades no Eletrocardiograma (DINIZ *et al.*, 2012). Entretanto, terapias

alternativas, tais como a TFD, vem sendo pesquisadas a fim de obter um melhor resultado terapêutico e por serem menos invasivas.

O tratamento de segunda escolha para leishmaniose, as pentamidinas, possui um potencial efeito terapêutico inferior aos de primeira escolha, além disso, apresenta maior toxicidade, exigindo um monitoramento constante do paciente. As pentamidinas de maior uso são pentamidina-isotionato, estilbamidina e hidroxiestilbamidina. Caso os tratamentos de primeira e segunda escolha não surtirem efeito desejado, podem ser utilizados os tratamentos de terceira escolha, com os antibióticos Rifampicina e Anfotericina B (REY, 2008).

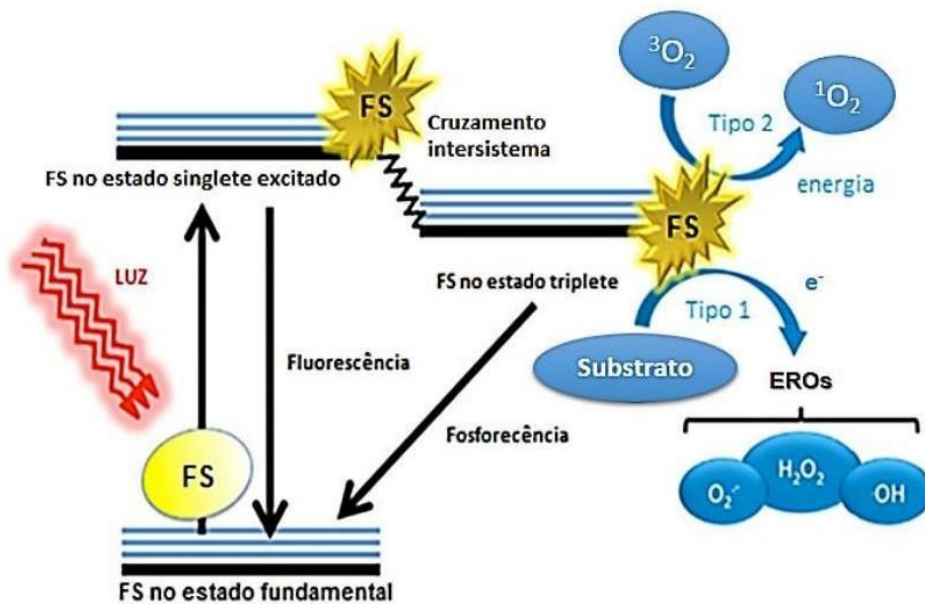
Além dos tratamentos supracitados, a miltefosina, vem surgindo como nova abordagem terapêutica para LTA. Inicialmente usada para tratamentos de cânceres, tal molécula possui o mecanismo de ação inibindo a biossíntese de fosfolipídios e esteróis e interferindo nas vias de transdução de sinal celular. Este fármaco já demonstrou grande potencial *in vitro* e em *in vivo* para diversas espécies do gênero *Leishmania* (MACHADO; PENNA, 2012).

Na última década, pesquisas com TFD frente à LTA vêm se destacando, com estudos utilizando diversos fotossensibilizadores, como, por exemplo ácido 5-aminolevulínico (ALA), azul de metileno, curcumina e diferentes protocolos, obtendo-se resultados promissores no que concerne à morte dos parasitos (PINTO *et al.*, 2016; VOLPE *et al.*, 2018; JOHANSEN; JERNEC; FABRÍCIUS, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019; GOLDIN *et al.*, 2020).

### 3.6 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento de doenças que consiste na associação de uma substância fotossensível denominado de FS, fonte de luz em comprimento de onda adequado a absorção do FS e oxigênio molecular para produzir uma reação fotoquímica, transferindo energia ao oxigênio molecular presente no tecido, formando espécies reativas de oxigênio (ERO). Tal mecanismo de ação ocorre por conversão intersistema e induz a duas reações distintas, tais como, reação do tipo 1: onde ocorre a formação de radicais livres e reação do tipo 2: por meio da qual ocorre formação de oxigênio singleto, a fim de causar a destruição seletiva das células, induzindo a morte celular (Figura 5). Este processo ocorre em duas etapas, sendo a primeira a aplicação do fotossensibilizador, podendo ser de forma tópica ou injetável, seguido da radiação de luz visível para sua ativação. (AKILOV *et al.*, 2007; ANDREEVA *et al.*, 2010; BASTOS *et al.*, 2012).

Figura 5. Princípio da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Ling, 2016.

O método teve seu início em meados do século XX, com Oscar Raab e seu professor Hernan von Tappeiner, que observaram os efeitos da fotossensibilização frente ao protozoário *Paramecium caudatum*, utilizando a luz branca e o corante acridina. O termo TFD, propriamente dito, surgiu quando o professor Hernan von Tappeiner através de diversos estudos, observou que para a reação acontecer, era necessária a presença de oxigênio (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Em paralelo o estopim para o início dos estudos médicos envolvendo a combinação de luz e um agente fotossensível, foi em 1903, quando Niels Finsen recebeu o prêmio Nobel pelo tratamento de lúpus vulgar com a radiação ultravioleta. A partir deste momento a fototerapia começou a ser estudada e praticada para tratamento de várias dermatoses (RAJESH *et al.*, 2011).

Já na era moderna, em 1993, uma formulação de hematoporfirina (Photofrin®), obteve aprovação clínica e vem sendo utilizada em TFD, na área de oncologia e dermatologia e desde então, o interesse pela ação fotodinâmica vem aumentando por todo o mundo (BASTOS *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que a TFD é altamente eficaz em diversas áreas, como dermatologia para o tratamento de câncer de pele (RODRIGUES *et al.*, 2017; SANTILE *et al.*, 2020), para tratamento de acne (JUNIOR *et al.*, 2020), bem como em tratamento conjunto para a melhora nos aspectos dermatológicos (DIAS; LOGSDON, 2021). Na odontologia (TERRA-GARCIA *et al.*, 2021; OLIVEIRA, 2017), entre outras áreas relacionadas

a microbiologia bacteriana (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2010; PEREIRA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2019; MAGACHO *et al.*, 2020).

Os fungos, como do gênero *Candida*, são amplamente estudados, principalmente em correlação com outras áreas como odontologia, bem como no auxílio do tratamento de comorbidades decorrentes de outras doenças, como vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a propensão à infecção com *Candida* (KHARKWAL *et al.*, 2011; LEITE; PIVA; MARTINS-FILHO, 2015). Além das bactérias e fungos, outro microrganismo estudado e fonte desse trabalho são os protozoários, como as espécies de *Leishmania*. Estudadas a fim de melhorar comorbidades e auxiliar no tratamento em conjunto com terapias convencionais (PINTO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2021).

Cabe destacar que, para se obter resultado positivo no uso da TFD, é necessário ter conhecimento quanto ao uso do fotossensibilizador, sua estrutura química e sua interação com a célula alvo. Estas características serão de suma importância para que se obtenha o efeito desejado, como a morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

### 3.7 FOTOSSENSIBILIZADOR

Fotossensibilizadores são compostos capazes de interagir com a luz de modo a produzir espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete. Possivelmente, são os principais componentes da TFD, sendo que os resultados terapêuticos a serem obtidos devem estar concentrados em sua estrutura química (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017).

Segundo Issa e Manela-Azulay (2010), dentre as características ideais de um FS estão a pureza química, a capacidade de localização específica em tecido ou célula alvo, o curto intervalo entre a administração do fármaco e o acúmulo máximo no tecido ou célula alvo, a meia-vida curta, a eliminação rápida das células normais, a ativação por comprimentos de onda com ótima penetração no tecido alvo e a capacidade de produzir grande quantidade de produtos citotóxicos. A eosina e a acridina foram os primeiros FS utilizados por Tappenier em estudos do câncer de pele não melanoma. Já na década de 60, um novo composto foi obtido a partir da purificação de hematoporfirina (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Kennedy *et al.* (1990) introduziram nos anos 90, um método alternativo com o uso do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) tópico, utilizado como precursor metabólico de porfirinas endógenas, que permitiu o uso restrito da fototoxicidade no local de aplicação. Como precursor metabólico de porfirinas endógenas, na via de biossíntese da heme, a absorção do 5-ALA induz a produção e o acúmulo da propotorfirina IX (Pp-IX), que é uma substância fluorescente e eficaz como fotossensibilizador (KENNEDY *et al.*, 1990; FELICIO *et al.*, 2008).

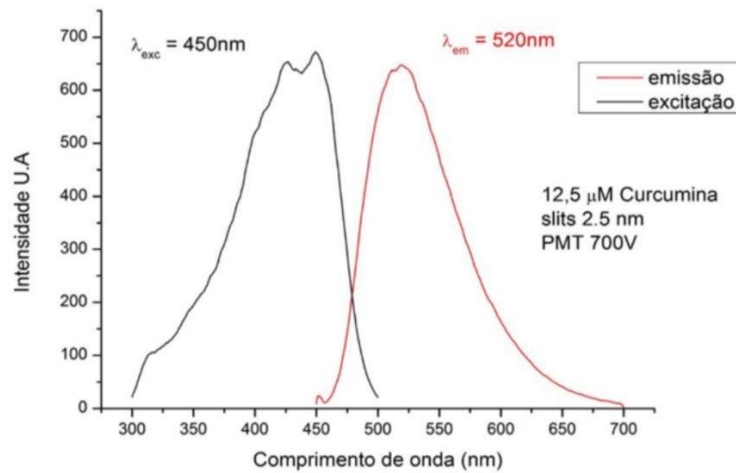
Abrahamse e Hamblin (2016) classificou os fotossensibilizadores em três grupos: I. FS de tetrapirrol, sendo porfirina (Pp-IX), cloro (Foscan, Verteporfina e Cloro e6) e ftalocianinas (Alumínio ftalocianina tetrasulfonada – ALPcS4), como exemplos. II. Corantes sintéticos, azul de metileno, azul de toluidina e Rosa bengala. III. Produtos naturais, Hipericina, Riboflavina e Curcumina (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

### 3.8 CURCUMINA

A curcumina é uma substância constantemente utilizada como corante e conservante alimentar, extraído de um rizoma chamado *Curcuma longa*, mas conhecido como Açafrão-da-Terra. Além da sua utilização na culinária, diversos pesquisadores vêm apontando o seu efeito terapêutico, como anti-inflamatório, antimicrobiano, ação cicatrizante e digestivo. Mas também para tratamento de doenças, como Mal de Alzheimer, doenças parasitárias e em alguns tipos de cânceres (SORIA-LOZANO *et al.*, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; YANG; LI; ZHAO, 2017).

Sua ativação corresponde a 300 e 500 nm de comprimento de onda (Figura 6). Entretanto, por se tratar de doença que acarreta uma lesão superficial, o comprimento de onda emitido pela curcumina possibilita e viabiliza a utilização dela para o tratamento de LTA. Outro ponto de extrema importância para um fotossensibilizador ser considerado ideal é a sua ação tóxica no escuro, ou seja, sua citotoxicidade nas células estudadas, quando em contato apenas com o FS.

Figura 6. Espectro de emissão e excitação da curcumina.



Fonte: Marcolino *et al.*, 2021.

Ao se tratar da propriedade antiparasitária da curcumina frente às cepas do gênero *Leishmania*, tal molécula apresenta baixa citotoxicidade no escuro, ou seja, quando do uso sem a adição da luz, conforme demonstrado por Pinto *et al.*, 2016 e Pereira *et al.*, 2021. Além da citotoxicidade, fatores como interação com o material genético (genotoxicidade) mostram-se importantes, pois algumas alterações genéticas podem influenciar em diversas fases do ciclo celular de uma célula tornando-a inviável, desencadeando assim, morte celular. Das *et al.* (2008) e Ogiwara *et al.* (2013) demonstraram a interação de curcumina com o material genético de diferentes células, mediante interação com o sistema de reparo celular, e, conseqüentemente, induzindo apoptose de células cancerígenas e também a influência da curcumina no ciclo celular das *Leishmania*, estimulando a formação de ERO, respectivamente, fatores estes que potencializam o uso de curcumina como fotossensibilizador, e, conseqüentemente, as aplicabilidade na terapia fotodinâmica.

### 3.9 TERAPIA FOTODINÂMICA SERIADA

A Terapia Fotodinâmica Seriada (TFDs) consiste na utilização de diversas aplicações da TFD, visando uma resposta terapêutica melhor, uma vez que, resultados de diversos pesquisadores utilizando apenas uma única aplicação da terapia não têm induzido uma completa eliminação de diferentes linhagens celulares e alvos biológicos (FREITAS *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2021; VITORIO *et al.*, 2021).

No que concerne a LTA, a potencialidade do uso da TFDs também tem sido demonstrada por diversos pesquisadores, dentre os quais Johansen, Jerneć e Fabricius (2019) os quais reportaram o uso de TFDs em um paciente acometido por leishmaniose multirresistente utilizando ALA como FS com duas aplicações semanais, resultando em completa regressão da úlcera. De forma semelhante, Goldin *et al.*, (2020), demonstraram a eficácia de três aplicações de TFDs utilizando como FS o azul de metileno, culminando com a regressão de uma lesão não ulcerosa decorrente de infecção por *L. tropica*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARO DAS CEPAS DE *Leishmania*

Cepas de *Leishmania braziliensis* (M2904) e *Leishmania amazonensis* (M2269) foram mantidas em meio de cultura *Liver Infusion Triptose* (LIT), suplementado com Soro Fetal Bovino a 10%, 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de hemina, urina estéril 2% e 1% de solução de penicilina/estreptomicina. Os protozoários foram mantidos em estufa de crescimento à 26°C e repiques de manutenção realizados semanalmente, após a determinação da fase logarítmica de crescimento da cepa.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITOS EM CULTURA

A determinação da fase estacionária de crescimento parasitário em cultura, foi realizada por meio de contagens diárias dos protozoários, iniciando com  $1 \times 10^6$  da cultura, com auxílio de uma câmara de Neubauer e observação em microscópio DM2500 LEICA, durante um período de 7 dias consecutivos.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

A curcumina, fotossensibilizador utilizado no estudo, foi cedida pelo Laboratório de Biofotônica - Instituto de Física, USP – São Carlos, sendo diluída inicialmente em Dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1% do volume final) e diluída com *Phosphate Buffer Solution* (PBS) na concentração de  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (MARCOLINO *et al.*, 2021).

### 4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A TFD foi realizada em dois experimentos independentes, cada um em triplicata ( $n = 6$ ), estando as culturas de *Leishmania* na fase estacionária de crescimento. Os grupos com  $1 \times 10^6$  parasitos foram divididos em: Controle (sem tratamento), FS (tratado com  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de curcumina), Luz (irradiado com  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e TFD (tratado com  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de curcumina e irradiado com  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), dividido em primeira e segunda aplicação da TFD. Os grupos FS e TFD foram incubados com curcumina por uma hora em estufa a 26°C.

Para a irradiação dos grupos Luz e TFD utilizou-se um equipamento de LED, Biotable (450 nm,  $110 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , Biopdi®) por 91 segundos resultando em fluência de luz de  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (MARCOLINO *et al.*, 2021). Após o processo, as placas irradiadas foram armazenadas protegidas da luz em estufa a 26°C por um período de 48 horas, sendo o mesmo procedimento

aplicado para os grupos escuros. Após esse período efetuou o segundo procedimento de incubação e posterior irradiação com os mesmos parâmetros, totalizando duas aplicações. Foram realizadas as análises de internalização, viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripan e morfologia por coloração pelo método de Giemsa/May-Grunwald, após a primeira aplicação e, após a segunda aplicação, sendo os resultados avaliados e comparados estatisticamente.

#### 4.5 ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para verificar a internalização da curcumina antes da primeira aplicação da TFD, ambas as espécies foram incubadas por 1 hora com FS na concentração de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após o período de incubação, o meio contendo o FS foi retirado e os parasitos foram lavados por duas vezes com PBS. Em seguida, as formas promastigotas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% diluída em PBS e então aderidas em lamínulas circulares tratadas com Poli-l-lisina. As lamínulas foram montadas com ProLong™ *Live Antifade Reagent* (Thermofisher).

Em acréscimo, dois grupos das cepas de *Leishmania* que haviam sido previamente submetidos à primeira aplicação de TFD, receberam após 48 horas, um novo tratamento com curcumina e posteriormente foram fixados para análise da internalização. Todo o procedimento experimental foi realizado no escuro, e as lâminas foram examinadas em microscópio confocal Zeiss LSM 700. Os espectros de emissão da curcumina foram registrados de 450 a 650 nm com onda de excitação em 405 nm.

#### 4.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DOS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* E *L. amazonensis* PELO DO MÉTODO DE EXCLUSÃO COM AZUL DETRIPAN

Para a determinação da viabilidade celular dos promastigotas das cepas avaliadas, realizou-se o teste de exclusão com Azul de Tripan. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da cultura do parasito nos grupos Controle, FS, Luz e TFD,  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de curcumina, para os grupos FS e TFD e 90  $\mu\text{L}$  do azul de Tripan para todos os grupos analisados. Após homogeneizar e aguardar 5 minutos, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, determinando-se o número de parasitos vivos e mortos. Tal procedimento foi igualmente estabelecido nos grupos submetidos à segunda aplicação de TFD sendo realizado em triplicata em ambas as aplicações.

#### 4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR COLORAÇÃO DE GIEMSA/MAY-GRUNWALD

Para a análise morfológica, uma alíquota de cada grupo foi retirada e foram preparados os esfregaços, que após secos foram corados. Para a coloração de Giemsa/May-Grunwald, a lâmina foi coberta com o corante May-Grunwald, por 1 minuto. Em seguida foi adicionado o mesmo volume de água, e após 1 minuto retirado.

Posteriormente, acrescentou-se o mesmo volume do corante Giemsa, diluído em Tampão fosfato, por 20 minutos. Após os 20 minutos, foi retirado todo excesso de corante, sendo as lâminas lavadas em água corrente, secas e analisadas por meio do microscópio DM 2500 LEICA, com câmera LEICA DFC 425 acoplada. Este procedimento foi realizado após a primeira e segunda aplicação de TFD.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

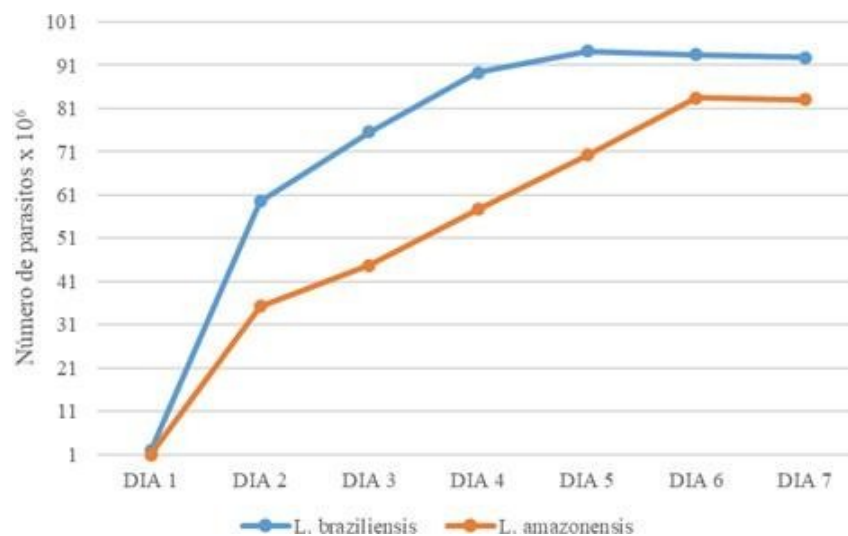
Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos ao teste de ANOVA One-way com teste de Tukey como confirmação, utilizando o software GraphPad Prism 6.0, com nível de significância  $p < 0.0001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA

Após a realização da curva de crescimento dos parasitos durante o período de 7 dias, observou-se que ambas as espécies apresentaram um crescimento progressivo, conforme esperado (Figura 7). *L. braziliensis* ( $1,9 \times 10^6$  - dia 1), atingiu o pico de crescimento no dia 5 ( $94,2 \times 10^6$ ), mantendo-se o platô durante o dia 6 ( $93,4 \times 10^6$ ), porém com uma pequena diminuição do número de parasitos no dia 7 ( $92,7 \times 10^6$ ). Já a espécie *L. amazonensis* ( $1,1 \times 10^6$  - dia 1), apresentou o pico de crescimento no dia 6 ( $83,5 \times 10^6$ ) e manteve o platô no dia 7 ( $83,3 \times 10^6$ ). Após determinada a fase estacionária, os experimentos foram realizados no dia 5 para a espécie *L. braziliensis* e dia 6 para a espécie *L. amazonensis*, conforme observado na figura 7.

Figura 7. Curva de crescimento de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* durante 7 dias consecutivos.

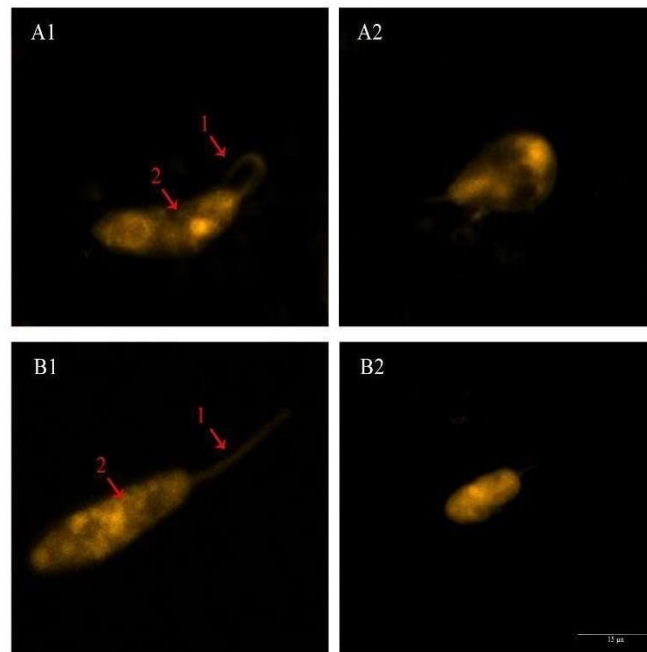


Fonte: Autor.

### 5.2 INTERNALIZAÇÃO DA CURCUMINA

Observou-se, após a primeira incubação, a presença de curcumina no citosol e flagelo de ambas as espécies de *Leishmania* testadas. Já a análise, após a segunda incubação com o FS, foi possível verificar a presença de curcumina no citoplasma de ambas as espécies, no entanto, observou-se que houve a perda do formato fusiforme característico das espécies e de grande parte do flagelo após a aplicação da TFD, como demonstrado nas figuras A2 e B2 (Figura 8).

Figura 8. (A1) Presença do fotossensibilizador no interior de *L. amazonensis* após a primeira incubação, sendo 1 – Flagelo e 2 - Citoplasma (A2) *L. amazonensis* após a segunda incubação, com presença de curcumina no interior do citoplasma e baixa fluorescência no flagelo. (B1) Curcumina presente no flagelo (1) e citoplasma (2) de *L. braziliensis*, após primeira incubação. (B2) *L. braziliensis* após segunda incubação, evidenciando citoplasma, com baixa fluorescência no flagelo.



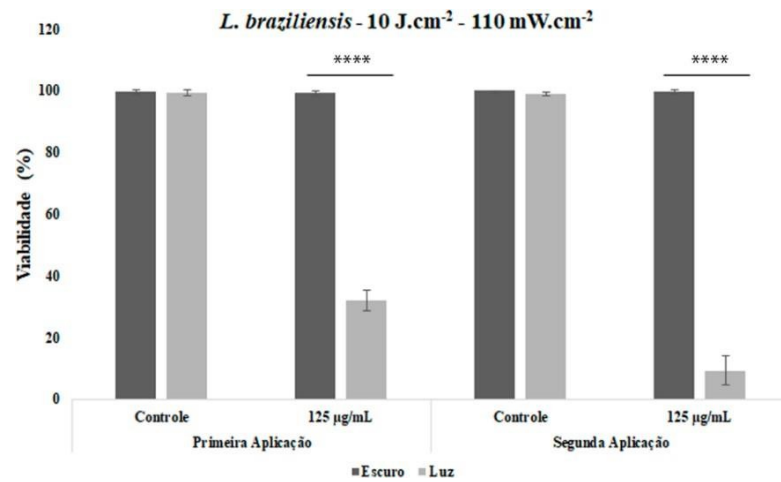
Fonte: Autor.

### 5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DOS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* E *L. amazonensis* PELO TESTE DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN

Após a realização do tratamento seriado da TFD com curcumina, o teste de viabilidade demonstrou que os grupos Escuros (Controle e FS), bem como o grupo Luz não apresentaram impacto na viabilidade da espécie de *L. braziliensis* confirmando ausência de toxicidade da curcumina e luz de forma isolada para a célula.

O grupo TFD, apresentou alta toxicidade celular, com diferença significativa ( $p < 0.0001$ ) em relação ao grupo controle, obtendo-se índice de mortalidade de 68% e 92% após a primeira e segunda aplicação da terapia, respectivamente (Figura 9).

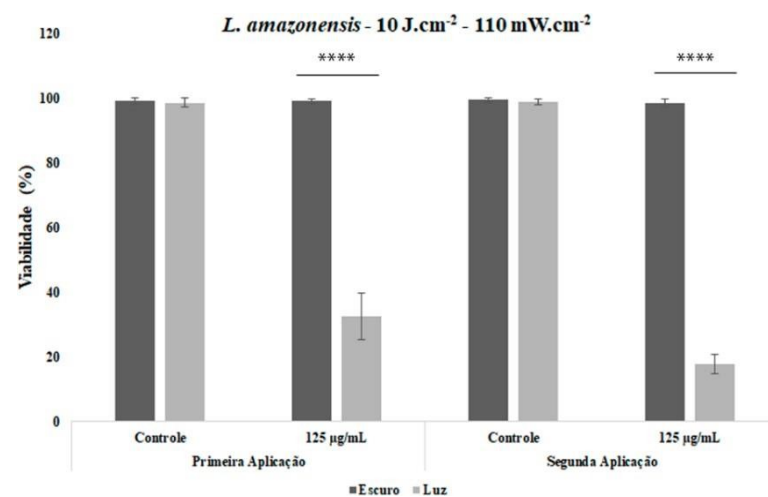
Figura 9. Porcentagem de promastigotas viáveis de *L. braziliensis*: Primeira e segunda aplicação de TFD com curcumina na concentração de  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



Fonte: Autor.

Já a espécie *L. amazonensis*, demonstrou resultados semelhantes aos observados na espécie *L. braziliensis*, de forma que os grupos Controles, FS e Luz, não apresentaram diferença significativa estatisticamente, porém o grupo TFD apresentou alta toxicidade quando comparado ao grupo Controle, obtendo-se um índice de mortalidade de 67% ( $p < 0.0001$ ) após a primeira aplicação da TFD e de 82% ( $p < 0.0001$ ) na segunda aplicação (Figura 10).

Figura 10. Porcentagem de promastigotas viáveis de *L. amazonensis*: Primeira e segunda aplicação de TFD com curcumina na concentração de  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



Fonte: Autor.

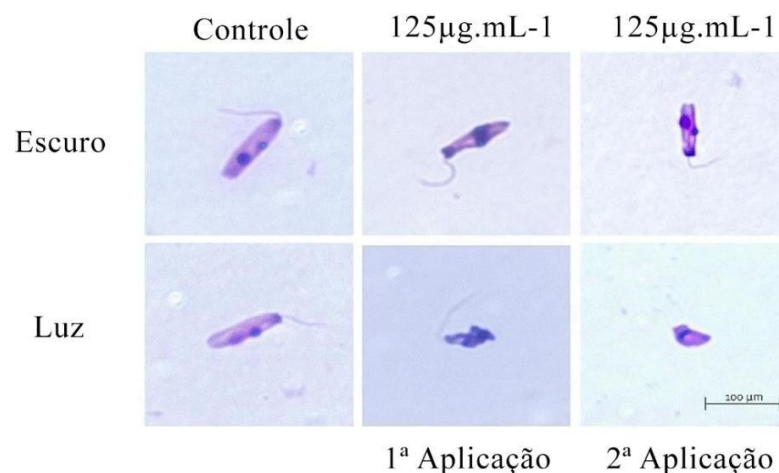
#### 5.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS PROMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO SERIADO COM CURCUMINA

De maneira geral, a análise morfológica de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, revelou que os grupos Escuros (Controle e FS) e o grupo Luz não apresentaram alterações morfológicas visíveis, mantendo aspecto fusiforme, com núcleo, cinetoplasto e flagelo evidente.

Após a primeira e segunda aplicação da TFD, os parasitos apresentaram alterações morfológicas significativas quando comparado aos demais grupos não tratados, observando-se de maneira geral diminuição do citoplasma, alteração do formato fusiforme e em alguns casos ausência de flagelo.

Em relação à morfologia de *L. braziliensis* (figura 11) após a primeira aplicação da TFD houve alteração no aspecto fusiforme e no tamanho do parasito, entretanto a cepa ainda demonstrou flagelo evidente. Quanto às organelas presentes no citoplasma, ainda pode-se observar a presença do núcleo e cinetoplasto. Já após a segunda aplicação, observou-se uma diminuição mais acentuada e alterações mais evidentes do formato original do protozoário. No que diz respeito às estruturas, o flagelo não se mostrou evidente, com evidência apenas do núcleo.

Figura 11. Morfologia de *L. braziliensis* em todos os grupos experimentais, escuro e luz na fluência de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  -  $110 \text{ mW.cm}^{-2}$ , após duas aplicações de TFD.

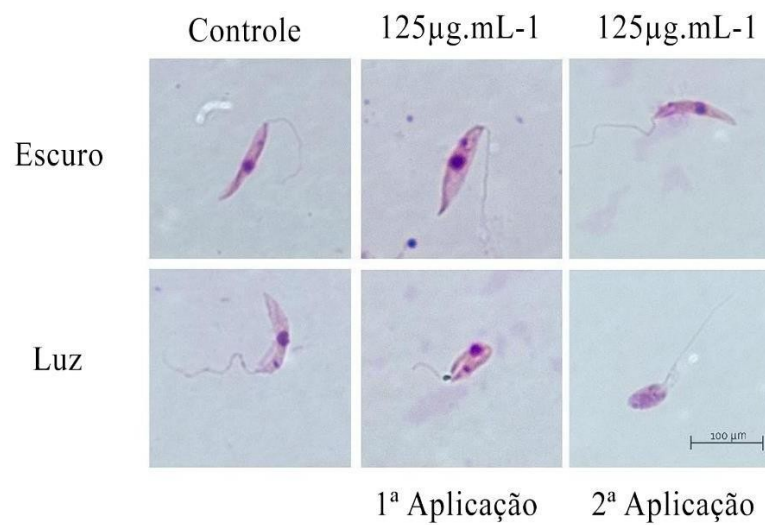


Fonte: Autor.

Nas análises feitas com a cepa de *L. amazonensis* (Figura 12), as alterações morfológicas foram ainda mais evidentes do que as observadas na cepa de *L. braziliensis*.

Após a primeira aplicação de TFD nas cepas de *L. amazonensis*, observou-se alteração de sua estrutura, com perda do formato alongado e fusiforme, entretanto o núcleo e flagelo ficaram evidentes. Após a segunda aplicação da TFD, foi observado a não presença do núcleo e cinetoplasto. Com relação ao formato, houve uma alteração ainda mais acentuada, uma vez que passou de um formato grande alongado e fusiforme, para pequeno e arredondado.

Figura 12. Morfologia de *L. amazonensis* em seus respectivos grupos experimentais, escuro e luz na fluência de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  e  $110 \text{ mW.cm}^{-2}$  após duas aplicações de TFD.



Fonte: Autor.

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho observou-se que a curcumina foi internalizada em promastigotas das espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* nos dois momentos observados, a saber: primeira e segunda incubação. Tais resultados corroboram com os apresentados por Pinto *et al.* (2016), os quais demonstraram a capacidade de internalização da curcumina por promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*, após uma hora de incubação, apresentando uma distribuição difusa no citosol, com acumulação específica no núcleo e cinetoplasto.

Um dos objetivos do presente estudo foi o de avaliar se após uma aplicação de TFD, ainda existiriam células viáveis que pudessem ter capacidade novamente de internalizar o FS e, em consequência, serem passíveis de eliminação após estabelecido uma segunda aplicação da TFD. Os resultados obtidos não só permitiram observar a internalização do FS após a primeira aplicação da TFD, como também evidenciaram a eficiência da segunda aplicação de TFD, demonstrando maiores alterações morfológicas e de viabilidade das formas promastigotas.

Considerando-se que a observação de internalização de curcumina se deu apenas de forma qualitativa, mediante evidenciação visual em microscópio confocal, não se permitiu inferir a respeito da existência ou não de diferenças quantitativas na internalização do FS, o que se tornaria possível por meio do uso de técnicas mais acuradas para além da simples visualização, como, por exemplo, a indução de ruptura dos parasitos com liberação de seus conteúdos intracelulares e posterior determinação da quantidade de FS, mediante uso de espectrofotometria (AKILOV *et al.*, 2007).

De fato, a eficácia de internalização é um dos fatores fundamentais para o sucesso da TFD de modo que, havendo persistência de células viáveis após uma primeira aplicação de TFD, o sucesso de uma nova internalização do FS seria crítico para a eficácia de uma segunda aplicação. Neste sentido, o dano decorrente da primeira aplicação de TFD pode ter sido crucial não só para induzir a morte de formas promastigotas como também para causar alterações morfológicas nas formas que sobreviveram, e, conseqüentemente, permitir uma persistência ou até mesmo um aumento da internalização do FS para aplicações seguintes, e conseqüentemente, um aumento da eficácia da terapia.

A eficácia da curcumina como FS possivelmente está relacionada com a capacidade de tal molécula induzir estresse oxidativo em experimentos de fotodegradação, com produção de ERO, mais especificamente oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila,

impulsionando a biodisponibilidade de tais substâncias, o que possivelmente culminaria com um colapso na capacidade de resistência a ERO que o parasito comumente apresenta, o tornando, dessa forma, mais susceptível a ser eliminado (KAZANTZIS *et al.*, 2020).

De fato, para a manutenção da longevidade de uma célula parasitária, é defundamental importância que esta célula mantenha a homeostase celular frente a ERO, e, quando uma célula falha em manter sua homeostase mediante o uso de sua capacidade antioxidante, é gerado estresse oxidativo, que leva a apoptose. Assim, para se proteger da apoptose mediada por ERO, o parasito deve controlar rigorosamente os níveis de tais substâncias, de forma a regular positivamente a defesa antioxidante (HA *et al.*, 1998). Com o aumento da disponibilidade de ERO induzida pela TFD utilizando curcumina como FS, este equilíbrio tende a se desfazer de forma desfavorável ao parasito, extrapolando sua capacidade de depurar ERO, e, conseqüentemente o levando a morte (MANDAL *et al.*, 2016).

As ERO representam um importante papel na defesa contra *Leishmania*, porém o parasito apresenta arsenais de defesa de forma a sobreviver sem que seja destruído por tais moléculas. De acordo com Marcolino *et al.* (2021), as ERO, quando produzidas em excesso, são capazes de induzir danos ao DNA, e, dessa forma, causar a morte celular de diversos patógenos, inclusive de espécies do gênero *Leishmania*. Em contrapartida, estes protozoários são capazes de evadir da ação das ERO principalmente por desregulação de enzimas envolvidas na produção de tais moléculas, bem como regulando negativamente a produção destas a nível mitocondrial. Tais autores enfatizam o potencial do uso de compostos geradores de ERO como ferramentas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controle de leishmaniose, podendo-se neste caso, destacar a potencialidade da terapia proposta no presente trabalho, a TFD utilizando curcumina como fotossensibilizador.

Cabe destacar que no presente trabalho foram utilizadas apenas formas promastigotas nos procedimentos experimentais. Apesar de tais formas evolutivas não estarem presentes na lesão de um paciente diagnosticado com leishmaniose, fato este que poderia limitar a relevância de algum possível resultado de eficácia *in vitro*, segundo Van Assche *et al.* (2011), o fato de uma terapia baseada na produção de ERO, se apresentar eficiente na indução de mortalidade de formas promastigotas é de elevada importância, uma vez que estas formas parasitárias são capazes de produzir elevadas quantidades de enzimas antioxidantes frente a ERO, sendo tal capacidade mantida quando da progressão para a condição amastigota, embora possíveis ajustes

na concentração/dose do FS e luz sejam necessários quando do uso de formas amastigotas, conforme exposto por Pereira *et al.* (2021) .

De acordo com Cabral *et al.* (2020) os padrões antioxidantes da *Leishmania* são essenciais para a resistência a drogas, recaídas e patogenicidade, e, dessa forma, danos oxidativos mais intensos, induzidos pela TFD podem causar a destruição do parasito.

Kocyigit e Guler (2017) evidenciaram a capacidade da curcumina induzir estresse oxidativo e demonstraram o potencial uso desta para tratamento de câncer, induzindo, *in vitro*, dano ao DNA de células B16-F10 de melanoma murino, bem como apoptose e citotoxicidade via sua atividade pró-oxidante, porém tal capacidade sendo de uma maneira dose-dependente. No presente trabalho, o tratamento apenas com a curcumina na concentração aplicada não foi capaz de induzir danos perceptíveis as formas promastigotas do parasito e conseqüentemente não afetou sua viabilidade, porém apresentou uma maior eficácia possivelmente não devido ao aumento da concentração do FS, mas sim pela TFD ou mais precisamente pela TFDs (Terapia Fotodinâmica Seriada).

No que diz respeito à morfologia das cepas estudadas, ambas demonstraram alterações nos grupos em que foram aplicadas a TFD quando comparadas com os grupos escuros. Os grupos irradiados com  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de curcumina apresentaram alterações morfológicas relevantes desde a primeira aplicação, sendo possível observar perda do formato fusiforme e do flagelo nas cepas de *L. braziliensis*, mas o núcleo ainda se mostrou evidente nas duas aplicações. Entretanto, nas cepas de *L. amazonensis*, pode-se observar que em comparação com a outra cepa estudada, as alterações foram ainda mais acentuadas, pois em uma segunda aplicação, além de perder o formato fusiforme e apresentar-se de forma arredondada o núcleo não foi evidenciado.

Segundo Basmacıyan e Casanova (2019), para que seja definida apoptose em *Leishmania* diversos critérios devem ser considerados, e, em relação à morfologia deve ser evidenciado pelo menos duas das cinco alterações que seguem: encolhimento celular, arredondamento celular, alterações na membrana plasmática com a manutenção de sua integridade, fragmento nuclear e condensação da cromatina.

Mediante os procedimentos experimentais delineados no presente estudo foi possível identificar encolhimento e arredondamento celular nas duas espécies de *Leishmania* avaliadas podendo-se, deste modo, sugerir que a utilização da TFD, mais precisamente a TFDs foi capaz

de causar danos irreversíveis a estrutura destes protozoários, provavelmente induzindo apoptose.

Ainda segundo Basmacıyan e Casanova (2019), a indução de estresse oxidativo com produção de ERO promove estímulos que induzem fenótipos semelhantes à apoptose. Estas alterações morfológicas também foram relatadas em um estudo com curcumina e utilizando fluência de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  feito por Pinto *et al.* (2016). O estudo corrobora com o presente resultado, pois também obtiveram alterações em sua morfologia com a perda da formade fuso, além de não evidenciarem em alguns casos o cinetoplasto e flagelo em cepas de *L. braziliensis* e *L. major*. Em outro experimento delineado por Marcolino *et al.* (2021), a indução de apoptose mediada pela aplicação da TFD utilizando curcumina como FS foi mais fortemente evidenciada, já que tais pesquisadores observaram que essa estratégia terapêutica induziu fragmentação do DNA nas mesmas cepas alvo utilizadas por Pinto *et al.* (2016), alteração esta que também é considerada um importante pré-requisito para caracterizar a ocorrência deste processo de indução de morte celular.

As alterações morfológicas se mostraram diferentes, sendo tais discrepâncias possivelmente decorrentes de peculiaridades estruturais de cada espécie de *Leishmania*, as quais apresentam particularidades na sua estrutura, conforme descrito por Sunter e Gull (2017). Tais pesquisadores demonstraram que a membrana celular deste protozoário possui microtúbulos, que além de auxiliarem no formato fusiforme, também auxiliam na proteção, impedindo que algumas substâncias estranhas sejam absorvidas, porém, tais autores não inferem diferença estrutural dos microtúbulos em diferentes espécies de *Leishmania*.

Dubey e Chinnatahambi (2021) afirmaram, com base em evidências científicas de diversos pesquisadores, que a TFD modula a dinâmica estrutural do citoesqueleto de várias linhagens celulares, podendo induzir a ruptura da rede de tubulina e de filamentos intermediários em células tumorais, bem como alterações da organização e rompimento do citoesqueleto de actina, desorganização dos microtúbulos das células, aumento do cálcio intracelular, o que leva a despolimerização dos microtúbulos, além da indução de um grande número de pequenas invaginações do citoplasma na superfície celular, possivelmente em função da despolimerização de microtúbulos. Segundo tais autores, os microtúbulos fazem parte do citoesqueleto celular e podem ser alvo da TFD.

Levando-se em consideração a importância dos microtúbulos na manutenção da estrutura fusiforme e na limitação de internalização de moléculas, pode-se sugerir que as alterações morfológicas aqui demonstradas podem ser consequentes da indução de danos aos microtúbulos, decorrentes do uso da TFD utilizando curcumina como FS.

Conforme já explicitado, a eficácia da aplicação de apenas uma aplicação de TFD foi de 68% para espécie *L. braziliensis* e 67% para espécie *L. amazonensis* sendo evidenciado por meio do teste de viabilidade por exclusão com azul de tripan. Tais resultados corroboram com os resultados de Pinto *et al.* (2016), no entanto, os autores utilizaram apenas uma aplicação da terapia e obtiveram resultados promissores, com cerca de 80% de redução de viabilidade, sendo estes valores próximos aos obtidos quando da primeira aplicação de TFD. Porém, no presente trabalho realizou-se a TFDs, alcançando índices de mortalidade superiores nas duas espécies de *Leishmania* avaliadas, com o aumento da mortalidade de 68% para 92% nas cepas de *L. braziliensis* e 67% para 82% nas cepas de *L. amazonensis*.

Ainda no que concerne a TFDs utilizando curcumina como FS, os achados evidenciados no presente trabalho corroboram com os de outros pesquisadores (JOHANSEN; JEMEC; FABRÍCIUS, 2019; GOLDIN *et al.*, 2020), os quais, apesar de haverem utilizado outros FS e experimentos *in vivo*, evidenciaram, que a utilização de TFDs permitiu maximizar a eficácia da terapia, mediante a indução de uma maior taxa de cura, quando comparada a TFD em aplicação única, inclusive minimizando a possibilidade da ocorrência de recidiva, a qual pode ocorrer mediante a adesão a outras estratégias “alternativas” de tratamento alopático, à exemplo do uso de alopurinol (LIMA, 2007).

Em acréscimo, a TFDs, assim como a TFD, tem a potencial vantagem de provavelmente não vir a induzir incomodo significativo para os pacientes, nem reações adversas ou demanda por longos períodos de tratamento, desvantagens estas que são observadas, por exemplo, mediante uso da terapia “gold standard” preconizada atualmente, que se dá mediante uso de drogas antimoniais pentavalentes, as quais necessitam de administração parenteral, longo período de tratamento e ocorrência de reações adversas, dentre as quais nefrites, cardiovasculares, distúrbios gastrintestinais e respiratórios (MAIA; MONTE, 2019), demonstrando-se dessa forma que a TFDs utilizando curcumina como FS se destaca como potencial alternativa para o tratamento da LTA devido ao sua grande potencial leishmanicida *in vitro* e evidenciando a demanda por protocolos *in vivo*, de forma a demonstrar segurança e

eficácia, e destacando esta estratégia como perspectiva para o tratamento dessa importante protozoose.

Apesar dos resultados promissores aqui apresentados, a não indução de 100% de mortalidade das cepas de *Leishmania* submetidas a duas aplicações de TFD utilizando curcumina como FS, permite sugerir a demanda por novos protocolos experimentais, objetivando obter uma maior eficácia mediante o uso de um número maior de aplicações de TFD e/ou de ajustes na concentração de curcumina, principalmente quando se objetivar a destruição de formas amastigotas.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Houve internalização de curcumina tanto na primeira incubação, antes da TFD, como após a primeira aplicação de TFD, destacando, dessa forma a sua potencialidade como FS.

- A TFDs, com duas aplicações demonstrou efetividade frente a cepas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, na forma promastigota, induzindo mortalidade superior, quando comparada aos resultados obtidos após apenas uma aplicação da TFD.

- A TFD e a TFDs induziram alterações morfológicas em ambas as espécies avaliadas, implicando dessa forma na viabilidade dos parasitos.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABADIR, A.; PATEL, A.; HAIDER, S. Systemic therapy of New World cutaneous leishmaniasis: A case report and review article. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, v. 21, n. 2, p. 79-83, 2010.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem J**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2017.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.
- AKILOV, O. E. *et al.* Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Experimental dermatology**, v. 16, n. 8, p. 651-660, 2007.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniose mundial e estimativas globais de sua incidência. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES, D. F. S. *et al.* Efeitos da aplicação tópica do mel de Melipon subnitida em feridas infectadas de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.
- 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.
- ANDREEVA, E. R. *et al.* Effects of photodynamic exposure on endothelial cells *in vitro*. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 149, n. 2, p. 262-264, 2010.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- ARAÚJO, F. R. F.; ANDRE, W. P. P.; CISNEIROS, P. F. Leishmaniose tegumentar americana canina na zona rural do município de São Miguel, Rio Grande do Norte. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 188-191, 2014.
- AURELIANO D. P. *et al.* Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue mediated antiparasitic photodynamic therapy, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 1-8, 2018.
- BASTOS, M. M. *et al.* O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257-267, 2012.

BERNDT-PAETZ, M. *et al.* Reduction of muscle-invasive tumors by photodynamic therapy with Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat in an orthotopic rat bladder cancer model. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 1-22, 2019.

BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012.

BRASIL – Portal MS – Ministério da Saúde. Disponível em: [www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-l/l/leishmaniose-visceral](http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-l/l/leishmaniose-visceral). Acesso em: mar 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

CABRAL, F. V.; SABINO, C. P.; DIMMER, J. A.; SAUTER, I. P.; CORTEZ, M. J.; RIBEIRO, M. S. Preclinical investigation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on *Leishmania* parasites using real-time bioluminescence. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, p. 604–610, 2020.

CALVOPIÑA, M. *et al.* Intralesional Infiltration with Meglumine Antimoniate for the Treatment of Leishmaniasis Recidiva Cutis in Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1508-1512, 2017.

CARVALHO, E. M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.

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.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Mol Biochem Parasitol**, v. 89, p. 149–159, 1997.

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

DAS, R. *et al.* Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Apoptosis**, v. 13, n. 7, p. 867-882, 2008.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **Am J Clin Dermatol**, v. 16, p. 99–109, 2015.

DIAS, A. C. N.; LOGSDON, N. T. Associação do microagulhamento ao led para tratamento de cicatrizes de acne. **Rev Episteme Transversalis**, v. 12, n. 1, p. 239-264, 2021.

DINIZ, D. S.; COSTA, A. S. V.; ESCALDA, P. M. F. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 5, p. 597-600, 2012.

DUBEY, T.; CHINNATHAMBI, S. Photodynamic sensitizers modulate cytoskeleton structural dynamics in neuronal cells. **Cytoskeleton**, v. 2021, p. 1-17, 2021.

FAKHAR-E-ALAM, M. *et al.* Empirical modeling of physiochemical immune response of multilayer zinc oxide nanomaterials under UV exposure to melanoma and foreskin fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

FELICIO, L. B. A. *et al.* A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 4, p. 309-316, 2008.

FREITAS, M. A. A.; PEREIRA, A. H. C.; PINTO, J. G.; CASAS, A.; FERREIRA-STRIXINO, J. Bacterial viability after antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on multiresistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 739-748, 2019.

GERMANÓ, M. J. *et al.* Evaluation of different total *Leishmania amazonensis* antigens for the development of a first-generation vaccine formulated with a Toll-like receptor-3 agonist to prevent cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

GOLDIN, H. *et al.* *Leishmania tropica* infection of the ear treated with photodynamic therapy. **JAAD Case Reports**, v. 6, p. 514-7, 2020.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

HA, H.C. *et al.* The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 11140-11145, 1998.

HORNEMANN, A. *et al.* A pilot study on fingerprinting *Leishmania* species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, n. 29, p. 6907-6923, 2017.

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.

JOHANSEN, B.; JEMEC, G. B. E.; FABRICIUS, S. Effective treatment with photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis: A case report Mila. **Dermatologic Therapy**, p. 1-6, 2019.

- JUNIOR, S. A. *et al.* Application of *Melaleuca alternifolia* essential oils associated with phototherapy in acneic inflammatory injury. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. 1-11, 2020.
- KAZANTZIS, K. T. *et al.* Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and in vitro studies with prostate cancer cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, p. 193-206, 2020.
- KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.
- KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrins IX: basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B**. v. 6, p.143-8, 1990.
- KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.
- KOCYIGIT, A.; GULER E, M. Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 11, p. 97-105, 2017.
- LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Identification of *Candida* species in patients with denture stomatitis and evaluation of susceptibility to miconazole and photodynamic therapy. **Rev Odontol UNESP**, n. 44, v. 1, p. 12-17, 2015.
- LIMA, E. B.; MOTTA, J. E. C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R. N. R. Treatment of American cutaneous leishmaniasis. **An Bras Dermatol**, n.82, v. 2, p. 111-24, 2007.
- LING, M. H. Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da Hipericina e da Curcumina em células tumorais. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, 2016.
- MACHADO, P. R. L.; PENNA, G. Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 141–144, 2012.
- MAGACHO, C. C.; PINTO, J. G.; SOUZA, B. M. N.; PEREIRA, A. H. C.; FERREIRA-STRIXINO, J. Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; An *in vitro* study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, n. 30, p. 1-8, 2020.
- MAIA, J. L.; MONTE, M. G. Adverse reactions of n-methylglucamine presented during the treatment of american tegumentary leishmaniasis. **DêCiência em Foco**, n. 3, v. 1, p. 54 -56, 2019.
- MANDAL, A. *et al.* Deprivation of L-Arginine induces oxidative stress mediated apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes: Contribution of the polyamine pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 2016.

- MARCOLINO, L. M. C.; PEREIRA, A. H. C.; PINTO, J. G.; MAMONE, L. A.; FERREIRA-STRIXINO, J. Cellular and metabolic changes after photodynamic therapy in *Leishmania* promastigotes. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, 2021.
- MOREIRA, D. S. Análise Fosfoproteômica e genômica funcional de linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente. 2017. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2017.
- MURRAY, H. W. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 434–440, 2012.
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- OGIWARA, H. *et al.* Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 11, p. 2486–2497, 2013.
- OLIVEIRA, C. L. The effectiveness of photodynamic therapy in non-surgical periodontal treatment. **Arch Health Invest**, v. 6, n. 6, p. 275-279, 2017.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of infection**, v. 69, p. 10–18, 2014.
- PEREIRA, A. H. C. *et al.* Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 40-50, 2018.
- 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**, n. 10, v. 6, p. 634, 2021.
- PINTO, J. G. *et al.* *In vitro* evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major*. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 883–890, 2016.
- QUINETE, G. M. C. P. Novas abordagens sobre tratamentos da Leishmaniose tegumentar. 2013. 60 f. Monografia (Graduação em Farmácia e Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.
- RAJESH, S. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 4, p. 323-327, 2011.
- 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. **The Ceylon Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 149–152, 2012.
- REPOLÊS, B. M.; MACHADO, C. R.; FLORENTINO, P. T. V. DNA lesions and repair in trypanosomatids infection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. e20190163, 2020.
- REY, L. Parasitologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.
- 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 Photodyn Ther**, v. 26, p. 261-269, 2019.

- RODRIGUES, T. N. A.; GALVÃO, L. E. G.; GOLÇALVES, H. S.; PONTES, M. A. A. Basal cell carcinoma growth over a nevus sebaceous: treatment of the field cancerization with photodynamic therapy. **Surg Cosmet Dermatol**, n. 9, v. 1, p. 100-3, 2017.
- ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.
- ROSS, R. Further notes on *Leishmania*'s bodies. **BMJ**, v. 11, p. 1401, 1903.
- SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania* Ross. Chapter 11 (in Russian). In: The Leishmaniasis. Protozoology, **Academy of Sciences**, USSR All Union Society of Protozoologists, Lennigrad, Part 7, p. 95–101, 1982.
- SANTILE, J. H.; REQUENA, M. B.; SALVIO, A.G.; BAGNATO, V. S.; OLIVEIRA, E. R. Strategies for pain management in photodynamic therapy in malignant and premalignant skin lesions: integrative review. **Rev Enfermagem Atual In Derme**, p. 92-30, 2020.
- SANTOS, L. S. *et al.* Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 242-247, 2019.
- SILVA, E. P. O. *et al.* Photodynamic effects of zinc phthalocyanines on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci**, v. 30, p. 347–354, 2015.
- SORIA-LOZANO, P. *et al.* *In vitro* effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 187, 2015.
- SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTE-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. Curcumin, the golden powder from turmeric: insights into chemical and biological activities. **Quím Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.
- SULAIMAN, A. A. *et al.* An outbreak of cutaneous leishmaniasis among a displaced population in North Sudan: Review of cases. **J Family Med Prim Care**, v. 8, n. 2, p. 556-563, 2019.
- SUNTER, J. G. K.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biol**, v. 8, n. 8, p. 1-11, 2017.
- TERRA-GARCIA, M. *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy with Fotoenticine on *Streptococcus mutans* isolated from dental caries. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 19, n. 34, p. 102303, 2021.
- TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: A Review. **F1000Res**, v. 26, n. 6, p. 750, 2017.

VAN ASSCHE, T. *et al.* *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA A.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, J. M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.

VOLPE, R. A. F. N.; NAVASCONI, T. R.; DOS REIS, V. N.; BECKER, T. C. A.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V. Photodynamic therapy for the treatment of american tegumentary leishmaniasis: Evaluation of therapies association in experimentally infected mice with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J Lasers Med Sci**, v. 9, n. 4, p. 274-282, 2018.

VITORIO, G. S.; ALMEIDA, R. M. S.; PINTO, J. G.; FONTANA, L. C.; FERREIRA-STRIXINO, J. Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, *In vitro* study. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 34, 2021.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, 2015.

YANG, D.; LI, Y.; ZHAO, D. Curcumin induces apoptotic cell death in human pancreatic cancer cells via the miR-340/ZIAP signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 14, p. 1811-1816, 2017.