

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UM MODELO MURINO

Fernanda Viana Cabral¹, Camila Ramos Silva¹, Ismael Pretto Sauter², Caetano Padial Sabino¹, Tania Mateus Yoshimura¹, Mauro Cortez² e Martha Simões Ribeiro^{1*}

¹Laboratório de Terapia Óptica – Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP

²Laboratório de Imunobiologia da Interação *Leishmania*-Macrófagos, ICB/USP

*Av. Lineu Prestes, 2242- 04809-270- Cidade Universitária- SP-BR, + 55 11 3133-9197

E-mail: marthasr@usp.br

Resumo

Leishmanioses são doenças parasitárias desenvolvidas por protozoários do gênero *Leishmania*. A forma cutânea abrange lesões destrutivas e ulceradas com diversas limitações no tratamento. Terapias alternativas são fundamentais devido à grande relevância da doença e elevada incidência. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido introduzida devido ao baixo custo, baixa toxicidade, praticidade e sem relatos de resistência na literatura. Neste trabalho, dezesseis camundongos BALB/c foram infectados com 1.10^6 parasitos de *Leishmania (L) amazonensis* no membro posterior esquerdo e acompanhados por 4 semanas até o surgimento da lesão. Após esse período, os animais foram submetidos à PDT usando um diodo emissor de luz ($\lambda=660 \pm 22$ nm) e azul de metileno (100 μ M), com fluências de 50, 100 e 150 J/cm² e acompanhados durante 3 semanas. Animais controle não receberam tratamento. O tamanho da lesão e escala de dor foram mensurados utilizando um paquímetro e filamentos von Frey, respectivamente. A quantificação da carga parasitária foi realizada através do método de diluição limitante. Os resultados demonstraram que, nas semanas 2 e 3 após tratamento, ocorreu diminuição da lesão e alívio de dor nos animais que receberam 150 J/cm², sugerindo que a PDT promoveu melhora clínica através da modulação do processo inflamatório.

Palavras-chave: LED de emissão vermelha, azul de metileno, *Leishmania amazonensis*, ensaio pré-clínico

Abstract

Leishmaniasis is a chronic disease developed by prozotoa parasites of genus *Leishmania*. Cutaneous leishmaniasis has several different forms including destructive and ulcerated lesions. The current available treatments are limited because of side effects and toxicity. Photodynamic therapy (PDT) has been studied as an alternative treatment for this disease, once it is less expensive and no reports about resistance have been described. In the present study, sixteen BALB/c mice were infected in the left footpad with 1.10^6 parasites of *Leishmania (L) amazonensis* specie. They were observed for 4 weeks until lesion appearance. After that, the animals were divided into 3 groups with different fluences (50, 100 e 150 J/cm²) and control (infected and non-treated). PDT was performed using a light-emitting diode ($\lambda=660 \pm 22$ nm) and methylene blue (100 μ M). After treatment, animals were observed for 3 weeks and lesion size, hyperalgesia with von Frey filaments and parasite burden through limited dilution were measured. Our results showed lesion reduction and pain relief for animals that received 150 J/cm² on 2 and 3 weeks after PDT, suggesting that PDT promoted clinical improvement by modulation of the inflammatory process.

Keywords: methylene blue, red LED, *Leishmania amazonensis*, pre-clinical trial

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses caracterizam-se por enfermidades infecto-parasitárias, desenvolvidas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Trata-se de uma antropozoonose de ciclo biológico heteroxênico, apresentando um inseto vetor, cujo interior habitam as formas promastigotas do parasito, responsável pela transmissão da doença a hospedeiros vertebrados, essencialmente mamíferos, como roedores, marsupiais, animais domésticos e seres humanos (Rogers and Bates, 2007). Nesses, as formas amastigotas do parasito se inserem no sistema mononuclear fagocitário, preferencialmente, macrófagos (Sacks and Kamhawi, 2001).

A leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana (LTA) são as duas principais manifestações clínicas desenvolvidas pelo parasito e apresentam sintomatologia bastante distinta (Ribeiro-Gomes and Sacks, 2012; WHO, 2016). A leishmaniose visceral destaca-se por sua extrema gravidade devido ao tropismo do protozoário por órgãos como baço, fígado e medula óssea, com intensa prostração do hospedeiro e elevado índice de letalidade. A LTA possui quatro principais formas clínicas, conhecidas como localizada, disseminada, difusa e mucocutânea ou cutâneo-mucosa (Sacks and Perkins, 1984; Desjeux, 2004). Caracterizam-se por lesões dermatológicas, cuja progressão relaciona-se com a espécie do parasito e resposta imunológica do hospedeiro. Abrange lesões destrutivas, edemaciadas, supurativas, com tecido granulocítico e ulcerado, possibilitando o desenvolvimento de infecções secundárias, cujos aspectos, de caráter desfigurante, podem proporcionar transtornos psicológicos em seres humanos acometidos. Nas formas mais graves, a LTA pode ocasionar óbito do hospedeiro (Sacks and Perkins, 1984).

O surgimento de novas pesquisas relacionadas ao tratamento se faz fundamental atualmente, uma vez que as leishmanioses são doenças com grande relevância, não somente pela sua elevada incidência, mas pela dificuldade dos tratamentos disponíveis, os quais apresentam diversas limitações, que variam desde o alto custo, com índices de toxicidade bastante proeminentes, baixa aderência do paciente ao tratamento, que depende de múltiplas injeções intravenosas, por vários dias consecutivos, e também pela resistência do parasito aos fármacos disponíveis (McGwire and Satoskar, 2014).

Nesse contexto, o surgimento de novas terapias alternativas vem sendo estudado com a finalidade de propiciar eficácia adequada, preservação da integridade física do paciente e acessibilidade financeira, já que as principais regiões endêmicas apresentam baixa infraestrutura e poucos recursos (McGwire and Satoskar, 2014). Dessa forma, a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) tem sido introduzida no campo da pesquisa como uma possibilidade terapêutica interessante no tratamento de LTA, uma vez que sua administração é tópica e, portanto, o método é pouco invasivo (Dai *et al.*, 2009). Além disso, o custo é reduzido, a toxicidade baixa e não existem relatos de indução de resistência descrito na literatura, o que torna a técnica bastante vantajosa na terapêutica (Hamblin and Hasan, 2004; Hamblin, 2016).

A PDT consiste na combinação de três componentes principais: fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz com comprimento de onda ressonante à absorção do FS. Ao absorver um fóton, o FS é promovido a um estado excitado no qual poderá promover reações fotoquímicas que levam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO, e.g., radical hidroxila, ânion superóxido, oxigênio singlete). As ERO são capazes de danificar biomoléculas de importância central nas células-alvo promovendo morte celular por estresse oxidativo (Hamblin and Hasan, 2004; Kharkwal *et al.*, 2011; Wan e Lin, 2014).

Apesar de ser um problema de saúde pública, sabe-se que as leishmanioses são doenças negligenciadas (WHO, 2016). Portanto, considerando a importância do tema, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da PDT em LTA induzida em modelo murino com 3 diferentes fluências, através da quantificação da carga parasitária, evolução do tamanho das lesões e hipersensibilidade nociceptiva (alodínea).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Terapia Óptica e todos os procedimentos experimentais seguiram as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA 70/10) do IPEN-CNEN-SP. Os animais receberam ração granulada e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente controlado no biotério, sem a possibilidade de contato com insetos vetores.

2.1. Cultivo de Leishmania

Culturas de *L.(L.)amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas como promastigotas a 25°C em 5 mL de meio Grace's (Vitrocell) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Gibco), em garrafas de cultura de 25 cm². Para manutenção da cultura (máximo sete passagens) foram realizados repiques semanais em que aproximadamente 5.10⁵ parasitos foram adicionados em 5 mL do meio. Para a realização da curva de crescimento, os parasitos foram fixados em 4 % de paraformaldeído e contados em câmara de Neubauer durante sete dias (Latorre-Esteves et al., 2010; Coelho et al., 2016)

2.2. Inoculação do Parasita

No ensaio de infecção *in vivo* foram utilizados 16 camundongos BALB/c (fêmeas, 8 semanas, aproximadamente 30 g). A indução de LTA foi realizada através da administração de um inóculo de promastigotas de fase estacionária com 1.10⁶ parasitos, em um volume de 20 µL, obtidos no sétimo dia de cultura. O inóculo foi administrado por via subcutânea, na porção superior do membro posterior esquerdo de cada animal. O monitoramento da lesão foi realizado durante 4 semanas. A altura de ambos os membros de cada animal foi mensurada com um paquímetro semanalmente (Latorre-Esteves et al., 2010; Coelho et al., 2016). Os animais foram divididos em grupos para realização do tratamento (tabela 1).

TABELA 1- Distribuição dos grupos experimentais e dos parâmetros utilizados na PDT

Grupo	Fluência (J/cm ²)	Tempo de Irradiação (s)	Número de Animais
Controle	0	0	4
PDT50	50	500	4
PDT100	100	1000	4
PDT150	150	1500	4

2.3. Terapia Fotodinâmica (PDT)

Após 4 semanas de indução da infecção, a PDT foi administrada utilizando-se azul de metileno (AM) como fotossensibilizador. O AM foi inoculado por via subcutânea no membro infectado na concentração de 100 µM, em um volume de 10 µL. O tempo de pré-irradiação foi de 10 min. Em seguida, as lesões foram irradiadas com um LED emitindo em $\lambda=660 \pm 22\text{nm}$, com irradiância de 100 mW/cm², área do feixe equivalente a 1cm² e densidades de energia conforme mostra a tabela 1 (Latorre-Esteves et al., 2010). Todas as etapas do tratamento foram realizadas com os animais devidamente anestesiados por via intraperitoneal com coquetel de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) seguindo os padrões e princípios éticos do CEUA (Latorre-Esteves et al., 2010). Os animais foram acompanhados durante 3 semanas.

2.4. Quantificação da Lesão

O progresso da lesão foi avaliado com um paquímetro. A altura de ambos os membros de todos os animais foi mensurada. Para estimar o real tamanho da lesão, foi medida a diferença

relativa dos valores obtidos, em porcentagem, através da fórmula:

$$\text{Diferença Relativa (\%)} = (\text{Pi}-\text{Pc}/\text{Média Pc}) \times 100$$

Onde, Pi relaciona-se à pata infectada e Pc à pata contralateral, não infectada, do mesmo animal (Maspi et al., 2016).

2.5. Quantificação da carga parasitária

Após PDT, os animais foram imediatamente eutanasiados para a quantificação da carga parasitária. O tecido da lesão no membro infectado foi removido e as lesões foram lavadas 3 vezes em álcool 70% por 10 min e maceradas em homogeneizador de tecidos com meio RPMI. O conteúdo foi filtrado em filtro de 70 µm, centrifugado a 1300 g por 10 min e ressuspensos em 1 mL de meio RPMI (Reimao et al., 2013).

Placas de 96 poços foram semeadas previamente com meio de cultura M199. No primeiro poço foi adicionado o macerado da lesão e foi feita a diluição seriada com fator de diluição 10 até o último poço. A placa foi incubada a 25° C por 7 dias para a confirmação da presença de promastigotas. A quantificação foi realizada utilizando-se o programa ELIDA (ELIDA software Carl Tarswel) (Reimao et al., 2013).

2.6. Avaliação da dor

A avaliação da dor foi determinada pelo método von Frey, que possibilita analisar a hipersensibilidade nociceptiva frente a um estímulo mecânico, com uma força expressa em gramas. Os filamentos utilizados foram de 10, 15, 26, 60 e 100 gramas (Young et al., 2016). As medidas foram realizadas no dia da PDT (semana 0) e após 3 semanas de tratamento. Foi desenvolvida uma escala de dor com base nos resultados obtidos, em que 1 representa grande sensibilidade e 6 pouca sensibilidade do animal de acordo com a tabela 2.

TABELA 2- Escala de dor e suas representações utilizando o método von Frey

Escala de Dor	Força Expressa em gramas (g)
1	<10
2	10-15
3	15-26
4	26-60
5	60-100
6	>100

2.7. Análise Estatística

Os resultados são apresentados em média ± EPM (erro padrão da média). Para análise comparativa utilizamos o teste ANOVA two-way com medidas repetidas e Tukey como pós-teste. As análises foram realizadas no software GaphPad Prisma 6.0. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Tamanho da lesão

Nossos resultados demonstraram que o perfil infectivo, *in vivo*, foi semelhante em todos os grupos, uma vez que na quarta semana de infecção e início da PDT, a espessura da pata permaneceu homogênea em todos os grupos. A figura 1 mostra imagens representativas do aspecto clínico das lesões para todos os grupos 3 semanas após tratamento. Note que as lesões controle e 50 J/cm²

apresentam-se edemaciadas e com áreas de necrose. Para as maiores doses de PDT observa-se um edema mais brando, sendo que a dose de 150 J/cm² mostrou o melhor aspecto clínico, sem áreas de necrose. De fato, após 2 semanas de tratamento, observa-se que o grupo que recebeu 150 J/cm² reduziu significativamente o tamanho da lesão, mantendo seu tamanho significativamente menor até a 3^a semana (figura 2).



Figura 1. Aspecto clínico de infecção *in vivo* em camundongo BALB/c com isolados de *L. (L.) amazonensis*. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente, durante 3 semanas após a PDT. A primeira imagem representa um camundongo do grupo controle, com 7 semanas de infecção, sem tratamento. As imagens subsequentes indicam animais com 7 semanas de infecção e 3 semanas após a PDT, nas respectivas doses de cada grupo.

Na primeira semana após a PDT, os grupos experimentais apresentaram resultados semelhantes, com exceção do grupo PDT 150 J/cm² (142,25 ± 11,55 %), que apresentou uma diferença média inferior ao grupo controle (168,75 ± 7,55 %), mas não significativa. Nas semanas 2 e 3 pós-tratamento, essa diferença acentuou, uma vez que o grupo controle aumentou a diferença relativa em aproximadamente 293 % em relação a semana 0 (figura 2).

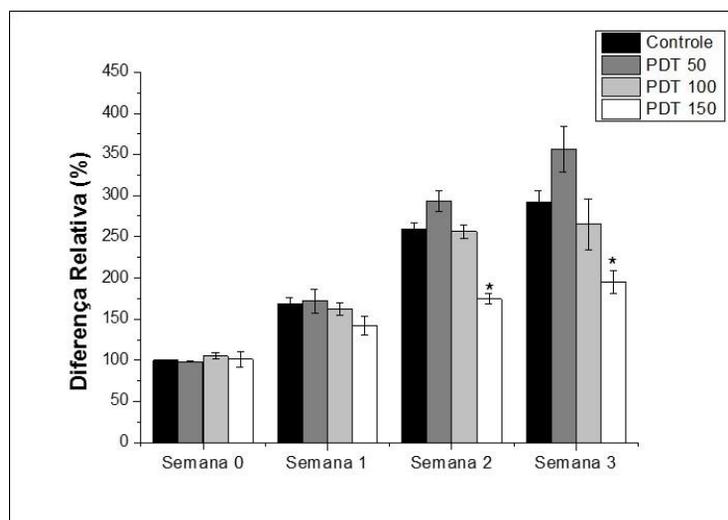


FIGURA2. Diferença relativa da espessura de patas de camundongos BALB/c infectadas com *Leishmania(L) amazonensis*. O gráfico representa a média de diferença relativa entre pata infectada e não infectada da espessura da lesão ± EPM para cada grupo (n=4) no respectivo período experimental. O sinal * indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle de cada período experimental.

3.2. Quantificação da carga parasitária

A quantificação de parasitas foi obtida 3 semanas após a PDT e é mostrada na figura 3. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos. Entretanto, foi observado que a carga parasitária dos grupos PDT 100 e PDT150 tiveram uma redução média de cerca de 25 % e 50 %, respectivamente, em relação ao controle.

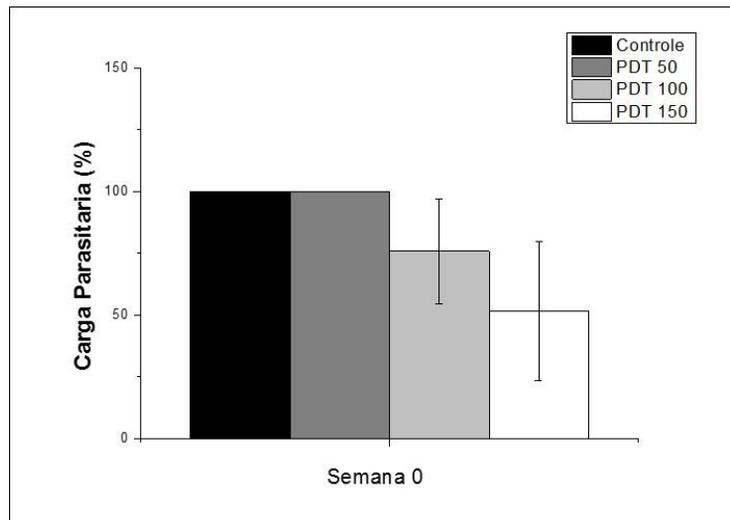


FIGURA 3. Quantificação da carga parasitária através do método de diluição limitante em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L) amazonensis*. O gráfico representa a média \pm EPM para cada grupo (n=4) logo após a PDT (semana 0).

3.3. Escala de dor

A Figura 4 apresenta os dados referentes à hiperalgesia das patas infeccionadas dos animais experimentais. Os camundongos que receberam a dose de 100 J/cm² obtiveram, na semana 3, um valor inferior e significativo em relação ao controle (4,25 \pm 0,188) com uma redução de 25 % da sensibilidade ao estímulo doloroso.

Observa-se que após o tratamento, a maior fluência (150 J/cm²) promoveu redução significativa da dor comparada aos demais grupos. Esses resultados apresentaram diferença significativa em relação ao controle nas semanas 2 (4,25 \pm 0,188) e 3 (1,25 \pm 0,188). Após 3 semanas de tratamento, as doses de 100 J/cm² e 150 J/cm² diminuíram significativamente a dor associada à LTA. Nesse período, o grupo PDT150 apresentou uma redução de aproximadamente 75% à sensibilidade nociceptiva, quando comparada ao controle e ao grupo PDT50.

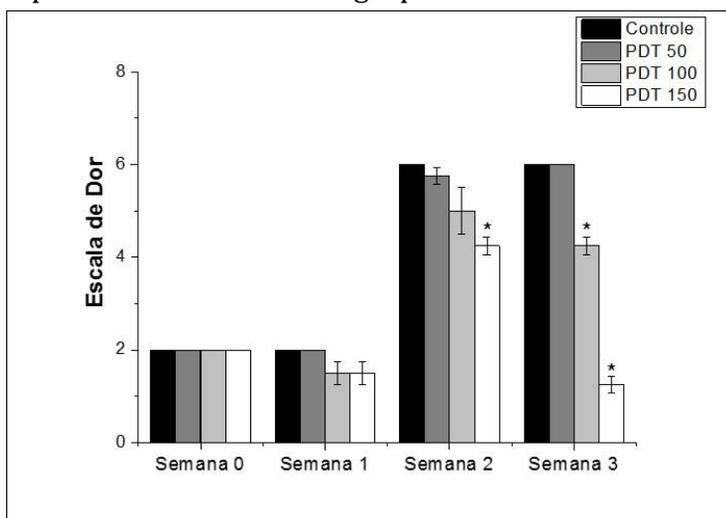


FIGURA 4- Escala de dor utilizando o método von Frey em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L) amazonensis*. O gráfico representa a média \pm EPM para cada grupo (n=4) em seus respectivos dias experimentais. O símbolo * representa diferença significativa em relação ao grupo controle em cada período experimental.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos a terapia fotodinâmica para avaliar sua resposta em LTA induzida em camundongos BALB/c. Esta linhagem de camundongos foi escolhida por apresentar uma resposta imune celular (i.e., envolvendo resposta Th1) pouco eficaz contra LTA, sendo assim considerada um bom modelo para estudo de leishmaniose tegumentar americana originada pela espécie *L. (L.) amazonensis*. O avanço das lesões nesses animais pode ser tão intenso, que culmina com a amputação do membro em função do tempo de infecção (Akilov et al., 2007).

A escolha do modelo experimental é um fator essencial, pois deve reproduzir da melhor maneira possível as condições a serem analisadas. Nessa linhagem, há predominância da resposta imune do tipo Th2, que se relaciona com a evolução da enfermidade, pois promove elevação dos níveis de IL-4, IL5 e IL-10, enquanto na resposta imune do tipo Th1 prevalecem citocinas como IFN- e IL-12, responsáveis pela cura e proteção contra reinfecções, prevalente nas linhagens de camundongos C57BL/6 (Felizardo et al., 2012; Sassi et al., 2015). Portanto, de acordo com a cepa, espécie do protozoário e linhagem do hospedeiro, é possível desenvolver modelos de susceptibilidade ou resistência em camundongos (Akilov et al., 2007).

A linhagem BALB/c geralmente é escolhida como modelo experimental, uma vez que sua resposta imunológica capaz de causar danos letais ao parasito é ineficiente. Sendo assim, estudos relacionados à terapia e farmacologia de medicamentos são bastante eficazes. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica foi administrada, a fim de analisar a eficiência de sua resposta nesses animais, já que é uma técnica de aplicação tópica e, portanto, minimamente invasiva (Akilov et al., 2007; Akilov et al., 2009).

Trabalhos relacionados ao tratamento de LTA com PDT têm sido descritos na literatura com a utilização de diferentes fotossensibilizadores e variados parâmetros da luz (Hamblin e Hasan, 2004; Akilov et al., 2009; Latorre-Esteves et al., 2010; Peloi et al., 2011). Akilov e colaboradores demonstraram que as propriedades dos fotossensibilizadores também apresentam grande relevância na terapêutica da LTA (Akilov et al., 2006). Os autores apontaram que as fenotiazinas, por apresentarem carga catiônica em soluções aquosas e características anfífilas, são capazes de promover maior interação com as células dos parasitas do gênero *Leishmania* (negativamente carregadas), quando comparadas aos fotossensibilizadores aniônicos ou hidrofóbicos (Akilov et al., 2006). O uso do azul de metileno é bastante favorável em LTA, pois, além de ser um FS catiônico anfífilo, é desprovido de efeitos tóxicos aos hospedeiros (desde que esteja nas concentrações adequadas), seu custo é baixo, além de ser um fármaco propenso à formação de ROS (Peloi et al., 2011; Nunez et al., 2014).

A fluência entregue, aliada ao FS, influencia de maneira relevante na eficácia da terapia fotodinâmica. Entretanto, os relatos da literatura referenciam muitos estudos de PDT em LTA, com diferentes densidades de energia, dificultando o estabelecimento de um protocolo em PDT para aplicação clínica (Akilov et al., 2007). Por exemplo, Akilov e colaboradores observaram que com o uso de uma fenotiazina (3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide) associada a um LED emitindo em $\lambda=660 \text{ 30 nm}$, na dose de 50 J/cm^2 , em camundongos BALB/c infectados no pavilhão auricular, houve uma remissão da lesão, com diminuição significativa da carga parasitária e melhora no processo inflamatório, com apenas uma sessão de PDT (Akilov et al., 2009). Nossos dados demonstram que, com a mesma densidade de energia e outro composto fenotiazínico (azul de metileno), com apenas uma sessão, não obtivemos redução da carga parasitária da lesão. Entretanto, com 150 J/cm^2 , os resultados foram promissores tanto clinicamente como em relação à sensibilidade nociceptiva. Devemos considerar que o modelo de infecção e a espécie do protozoário foram distintas daquelas utilizadas em nosso estudo, o que pode justificar parte da variabilidade entre nossos resultados.

O modelo animal, local de infecção, número de sessões, tempo de tratamento e momento de iniciá-lo, são variáveis fundamentais a serem consideradas, pois também interferem na

progressão ou remissão da doença nos modelos *in vivo*, solidificando a hipótese de que a implementação de um tratamento protocolado de PDT para LTA é uma tarefa difícil de se estabelecer.

Relatos da literatura apontam que infecções causadas por leishmaniose cutânea não apresentam dor (Kanaan et al., 2000; Karam et al., 2007; Borghi et al., 2016). Grevelink e Lerner reportaram que camundongos infectados com *L. (L.) major* possuem uma lesão em pápula eritematosa no período inicial, que evoluem para lesões nodulares e ulceradas, não dolorosas (Grevelink and Lerner, 1996). Porém, nos animais utilizados nesse experimento, constatamos forte presença de hiperalgesia, que aumentou constantemente em conjunto com a evolução da lesão. Contudo, nos animais submetidos à PDT, na dose de 100 J/cm² e 150 J/cm², houve diminuição significativa da hiperalgesia local.

Kanaan e colaboradores demonstraram que camundongos BALB/c infectados com a mesma espécie exibem evidências de nocicepção quando submetidos a testes de hiperalgesia, como o teste de placa quente (Kanaan et al., 2000). O trabalho sugere que esses estímulos ocorrem pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1, conhecida por produzir efeitos nociceptivos, o que foi confirmado por Karam e colaboradores (Karam et al., 2006; Karam et al., 2007).

Nossos resultados em relação à hiperalgia, aliados à melhora clínica observada, sugerem que os efeitos benéficos da PDT podem ter ocorrido através da modulação do processo inflamatório, além do estresse oxidativo frente aos parasitas. Embasados nesses dados, nossos resultados indicam uma notória semelhança com os trabalhos anteriormente citados em relação aos padrões nociceptivos de camundongos BALB/c infectados com a espécie *L. (L.) amazonensis*. Contudo, não podemos afirmar se esse estímulo é decorrente da liberação das mesmas citocinas pró-inflamatórias.

Em relação à carga parasitária, observamos que após a PDT houve uma redução média de aproximadamente 25 e 50 % dos grupos PDT100 e PDT150, respectivamente, em relação ao grupo controle. Entretanto, o desvio padrão obtido foi elevado e não foi possível verificar uma significativa diminuição da carga parasitária. É bem conhecido que nos modelos *in vivo* existe uma grande variabilidade da resposta imunológica, inflamatória, e reparação tecidual dos animais, justificando o desvio padrão acentuado. Contudo, nossos resultados são promissores, uma vez que os tratamentos convencionais, além de possuírem efeitos colaterais graves, podem deixar cicatrizes graves, afetando, entre outros fatores, os aspectos psicológicos e sociais das pessoas acometidas (Desjeux, 2004; WHO, 2016). Logo, aprofundar pesquisas nessa área de alternativas terapêuticas torna-se imprescindível para que novas perspectivas que conciliem erradicação do parasita, melhora na inflamação, reparação tecidual, cicatrização das lesões e qualidade de vida sejam proporcionadas aos pacientes acometidos pela doença.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a PDT mediada por azul de metileno promoveu melhora nos aspectos clínicos das lesões desenvolvidas nos animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, bem como melhora da hiperalgesia, sugerindo que o tratamento realizado pode ter influenciado na modulação da resposta inflamatória de camundongos, dependendo da fluência utilizada.

6. AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos órgãos de fomento CNPQ, FAPESP e CNEN pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKILOV, O.E.; KOSAKA, S.; O`RIORDAN, K.; HASAN, T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.6, n.10, p.1067-1075, 2007.
- AKILOV, O.E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K.; SONG, X.; SHERWOOD, M.; FLOTTE, T.J.; FOLEY, J.W.; HASAN, T. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. **Chemistry & Biology**, v.13, n.8, p.839-847, 2006.
- AKILOV, O.E.; YOUSAF, W.; LUKJAN, S.X.; VERMA, S.; HASAN, T. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.41, n.5, p.358-365, 2009.
- BORGHI, S.M.; FATTORI, V.; CONCHON-COSTA, I.; PINGE-FILHO, P.; PAVANELLI, W.R.; VERRI JR, W.A. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology Research**, v.116, n.2, p.465-475, 2017.
- COELHO, A.C.; OLIVEIRA, J.C.; ESPADA, C.R.; REIMÃO, J.Q.; TRINCONI, C.T.; ULIANA, S.R. A luciferase-expressing Leishmania braziliensis line that leads to sustained skin lesions in BALB/c mice and allows monitoring of miltefosine treatment outcome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.5, p.e0004660, 2016.
- 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.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n.5, p. 305-318, 2004.
- FELIZARDO, T.C.; GASPAR-ELSAS, M.I.; LIMA, G.M.; ABRAHAMSOHN, I.A. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on Leishmania amazonensis dorsal skin--than on footpad-infected mice. **Experimental Parasitology**, v.130, n.1, p.48-57, 2012.
- GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.34, n. 2 (Pt 1), p.257-272, 1996.
- HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v.33, p.67-73, 2016.
- HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, n.5, p. 436-450, 2004.
- KANAAN, S.A.; SAADE, N.E.; KARAM, M.; KHANSA, H.; JABBUR, S.J.; JURJUS, A.R.; Hyperalgesia and upregulation of cytokines and nerve growth factor by cutaneous leishmaniasis in mice. **Pain**, v.85, n.3, p. 477-482, 2000.
- KARAM, M.C.; HAMDAN, H.G.; ABI CHEDID, N.A.; BODMAN-SMITH, K.B.; BAROODY, G.M. Interleukin-10 reduces hyperalgesia and the level of Interleukin-1 beta in BALB/c mice infected with Leishmania major with no major effect on the level of Interleukin-6. **Journal of Neuroimmunology**, v.183, n.1/2, p. 43-49, 2007.

- KARAM, M.C.; HAMDAN, H.G.; ABI CHEDID, N.A.; BODMAN-SMITH, K.B.; EALES-REYNOLDS, L.J.; BAROODY, G.M. Leishmania major: low infection dose causes short-lived hyperalgesia and cytokines upregulation in mice. **Experimental Parasitology**, v.113, n.3, p.168-173, 2006.
- KHARKWAL, G.B.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.43, n.7, p.755-767, 2011.
- LATORRE-ESTEVEZ, E.; AKILOV, O.E.; RAI, P.; BEVERLEY, S.M.; HASAN T. Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using L. major expressing GFP. **Journal of Biophotonics**, v.3, n.5/6, p. 328-335, 2010.
- MASPI, N.; GHAFARIFAR, F.; SHARIFI, Z.; DALIMI, A. Codelivery of DNA vaccination encoding LeIF gene and IL-12 increases protection against Leishmania major infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v.38, n.4, p. 228-235, 2016.
- MCGWIRE, B.; SATOSKAR, A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM. An International Journal of Medicine**, v.107, n.1, p.7-14, 2014.
- NUÑEZ, S.C.; GARCEZ, A.S.; KATO, I.T.; YOSHIMURA, T.M.; GOMES, L.; BAPTISTA, M.S.; RIBEIRO, M.S. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.13, n.3, p. 595-602, 2014.
- PELOI, L.S.; BIONDO, C.E.; KIMURA, E.; POLITI, M.J.; LONARDONI, M.V.; ARISTIDES, S.M.; DOREA, R.C.; HIOKA, N.; SILVEIRA, T.G. Photodynamic therapy for american cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Experimental Parasitology**, v.128, n.4, p. 353-356, 2011.
- REIMÃO, J.Q.; TRINCONI, C.T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; MIGUEL, D.C.; KALIL, S.P.; ULIANA, S.R. Parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **Journal of Microbiological Methods**, v.93, n.2, p.95-101, 2013.
- RIBEIRO-GOMES, F.L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology**, v.2, art.59, 2012.
- ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v.3, n.6, p.e91, 2007.
- SACKS, D.; KAMHAWL, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.453-483, 2001.
- SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, v.223, n.4643, p.1417-1419, 1984.
- SASSI, A.; KAAK, O.; ELGAAIED, A.B. Identification of immunodominant Leishmania major antigenic markers of the early C57BL/6 and BALB/c mice infection stages. **Parasite Immunology**, v.37, n.10, p.544-552, 2015.

WAN, M.T.; LIN, J.Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 145-63, 2014.

WHO. World Health Organization. **Epidemiological situation**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>. Acesso em: 11 outubro 2016.

YOUNG, E.E.; BRYANT, C.D.; LEE, S.E.; PENG, X.; COOK, B.; NAIR, H.K.; DREHER, K.J.; ZHANG, X.; PALMER, A.A.; CHUNG, J.M.; MOGIL, J.S.; CHESLER, E.J.; LARIVIERE, W.R. Systems genetic and pharmacological analysis identifies candidate genes underlying mechanosensation in the von Frey test. **Genes, Brain and Behavior**, v.15, n.6, p.604-615, 2016.