

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas

Mona Lisa Fabiana da Silva

**Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea
submetido à terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico**

Uberaba-MG

2015

Mona Lisa Fabiana da Silva

**Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea
submetido à terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

Uberaba-MG

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S581a Silva, Mona Lisa Fabiana da
Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea submetido à terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico / Mona Lisa Fabiana da Silva. -- 2015.
42 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior
Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

1. Leishmaniose cutânea. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Ácido aminolevulínico. 5. Macrófagos. I. Rodrigues Junior, Virmondes. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.928.5

Dedico ao meu esposo, meus filhos e minha mãe pela força e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Polyanna Miranda Alves por ter me aceito em seu ambiente de trabalho e por ter-me apresentado a um projeto pelo qual me encantei. Por ter dividido comigo viagens, metas e bons momentos entre amigos, sendo mais do que uma colega de trabalho, uma amiga.

Às amigas Danila e Selma que fiz no laboratório multidisciplinar Cefores, pela grande contribuição no desenvolvimento de nosso trabalho, sem a ajuda de vocês não seria possível concluir.

Aos meus pais, Maria Ângela e Ronaldo, a quem eu devo o que sou e que conquistei até hoje, meu carinho e minha gratidão em reconhecimento ao amor incondicional a mim devotado.

Aos meus maravilhosos filhos Edson Filho e Katharine, e ao meu querido companheiro Edson pelo amor, apoio e compreensão.

Muito agradecida a todos em especial ao meu orientador Virmondes e coorientador Tony por todo o conhecimento que me passaram, por suas simplicidades, paciência e constante disposição em ajudar. Com certeza tive muita sorte em minha escolha.

A banca de qualificação e defesa: Dr. Odonório Abrahão Junior, Dr. Alexandre de Paula Rogerio, Dr.^a Luciana de Almeida Silva Teixeira e de defesa, Dr.^a Katia Regina Perez, Dr. Marcos Vinicius da Silva, Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, Dr. Carlo José Freire de Oliveira pela disposição em ajudar e pela contribuição na elaboração de um trabalho melhorado e de qualidade.

A todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho acontecesse, sem elas com certeza não teria concluído.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho e bolsas cedidas aos alunos.

Agradeço a Deus a oportunidade de fazer a pós-graduação, pois aprendi não só coisas que tratam da pesquisa, mas principalmente aprendi a ser mais forte, a lidar com diferentes situações, a trabalhar em grupo, a ir além do que imaginava ser capaz.

Só aqueles que são loucos o bastante para achar que podem mudar o mundo podem de fato mudá-lo.

Steve Jobs, 1997.

RESUMO

Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea submetido à Terapia Fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico

Introdução: A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Sua forma cutânea é causada pela *L. major* no velho mundo e pela *Leishmania braziliensis* nas Américas. Devido a sua localização, a Terapia Fotodinâmica pode representar uma abordagem terapêutica interessante. Os macrófagos são as células hospedeiras da *Leishmania* no homem e podem ser classificados como macrófagos M1 ou M2 dependendo do padrão de citocinas secretado. Neste estudo, avaliamos o perfil de macrófagos do tipo 1 e tipo 2, a efetividade da Terapia Fotodinâmica (TFD) utilizando o ácido aminolevulínico (ALA) no tratamento da leishmaniose cutânea (LC) e os níveis de Heme oxigenase 1 (HO-1) em modelo experimental de leishmaniose tratado com ALA-TFD.

Métodos: Camundongos BALB/c machos com quatro semanas foram infectados nas patas com 1×10^6 formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*, após 4 semanas os camundongos foram tratados com ALA, LUZ ou com ALA-TFD. Foi avaliada *ex vivo* a expressão dos marcadores mRNA interleucina (IL)-10 e Arginase-1 para identificação de macrófagos M2, TNF- α e iNOS para M1 e HO-1 no local da infecção.

Resultados: O número de parasitas diminuiu significativamente nos grupos com TFD quando comparado aos demais. Os Níveis de iNOS foram maiores, não significativamente, no grupo TFD. Não houve diferença na expressão dos demais produtos testados.

Conclusão: A morte do parasita não parece ser mediada pela modulação de macrófagos M1 ou M2 neste modelo experimental de leishmaniose tratado com ALA-PDT. A terapia reduz significativamente a carga parasitária *in vivo* sem a eliminação completa do parasita. O aumento de iNOS sugere a sua participação nos mecanismo microbicidas ativados por ALA-PDT.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, ALA-TFD, *Leishmania braziliensis*, ácido 5-aminolevulínico e macrófagos.

ABSTRACT

Analysis of macrophage types M1 and M2 in an experimental model of cutaneous leishmaniasis treated with photodynamic therapy associated with 5-aminolevulinic acid

Introduction: Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by *L. major* in the old world and by *L. braziliensis* in the Americas. Considering the targeted organs, photodynamic therapy (PDT) may constitute a valuable therapeutic intervention. Macrophages are the host cells of *Leishmania* in mammals and may be classified into type M1 or M2 depending on the pattern of activation. In this study, we evaluated the profile of macrophage and the effectiveness of PDT for the treatment of experimental CL.

Methods: BALB/c mice were infected in the foot pad with 1×10^6 amastigotes of *L. braziliensis* and treated with aminolevulinic acid (ALA), visible light, or ALA-PDT. The *ex vivo* mRNA expression levels of interleukin-10 and arginase-1, and TNF- α and induced nitric oxide synthase (iNOS) were quantitated for the identification of M2 and M1 macrophages, respectively. **Results:** The parasite load decreased significantly in the groups treated with PDT compared with the other groups. The iNOS levels were higher in the group treated with PDT, but the difference was not significant. Moreover, no significant difference was observed in the expression of the other markers evaluated.

Conclusion: Parasite death does not appear to be mediated by the modulation of M1 or M2 macrophages in this experimental model of leishmaniasis treated with ALA-PDT. PDT significantly decreased the parasite load *in vivo* but did not eliminate parasitism. The increase in the iNOS levels suggests it might participate in the antimicrobial mechanisms triggered by ALA-PDT.

Keywords: Photodynamic therapy, ALA-PDT, *Leishmania braziliensis*, 5-aminolevulinic acid, and macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	12
Figura 2- Catabolismo do grupo heme.....	22
Figura 3- Via de síntese da PPIX a partir do Acido aminolevulinico.....	26
Figura 4- Espectro de absorção da protoporfirina IX.....	27
Figura 5- Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	28
Tabela 1- Seleção de macrófagos M1 e M2.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

AST- Aspartato aminotransaminase
ALT - Alanina transaminase
ALA- Ácido 5-aminolevulínico
CO- Monóxido de carbono
HO-1-Heme oxigenase
H₂O₂- peróxido de hidrogênio
iNOS- Enzima oxido nítrico sintase induzível
iTregs- Linfócitos T reguladores induzidos
IL- interleucina
IFN- γ - Interferon gama
LC- Leishmaniose cutânea
LM- Leishmaniose mucocutânea
LTA- Leishmaniose tegumentar americana
MIF- Fator Inibitório da Migração de Macrófagos
N- Nyssomyia
NO- Oxido Nítrico
NK- Linfócitos matador natural
nTreg- Linfócitos T reguladores naturais
O⁻- radical superóxido
OH- radical hidroxila
PBG- porfobilinogênio
PpIX- protoporfirina IX
P- Psychodopygus
ROS- Espécies reativas de oxigênio
TGF- β - Fator de Crescimento Transformador beta
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
Th- Linfócito T auxiliar
Tregs – Linfócito T regulador
Tr1- Linfócitos T reguladores induzidos FOXP3-
TFD- Terapia Fotodinâmica
V- Viannia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	LEISHMANIOSE.....	11
1.1.1	Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	12
1.1.2	Leishmaniose cutânea	13
1.2	ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE À LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	14
1.2.1	Macrófagos M1 e M2	17
1.3	HEME OXIGENASE, TERAPIA FOTODINAMICA E LEISHMANIA.....	20
1.4	TERAPIAS CONVENCIONAIS.....	23
1.5	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	24
1.5.1	A Terapia fotodinâmica na leishmaniose cutânea	28
	REFERÊNCIAS	31
2	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO	42

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem através da picada das fêmeas de insetos vetores hematófagos, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Existem hoje cerca de doze milhões de pessoas infectadas em 88 países sendo o Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão os mais afetados. Os dados de 2007 constaram 3505 casos (SOUZA, 2010). A transmissão da *leishmania sp* ocorre através da picada da fêmea do mosquito flebotomíneo hematófago que ao picar o homem transfere formas promastigotas do parasita para o tecido do hospedeiro, a *leishmania* tem tropismo por células chamadas macrófagos que são cruciais na defesa do organismo contra o desenvolvimento da leishmaniose, dentro destas células a *leishmania* muda da forma promastigota para amastigota, e reproduz para manter seu ciclo de vida (BRASIL, 2010; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). A Leishmaniose pode se manifestar de quatro formas principais, como leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (DESJEUX, 1996; KAYE; SCOTT, 2011). O curso da Leishmaniose em mamíferos é altamente variável, sendo dependente da espécie de *Leishmania*, das características genéticas e da resposta imune do hospedeiro (AWASTHI; KUMAR; SAHA, 2004). A espécie de *Leishmania* escolhida para este trabalho é a *Leishmania braziliensis* agente causador da leishmaniose tegumentar americana (LTA) podendo evoluir para a forma mucocutânea. Embora não seja considerada a forma mais grave da doença, trata-se de uma das formas mais prevalentes de leishmaniose cutânea no Brasil (BRASIL, 2007). Os macrófagos são as células hospedeiras da *leishmania* no hospedeiro vertebrado e podem basicamente ser classificadas como M1, quando secretam um padrão de citocinas de linfócitos do tipo T auxiliares 1 (Th1) ou M2 quando o padrão de citocinas estimula uma resposta de linfócitos do tipo T auxiliar 2 (TH2) (VERRECK et al., 2004; BASANO; CAMARGO, 2004).

A Terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que associa a utilização de uma luz visível, um agente fotossensível e oxigênio e ou nitrogênio moleculares presentes em meios celulares. A terapia age de forma a formar espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio que podem por consequência ativar e destruir macrófagos infectados (AGOSTINIS et al., 2012). O ácido 5-aminolevulínico (ALA), é uma das drogas mais utilizadas na Terapia fotodinâmica por se tratar de um precursor da protoporfirina IX, um corante natural importante para a biossíntese do grupo Heme da hemoglobina, que quando em concentrações elevadas e em contato com a luz é tóxico para as células e induz a morte celular (ISSA; MANELA-

AZULAY, 2010; SAH et al., 2002). Atenção tem sido dada a enzima Heme oxigenase 1 (HO-1), enzima responsável pelo catabolismo do grupo heme por promover a persistência da infecção por *leishmania*, a redução de TNF- α e espécies reativas de oxigênio (LUZ et al., 2012). A proposta deste estudo foi avaliar o papel da terapia fotodinâmica mediada por ALA na modulação de macrófagos M1 ou M2 em camundongos infectados com *Leishmania braziliensis*, a efetividade de ALA-TFD na redução da carga parasitaria e se a terapia interfere nos níveis de HO-1.

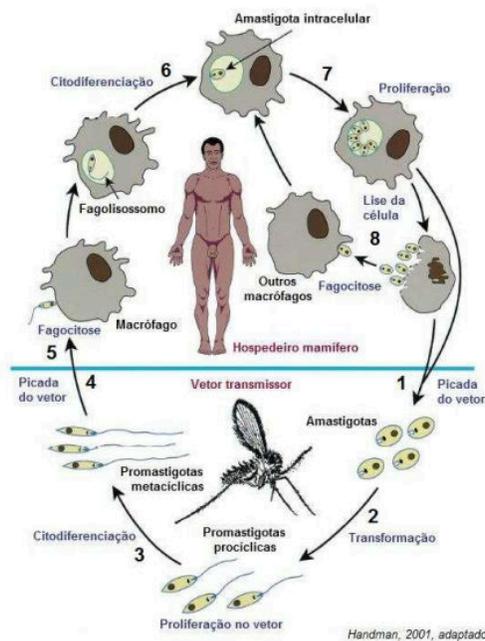
1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença causada por diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem através da picada das fêmeas de insetos vetores hematófagos, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Existem hoje cerca de doze milhões de pessoas infectadas em 88 países sendo o Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão os mais afetados. Os dados de 2007 constaram 3505 casos (SOUZA et al., 2010). A transmissão da *leishmania sp* ocorre através da picada da fêmea do mosquito flebotomíneo hematófago que ao picar o homem transfere formas promastigotas do parasita para o tecido do hospedeiro, a *leishmania* tem tropismo por células chamadas macrófagos que são cruciais na defesa do organismo contra o desenvolvimento da leishmaniose (BRASIL, 2010; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). A Leishmaniose pode se manifestar de cinco formas principais, como leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (DESJEUX, 1996; KAYE; SCOTT, 2011). As leishmanioses cutânea e cutânea difusa são formas clínicas da doença que se caracterizam pela presença do parasita no interior de macrófagos presentes na pele e se diferenciam apenas pelo perfil de resposta imune e a evolução da doença. A forma mucocutânea evolui de infecções cutâneas primárias acometendo a mucosa do nariz através da disseminação do parasita por via linfática e ou hematogênica (COSTA et al., 2009). Enquanto a leishmaniose visceral apresenta-se de forma diferenciada acometendo principalmente fígado, baço, medula óssea e linfonodos, provocando febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia (GONTIJO; MELO, 2004). O curso da Leishmaniose em mamíferos é altamente variável, sendo dependente da espécie de *Leishmania*, das características genéticas e da resposta imune do hospedeiro (AWASTHI; KUMAR; SAHA, 2004)

1.1.1 Ciclo de vida da *Leishmania*

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de macrófagos. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos a *leishmania sp* vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sangüíneo, se diferenciam em formas flageladas chamadas promastigotas metacíclicas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (BRASIL, 2007; GREVELINK; LEMER, 1996; HANDMAN, 2001; WALTERS, 1993), sendo posteriormente inoculadas na pele de mamíferos durante a picada. (Figura-1)

Figura 1 – Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*.



(1) Macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor, durante seu repasto sanguíneo; (2) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não infectivas e, posteriormente, (3) em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e (4) são transmitidas após sua picada na derme do hospedeiro; (5) ocorre, então, a fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (6) no interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e (7) iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. (8) Os macrófagos infectados são lisados, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células.

Fonte: (HANDMAN, 2001).

1.1.2 Leishmaniose cutânea

No Brasil, a LTA ou cutânea foi identificada pela primeira vez em 1895 por Moreira como o botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra” (JACOBINA; GELMAN, 2008). Em 1909 foi confirmada por Lindenberg a presença de formas de *Leishmania* quando examinava úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo (FURUSAWA; BORGES, 2014; MARQUES, 2007). Splendore (1911) diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*. (BRASIL, 2007; MEIRA, 2010). No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar (Aragão, H. B., 1922) e Forattini (1958) encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo (FORATTINI, 1958).

Até o momento, sete espécies de *Leishmania* (*L.*), pertencentes aos subgêneros *Leishmania* (*L.*) e *Viannia* (*V.*) foram identificadas no Brasil como causadoras da LTA humana: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) amazonensis* (Gontijo, B. & Carvalho, M. L. R., 2003 e Brasil. Ministério da saúde, 2010) e *L. (V.) lindenberg*. (BRASIL, 2010).

A *Leishmania braziliensis*, pertencente à família trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia* e complexo *braziliensis*, pode ser transmitida por mosquitos *Lutzomyia* de várias espécies, *Lutzomyia Psychodopygus (P.) wellcomei*, *Lutzomyia (P.)*

complexa, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia Nyssomyia (N.) whitmani*, *Lutzomyia (N.) intermedia*, e *Lutzomyia (N.) neivai* (MARCONDES et al., 2003).

No Brasil, a LTA é uma doença em fase de expansão geográfica, registrando, na década de 80, casos em 19 estados brasileiros e, a partir de 2003, todas as Unidades Federadas passaram a registrar casos autóctones. No período de 1996 a 2007 a LTA apresentou uma média anual de 28.233 casos novos e coeficientes de detecção variando entre 13,5 a 22,4 casos por 100.000 habitantes. As maiores proporções de casos são das regiões Norte e Nordeste com 36,7% e 33,3%, respectivamente (BASANO; CAMARGO, 2004).

Estudos recentes relatam que a Leishmaniose provocada pelo agente etiológico *Leishmania (V.) braziliensis* esta presente em aproximadamente 55% dos casos de LTA na região amazônica e em cerca de 95% dos casos fora da região da Amazônia (BRITO et al., 2009; LIMA et al., 2009; TOJAL DA SILVA et al., 2006).

As lesões podem ser caracterizadas como localizada ou disseminada, podendo evoluir para a forma mucocutânea. A forma cutânea localizada apresenta lesão de bordo elevado, fundo granuloso e indolor, podendo ser uma ou mais, enquanto que a forma disseminada se manifesta com pequenas e múltiplas lesões. As formas cutaneomucosas são lesões mucosas agressivas que afetam a mucosa nasal, palato, faringe, laringe e cordas vocais podendo ocorrer em até 5% dos pacientes infectados por *L. braziliensis* e resulta da extensão direta ou de metástase hematogênica de lesão cutânea primária (BERMAN, 1997; BRASIL, 2005; MURBACK et al., 2011).

Para LTA, o período de incubação para desenvolvimento de lesões pode variar de uma semana a um mês após a infecção e de um a dois anos para lesões mucosas (BRASIL, 2005; SAMPAIO, S. A. P., RIVITTI, 2008).

A Leishmaniose cutânea (LC) pode ser representada por dois modelos experimentais comumente usados no meio científico. Camundongos BALB/c conhecidos como susceptíveis por possuir um predomínio de resposta imune do tipo Th2 e camundongos C57BL/6 resistentes por apresentarem predomínio de resposta Th1 (BIEDERMANN; RÖCKEN; CARBALLIDO, 2004; VON STEBUT et al., 2003; WORTMANN et al., 2002).

1.2 ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE À LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Após o vetor injetar algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas (geralmente de 100 a 1000 parasitas, por picada) na derme do hospedeiro vertebrado, enquanto realizam seu repasto sanguíneo (ROBERTS, 2005), diferentes células do sistema

imune inato e adaptativo são ativadas. Células como macrófagos, células dendríticas e células T teciduais são residentes naturais da pele e fazem o primeiro reconhecimento da *Leishmania* ao entrar no organismo (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). As primeiras células a serem recrutadas são os neutrófilos 24h após a infecção mostrando importante participação na interação com macrófagos na manutenção e ou resistência a infecção (KAYE, SCOTT, 2011; RIITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VANZANDBERGEN, 2009).

O papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* é variável, dependendo da espécie de *Leishmania* e da genética do hospedeiro, apesar disto parece estar claro que os neutrófilos promovem a manutenção da infecção ao abrigar os parasitas até que cheguem as células hospedeiras, os macrófagos. Os parasitas promastigotas de *Leishmania* internalizadas por neutrófilos bloqueiam a produção da quimiocina CXCL10 e proteína-10 induzível por IFN- γ , o que diminui o recrutamento de células Natural Killers (NK) e células Th1 (VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Há evidências de que neutrófilos podem colaborar com a sobrevivência da *Leishmania*, pois ao morrerem por apoptose podem manter formas vivas do parasita e ao serem fagocitados por macrófagos funcionam como um veículo de infecção promissor para o parasita (RIITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VANZANDBERGEN, 2009)

Novais e colaboradores (2009) demonstraram que Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e depletados de neutrófilos no momento da infecção apresentaram aumento significativo da carga parasitaria. *In vitro* a carga parasitaria em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* foi reduzida significativamente na presença de neutrófilos em associação com a produção do TNF- α e Superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O mesmo foi observado em células humanas infectadas por *L. braziliensis*, mostrando que a interação de neutrófilos com macrófagos neste modelo experimental de leishmaniose é de grande importância para a eliminação do parasita (NOVAIS et al., 2009). Linfócitos Th1 regulam positivamente a atividade do macrófago na eliminação do parasito e linfócitos Th2 negativamente permitindo a sobrevivência da *Leishmania sp* dentro dos macrófagos (CAMPOS-NETO, 2005; LAUNOIS, P., LOUIS, J. A., MILON, 1997; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

A interleucina (IL)-12 uma das primeiras citocinas secretadas por macrófagos possui importante papel na indução da produção de IFN- γ por linfócitos Th1 e células NK (TRINCHIERI; GEROSA, 1996). Camundongos geneticamente resistentes a infecção depletados de IL-12 tornam se susceptíveis a *Leishmania major* (AWASTHI; KUMAR;

SAHA, 2004). Enquanto camundongos BALB/c tratados com IL-12 se tornam resistentes (HEINZEL et al., 1993).

Camundongos C57BL/6 resistentes knockout de IFN- γ infectados com *L. major* falham na cura da infecção (WANG et al., 1994). Em modelos experimentais o IFN- γ tem sido relatado atuar em sinergia com o TNF- α , na ativação de macrófagos e na indução de óxido nítrico (ON) (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000a; LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997; LIEW et al., 1990).

Camundongos BALB/c infectados com *L. major* e knockouts para IL-4 ou tratados com anticorpo anti-IL-4 apresentaram cura da doença, mostrando a importância da IL-4 na manutenção da resposta Th2 e conseqüentemente do parasita (KOPF et al., 1996).

As células T regulatórias (Tregs) exibem importante papel na resistência do parasita, podem ser subdivididas em células T reguladoras naturais (nTreg) oriundas do timo e células T reguladoras induzidas, geradas na periferia, estas últimas podem ser FOXP3+ (iTregs) e FOXP3- , células T regulatórias do tipo 1 (Tr1) (BELKAID; PICCIRILLO; MENDEZ, 2002). Esta última produz IL-10 e TGF- β , porém o papel destas citocinas é complexo dependendo do tempo e contexto da doença (PICCIRILLO, 2008; SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008).

A IL-10 é produzida por uma variedade de células na infecção, tais como as células T reguladoras, Th1, células T CD8 +, células B, células NK, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, protege o organismo durante infecções crônicas revertendo o processo de inflamação intensa (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Por outro lado, pode contribuir para a persistência de microorganismos, agindo diretamente na supressão de macrófagos e células dendríticas, prejudicando suas funções microbidas e de apresentação de antígeno e inibindo a ativação de células Th1 (SABAT et al., 2010).

Camundongos knockouts para IL-10 somente e para IL-4 e IL-10 apresentaram cura estéril da infecção por *L. major*, mostrando o importante papel da IL-10 na persistência do parasita (BELKAID; PICCIRILLO; MENDEZ, 2002). Em 2014 foi demonstrado que a principal fonte de IL-10 na LC provocada por *L. braziliensis* em humanos são as células Tr1 (CD4+, CD25-, CD127-/low e FOXP3-)(COSTA et al., 2014).

O TGF- β é uma citocina produzida por linfócitos, macrófagos e células dendríticas entre outras, sua ação seja autocrina ou paracrina serve para controlar a diferenciação, a proliferação e o estado de ativação das células do sistema imune, pode modular a expressão de moléculas de adesão e providenciar um gradiente quimiotático para leucócitos e outras células que participam em uma resposta inflamatória e inibi-los. O aumento da produção e

ativação de TGF- β tem sido associado a defeitos imunológicos (doenças auto-imunes), a susceptibilidade a infecções oportunistas, e para as complicações fibróticas associadas com condições inflamatórias crônicas (LETTERIO; ROBERTS, 1998). Estudo anterior mostrou o papel do TGF- β na infecção *L. braziliensis*, *in vitro* macrófagos foram infectados com o parasita e observou-se aumento da virulência da cepa associada a citocina. *In vivo* camundongos infectados em processo de cura foram tratados com TGF- β e os parasitas em estado de latência foram reativados. A reativação da doença foi acompanhada do aumento da expressão de IL-10 (BARRAL et al., 1993).

Em camundongos BALB/c infectados por *L. major* células t regulatórias apresentam importante papel na regulação da resposta imune, impedindo ao mesmo tempo o processo de cura estéril. Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* expressam células T regulatórias durante todo o curso da infecção, inclusive após a cura, mas estas células não parecem ter um papel importante após a reinfeção dos animais (C. FALCÃO et al., 2012).

Os estudos de LTA em seres humanos não parecem estar bem definidos, havendo um consenso de que citocinas do perfil de linfócitos Th1 promovem a eliminação da *Leishmania* e as citocinas do perfil Th2 favorecem a manutenção da infecção respectivamente (DOMINGOS et al., 2012).

1.2.1 Macrófagos M1 e M2

Os macrófagos são principal reservatório para a *Leishmania*. No entanto quando ativados possuem mecanismos microbicidas importantes capazes de eliminar o parasita (HANDMAN; BULLEN, 2002). Uma vez dentro do fagossomo os macrófagos podem contribuir com a destruição do parasita fagocitando antígenos solúveis de parasitas intracelulares e apresentando-os em sua superfície (FARAH; SAMRA; NUWAYRI-SALTI, 1975).

As formas promastigotas da *Leishmania* podem criar um ambiente propício para a sua sobrevivência, silenciando os macrófagos por diversos mecanismos, retardando a maturação do fagossomo e a fusão com o endossomo (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997). Inibindo enzimas hidrolíticas em fagolisossomos (EL-ON; BRADLEY; FREEMAN, 1980). Evitando a formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, suprimindo a apresentação de antígeno e reprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias ((KAYE; SCOTT, 2011). Sendo a interação entre o parasita e a resposta imune mediada por macrófagos fundamental para o resultado final da infecção (MURRAY et al., 2005).

O NO e seus derivados são produzidos pelos macrófagos a partir de L-arginina sobre a ação da enzima NO sintase induzível (iNOS) (MAUËL; RANSIJN; BUCHMÜLLER-ROUILLER, 1991). A iNOS não é expressa fisiologicamente, mas apenas após a ativação por citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos bacterianos (BEGNAMI et al., 2004). É importante no controle da replicação e da destruição de patógenos intracelulares (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000b). De forma que a expressão de iNOS em camundongos resistentes é um importante mecanismo de eliminação da *Leishmania in vivo* e a relativa falta da enzima em camundongos susceptíveis pode ser resultado da modulação de macrófagos por TGF- β e reduzida capacidade de resposta ao IFN- γ (STENGER et al., 1994).

Os macrófagos podem ser basicamente classificados como macrófagos M1, quando secretam o padrão de citocinas como o IL-12 e TNF- α e estimula linfócitos Th1 ou M2 quando citocinas como a IL-4 e IL-13 estimula linfócitos do tipo Th2.

Denomina-se ativação clássica do macrófago à induzida pela exposição à IFN- γ , TNF- α , ou indutores do mesmo, tais como ligantes de receptores do tipo Toll (CpG DNA, poli (I: C), LPS, peptidoglicano e sinais endógenos HSP-60 e 70 kDa). Uma vez polarizado como M1, este macrófago é caracterizado pela alta capacidade de apresentar antígenos e de produzir fatores que promovem a proliferação e ativação das células T, produção de substâncias tóxicas, tais como intermediários do óxido nítrico e espécies reativas do oxigênio, produção e secreção de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , quimiocinas CCL3, CCL9 e CXCL10, alterações fagolisossomais, expressão aumentada do complexo maior de histocompatibilidade do tipo 2 (MHC II), CD86. Desta maneira os macrófagos M1 são potentes células efetoras que combatem microrganismos e células tumorais, apresentando antígenos e produzindo citocinas pró-inflamatórias (DUPASQUIER et al., 2006; GORDON; MARTINEZ, 2010; GURUVAYOORAPPAN, 2008; MARTINEZ; GORDON, 2014).

Macrófagos ativados pela via alternativa ou M2 partilham propriedades funcionais geralmente envolvidas nas respostas do tipo Th2, como imunorregulação e remodelação tecidual e são classificados como M2 ou tipo II. Para se referir a cada forma particularmente designa-se como o M2a ativação induzida por IL-4 e IL-13, M2b a resposta promovida pela exposição a complexos imunes e agonistas de TLR e o M2c estimulado por IL-10 e glucocorticóides (CORREA, M. A. D., LOPEZ, 2007; ZIZZO et al., 2012). Embora esta classificação não inclua o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) como ativador alternativo, outros autores consideram que esta citocina induz o fenótipo do tipo M2c (CORREA, M. A. D., LOPEZ, 2007; LU et al., 2013).

O NO e seus derivados são produzidos pelos macrófagos a partir de L-arginina sobre a ação da enzima NO sintase induzível (iNOS) (MAUËL; RANSIJN; BUCHMÜLLER-ROUILLER, 1991).

A família da enzima NOS é geralmente classificada como constitutiva, cálcio dependentes como NOS neuronal (NOS1), NOS endotelial (NOS2) e NOS induzível independentes de cálcio (iNOS). As NOS apresentam três isoformas, que são agrupadas em dois grupos: as constitutivas (cNOS) e as induzidas (iNOS). A NOS-1 (NOS neuronal) e a NOS-3 (NOS endotelial) são constitutivas, enquanto que a NOS-2 (iNOS) proveniente de macrófagos é induzida. A atividade das cNOS é dependente de cálcio e calmodulina. A iNOS não é expressa fisiologicamente, mas apenas após a ativação por citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos bacterianos (BEGNAMI et al., 2004).

A expressão de iNOS em camundongos resistentes a leishmaniose é um importante mecanismo de eliminação da *Leishmania in vivo* e a relativa falta da enzima em camundongos susceptíveis pode ser resultado da modulação de macrófagos por TGF- β e reduzida capacidade de resposta ao IFN- γ (LIU; UZONNA, 2012; STENGER et al., 1994).

O balanço das respostas Th1 e Th2 regula o metabolismo de L. arginina durante a infecção, direcionando este aminoácido para ser utilizado na via metabólica da arginase ou da iNOS (GORDON; MARTINEZ, 2010; HESSE et al., 2001; MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998; NOËL et al., 2004).

A arginase possui um importante papel na regulação da disponibilidade da L-arginina para a síntese de NO, uma vez que, tanto a NOS como a arginase compartilham o mesmo substrato (GOBERT et al., 2000; HESSE et al., 2001). Outro mecanismo importante de interseção dessas duas vias é o fato de a NOS produzir, durante a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO, um intermediário capaz de inibir a arginase denominado N-hidroxi-L-arginina (NOHA) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A arginase foi primeiramente detectada no fígado, tendo um importante papel no ciclo da uréia. São descritas duas isoformas de arginases: arginase I, citosólica e arginase II, mitocondrial. Ambas são responsáveis pela conversão de L-arginina em L-ornitina e uréia (CEDERBAUM et al., 2004; JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996). ARG I é expressa principalmente no fígado. Em contraste, a Arg-2 é expressa em níveis mais baixos no cérebro, rim, intestino delgado, glândula mamária e em macrófagos. No entanto a biodisponibilidade de Arg-1 em macrófagos M2 limita a produção de NO induzida por iNOS reduzindo a inflamação e danos teciduais (GRODY et al., 1989; HESSE et al., 2001; MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998).

Green, 1990 e Mauel, 1991 observaram que a morte da *Leishmania major* e *Leishmania enriettii* respectivamente em macrófagos ativados acontece por uma via dependente de L-arginina que produz espécies reativas de oxigênio (GREEN, S. J., MELTZER, M. S., HIBBS JR, J. B., NACY, 1990; MAUËL; RANSIJN; BUCHMÜLLER-ROUILLER, 1991).

Em 2005 Kropf e colegas demonstraram em modelo experimental de leishmaniose cutânea que o aumento da atividade da arginase é uma característica da não cura da doença. (Kropf P. et al., 2005). Em 2009 Modolell e colaboradores junto com Abebe e colaboradores (2012) observaram que a arginase aumentada contribui para a persistência da Leishmaniose por causar supressão local de respostas de células T (ABEBE et al., 2012; MODOLELL et al., 2009).

De acordo com Da Silva e colaboradores (2012) a *Leishmania* expressa alta absorção de arginina e sua própria arginase, o que torna complicado estabelecer o metabolismo da arginina em um hospedeiro infectado por *leishmania*. Segundo pesquisas recentes a arginase da *Leishmania* esta localizada nos glicosomos (CRUZ, 2011; DA SILVA et al., 2012; SHIO; OLIVIER, 2010).

Em 2014 Martinez e Gordon fizeram uma revisão sistemática da ativação de macrófagos M1 e M2 e definiram os marcadores de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 1: Seleção de macrófagos M1 e M2

Macrófagos	M1 (IFN- γ , TNF- α)	M2 (IL-4/IL-13/IL-10)
	Marcadores	
Humanos	CD64, IDO, SOCS1, CXCL10	MRC1, TGM2, CD23, CCL22
Camundongos	CXCL9, CXCL10, CXCL11, NOS2	Mrc1, tgm2, Fizz1, Ym1/2, Arg1

CD64 (receptor da porção Fc de IgG), IDO (idoleamina 2,3-dioxygenase), SOCS1 (sinal supressor de citocina), CXCL10 (proteína 10 induzida por interferon- γ - ligante de quimiocina 10), MRC1 (receptor de manose), TGM2 (enzima transglutaminase 2), CD23 (receptor da porção Fc de IgE), CCL23 (ligante de quimiocina 23 com motivo C-C), CCL22 (quimiocina 22 com motivo C-C), CXCL9 (ligante de quimiocina 9), CXCL11 (ligante de quimiocina 11), NOS2 (óxido nítrico sintase 2), Mrc1 (receptor de manose C tipo 1), Fizz1 (gene presente em macrófagos com ativação mediada por Th2), Ym1/2 (gene presente em macrófagos com ativação mediada por Th2), Arg1 (arginase1). Fonte: adaptado de (MARTINEZ; GORDON, 2014)

1.3 HEME OXYGENASE E O CATABOLISMO DO GRUPO HEME

A mais conhecida função do grupo heme é por fazer parte da hemoglobina e promover o transporte de oxigênio. Organismos unicelulares não transportam oxigênio através dos tecidos, mas usam globinas e outras hemoproteínas para detectar a presença de gases diatômicos e evitar processos stress oxidativos ou nitroativos (FURUYAMA; KANEKO; VARGAS, 2007; POOLE; HUGHES, 2000).

A produção de heme por alguns organismos permite suas sobrevivências, uma vez que a resposta imune de seus hospedeiros são frequentemente baseada na produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (POOLE; HUGHES, 2000; RAFFERTY et al., 2010). A síntese de enzimas lisossomais durante o processo de fagocitose induz efeito tóxico direto e acidificação do meio. A explosão oxidativa subsequente é provocada pela enzima NADPH oxidase. Após a ativação do macrófago citocinas como TNF- α são expressas aumentando ainda mais a atividade de NADPH oxidase com produção a produção de ROS, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que leva a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (HO^{\cdot}), hipoclorito (OCl^-), e peroxidonitrito ($ONOO^-$)(BABIOR; KIPNES; CUMVU, 1973; BABIOR, 2000).

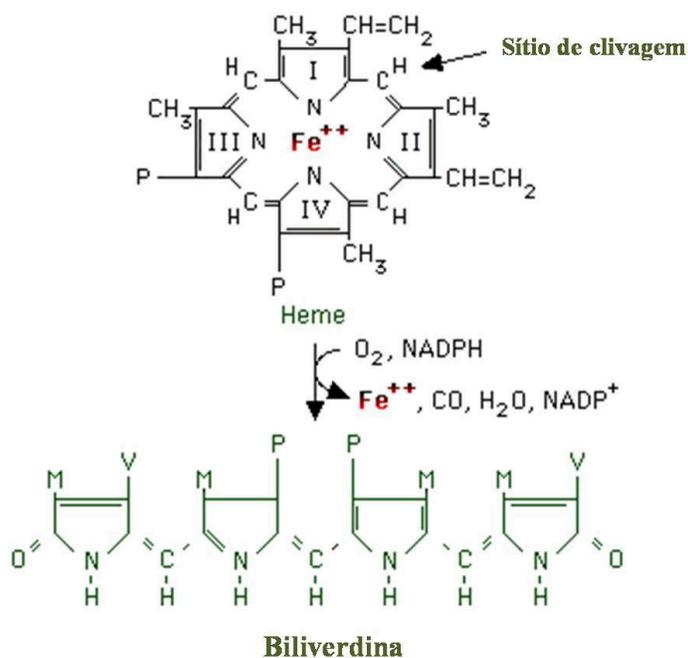
Muitos destes organismos são capazes de sintetizar o grupo heme a partir do precursor ALA, usando os sete conservados passos da via bioquímica. Archaea e muitas bactérias sintetizam ALA a partir de glutamato, enquanto proteobactérias sintetizam a partir da condensação de Succinil-CoA com glicina (PANEK; O'BRIAN, 2002). No entanto os organismos da classe kinetoplastida não podem sintetizar o heme usando estes precursores incluindo a *Leishmania* sp que codifica no mínimo três passos da síntese e as primeiras cinco enzimas da via são ausentes (ALVES et al., 2011; KOŘENÝ; LUKEŠ; OBORNÍK, 2010).

O grupo heme livre na circulação sem estar ligado a hemoglobina é tóxico para as células e acarreta uma serie de mecanismos inflamatórios, como trombose microvascular, vaso-oclusão e isquemia tecidual (FERREIRA et al., 2008). O organismo humano apresenta estratégias para a eliminação do grupo heme o que culmina com sua catabolização mediada pela enzima HO-1 que por sua vez promove a abertura do anel de tetrapirrol da porfirina, onde há quebra da ponte metenil entre os pirróis I e II como mostra a figura 2. Nesta reação ocorrem duas oxigenações e o NADPH, com seu poder redutor, libera Fe^{2+} , monóxido de carbono (CO) e biliverdina (STOCKER et al., 1987). Sendo o CO e a biliverdina liberados pela quebra da porfirina potentes antioxidantes.

Há duas isoformas de HO, o que consiste de uma forma induzível e outra constitutiva (HO-1 e HO-2). A expressão HO-1 é aumentada na presença de heme e de estresse oxidativo, enquanto pouco se sabe a respeito de HO-2 (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; ZHANG et al., 2006).

Trabalhos recentes mostraram que HO-1 é induzida em macrófagos infectados por *Leishmania chagasi* e a administração exógena da enzima aumenta a carga parasitaria, reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumenta a expressão de Il-10. Macrófagos derivados de camundongos deficientes no gene HO-1 tem menor carga parasitaria em comparação a camundongos saudáveis infectados por *Leishmania chagasi* (LUZ, 2011).

Figura 2- Catabolismo do grupo heme.



Disponível em: <http://textos-fisiopatologia.blogspot.com.br/2013/08/sangue-xxxx.html>.

Há duas isoformas de HO, o que consiste de uma forma induzível e outra constitutiva (HO-1 e HO-2). A expressão HO-1 é aumentada na presença de heme e de estresse oxidativo, enquanto pouco se sabe a respeito de HO-2 (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; ZHANG et al., 2006).

Trabalhos recentes mostraram que HO-1 é induzida em macrófagos infectados por *Leishmania chagasi* e a administração exógena da enzima aumenta a carga parasitaria, reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumenta a expressão de Il-10. Macrófagos

derivados de camundongos deficientes no gene HO-1 tem menor carga parasitaria em comparação a camundongos saudáveis infectados por *Leishmania chagasi* (LUZ, 2011). Paralelamente a Il-10 suprime a expressão de TNF- α e esta supressão é dependente da expressão de HO-1. Tanto O monóxido de carbono (CO) quanto a biliverdina podem também substituir o efeito anti-inflamatório de HO-1 em macrófagos ativados. (LEE; TSAI; CHAU, 2003; OTTERBEIN et al., 2000; PIANTADOSI et al., 2011).

Alem disso trabalhos anteriores demonstraram que o aumento ou diminuição dos níveis HO-1 interfere com a eficácia da terapia fotodinâmica mediada por ALA (BREUSING et al., 2010; FRANK et al., 2007; KIM et al., 2013).

1.4 TERAPIAS CONVENCIONAIS

Os Antimoniais pentavalentes são indicados pela Organização Mundial de Saúde como droga de primeira escolha para tratamento das leishmanioses. Não havendo melhora significativa as drogas de segunda escolha indicadas são a Anfotericina B e a Pentamidina (BRASIL, 2007; MINODIER et al., 2010).

Estudos comparando 10 e 20 dias de tratamento com Glucantime mostram que a medida que se estende o tratamento aumenta os danos causados pelo medicamento como o aumento das enzimas Aspartato transaminase (AST) e Alanina transaminase (ALT), amilase, lipase e diminuição dos leucócitos, plaquetas e hematócrito. De 36 pacientes tratados 1 apresentou recidiva para a infecção por *L. braziliensis* e 4 evoluíram para pancreatite e tiveram que parar o tratamento (WORTMANN et al., 2002). Mais de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral tratados com Antimônio pentavalente na Índia não respondem mais ao tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Como droga de segunda escolha, a Anfotericina B, é um antibiótico que interage com a membrana celular, formando poros e causando morte celular. Possui uma grande quantidade de efeitos adversos, como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função renal e hipocalcemia. Na forma de lipossoma o medicamento passa pela membrana e entra no macrófago podendo interagir diretamente com o parasita, o que aumenta a eficácia e tolerabilidade (ROBERTS, 2005).

A Pentamidina é uma diamidina que se une ao DNA do cinetoplasto. Sua eficácia é bastante variável e pode causar efeitos colaterais graves. É usada apenas em caso de contra

indicação as drogas de primeira e segunda escolha e quando não houve resposta ao tratamento (FRIES, D. S., FAIRLAMB, 2002; MONTENEGRO, 1997).

Novas terapias estão em desenvolvimento e algumas já se encontram em uso, necessitando de estudos adicionais. Os esforços têm sido na busca de medicamentos que sejam eficazes, de baixo custo e com menos efeitos colaterais (SOTO et al., 2004).

1.5 TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD é uma modalidade terapêutica que associa a utilização de uma luz visível, um agente fotossensibilizante e oxigênio e/ou nitrogênio moleculares presentes em meios celulares. Esta terapia age de forma a formar espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio que podem, por consequência levar células à morte por diferentes mecanismos (AGOSTINIS et al., 2011; KESSEL et al., 1995; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Além de causar morte celular via espécies reativas do oxigênio, as reações nos tecidos biológicos a TFD pode também modular a resposta imune celular (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006; HRYHORENKO et al., 1998).

A TFD tem tido usada no tratamento de varias outras doenças, tais como o Câncer, Degeneração macular da retina, Psoríase, Artrite reumatóide sistêmica, Restenosis, Micoses fungóides, Infestações bacterianas, parasitarias, verrugas, Arteriosclerose, AIDS, etc (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; PAULINO et al., 2005).

Há mais de 4.000 anos atrás o povo egípcio já fazia uso da Terapia fotodinâmica, através da ingestão de plantas (contendo os psoralenos) e luz solar, para tratar doenças como o vitiligo (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Em 1900 foi descrito a ação de corantes acridina e luz solar sobre *Paramecia*, demonstrando a morte do organismo unicelular sob essas condições (DANIELL, M. D., HILL, 1991). Em 1901, Finsen observou que a radiação solar poderia ser utilizada na cura de *Lupus vulgaris* (BONNETT, 1995). Em 1903, Trappeiner utilizou a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para o tratamento de um câncer de pele (VON TAPPEINER, H., JESIONEK, 1903). Em 1913 Meyer-Betz fez uma auto-injeção de 200 mg do que ele pensava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses. Policard, em 1925, estudou porfirinas objetivando a produção de efeitos fototóxicos em tecidos, principalmente em tumores malignos (AULER, H., BANZER, 1942).

A história da chamada primeira geração de drogas para a TFD, à base de derivados hematoporfíricos, começa com Schwartz no início da década de 50. Ele mostrou que nos experimentos de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, pois o composto era facilmente eliminado do organismo, na realidade tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento da mesma. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros e Lipson, sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo preferencial deles em tumores, implantados em camundongos e ratos e observou que a incidência de luz proporcionava regressão da doença (ACKROYD et al., 2001; STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). Como resultado desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher que possuía câncer de mama usando Hematoporfirina derivativa e irradiação seletiva do tumor, marcando assim o início da TFD como terapia clínica para câncer (ACKROYD et al., 2001; MOAN, J., PENG, 2003).

A partir da década de 70, várias preparações de derivados porfíricos começaram a ser testadas para uso em TFD (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Naturalmente os pesquisadores começaram a observar a necessidade de seguir alguns princípios físicos básicos, primeiro na escolha de um fármaco adequado e segundo de uma luz de qualidade que correspondesse ao espectro de absorção de elétrons deste fármaco (NOWIS et al., 2005).

A eficácia da TFD depende de vários fatores como o tipo do fotossensibilizador, concentração da droga, localização intracelular, taxa de fluência e disponibilidade de oxigênio (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; TOREZAN; NIWA; NETO, 2009).

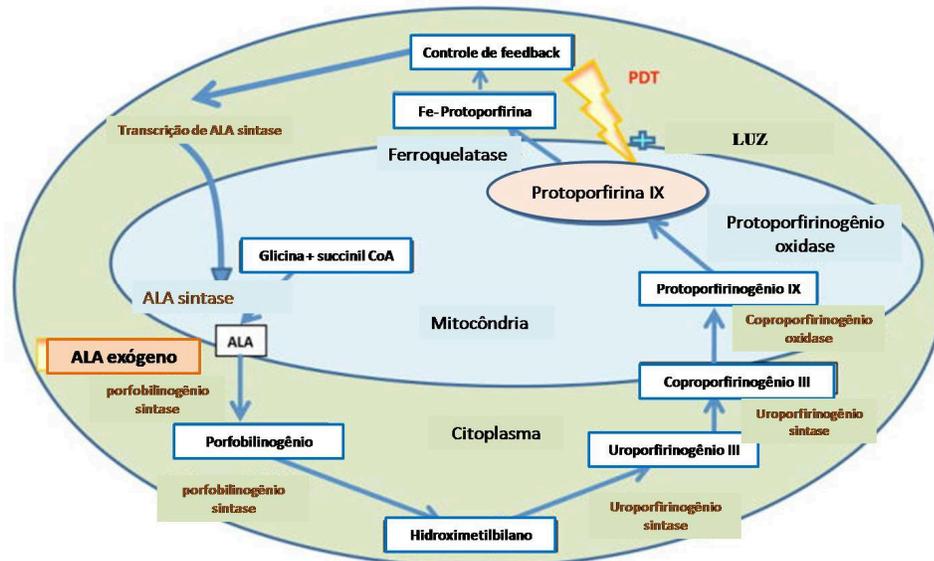
O fotossensibilizador ideal deve possuir varias características como pureza química, retenção preferencial pelo tecido de interesse (tumor, lesão), rápido acúmulo neste tecido e rápida depuração, ativação pela luz com uma boa penetração tecidual, alto coeficiente de absorção e ausência de toxicidade no escuro. Comprimentos de onda da luz utilizados na TFD estão entre a faixa do vermelho ou do infravermelho de ondas eletromagnéticas. Para que ocorra a reação da Terapia fotodinâmica a luz deve ser absorvida pelo fotossensibilizador. Isso é possível quando o comprimento de onda da luz corresponde ao espectro de absorção de elétrons do fotossensibilizador (JORI, 1996; NOWIS et al., 2005).

Foi sintetizado em 1960 um composto chamado hematoporfirina, em 1970-80 estudos realizaram experimento com um derivado deste composto, chamado Porfimer sódico para tratamento de tumores. Em 1990 no Canadá o Porfimer foi aprovado pela primeira vez

(Szeimies, R. M., et al, 2005). No mesmo ano Kennedy e colegas revolucionaram a TFD com o uso de uma substância tópica chamada ácido 5- delta aminolevulínico (5-ALA)(KENNEDY, 1990).

O ALA por si só não é um fotossensibilizador, mas um produto intermediário processado para protoporfirina IX (PpIX) na via de biossíntese do grupo Heme. No citoplasma da célula, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG), e quatro moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio. Este, então, é convertido em coproporfirinogênio e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX. O protoporfirinogênio IX converte-se em PpIX por ação da protoporfirinogênio oxidase. A PpIX é o intermediário porfirínico com atividade fotodinâmica e emite fluorescência vermelha intensa quando ativada por luz azul (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; KHARKWAL et al., 2012; WACHOWSKA et al., 2011) (fig.2).

Figura 3- Via de síntese da PPIX a partir do Acido aminolevulínico (ALA)



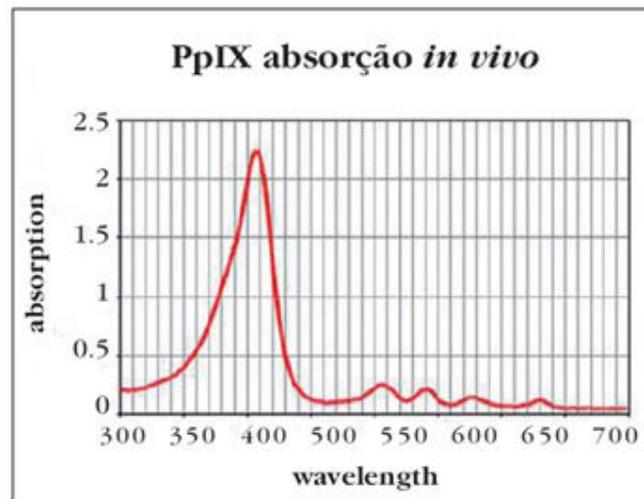
Fonte: adaptado de Kharkwal, G. B. et al., 2011

A PpIX pode ser sintetizada localmente por todas as células nucleadas, é detectada na epiderme três a oito horas depois da administração sistêmica do ALA e é eliminada em 24 a 48 horas após a administração em humanos e animais (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

O principal pico de absorção da Protoporfirina IX em torno de 405 nm, o que corresponde à luz azul. Outros picos chamados bandas Q também são importantes e estão entre 510 e 700 nm (gráfico 1).

Para a eficácia da TFD um parâmetro importante é a profundidade da penetração da luz através dos tecidos, que é dependente das características do tecido, bem como a sua espessura, tecidos ricos em pigmento. A penetração nos tecidos também é afetada pelo comprimento de onda da luz. Comprimentos de onda longos da luz visível penetram nos tecidos melhor do que comprimentos de onda curta (MOORE; WEST; WHITEHURST, 1997).

Figura 4- Espectro de absorção da protoporfirina IX



Fonte: Elaborado por Torezan, L. A., 2009

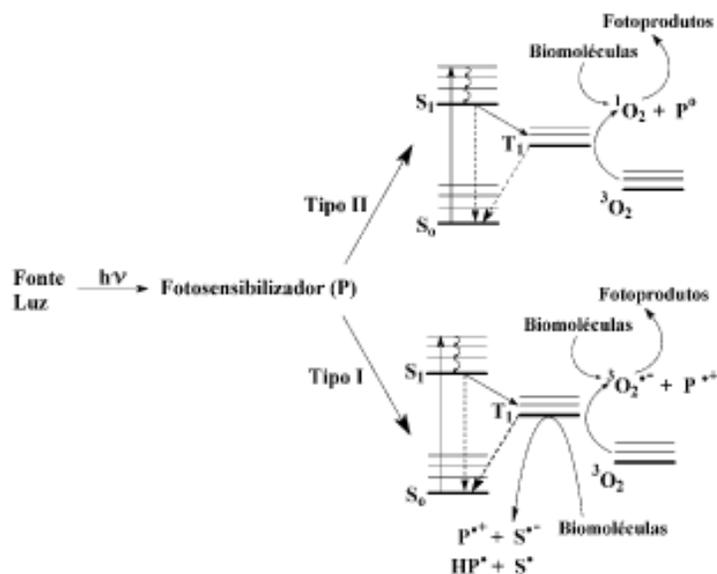
A fotodestruição de tecidos pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) (FOOTE, 1968; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e outras moléculas vizinhas, produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons. No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio (PUSHPAN et al., 2002).

A irradiação do tecido tratado provoca a excitação do fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia, o qual pode retornar ao estado fundamental via processos radioativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais). Dentre estes processos de decaimento

energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico singlete excitado (S_1) sofre uma transição para o estado tripleto excitado (T_1). O fotossensibilizador no estado tripleto excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin. Dessa forma, o fotossensibilizador no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FOOTE, 1968), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O^-) e hidroxila (OH), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas (GORMAN et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007; SHARMAN; ALLEN; VAN LIER JE, 1999) (Fig.3).

Figura 5- Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica



Fonte: RIBEIRO et al, 2007

1.5.1 A terapia fotodinâmica na Leishmaniose cutânea

A terapia fotodinâmica tem sido apresentada como promissora para o tratamento da leishmaniose cutânea. Muitos estudos têm relatado a cicatrização completa de úlceras na pele provocadas pelo parasita *Leishmania sp* após algumas sessões de TFD em humanos, outros demonstraram que a terapia em camundongos significativamente reduz a carga parasitária sem, contudo promover a eliminação completa do parasita. Alguns destes estudos são detalhados abaixo:

Em 2003, um homem de 32 anos apresentou leishmaniose com múltiplas lesões causadas por *Leishmania Donovanii*. O paciente foi tratado com Pentostan e não houve melhora das feridas. Ao tratar o paciente com 20 sessões de Metil- ácido aminolevulinico (MAL) intralesional e luz vermelha ($75\text{j}/\text{cm}^2$) as lesões foram curadas (GARDLO et al., 2003). No mesmo ano 11 israelistas infectados por *Leishmania major* com lesões características foram tratados com 1 ou 2 sessões de 10% de ALA e Luz vermelha ($100\text{j}/\text{cm}^2$). Destes pacientes 10 obtiveram regressão das lesões até a cura e um não. O paciente que não curou as feridas foi submetido a terceira sessão de PDT e após abandonou o tratamento (ENK et al., 2003).

Em 2004 um rapaz turco de 19 anos infectado com espécie de *leishmania* desconhecida recebeu 5 sessões com intervalos de 7 dias de Metilaminolevulinato (MAL) e luz vermelha ($75\text{ J}/\text{cm}^2$), foi observada a cura completa da lesão após 3 meses (GARDLO et al., 2004).

A ciência foi contemplada em 2006 com o primeiro estudo placebo controlado randomizado no tratamento da Leishmaniose cutânea com TFD. O estudo foi composto por 20 pacientes (31 lesões) tratados com 10% de ALA intralesional e luz vermelha ($100\text{j}/\text{cm}^2$), 19 pacientes (34 lesões) tratados com pomada de Paranomocina e 18 pacientes (30 lesões) foram tratados com pomada de parafina branca (placebo). Todos os grupos foram infectados no Iran por *Leishmania major* e os tratamentos aconteceram com intervalos de 7 dias por 1 mês. Após 3 meses 94% do grupo tratado com TFD tiveram as lesões curadas, quando comparado aos grupos tratados com Paranomocina (cura de 42%) e grupo placebo (13%) a TFD apresentou melhor taxa de cura que os demais tratamentos ($p < 0,001$). Todos os pacientes curados com TFD apresentaram eliminação completa do parasita comparados com 65% do grupo com Paranomocina e 20% do grupo placebo ($p < 0,001$) (ASILIAN; DAVAMI, 2006).

Em 2006, um grupo de 5 iranianos infectados com *Leishmania major* foram tratados com 4 sessões de 10% de ALA tópico dentro das lesões e luz vermelha ($100\text{j}/\text{cm}^2$). Dos pacientes tratados 71% apresentaram cura completa 2 semanas depois da última sessão (GHAFARIFAR et al., 2006).

Em 2007 um homem que adquiriu a infecção por *Leishmania tropica* na Itália, após várias tentativas de tratamento o paciente foi tratado com 2 sessões de MAL-TFD ($100\text{j}/\text{cm}^2$) com intervalos de 1 e 4 meses e as lesões apresentaram cura (SOHL et al., 2007).

Em 2011 Song e colegas trataram 2 lesões de um homem com LC de maneira comparativa uma recebeu 0,5% de azul de metileno (AM) intralesional, Luz RL50 (570-750nm) e baixa dose de antimônio pentavalente (AP) (5mg/kg/dia) e a outra apenas AP. O grupo mostrou que

o tamanho da lesão tratada com antimônio e TFD diminuiu significativamente comparado a lesão tratada apenas com AP (. Uma semana após 2 sessões de AM-TFD a lesão havia cicatrizado (SONG et al., 2011).

No mesmo ano as patas traseiras de Hamsters foram infectadas com *Leishmania amazonensis* e após o desenvolvimento da infecção os animais foram tratados 3 vezes por semana durante três meses com 10nM de AM e luz vermelha por 1 hora. O tratamento mostrou ser eficaz, pois a carga de parasitas foi significativamente reduzida (P=0,0001) comparado controle (PELOI et al., 2011).

Embora resultados significativos tenham marcado a TFD para o tratamento da leishmaniose cutânea pouco tem sido relatado sobre os mecanismos de destruição do parasita. Akilov e colegas (2007) observaram um aumento significativo de interleucina IL-6 e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), maior porcentagem de células B e diminuição do número de parasitas em camundongos infectados por *L. major* e tratados com TFD mediada por ALA (AKILOV et al., 2007).

Este trabalho se justifica por tentar compreender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos no tratamento da leishmaniose pela terapia fotodinâmica e assim ampliar os resultados existentes sobre os efeitos induzidos pela terapia fotodinâmica na leishmaniose tegumentar, especialmente na causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* ainda não relatado pela literatura. O uso da Terapia fotodinâmica no controle da leishmaniose tegumentar embora com resultados ainda preliminares, representa possibilidade futura promissora.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T. et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1–10, 2012.
- ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2001.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. **American Cancer Society**, v. 61, p. 250–281, 2011.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic Therapy of Cancer: an Update. v. 61, n. 4, p. 250–281, 2012.
- AKILOV, O. E. et al. Parasiticidal effect of α -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.
- ALVES, J. M. P. et al. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- ASILIAN, A.; DAVAMI, M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: A placebo-controlled, randomized clinical trial. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 634–637, 2006.
- AULER, H., BANZER, G. Untersuchungen Über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. **Cancer Research Clinical Oncology**, v. 53, n. 65, p. 65–68, 1942.
- AWASTHI, A.; KUMAR, M. R.; SAHA, B. Immune Response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. June, p. 238–258, 2004.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33–44, 2000.
- BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CUMVU, J. T. The production by leukocytes of superoxide, a potencial bactericidal agent. v. 52, n. March, p. 741–744, 1973.
- BARRAL, A et al. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3442–3446, 1993.
- BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.

- BEGNAMI, M. D. F. S. et al. Análise imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico em adenocarcinomas gástricos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 351–357, 2004.
- BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. September, p. 633–637, 2002.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.
- BIEDERMANN, T.; RÖCKEN, M.; CARBALLIDO, J. M. TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, v. 9, n. 1, p. 5–14, 2004.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, 2000a.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, 2000b.
- BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society reviews**, v. 24, n. 1, p. 19–33, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, p.187, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, p.180, 2010.
- BREUSING, N. et al. Light-induced cytotoxicity after aminolevulinic acid treatment is mediated by heme and not by iron. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 1, p. 36–43, 2010.
- BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 10, p. 1278–1286, 2009.
- C. FALCÃO, S. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 8, p. 771–780, 2012.

CAMPOS-NETO, A. What about Th1 / Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 38, p. 979–984, 2005.

CASTANO, A.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535–545, 2006.

CEDERBAUM, S. D. et al. Arginases I and II: Do their functions overlap? **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, n. SUPPL., p. 38–44, 2004.

CORREA, M. A. D., LOPEZ, M. R. Alternative macrophage activation: the diversity of one cell involved in innate immunity in response to its environmental complexity. **Immunology**, v. 26, n. 2, p. 73–86, 2007.

COSTA, D. L. et al. Tr-1-Like CD4+CD25-CD127-/lowFOXP3- Cells Are the Main Source of Interleukin 10 in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 5, p. 708–718, 2014.

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

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 2008.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CRUZ, E. DE M. **Inibição da arginase de *Leishmania* por frações do extrato etanólico de *Cecropia pachystachya***. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ, 2011.

DA SILVA, M. F. L. et al. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

DANIELL, M. D., HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340–348, 1991.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417–423, 1996.

DOMINGOS, P. L. B. et al. OX40+ T lymphocytes and IFN- γ are associated with American tegumentary leishmaniasis pathogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 87, n. 6, p. 851–5, 2012.

DUPASQUIER, M. et al. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 4, p. 838–849, 2006.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico; Nitric oxide revision. **J. bras. patol. med. lab**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

EL-ON, J.; BRADLEY, D. J.; FREEMAN, J. C. *Leishmania donovani*: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. **Experimental parasitology**, v. 49, n. 2, p. 167–174, 1980.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524–530, 2004.

ENK, C. D. et al. [Cutaneous leishmaniasis]. **Hautarzt**, v. 54, n. 6, p. 506–512, 2003.

FARAH, F. S.; SAMRA, S. A.; NUWAYRI-SALTI, N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 29, n. 4, p. 755–764, 1975.

FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: The missing link? **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1097–1111, 2008.

FOOTE, C. S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation. **Sciences-New York**, v. 162, n. 3857, p. 963–970, 1968.

FORATTINI, O. P. Nota sobre o encontro de *Leishmania* em roedores silvestres de zona endêmica de leishmaniose no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista paulista de Medicina**, v. 53, n. 2, p. 155, 1958.

FRANK, J. et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of melanoma cells to ALA-based photodynamic therapy. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 6, p. 1539–1545, 2007.

FRIES, D. S., FAIRLAMB, A. H. **Antiprotozoal agents**. 6th. ed. New York: [s.n.].

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração Para O Conhecimento Do Histórico Da Leishmaniose Tegumentar Americana No Brasil: Possíveis Casos Entre Escravos Na Vila De Vassouras-Rj, Nos Anos 1820 a 1880. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 1, p. 7–25, 2014.

FURUYAMA, K.; KANEKO, K.; VARGAS, P. D. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 213, n. 1, p. 1–16, 2007.

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

GARDLO, K. et al. Photodynamische therapie bei kutaner leishmaniose: Eine viel versprechende neue therapiemodalit. **Hautarzt**, v. 55, n. 4, p. 381–383, 2004.

GHAFFARIFAR, F. et al. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. **Eastern Mediterranean health journal = La revue de santé de la**

Méditerranée orientale = al-Majallah al-šihḥīyah li-sharq al-mutawassiṭ, v. 12, n. 6, p. 902–8, 2006.

GOBERT, A. P. et al. L-arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4653–4657, 2000.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

GORMAN, A. et al. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 34, p. 10619–10631, 2004.

GREEN, S. J., MELTZER, M. S., HIBBS JR, J. B., NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by L-arginine-dependent killing mechanism. **The journal of immunology**, v. 144, n. 1, p. 278–283, 1990.

GREVELINK, S. A; LEMER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the american academy of dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257–272, 1996.

GRODY, W. W. et al. Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic, and molecular analysis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 2, p. 602–609, 1989.

GURUVAYOORAPPAN, C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? **Integrative cancer therapies**, v. 7, n. 2, p. 90–95, 2008.

HANDMAN, E. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HEINZEL, FP, SCHOENHAUT, DS, RERKO, R. M, ROSSER, L., GATELY, M. K. Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505–1509, 1993.

HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **Journal of immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533–6544, 2001.

- HRYHORENKO, E. A et al. Antigen specific and nonspecific modulation of the immune response by aminolevulinic acid based photodynamic therapy. **Immunopharmacology**, v. 40, n. 3, p. 231–240, 1998.
- IBANEZ SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.
- 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.
- JACOBINA, R. R.; GELMAN, E. A. Juliano Moreira and the Gazeta Medica da Bahia. **Historia, ciencias, saude--Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1077–1097, 2008.
- JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 107–132, 1996.
- JORI, G. Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, n. 2, p. 87–93, 1996.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KENNEDY, J. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, p. 143–148, 1990.
- KESSEL, D. et al. Modes of photodynamic vs. sonodynamic cytotoxicity. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 28, n. 3, p. 219–221, 1995.
- KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. v. 43, n. 7, p. 755–767, 2012.
- KIM, C. H. et al. Synergistic effects of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy and celecoxib via oxidative stress in human cholangiocarcinoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2173–2186, 2013.
- KOPF, M., BROMBACHER, F. KOHLER, G., KIENZLE, G.; WIDMANN, K., LEFRANG, K.; HUMBORG, C., LEDERMANN, B., SOLBACH, W. IL-4-deficient Balb/c Mice Resist Infection with *Leishmania major*. **Immunological reviews**, v. 184, n. 3, p. 1127–1136, 1996.
- KOŘENÝ, L.; LUKEŠ, J.; OBORNÍK, M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 2, p. 149–156, 2010.
- LAUNOIS, P., LOUIS, J. A., MILON, G. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. **Parasitology**, v. 115, p. 25–32, 1997.

- LEE, T.-S.; TSAI, H.-L.; CHAU, L.-Y. Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19325–19330, 2003.
- LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annual review of immunology**, v. 16, n. 1, p. 137–161, 1998.
- LIEW, F. Y. et al. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 570–573, 1990.
- LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311–1315, 1997.
- LIMA, M. S. D. C. et al. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 303–308, 2009.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.
- LU, J. et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. **Kidney international**, v. 84, n. 4, p. 745–55, 2013.
- LUZ, N. F. **Papel da proteína heme oxigenase 1 na infecção de macrófagos por *Leishmania chagasi***. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
- LUZ, N. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 9, p. 4460–7, 2012.
- MARCONDES, C. B. et al. A survey of visceral leishmaniasis in dogs from Santa Maria and neighbouring municipalities, State of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 499–501, 2003.
- MARQUES, S. A. Leishmaniose tegumentar americana: apresentação clínica pseudolinfomatosa. v. 12, n. 4, p. 168–170, 2007.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, n. March, p. 13, 2014.
- MAUËL, J.; RANSIJN, A; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **Journal of leukocyte biology**, v. 49, n. 1, p. 73–82, 1991.
- MEIRA, A. R. Splendore : facets of life of the Toxoplasma discoverer. **Scientia**, v. 20, p. 9–12, 2010.

- MINODIER, P. et al. Leishmaniasis treatment. **Archives of pediatrics**, v. 17, n. 6, p. 838–839, 2010.
- MOAN, J., PENG, Q. An outline of the hundred year history of PDT. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3561–3600, 2003.
- MODELELL, M. et al. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, 2009.
- MONTENEGRO, D. Utilization of Pentamidine for Mucosal Leishmaniasis Treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 529–530, 1997.
- MOORE, J. V.; WEST, C. M.; WHITEHURST, C. The biology of photodynamic therapy. **Physics in medicine and biology**, v. 42, n. 5, p. 913–935, 1997.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODELELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 11, p. 5347–5354, 1998.
- MURBACK, N. D. N. et al. Leishmaniose tegumentar americana: Estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55–63, 2011.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NOËL, W. et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 126–133, 2004.
- NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.
- NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339–352, 2005.
- O’CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.
- OTTERBEIN, L. E. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 422–428, 2000.
- PANEK, H.; O’BRIAN, M. R. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2273–2282, 2002.
- PAULINO, T. P. et al. Use of visible light-based photodynamic therapy to bacterial photoinactivation. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 1, p. 46–49, 2005.

- PELOI, L. S. et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 353–356, 2011.
- PIANTADOSI, C. A. et al. Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 16374–16385, 2011.
- PICCIRILLO, C. A. Regulatory T cells in health and disease. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 395–401, 2008.
- POOLE, R. K.; HUGHES, M. N. New functions for the ancient globin family: Bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 775–783, 2000.
- PUSHPAN, S. K. et al. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 2, n. 2, p. 187–207, 2002.
- RAFFERTY, S. et al. Giardia lamblia encodes a functional flavohemoglobin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 3, p. 347–351, 2010.
- RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecletica Quimica**, v. 32, n. 1, p. 7–14, 2007.
- RIITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VANZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–510, 2009.
- ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v. 75-76, n. 1, p. 115–130, 2005.
- ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- RYTER, S. W.; ALAM, J.; CHOI, A. M. K. Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications. **Physiol Rev**, v. 86, p. 583–650, 2006.
- SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–344, 2010.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.
- SAH, J. F. et al. Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14902–14909, 2002.

SAMPAIO, S. A. P., RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3th. ed. São Paulo: Artes Médicas, p.1197-1225, 2007.

SHARMAN, W.; ALLEN, C.; VAN LIER JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug discovery today**, v. 4, n. 11, p. 507–517, 1999.

SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Editorial: *Leishmania* survival mechanisms: the role of host phosphatases. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 1–3, 2010.

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

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - A diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13–22, 2008.

SONG, D. et al. Phodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. **Photomedicine and laser surgery**, p. 711–715, 2011.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.

SOUZA, W. D. et al. **Doenças negligenciadas**, Rio de Janeiro: Acadêmia Brasileira de Ciências, p.1-58, 2010.

STENGER, B. S. et al. Tissue Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Is Closely Associated with Resistance to *Leishmania Major*. **Journal experimental medicine**, v. 180, p.783-793, 1994.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151–4202, 1998.

STOCKER, R. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 235, n. 4792, p. 1043–1046, 1987.

TOJAL DA SILVA, A. C. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 9, p. 1388–1398, 2006.

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

TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **The oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–1044, 2006.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 4, p. 505–511, 1996.

- VAN ZANDBERGEN, G. et al. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177–4184, 2002.
- VERRECK, F. A W. et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4560–4565, 2004.
- VON STEBUT, E. et al. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 2, p. 191–199, 2003.
- VON TAPPEINER, H., JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Munchiner Med Wochenschr**, v. 50, n. 47, p. 2042–2044, 1903.
- WACHOWSKA, M. et al. Aminolevulinic acid (ala) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4140–4164, 2011.
- WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. **Journal of Eukariotic microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196–206, 1993.
- WANG, Z. E. et al. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1367–1371, 1994.
- WORTMANN, G. et al. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 35, n. 3, p. 261–267, 2002.
- ZHANG, Y. et al. Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines: A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. **FEBS Journal**, v. 273, n. 14, p. 3136–3147, 2006.
- ZIZZO, G. et al. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. **Journal of immunology**, v. 189, n. 7, p. 3508–20, 2012.