

**ANDRÉA LISBÔA CARNEIRO**

**USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO ALUMÍNIO  
NO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**BRASÍLIA  
2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANDRÉA LISBÔA CARNEIRO**

**USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO ALUMÍNIO  
NO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Médicas da Universidade de  
Brasília como requisito para  
obtenção do grau de mestre.**

**Orientadora: Professora Doutora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio**

**Brasília-DF**

**2013**

**ANDRÉA LISBÔA CARNEIRO**

**USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO ALUMÍNIO  
NO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Aprovada em Março de 2013.

Banca Examinadora:

---

*Dr<sup>a</sup> Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio*

*Presidente/Orientadora*

*Faculdade de Medicina/Universidade de Brasília*

---

*Dra. Ada Amália Ayala Urdapilleta*

*Membro*

*Hospital Militar de Área de Brasília*

---

*Dr<sup>a</sup> Izabel Cristina Rodrigues da Silva*

*Membro*

*Faculdade de Farmácia da UnB*

---

*Dr. Killarney Ataíde Soares*

*Suplente*

*Coordenação de Saúde da  
Presidência da República*

*Prof<sup>o</sup> Pesquisador da Faculdade  
Anhanquera de Brasília*

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação de mestrado...*

*À Deus. “Para Ti, Senhor, para tua Glória e por amor”.*

*Aos meus pais, Alba Maria Lisbôa Carneiro (in memorian) e Antônio de Sousa Carneiro, os primeiros a me ensinarem a buscar o valor Divino humano.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Professora Doutora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, minha orientadora, pelo ensino e pela confiança.*

*A minha querida irmã Aldenise Regina Lisboa Carneiro, pela paciência, e palavras de consolo nas horas difíceis.*

*Aos meus irmãos Antônio de Sousa Carneiro Júnior, Alexandre Augusto Lisbôa Carneiro, e Adriano Lisbôa Carneiro, pelo apoio emocional.*

*Aos meus tios Walmir Hugo dos Santos e Nise Lisbôa dos Santos, Regina Coeli de Paiva Lisbôa, Déa Lisbôa ....., Nelson de Sousa Carneiro e Maria Lúcia de Sousa Carneiro, que mesmo distante sempre torceram por mim e me incentivaram com palavras de coragem para que eu alcançasse meus objetivos.*

*A Petrônio Caldas França, pelo apoio.*

*Ao João Paulo Figueiró Longo por disponibilizar o laser para a execução dos ensaios, sem o qual não conseguiríamos desenvolver este trabalho.*

*A Professora Mônica Oliveira da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e sua equipe, em especial a Sávia Caldeira de Araújo por terem manipulado e fornecido a ftalocianina cloro alumínio.*

*Aos Doutores Killarney Ataíde Soares e Ada Amália Ayala Urdapilleta pelo apoio.*

*A Dr<sup>a</sup> Izabel Cristina Rodrigues da Silva pelo apoio na estatística.*

*Ao Dr<sup>o</sup> Ciro Martins Gomes pelo auxílio na língua inglesa.*

*As Mestras Mariana Boff Barreto e Juliana Araújo Sabóia, pelo estímulo e carinho.*

*A aluna de Medicina da Universidade de Brasília, do Programa de Iniciação Científica (PIC) Nathália Araújo de Almeida, pela imensa ajuda a mim dispensada, para a realização deste trabalho.*

*Aos Técnicos do Laboratório de Dermatocologia; Tércio Rodrigues Pereira, Viviane Medeiros Silva e Deise Dalila Oliveira pelo apoio técnico com os animais, mas principalmente pela amizade.*

*À equipe do Biotério, Gabriela Mariângela Farias de Oliveira e Uyara Renno Arruda (médicas veterinárias) e Emiraldo dos Anjos Brito (técnico) pela ajuda com os animais.*

*A família Thomas, que me acolheu de abraços abertos.*

*As minhas amigas da Paróquia São José Operário, pelas orações: Ana Cristina, Aracélia, Janete, Janice, Sr<sup>a</sup> Inácia e Sr. Mozart, Márcia e Mila .*

*Aos amigos que fiz no decorrer dessa jornada, com quem sempre pude contar e aprender: Ricardo Jorge, Luciana, Daniele, Graciene, Júlio César e Marília Santana.*

*As queridas amigas Adriana Benevides de Jesus Almeida e Perla Fabíola de Araújo, por acreditarem em mim desde o começo.*

*À Universidade de Brasília, pela oportunidade de estudo.*

*Aos apoios financeiros da FINATEC para realização dos experimentos e a CAPES pela bolsa de fomento.*

*E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Muito obrigada !*

***“É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor da ação, sem sabermos o sacrifício que ela comporta”.***

Henry Ward Beecher

## RESUMO

Considerando os desafios clínicos e técnicos no tratamento da Leishmaniose Cutânea, o objetivo do presente estudo, foi avaliar *in vivo*, a eficácia da terapia fotodinâmica usando como fotossensibilizador a ftalocianina cloro alumínio no tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental. Vinte e quatro camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas metacíclicas de *Leishmania (L.) amazonensis* na concentração de  $3 \times 10^6$  e divididos em 4 grupos: um tratado com terapia fotodinâmica (TFD) usando o fotossensibilizador ftalocianina cloro alumínio sob apresentação de gel e na concentração e  $20 \mu\text{g}/\text{mg}$  (aplicação por 15 minutos de laser no comprimento de onda 640-710nm,  $150 \text{ J}/\text{cm}^2$ , em 10 doses em sessões diariamente), um grupo infectado e tratado com antimoniato pentavalente ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ), um grupo controle infectado sem tratamento e um grupo sem infecção e sem tratamento. Avaliação: realizada pela medição da pata e exames parasitológicos (cultura em meio NNN-Novy McNeal-Nicolle e esfregaços) e cultura de *Leishmanias* em diluição limitante seguido de análise pelo método colorimétrico MTT (método colorimétrico Methyl Thiazolyl Blue) utilizando-se o programa estatístico ELIDA<sup>®</sup>. Usou-se o programa SPSS versão 17.0, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA seguida pelo teste de Tukey para análise estatística. Resultados: no grupo da terapia fotodinâmicas a média dos diâmetros das patas dos camundongos caíram de 0,25mm para 0,20mm. No grupo  $\text{Sb}^{\text{V}}$  subiram de 0,25 mm para 0,30 mm, no controle infectado não tratado cresceram de 0,25mm para 0,30mm ( $p < 0,05$ ). Na avaliação da viabilidade das *Leishmanias*, pelo MTT, foi possível observar que no grupo que utilizou a droga  $\text{Sb}^{\text{V}}$ , a redução desta viabilidade foi certa de 50% em relação ao grupo de INT, e que em relação ao tratamento, com ftalocianina cloro alumínio associada com a terapia fotodinâmica com laser, a média da viabilidade foi de cerca de 80% em relação ao grupo INT ( $p < 0,05$ ). Concluí-se que a terapia se mostrou eficaz com esta concentração, no tratamento de leishmaniose cutânea experimental.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose cutânea, Terapia fotodinâmica, ftalocianina cloro alumínio.



**ABSTRACT**

Considering technical and clinical challenges in the treatment of cutaneous leishmaniasis, the aim of this study was to evaluate the *in vivo* efficacy of photodynamic therapy using aluminum phthalocyanine chloride as a photosensitizer in topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. Twenty-four C57BL/6 mice were infected with *Leishmania (L.) amazonensis* metacyclic promastigotes at a concentration of  $3 \times 10^6$  and were divided into four groups: one treated with photodynamic therapy (PDT) using aluminum phthalocyanine chloride gel at a concentration of  $20 \mu\text{g}/\text{mg}$  (10 daily sessions of laser application for 15 minutes at a wavelength of 640-710nm,  $150 \text{ J}/\text{cm}^2$ ), a group infected and treated with pentavalent antimony (Sbv), an infected control group without treatment and a group not infected and untreated. Evaluation: The primary outcome evaluation was performed by paw measures, parasitological exams (culture in NNN medium Novy-McNeal-Nicolle and smears) and culture of *Leishmania* in limiting dilution analysis followed by MTT-colorimetric-method (colorimetric method Methyl Thiazolyl Blue) using the Statistical program (ELIDA ®). For statistical analysis, we used the SPSS version 17.0 package and the tools: Shapiro-Wilk normality test and ANOVA followed by Tukey test. Results: In the photodynamic therapy group, the mean diameter of the paws fell from 0.25 mm to 0.20 mm. In the Sbv group it increased from 0.25 mm to 0.30 mm. In infected and untreated controls it increased from 0.25 mm to 0.30 mm ( $p < 0.05$ ). In assessing the viability of *Leishmania* by the MTT test, it was observed that in the group that received Sbv, the reduction of viability was of 50% when compared to the INT group, and when compared to treatment with aluminum chloride phthalocyanine PDT associated with the laser, the average viability was of 80% when compared to the INT group ( $p < 0.05$ ). We may conclude that the therapy was effective at this concentration in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis.

**KEYWORD:** *Cutaneous Leishmaniasis*, , photodynamic therapy, treatment.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Leishmaniose.....	01
1.2 Agente etiológico.....	01
1.3 Parasito.....	02
1.4 Ciclo de vida o parasito.....	03
1.5 Transmissão.....	04
1.6 Formas clínicas.....	05
1.7 Epidemiologia.....	06
1.8 Diagnóstico.....	06
1.9 Tratamento.....	07
1.9.1 Terapia fotodinâmica.....	08
1.9.2 Fotossensibilizantes.....	08
1.9.3 Ftalocianina.....	09
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
3.1 Estudo <i>in vivo</i> com isolado de <i>Leishmania ssp</i> .....	12
3.2 Infecção experimental.....	12
3.3 Questões éticas.....	13
3.4 Preparo dos animais.....	13
3.5 Preparo do inoculo.....	13
3.6 Desenho experimental <i>in vivo</i> .....	14
3.7 Eutanásia dos animais.....	17
3.8 Diluição limitante.....	18
3.9 Critérios de avaliação.....	18
3.10 Tipo de estudo.....	18
3.11 Isolado de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	18
3.12 Análise estatística.....	19
3.12.1 Teste de normalidade.....	19

<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
4.1 Medida das patas dos camundongos.....	20
4.2 Análise – diferentes tempos de tratamento para cada grupo.....	20
4.3 Análise da viabilidade celular.....	21
4.3.1 Análise das médias das Leishmanias.(L.) amazonensis viáveis pelo método do MTT.....	21
4.4 Exame parasitológico – determinação da quantificação de parasitos nas patas dos camundongos (Diluição limitante+MTT+Espectrofotômetro).....	22
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>8. ANEXOS</b> .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido aminolevulinico
AIPhCl / AIPcCl	Alumínio ftalocianina cloro
AIPcS <sub>4</sub>	Alumínio ftalocianina tetrasulfonado
°C	Graus centígrados
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Monóxido de carbono
C57BL	Espécie de camundongos
ELIDA <sup>®</sup>	Programa estatístico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FINATEC	Fundação de Empreendedorismo Científico e Tecnológico
FSs	Fotossensibilizadores
g	Grama
INT	Grupo Infectado e Não Tratado
J	Joule
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LED	<i>Ligth Emission Diode</i> - Diodo emissor de luz
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
M	Molar
MAL	Metil aminolevulinato
mg	Miligrama
MHOM/BR/PH8	Código da OMS para definir a origem das cepas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i>
mm	Milímetro
MM	Mili Molar
MTT	Brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazólio)
mW	Miliwatt
NINT	Não infectado e não tratado

NNN	McNeal, Novy e Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pcs	<i>Phthalocyanines</i> - ftalocianinas
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
RPM	Rotações por minuto
Sb <sup>v</sup>	Grupo antimoniato pentavalente e símbolo do antimoniato pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia fotodinâmica
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
V.	<i>Viannia</i>

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01.** Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*..... 03

**Figura 02.** Formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*..... 03

**Figura 03.** Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*..... 04

**Figura 04.** Mosquito do gênero *Lutzomyia*..... 05

**Figura 05.** Leishmaniose cutânea..... 06

**Figura 06.** Rota de formação das espécies reativas de oxigênio. Diagrama de Jablonsk..... 10

**Figura 07.** Lesão cutânea em pata traseira direita (seta) de camundongo após Inoculação de formas promastigotas de *Leishmania(L.)amazonensis*..... 15

**Figura 08.** Camundongo com pata traseira direita recoberta com gel contendo AlPhCl envolto em folha de alumínio, para evitar a penetração da luz nos 15 minutos anteriores a aplicação do laser..... 16

**Figura 09.** Aplicação do laser no local da lesão (pata traseira direita) do camundongo..... 16

**Figura 10 .** Homogeneizador utilizado para maceração das patas dos camundongos..... 17

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 01.** Medida das patas e pesos dos animais antes da inoculação com *Leishmania (L.) amazonensis*..... 13

**Tabela 02.** Resultados da confirmação da infecção dos camundongos de *Leishmania (L.) amazonensis*, após 10 dias de inoculação..... 15

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 01.</b> Diferentes tempos de tratamento para cada grupo .....	20
<b>Gráfico 02.</b> Análise das médias das <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> viáveis pelo método de MTT.....	21
<b>Gráfico 03.</b> Exame parasitológico - determinação da quantificação de parasitos na pata.....	22



**LISTA DE QUADROS****Quadro 01.** Espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* e *Viannia*.....20

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença negligenciada, em países com áreas tropicais, que acomete geralmente populações rurais e de baixa renda, as quais não podem arcar com medicamentos de alto custo. Considerada de importância para a saúde pública de acordo com a Organização Mundial de Saúde com registro de 1 a 1,15 milhão de casos, assim a mesma permanece endêmica em 88 países distribuídos em quatro continentes (WHO, 2010).

### 1.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da Leishmaniose são tripanosomídeos do gênero *Leishmania*. No Brasil seis espécies já foram identificadas como causadoras da LC em humanos, sendo as principais *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*. A primeira é encontrada em todas as zonas endêmicas, do Norte até o Sul do Brasil, tanto nas áreas de colonizações antigas quanto na de colonizações recentes, estando geralmente associada à presença de animais domésticos (Gontijo, 2003; Silveira, 2009) (Quadro 1).

Quadro 1 Espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* e *Viannia*

	<b>SUBGÊNERO <i>Leishmania</i></b>		<b>SUBGÊNERO <i>Viannia</i></b>
01	<i>L. (Leishmania) donovani</i> ***	01	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> *
02	<i>L. (L.) infantum</i> ***	02	<i>L. (V.) guyanensis</i> *
03	<i>L. (L.) chagasi</i> ***	03	<i>L. (V.) panamensis</i>
04	<i>L. (L.) archibaldi</i>	04	<i>L. (V.) peruaviana</i>
05	<i>L. (L.) tropica</i> **	05	<i>L. (V.) lainsoni</i> *
06	<i>L. (L.) aethiopica</i> **	06	<i>L. (V.) naiffi</i> *
07	<i>L. (L.) major</i> **	07	<i>L. (V.) shawi</i> *
08	<i>L. (L.) gerbili</i>	08	<i>L. (V.) colombiensis</i> *
09	<i>L. (L.) mexicana</i>	09	<i>L. (V.) lindenberg</i>
10	<i>L. (L.) amazonensis</i>		
11	<i>L. (L.) venezuelensis</i>		
12	<i>L. (L.) enriettii</i>		
13	<i>L. (L.) aristidesi</i>		
14	<i>L. (L.) pifanoi</i>		

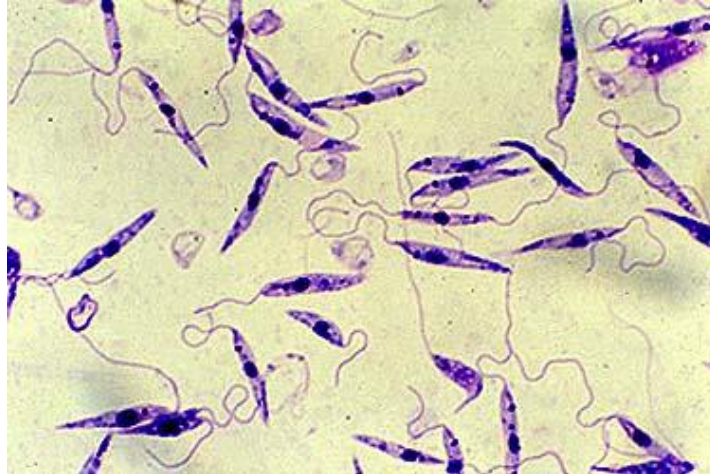
(LAINSON & SHAW, 1987)(\*)Determinantes da *Leishmania* no Brasil; (\*\*)Determinantes da *Leishmania* no Velho Mundo (Europa); (\*\*\*) Determinantes da *Leishmania Vianna*.

### 1.3 Parasito

Apresentam uma forma flagelada denominada de promastigota (Figura 01). Esta se encontra no meio extracelular na luz do trato digestivo no intestino médio de hospedeiros invertebrados.

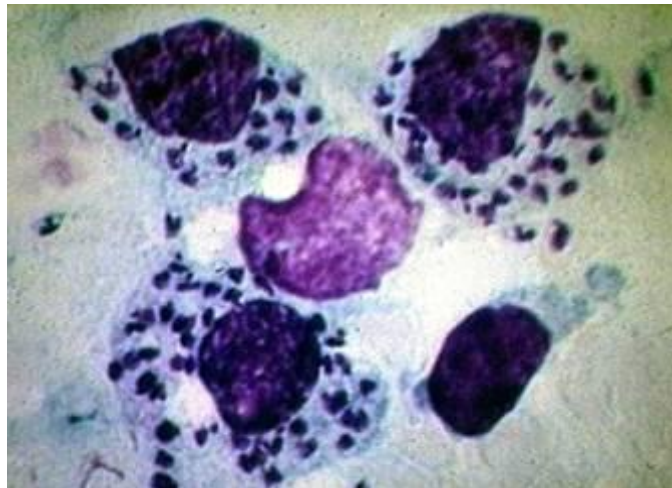
São transmitidos por dípteros da subfamília Phlebotominae (gênero *Phlebotomus* no Velho mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo) e que durante o repasto sanguíneo, depositam o parasito no hospedeiro humano. A forma promastigota metacíclica é infectante para os hospedeiros vertebrados (Ross, 1903).

A forma amastigota (Figura 02) presente em hospedeiros vertebrados inclusive o homem, é esférica com diâmetro variando de 2,5 a 5µm, as quais localizam-se em vacúolos no interior dos macrófagos do hospedeiro, onde se multiplicam por divisões binárias (Herwaldt, 1999). Diferenciam-se morfológicamente e bioquimicamente das promastigotas, por não mais possuírem nesta etapa o flagelo (Kilick-Kendrick 1979, 1990, 1991; Walters,1993).



**Figura 01** Formas promastigotas de *Leishmanias*

(Fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/archives/NSEP/Brazil2002/leishmania/Port/Leish03.htm>; Acesso: 11/04/2012)



**Figura 02** Formas amastigotas de *Leishmanias*

(Fonte: [http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero\\_Leishmania.htm](http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm); Acesso: 11/04/2012)

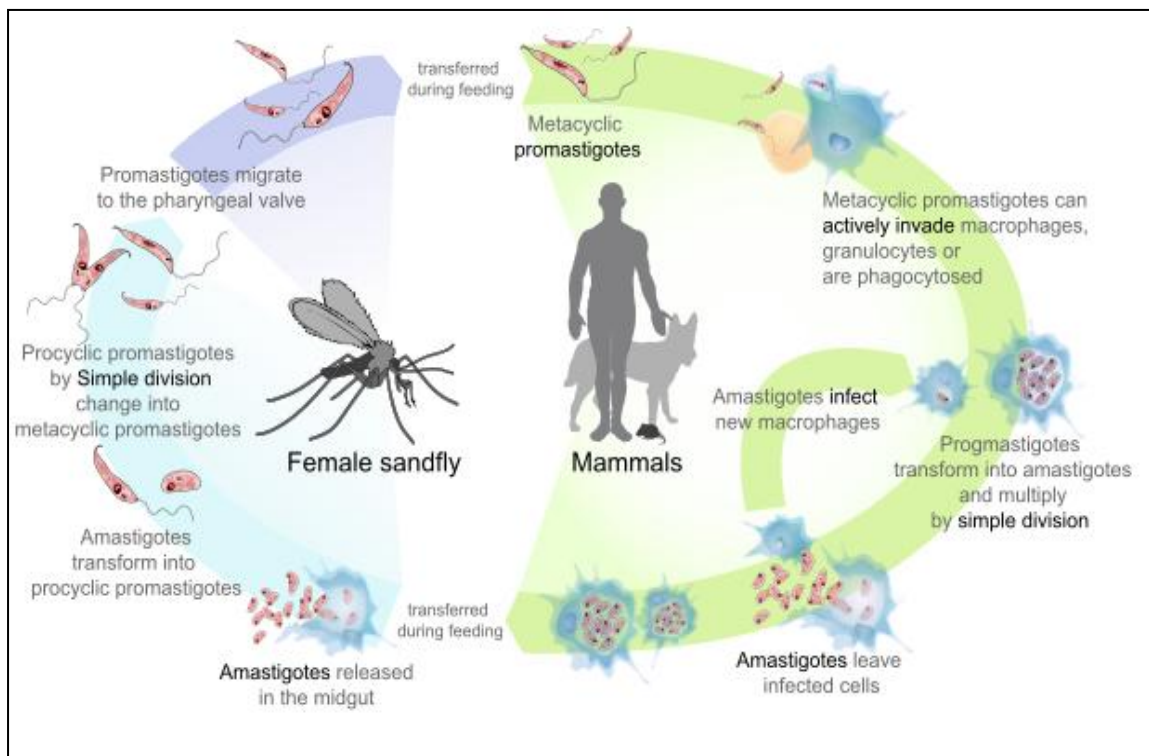
#### 1.4 Ciclo de vida da *Leishmania*

Os macrófagos são as células responsáveis pela imunidade, no qual fagocitam os microrganismos com a liberação de interleucinas no processo inflamatório estas são alvos das *Leishmanias* o que compromete esta função (Ota,2008). No caso da leishmaniose, o patógeno resiste à atividade fagocítica por reverter a maquinaria de ataque (Balland, 1996).

O ciclo de vida do protozoário inclui a fase extracelular, dentro do trato digestivo do invertebrado, e outra intracelular, dentro de macrófagos dos mamíferos (Ramos, 2011). As formas de *Leishmanias* infectantes que são transmitidas para o hospedeiro são chamadas metacíclicas e as não infecciosas são as procíclicas

(Silveira,2009; Sacks, 2002). No entanto, ambas são encontradas em culturas de células livres, no qual as procíclicas se proliferam e se diferenciam em metacíclicas, sendo estas mais abundantes na fase estacionária da cultura. Neste processo, uma variedade de genes apresenta diferentes expressões padrões, algumas das quais, codificam fatores virulentos (Ramos, 2011).

As *Leishmanias* são transferidas para o hospedeiro no estado de promastigota (alongada com um flagelo externo), no qual são fagocitadas por diferentes células fagocíticas do hospedeiro. Dentro das células do fagócito mononuclear, as promastigotas se diferenciam para amastigotas (forma arredondada sem o flagelo) (Figura 03). Em seguida, se proliferam, estabilizando a infecção (Goto, 2006).



**Figura 03** Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*

(Fonte:[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram\\_en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg) ; acesso: 11/04/2013)

### 1.5 Transmissão

Se realiza por meio das fêmeas infectadas dos dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (Figura 04). O mosquito, conhecido popularmente

como mosquito palha, berigui ou cangalha, parece voar centenas de metros, em geral com vôo saltitante e pica partes do corpo não cobertas por roupas ou lençol. Sua picada costuma ser dolorosa.



**Figura 04** Mosquito do gênero: *Lutzomyia*

(Fonte: <http://www.qnint.s bq.org.br>; Acesso: 20/12/2012)

Outro elemento constituinte no ciclo da doença são os pequenos animais silvestres, como macacos, tatus e preguiças, reservatórios já conhecidos do parasito.

## 1.6 Formas clínicas

No âmbito da LC, as espécies de Leishmanias do Velho Mundo, como *Leishmania. donovani* e *Leishmania. major*, geralmente causam lesões cutâneas benignas e autolimitantes. As espécies americanas levam a um grande espectro de manifestações, que vão desde as benignas até as severas com acometimento mucoso. Após a picada do flebotomíneo, o aparecimento da lesão cutânea pode variar de 10 dias a três meses. Inicialmente ela se apresenta com aspecto de pápula eritematosa no local da porta de entrada que pode envolver. As apresentações clínicas que se seguem constituem-se de úlceras cutâneas múltiplas ou únicas. Lesões cutâneas difusas e lesões mucosas, dependendo do agente parasitológico e da susceptibilidade do hospedeiro. Em infestações pela *Leishmania braziliensis*, não raro ocorre linfadenopatia regional que precede o surgimento da úlcera em uma a doze semanas. As úlceras são arredondadas, rasas e têm o assoalho de aspecto granuloso e as bordas elevadas e endurecidas.

A LC manifesta-se apenas por lesões cutâneas não tratadas, tratadas inadequadamente ou nas quais o tratamento se mostrou sem resultados. Pode causar lesões de mucosa disseminada, especialmente nasofaríngeas. Entre as formas de manifestação da LC menos comuns encontram-se a leishmaniose cutânea difusa (LCD), situada no pólo anérgico, e as formas resistentes denominadas de leishmaniose cutânea mucosa (LCM) e a leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 05).



**Figura 05** Leishmaniose cutânea

(Fonte: [www.infoescola.com/doencas/leishmaniose](http://www.infoescola.com/doencas/leishmaniose); Acesso: dia 13/02/2012)

### 1.7 Epidemiologia

A partir da década de 1980, verificou-se o aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Ocorreu o aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, com as implantações das ações de vigilância e controle da LC no país (WHO, 2010).

### 1.8 Diagnóstico

LC abrange aspectos clínicos-epidemiológicos dentro dos quais estão o histopatológico, o raspado e a cultura. É importante, no caso da LCD, fazer diagnóstico diferencial com a hanseníase virchowiana, caso as lesões se mostrem resistentes ao tratamento. Lesões traumáticas, neoplásicas, tuberculosas, sífilis e

paracoccidioidomicose estão entre os exemplos de diagnósticos diferenciais tanto das formas cutânea quanto das formas mucosas (Gontijo, 2003). O diagnóstico parasitológico é feito através de escarificação, aspiração ou biópsia da borda da úlcera, nas quais busca-se por meio de imprint corado com Giemsa a confirmação da presença de amastigotas. A sensibilidade intradérmica, chamada de Reação de Montenegro, é uma técnica imunológica (Smgh, 2003). Na hipersensibilidade tardia a imunofluorescência indireta (IFI) tem uma das maiores sensibilidades entre os testes disponíveis, com valores de 71% na forma cutânea e 100% na forma mucosa, sendo negativa na LCD (Gontijo, 2003). É capaz de indicar a presença de anticorpos em estágios precoces da infecção. O método de - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tem menor sensibilidade em comparação com a IFI. Além disso, na Leishmaniose tegumentar americana (LTA) os níveis de anticorpos circulantes são baixos. A Polymerase Chain Reaction (PCR) tem sensibilidade e especificidade altas, mas ainda não é acessível no Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente em condições de campo. Suas vantagens são: a rapidez e a identificação específica do agente parasitário, o que permite um tratamento orientado.

### 1.9 Tratamento

Em 1912, o médico Gaspar Vianna iniciou a terapia com tártaro emérito, antimoniato trivalente (SbIII) (Vianna, 1912). A terapia de primeira escolha desde 1930 até os dias atuais é o antimoniato pentavalente (SbV) na dose de 40mg SbV/Kg/dia (Sampaio, 1997), para a terapia de leishmaniose cutânea com menor toxicidade (Murray, 2000; Sundar, 2001; Soto, 2005), sendo a base de 60% a 90% dos casos, apresentando-se como a melhor opção terapêutica disponível (Bergman, 1986; Herwardt, 1999; Name, 2005). No caso de resistência ao tratamento ou de impossibilidade da utilização dos compostos preconizados, a pentamidina é a droga de segunda escolha, considerada eficiente no tratamento das lesões de mucosas ante o antimoniato (Gontijo, 2003).

Para ambas as drogas, a administração é sistêmica e os esquemas terapêuticos variam entre as formas mucosa e cutânea, e como toda droga, provocam no paciente efeitos colaterais: anorexia, mialgia, artralgia,



cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade sendo proibido a administração à gestantes.

São drogas que apresentam limitações: alto custo, baixa aderência do paciente ao tratamento e a necessidade de administração em âmbito hospitalar. Neste contexto, se faz necessário o desenvolvimento de terapias alternativas (Silva, 2011), e técnicas inovadoras vêm surgindo como potencial para tratamento da leishmaniose, dentre elas a nanotecnologia farmacêutica, associadas a prevenção e diagnósticos sofisticados. O emprego das nanopartículas em testes, têm obtido bons resultados, em fármacos anti-neoplásicos (Suri, 2007). A nanopartícula, diminui a toxicidade e a resistência relatadas com o uso de drogas de primeira e segunda escolha (Pimentel, 2007; Date, 2010).

#### 1.9.1 Terapia fotodinâmica

É um método terapêutico, que tem sido uma proposta como alternativa no tratamento de LC, já conhecida da dermatologia no emprego do tratamento de lesões neoplásicas do tipo não melanocítica e lesões cutâneas, acne e rejuvenescimento, sendo a terapia fotodinâmica (TFD) estudada e avaliada quanto a sua eficácia e toxicidade na LC, que segundo alguns autores, está na lista de doenças para o tratamento com a utilização da TFD (Zhang, 2006).

A TFD utiliza um fotossensibilizador (FS), que no presente trabalho é a ftalocianina cloro alumínio (AIPcCl) de uso exógeno no tecido lesado (in vivo), que foi exposto à luz, resultando na ocorrência de reações orgânicas que originam radicais livres, capazes de danificar componentes da célula-alvo (Escobar, 2006).

#### 1.9.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FSs) são os elementos principais na execução da TFD. Estas estruturas realizam a transferência de energia luminosa para gerar reações que culminam com a formação de uma série de espécies químicas altamente reativas, que por sua vez promovem a destruição das células-alvo. Diversos FSs têm sido desenvolvidos e testados clinicamente para serem utilizados na TFD. Têm-se uma ordem cronológica de classificação que envolve o desenvolvimento desses fármacos, nessa lógica, podemos citar os fármacos de

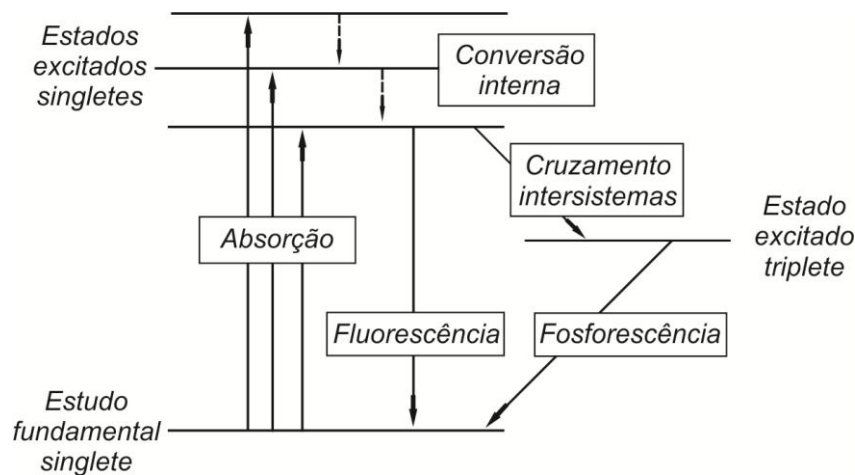
primeira, segunda e de terceira geração, esta última associando, FSs e imunoterapia e radiofototerapia (Dougherty, 1992).

Alguns autores (Allison, 2004) dispõem os FSs de acordo com semelhanças químicas entre fármacos, classificando-os em famílias de FSs, assim, estes seguem a seguinte classificação: família da porfirinas, das cloridrininas e ftalocianinas.

### 1.9.3 Ftalocianinas

As ftalocianioninas (Pcs) são substâncias análogas da porfirina, que são utilizadas em doenças cutânea como carcinoma basocelular, psoríase e ceratose actínica, frequentemente apresentando resultados positivos de cura e redução da lesão (Fabris, 2006). Apesar disso, o uso de Pcs na TFD tem sido pouco explorado em detalhes e, após extensa pesquisa na literatura, ainda não foi utilizado em modelos biológicos portadores de LTA. Resultados anteriores sugerem que as porfirinas são moléculas efetivas no tratamento da leishmaniose por terapia fotodinâmica (Gardlo, 2003; Guaffarifar, 2006). Em modelos murinos e in vitro as Pcs demonstraram baixa ou nenhuma toxicidade (Stojiljkovic, 2001; Kayser, 2003;).

O princípio básico da TFD é a geração de agentes citotóxicos através da interação dinâmica entre um fármaco fotossensibilizador excitado por luz em comprimento de onda específico. A absorção de fótons pelos FSs gera a ativação destes fármacos, levando estas moléculas a situações de grande instabilidade química, com a mudança de padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de toda molécula com algum grau de excitação eletrônica é o retorno ao seu estado fundamental, pois este estado é energeticamente o mais favorável a qualquer molécula. O retorno da molécula a estabilidade é realizado pela emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção dos fótons pelo fármaco fotossensibilizador. A absorção de fótons emitidos por irradiação pelo laser, pode levar a transformação do fármaco fotossensibilizador de seu estado fundamental a um estado excitado chamado de singlet. A partir desta transformação inicial, o FS pode retornar ao seu estado fundamental liberando a energia de excitação em forma de fluorescência ou calor, ou passar para outro estado de excitação menos instável denominado triplet (Figura 06)(Lukisiene, 2003).



**Figura 06** Rota de formação das espécies reativas de oxigênio. Diagrama de Jablonski simplificado

fonte: [www.infinito-e-diverso/diagrama-de-jablonski.html](http://www.infinito-e-diverso/diagrama-de-jablonski.html) Acesso: 19/03/2013

As propriedades fotofísicas desses compostos estão diretamente relacionados ao íon metal central, que deve ser escolhido de acordo com a aplicação de TFD. As ftalocianinas são fortes candidatas à utilização em TFD pela eficiente incorporação nas células alvo, por exibirem altas taxas de geração de tripletes e induzem a uma ótima penetração tecidual da luz, devido aos seus altos coeficientes de absorção na faixa de 650 a 680 nm (Nunes, 2004; Sguilla, 2004; Tedesco, 2004; Escobar, 2006;).

De acordo com literatura, as ftalocianinas encontradas foram a Zinco ftalocianina (ZnPc), Alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AlPcS<sub>4</sub>) e Cloro alumínio ftalocianina (AlPcCl), utilizadas para avaliar estresse oxidativo em linhagens celular após quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana, ou para a atividade antimicrobiana dos compostos (Alexandratou, Yova, Loukas, 2005; Nunes, Sguilla, Tedesco, 2004; Abrão, 2004; Braga, Soares, 2005).

Podem ser empregadas no tratamento fotodinâmico, as seguintes fontes de luz, divididas em três grupos: os lasers, as lâmpadas de amplo espectro e lâmpadas de diodo (LED - *Light emission diode* - diodo emissor de luz). A primeira fonte de luz utilizada em quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana, forma as luzes não coerentes, por serem seguras, possuem menor custo e seu espectro de ondas abrange vários fotossensibilizadores e podem ser utilizadas com filtros ópticos para selecionar um determinado comprimento de onda (Tomazini, 2007).

## 2. OBJETIVO

Testar e analisar a eficácia da terapia fotodinâmica na forma da leishmaniose cutânea experimental e in vivo, utilizando da ftalocianina cloro alumínio, comparando-a com a droga padrão-ouro, o antimoniato pentavalente (N-glucamine).

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Testar a ação leishmanicida da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador AIPcCl, em formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* comparando-as com o antimoniato pentavalente (N-metil-glucamina).
- 2) Testar a ação leishmanicida da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizante AIPcCl em camundongos.
- 3) Comparar os resultados através da: medida das patas dos camundongos, esfregaço, pesquisa de amastigotas viáveis em culturas convencionais, cultura em diluição limitante e verificar a viabilidade das *Leishmanias* pelo método colorimétrico MTT.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estudo *in vivo* com isolado de *Leishmania ssp*

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania*(*Leishmania*) *amazonensis* (MHOM/BR/PH8), cedidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), identificadas pela técnica de isoenzimas e anticorpos monoclonais, mantidas sobre criopreservação em nitrogênio líquido (-196<sup>0</sup>C) no Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Essas culturas são periodicamente inoculadas em camundongos para assegurar a infectividade e garantir a virulência dos inóculos.

#### 3.2 Infecção experimental

Foram utilizados 24 camundongos isogênicos fêmeas, adultas, linhagem C57BL/6 da espécie *Mus musculus* que são caracteristicamente animais de laboratório suscetíveis a *Leishmania*, com idade média de 3 meses, com peso médio de 30 gramas, divididos em 4 grupos, sendo cada grupo composto por 6 animais. Esta quantidade permite ao estudo estatístico valores confiáveis são eles: grupo da terapia fotodinâmica (TFD), antimoniato pentavalente (Sb<sup>v</sup>), infectados e não tratados (INT - controle positivo) e não infectados e não tratados (NINT - controle negativo) (Tabela 01).

Os animais foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que possui infraestrutura adequada sob a supervisão de um médico veterinário responsável. Os camundongos permaneceram em ambiente com controle de luminosidade (ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro), mantidos em gaiolas, cada uma contendo 6 animais, alimentados com ração própria para a espécie e hidratação com água potável e fresca *ad libitum*, durante todo experimento. Essas gaiolas foram trocadas e forradas com maravalha nova duas vezes por semana, garantindo a higienização do ambiente. Os camundongos C57BL/6 foram adotados por ser o modelo experimental que mais se aproxima do modelo humano na resposta ou manifestação da LC, ou seja,

assemelha-se à leishmaniose cutânea localizada crônica desenvolvida em humanos no Novo Mundo (de Sousa, 2010).

### 3.3 Questões éticas

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, cujo processo foi protocolado sob identificação nº 150030/2011.

### 3.4 Preparo dos animais

Os 24 animais foram pesados com o auxílio de uma balança, e sua pata traseira direita medida com um paquímetro, antes da etapa de inoculação.

**Tabela 01.** Medida das patas e pesos dos animais antes da inoculação com *Leishmania )L.) amazonensis*

Grupo	Idade (mês)	Espécie	Peso médio(g)	Média das patas (antes da inoculação)	Desvio padrão
TFD	3	<i>Mus musculus</i>	30	0,23	0,02
Sb <sup>v</sup>	3	<i>Mus musculus</i>	30	0,23	0,02
INT	3	<i>Mus musculus</i>	30	0,21	0,01
NINT	3	<i>Mus musculus</i>	30	0,21	0,01

### 3.5 Preparo do inóculo

Foram utilizadas formas promastigotas descriopreservadas e colocadas em meio sólido - NNN (Neal, Novy e Nicolle), mantidas em estufa a 26<sup>0</sup>C, por três dias. Foi realizada leitura diária em microscópio invertido, para verificar o crescimento. Foi realizado repique para o meio líquido Schneider´s Insect Sigma-Aldrich<sup>®</sup>(Saint Luis, Missouri, USA, lote RNBB 9868, validade agosto de 2012, 500ml, catálogo [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), referência S0146) e os tubos foram analisados em microscópio invertido da marca Zeizz, por três dias também com leitura diária. A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas deu-se

mediante o uso de curva de crescimento pré-estabelecida (Brenner, 1961) a qual consiste na quantificação de formas promastigotas em câmara de Neubauer dupla espelhada, da marca INLAB/Bright-line hemacytometer de 0.100 mm. Em um tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> (1,5 ml) foi feita diluição contendo 20 µl de meio de cultura, com os parasitos em fase metacíclica de crescimento ao atingirem  $3 \times 10^6$ , acrescido de 180 µl de tampão fosfato salina 10% (PBS), que têm a finalidade de manter as promastigotas em repouso e assim facilitar sua contagem. Na sequência, o tubo foi homogeneizado em aparelho vortex da marca A. DIAGGERS Co., INC, na rotação de 20 rotações por minuto (RPM), por 10 minutos e com auxílio de uma pipeta, foi colocada uma alíquota da mesma, na câmara de Neubauer até seu preenchimento. Na contagem, as formas que se encontravam em cima da linha e aglomerados em forma de rosetas foram excluídas e os parasitos em fase inicial de divisão binária foram contados como um e aqueles em divisão binária avançada foram contados como dois (Urdapilleta, 2006).

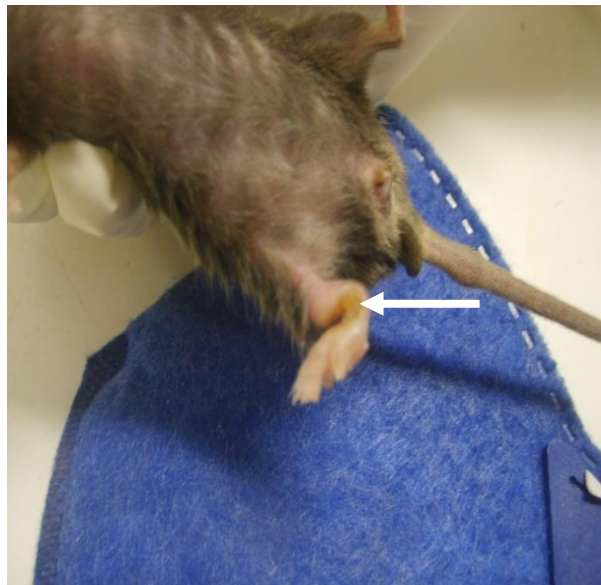
### 3.6 Desenho experimental *in vivo*

Os grupos ftalocianina cloro alumínio, antimoniato pentavalente e infectado e não tratado, foram infectados com concentrado parasitário de  $3 \times 10^6$  (Campos, 2008) promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/PH8) na pata traseira direita, via intradérmica com o auxílio de uma seringa de 0,1 µl.

Após 10 dias, foi realizada a confirmação da infecção: primeiro à olho nu (Figura 07), segundo por meio da medida das patas (Tabela 02), terceiro com a coleta do exsudado das patas traseiras direitas que foi analisado mediante a confecção de seis lâminas de extensão, que foram coradas com Giemsa sendo, duas para cada grupo e análise em microscópio invertido, e quarto o exsudado foi colocado em meio de cultura NNN. Após confirmada a infecção dos animais, foi iniciado o tratamento nos grupos TFD e Sb<sup>V</sup>.

**Tabela 02.** Resultados da confirmação da infecção dos camundongos de *Leishmania (L.) amazonensis*, após 10 dias de inoculação

Grupo	Formação de lesão	Média da medida das patas (mm)	Coleta do estudado	Meio de cultura NNN
TFD	sim	0,30	+	+
Sb <sup>v</sup>	sim	0,30	+	+
INT	sim	0,20	+	+
NINT	não	0,20	-	-

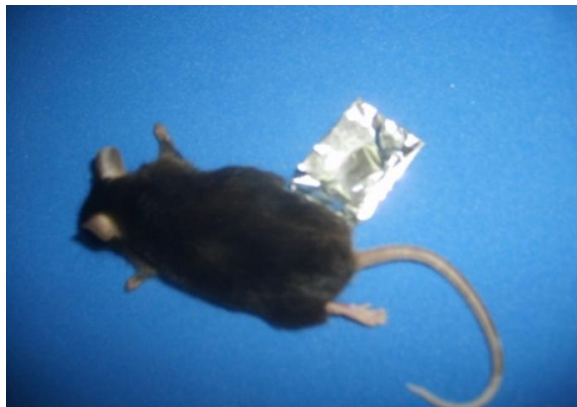


**Figura 07:** Lesão cutânea em pata traseira direita (seta) de camundongo após inoculação de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. (Fonte: acervo da autora).

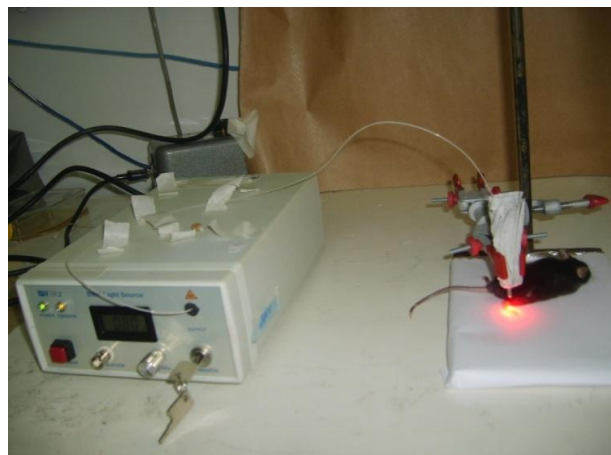
Foram utilizados dois esquemas terapêuticos: no grupo TFD os animais foram anestesiados e sedados com associação de xilazina (cloridrato de xilazina que produz no animal sedação com analgesia e o animal retorna ao seu estado normal) e quetanina (cloridrato de ketamina que leva normalmente 1 a 5 minutos para produzir sedação na qual o animal apenas adormece) por via intramuscular, técnica que consiste na imobilização do camundongo em decúbito ventral, a extensão do membro posterior esquerdo e injeção da solução na região postero-lateral da coxa. A associação padrão é de 10 mg/Kg de Xilazina e 90mg/Kg de Quetamina, sendo o cálculo realizado para o peso médio do animal que foi de 30g. Foi utilizada uma seringa de 1 ml para esta associação. Esperou-se cerca de 3 minutos até que a



associação dos anestésicos fizesse efeito e, com o animal sedado, foi aplicado o gel contendo AlPhCl na concentração de  $2,22\mu\text{g/ml}$ , valor esse que foi determinado pela área da lesão (tamanho da pata), sobre a lesão, perfazendo uma camada de 1 a 2 mm, na pata direita traseira que foi envolta em folha de alumínio para evitar penetração da luz (Figura 08). Aguardou-se mais 15 minutos até que houvesse absorção (pelo menos parcial) do gel pela derme do animal. A folha de alumínio foi removido e então, a pata contendo o gel, foi exposta à irradiação de luz visível (Figura 09), com comprimento de onda 640-710nm, liberando  $40\text{ J/cm}^2$  a uma intensidade de  $150\text{ mW/cm}^2$ , com tempo de 15 minutos. A distância entre a fonte de luz e a lesão foi de 10 cm. Após cada sessão de TFD, os resíduos do gel foram removidos utilizando-se soro fisiológico 0,9% e o animal retornou ao seu estado de alerta após cerca de 10 minutos do término da aplicação.



**Figura 08** - Camundongo com pata traseira direita recoberta com gel contendo ftalocianina cloro alumínio, envolta em folha de alumínio para evitar a penetração da luz nos 15 minutos anteriores à aplicação do laser. (Fonte: acervo da autora).



**Figura 09** - Aplicação do laser no local da lesão (pata traseira direita) do camundongo (Fonte: acervo da autora).

No grupo  $Sb^V$ , os animais receberam aplicações de antimoniato pentavalente (N-Metil-Glucamina/Glucantime<sup>®</sup>), cedido pelo serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, por via intraperitoneal na dose  $0,04gSb^V/mg/dia$  (adaptado da dosagem humana que é de  $400mgSb^V/Kg/dia$ ), com seringas de 1ml durante 10 dias corridos, realizando-se uma aplicação diária.

### 3.7 Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados por via intramuscular. Após anestesia, foi utilizada uma câmara contendo  $CO_2$  (fornecida pelo Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília) fechada de maneira a atingir uma saturação superior à 70%, onde os animais foram eutanasiados individualmente até a parada cardio-respiratória. Na sequência, foi realizada a dissecação asséptica, da pata traseira direita de dois camundongos de cada grupo, técnica que consiste em fazer assepsia das patas inoculadas. Em seguida, foi feito o maceramento destas com auxílio do homogeneizador (Figura 10) em meio de cultura Schneider acrescido de 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) e 0,2% de sulfato de gentamicina (Laboratório Hipolabor, Belo Horizonte, Brasil), gentilmente cedida pelo Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (Urdapilleta, 2006)



**Figura 10** Homogeneizador utilizado para maceração das patas dos camundongos (Fonte: acervo da autora).

Para o descarte, os cadáveres foram devidamente alocados em sacos plásticos brancos e mantidos sob refrigeração à  $-200C$ .

### 3.8 Diluição limitante

Este é um método para estimar a quantidade provável de formas amastigotas de leishmania viáveis na pata do animal ou seja, analisa se o tratamento diminui o número de Leishmanias in vivo a partir da dissecação asséptica da pata do animal, sua trituração em meio de cultura líquida Schenider® (Sigma) seguida de culturas em placas tipo Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa) de 96 poços em sucessivas diluições de 10 vezes. Assim dispostas diluição 1:1 (colocadas nas fileiras A) até diluição de 1:10.000.000 (fileira H).

Para esse método foram utilizadas as patas com lesão, de 3 camundongos por grupo de estudo. Caso haja uma amastigota em cada poço, crescerão formas promastigota após cerca de 24 a 72 horas em estufa à 26°C.

### 3.9 Critérios de avaliação

Para os critérios de avaliação foram utilizados os métodos: de medida das patas com auxílio de um paquímetro, com medidas antes da inoculação, antes do tratamento (porém com o animal já infectado), após a infecção com 24 horas e após 10 dias; em cultura de diluição limitante seguido de método colorimétrico com o uso de MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiliazol-2,5-difenil-tetrazólio) que consiste em estimar as formas amastigotas de *Leishmanias (L.) amazonensis* viáveis na pata do animal ou seja, analisa se o tratamento diminui o número de *Leishmanias*, a partir da dissecação da pata do animal sua trituração em meio de cultura líquida Scheiner (Sigma®), seguida de culturas em placas ELISA de 96 poços em sucessivas diluições de 10 vezes.

### 3.10 Tipo de estudo

Estudo *in vivo* tipo experimental.

### 3.11 Isolados de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Formas promastigotas de *Leishmanias (L.) amazonensis* cultivadas em meio *McNeal, Novy e Nicolle* (NNN) e solução salina, em estufa de 26°C, com observação diária por seis dias, para certificação da sua motilidade, virulência e se foi alcançada a fase exponencial tardia ou fase estacionária de crescimento.

### 3.12 Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o programa SPSS versão 17.0. Foi efetuado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar a distribuição dos dados. Como todos os dados apresentavam distribuição normal ( $p > 0,05$ ), optou-se pela análise de variância paramétrica (ANOVA) seguida pelos pós teste de Tukey. Os gráficos foram plotados com o programa Graph Prism<sup>®</sup> versão 5.0.

Para as culturas em diluição limitante os dados numéricos foram obtidos a partir da contagem do número de poços nos quais houve crescimento de promastigotas de *Leishmania(L.) amazonensis*, verificado pela leitura e em microscópio de luz invertida, e foi colocada a média dos valores obtidos para os grupos e tratamento pelo programa ELIDA<sup>®</sup>, no teste de viabilidade celular os dados foram normalizados em relação ao controle.

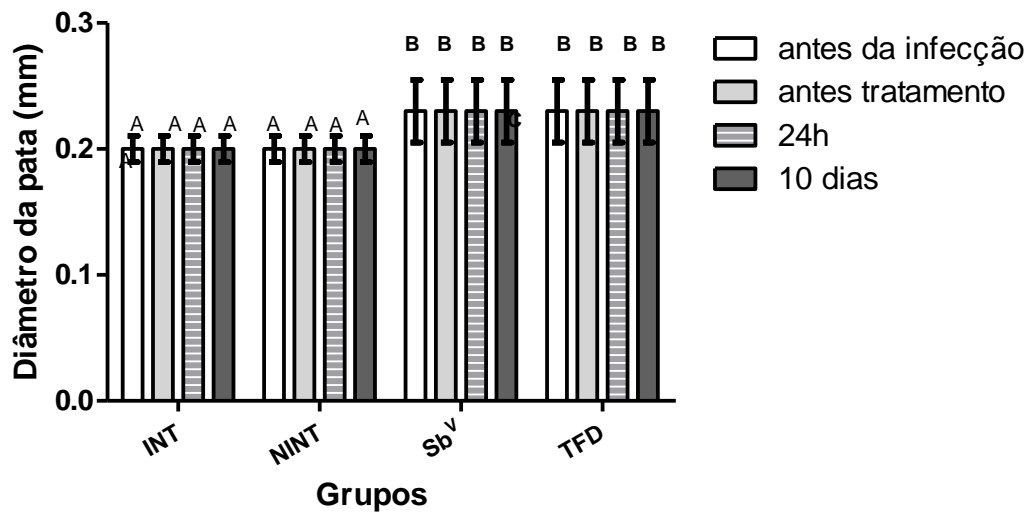
#### 3.12.1 Teste de normalidade

O teste de normalidade indica qual a estatística deverá ser utilizada (paramétrica ou não paramétrica) e, para isso, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para checar a normalidade dos dados. Como os valores de P (significância) foram superiores a 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Medida das patas dos camundongos

### 4.2 Análise – diferentes tempos de tratamento para cada grupo



**Gráfico 01-** Distribuição dos diâmetros das patas (mm) dos animais segundo o grupo experimental e o tempo de tratamento. As letras diferentes A e B indicam a diferença estatística ou não, dentro de cada grupo experimental ( $p > 0,05$ , ANOVA *one-way*, pós-teste de Tukey). Grupos: INT (animais infectados e não tratados,  $n=6$ ), NINT (animais não infectados e não tratados,  $n=6$ ), Sb<sup>V</sup>,  $n=6$  e TFD (animais infectados e tratados com ftalocianina e laser,  $n=6$ ). As barras de erro indicam o intervalo de confiança da média de 95%.

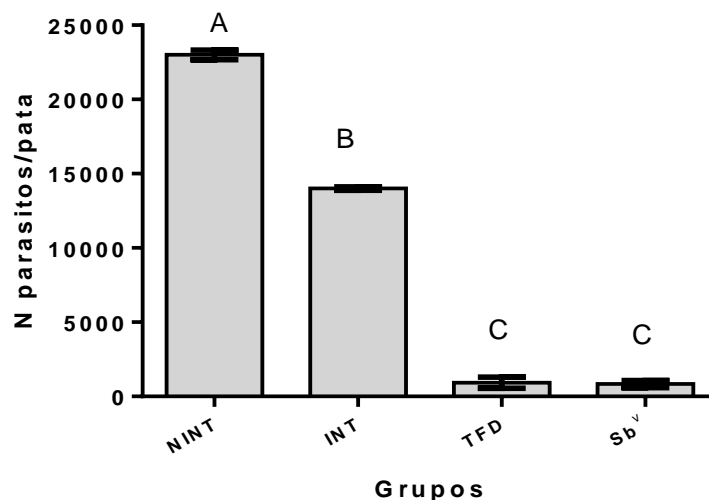
No gráfico, observou-se que, para o grupo infectado e não tratado, no dia da infecção, com 24 horas e com 10 dias após esta, não apresentou diferença dos diâmetros das patas dos animais, ou seja as medidas permaneceram iguais independente do tempo de infecção. Os animais do grupo infectado e não tratado, os valores também permaneceram iguais, no mesmo período de tempo.

Nos grupos Sb<sup>V</sup> e TFD, observou-se que no período entre o dia da infecção, com 24 horas, ou seja, no início do tratamento, e 10 dias após a infecção que houve

aumento dos diâmetros das patas dos animais, em comparação com os grupos INT e NINT. Este aumento teve significância estatística de  $p > 0,05$ .

### 4.3 Análise da viabilidade celular

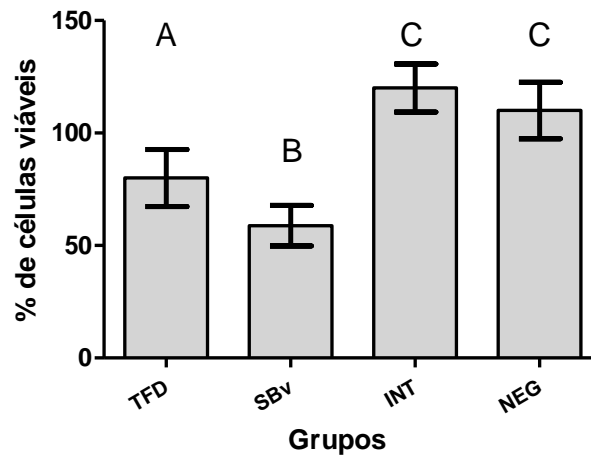
#### 4.3.1 Análise das médias das *Leishmanias.(L.) amazonensis* viáveis pelo método do MTT



**Gráfico 02** – Distribuição da porcentagem de *Leishmanias* viáveis de acordo com os quatro grupos experimentais, onde as letras diferentes A, B e C indicam diferença estatística dentro de cada grupo experimental ( $p > 0,05$ ), ANOVA *one-way*, pós teste e Tukey). As barras de erro indicam o intervalo de confiança da média de 95%.

Na avaliação da viabilidade das *Leishmanias*, observou-se que no grupo que utilizou a droga Sbv, a redução desta viabilidade foi de 50%. No grupo tratado com a terapia fotodinâmica com laser e APhCl observou-se redução de 80%. Nos grupos INT e NINT, houve 100% de viabilidade celular. Houve, portanto, diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupo tratados com Sbv e terapia fotodinâmica com laser e APhCl e os grupos NINT e INT. Entre os grupos terapia fotodinâmica com laser e APhCl e Sbv houve diferença estatística significativa com maior redução da viabilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* no grupo Sbv ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Exame parasitológico – determinação da quantificação de parasitos nas patas dos camundongos (DILUIÇÃO LIMITANTE+MTT+ESPECTROFOTÔMETRO)



**Gráfico 03** - Distribuição do número de parasitos por pata segundo os grupos experimentais

Na avaliação da quantidade de parasitos pelo método da diluição limitante, ou seja, a quantificação de parasitos nas patas dos camundongos, foi possível avaliar que as diferenças estatísticas dentro dos grupos experimentais NINT(NEG), INT, TFD e Sbv foi significativa ( $p > 0,05$ ).

As barras indicam o intervalo de confiança da média a 95%, verificando-se que os tratamentos com TFD e Sbv reduziram consideravelmente os parasitos e não houve diferença estatística entre os resultados. Os grupos INT e NINT, os valores estão próximos, significando que não ocorreu redução dos parasitos.

## 5. DISCUSSÃO

Com a exposição dos fatos, se faz necessário que as terapias disponíveis para o tratamento LC, necessitem de terapias alternativas coadjuvantes e eficazes (GIL, 2007). O presente trabalho realizou avaliações da eficácia da TFD *in vivo* utilizando a terapia fotodinâmica. Muitas dessas novas aplicações estão sendo estudadas e avaliadas quanto a sua eficácia e toxicidade (Zhang, 2006). A LC está entre as novas indicações do tratamento por terapia fotodinâmica (Zhang, 2006).

O predomínio de cada um dos mecanismos de morte celular, apoptose ou necrose, depende do tipo de agente fotossensibilizador usado (Escobar, 2006) e, provavelmente, do esquema terapêutico adotado. Mecanismos adjuvantes de destruição como recrutamento de células inflamatórias, aumento da resposta imunológica e dano vascular estão possivelmente associados.

Os principais fatores na determinação da eficácia da TFD são (1) o agente fotossensibilizador utilizado, sua habilidade de penetração seletiva no tecido e a duração da aplicação; (2) a fonte de luz ativadora (incluindo seu comprimento de onda e intensidade), sua capacidade de penetração no alvo desejado e sua duração de exposição; (3) o tipo de célula-alvo e seu status de oxidação (Zhang, 2006). Os únicos agentes fotossensibilizadores atualmente disponíveis no mercado são os análogos da porfirina ácido delta aminolevulinico (ALA) e o metil-aminolevulinato (MAL) (Zhang, 2006).

O ALA já foi utilizado TFD para o tratamento de LC do Velho Mundo, apresentando resultados terapêuticos e cosméticos animadores (Enk, 2003; Gardlo, 2003; Fabris, 2006). É importante frisar contudo, que existem questionamentos quanto à metodologia aplicada, já que as leishmanioses cutâneas do Velho Mundo não raro apresentam cura espontânea. Além disso, já foi bem documentado que em seres humanos com múltiplas lesões na LC, o tratamento de uma lesão pode afetar a cura de todas as outras (El-On, 1986). Outro ponto de controvérsia é que a TFD sucedeu o tratamento preconizado, supostamente não responsivo. Diante disso, fica claro a necessidade de novos estudos para avaliar de forma mais conclusiva a eficácia desse tipo de terapia nas formas cutâneas da leishmaniose.



O tratamento com utilização de fármacos para LC tem apresentado resultados clínicos não desejáveis. Não há também nenhuma vacina eficaz disponível atualmente aos pacientes acometidos por esta doença.

A resistência dos parasitas aos medicamentos ora utilizados, somados ao tratamento com longos períodos, justificam a necessidade de busca de substâncias e tratamentos alternativos, com fácil aplicabilidade, na tentativa de reduzir ou mesmo evitar a desistência do paciente ao tratamento, bem como a redução do custo (Sampaio, 1980; 2001) visto que a proposta do referido trabalho é justamente ajustar a utilização da droga ftalocianina cloro alumínio já largamente utilizada na Dermatologia.

Neste panorama, os estudos de novas drogas e tratamentos alternativos, corroboram a busca pela eficácia e segurança adequados (Franck, 2004; Raychaudhury, 2005). Além disso, a OMS recomenda a pesquisa de novos fármacos e formulações, bem como de vias de administração mais simples e seguras, como as vias oral e tópica (WHO, 2010; Ridley, 2003).

Baseando-se em estudos anteriores realizados com ftalocianina cloro alumínio, (Enk, 2003; Gardlo, 2003; Fabris, 2006) para tratamentos de dermatoses, em camundongos infectados, observou-se neste trabalho a eficácia terapêutica na avaliação parasitológica, de viabilidade e MTT.

Nos resultados deste trabalho, foi possível constatar que a utilização da droga  $Sb^V$  diminuiu a viabilidade celular em 50% em relação ao grupo INT, e a droga em teste, a APhCl associada a terapia fotodinâmica com laser, diminuiu 80% em média. Os grupos, NINT e INT não diferem estatisticamente o tamanho das patas, (Gráficos 01,02 e 03).

No grupo dos animais infectados e não tratados, portanto o grupo positivo, foi possível observar que não houve aumento nas medidas das patas, visto que ocorreu crescimento de parasitos e estes camundongos não foram tratados, e sim mantidos para referência para os demais grupos.

No grupo dos animais infectados e tratados com ftalocianina cloro alumínio e seguido de aplicação de laser, foi possível determinar que houve um aumento do diâmetro das patas deste grupo, quando este grupo foi comparado ao grupo

infectado e não tratado. Quanto ao grupo infectado e tratado com a droga padrão antimoniato pentavalente, podemos verificar um aumento do tamanho das patas, deste grupo quando comparados ao grupo infectado e não tratado (Gráfico 01), o que era esperado visto que os animais foram manipulados por alguns dias.

De acordo com Suri, 2007, as drogas nanoestruturadas são eficazes quando comparadas as terapias tradicionais para eliminação de parasitos, sem liberar diretamente mediadores químicos.

Neste trabalho foi possível demonstrar que a terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador ftalocianina cloro alumínio aplicada uma vez ao dia, por dez dias seguidos, não colaborou para a redução das medidas das patas quando comparadas as medidas do grupo INT e do grupo tratado com  $Sb^V$ , este fato sugere que o calor emitido pelo laser possa ter causado o aumento da pata.

No entanto a terapia alternativa em teste, promoveu significativa redução da viabilidade celular, com cerca de 80% em relação ao grupo INT, e redução de 50% para o grupo  $Sb^V$  também quando comparado ao grupo INT  $p < 0,05$  (Gráfico 02 e 03), tal fato fora esperado pela equipe, pois a droga atuou sobre a lesão com o auxílio de uma fonte luminosa, o laser.

No presente estudo foi utilizada a via de administração intraperitoneal para o medicamento  $Sb^V$ , e na terapia fotodinâmica foi utilizada a via dérmica com aplicação de gel contendo a concentração e na sequência o laser que aumenta a temperatura do local. A maioria dos agentes patogênicos são sensíveis à temperaturas elevadas e sendo assim, a febre atua como mecanismo de defesa contra os processos, relacionados as infecções do mesmo modo que o laser atua sobre a lesão, aquecendo o local. Este trabalho não avaliou os efeitos adversos.

Neste trabalho, o ensaio foi *in vivo*, utilizada uma única espécie a *L. amazonensis*, usada apenas uma concentração do mediador ftalocianina cloro alumínio, os grupos NINT, INT, TFD e  $Sb^V$ , nos tempos de vinte e quatro horas e dez dias (seguidos) de tratamento e aplicação de quinze minutos do laser. Para uma melhor análise e portanto gerar mais resultados para comparações, seria necessário, ensaios *in vitro*, pelo menos com mais duas espécies de *Leishmanias*, o uso de mais um tipo de mediador fotodinâmico, a inclusão dos grupo de animais

inoculados e com aplicação apenas do laser , outro grupo com lesão ativa de leishmaniose e administração de ftalocianina cloro alumínio, sem o laser. Outra sugestão seria tratar os animais por tempo mais prolongado, ou tempo maior do laser.

## 6. CONCLUSÃO

Pelo presente estudo conclui-se que o tratamento de camundongos infectados com LC causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratados com a terapia fotodinâmica mediada com ftalocianina cloro alumínio causou reduções maiores do número de parasitas e da viabilidade celular quando comparado com a droga padrão-ouro antimoniato pentavalente.

O presente trabalho visou contribuir como terapia alternativa para a melhoria do quadro de LC

Portanto, estes resultados aqui avaliados poderão servir de base para o aperfeiçoamento da metodologia com a perspectiva de aprimoramento de técnicas futuras do tratamento da LC.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, M. V. *et al* . Ação da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana em colônias de *Actinobacillus actinomycetem comitans*. Um estudo *in vitro*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8. : 2004 out. 20-22:, São José dos Campos, SP. ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO-EPG, 4, programação e anais de resumos. São José dos Campos: UniVap, 2004. 1 disco laser.

ABRAMSOM, A. L.; SHIKOWITZ, M. J.; MULLORY, V. M.; STEINBERG, B. M.; AMELLA, C. A.; ROTHSTEIN, H. R.; ARCH. Otolaryngol, Head Neck Surg. 1992, 118, 25.

ALEXANDRATOU, E., YOVA, D., LOUKAS, S.A. Confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. Free Radic Biol Med., v.39, n.9, p.1119-1127, 2005

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R., HU, X. H.; CHILDS, C. J. H., SIBATA, C. H. Photosensitizers in Clinical PDT. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 1, n.1, p.27-42, 2004.

BRAGA, F. M. P.; SOARES, C. P. Análise da sobrevivência de *Yersinia enterocolitica* após quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9. : 2004 out. 20-22:, São José dos Campos, SP. ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO-EPG, 5, **programação e anais de resumos**. São José dos Campos: UniVap, 2005. 1 disco laser.

BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapia experimental da doença de Chagas, 1961, 90 f. Tese (Livre Docência). Universidade Federal de Minas Gerais.

CAMPOS, J. F. F. Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosina em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Vianna) guyanensis*, *Leishmania (Vianna) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento de leishmaniose cutânea experimental. (Dissertação de Mestrado), ciências da Saúde, 2008, 80 f. Universidade de Brasília-DF.

DATE AA; JOSHI MD; PATRAVALE V. B; Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles vesicular lipid nanoparticles. Adv. Drug Deliv Rev 2007.

De SOUSA, M. C., de ASSIS, E. A.; GOMES, R. S.; MARQUES DA SILVA, Ede. A.; MELO, M. N.; FIETTO, J. L., AFONSO, L. C. The influence of ecto-nucleotidase on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57BL/6 mice. *Acta Trp.* 2010 Se; 115(3):262-9. Epub 2010 Apr 24

DUTTA, S. et al. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, v.49, n.11, p.4474-4484,2005.

ENK, C. D.; FRITSCH, C.; JONAS, F.; NASEREDDIN, A.; INGBER, A.; JAFFE, C.F.; RUZICKA, T.; Treatment of Cutaneous *Leishmania* With Photodynamic Therapy, *Archives of Dermatology*, v.139, p.432-434, 2003.

El-On, J.; LIVSHIN, R.; Even-Paz, Z.; HAMBURGER, D.; WEINRAUCH, L. Tropical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology*, v.87, n.2, p.284-288, 1986.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania promastigotes*; **Biomédica**, v.26, p.49-56, 2006.

FABRIS, C.; SONCIN, M.; MIOTTO, G.; FANTETTI, F.; CHITI, G.; DEI, D.; RONCUCCI, G.; JOTI, G. Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblast and keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.83, p.48-54, 2006.

FRANK, X; FOURNET A; PRINA E.; MAHIEUX, R.; HOCQUEMILLER, R; FIGADERE, B. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14(14):3635-8.

GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BARRETO, J. C.; AGUIAS, F. A. Leishmaniose: Arsenal Terapêutica e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas*, 2007;1:1-26.

GONTIJO, B.; CARALHO, M. L. R. american cutaneous leishmaniasis, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 36, p. 71-80,2003.

GARDLO, K; HORSKAR, Z.; ENK, C.D.; RAUCH, L.; MEGAHED, M.; RUZICKA, T.; FRITSCH, C. F. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J. Am Acad Dermatol*, v.48, n.6, p.893-896, 2003.

GHAFFARIFAR, F.; JORJANI, O.; MIRSHAMS, M.; MIRANBAY, M. H.; HOSSEINE, Z.K. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*, v.12, n.6, p. 902-908, 2006.

HERWALDT, B.; BERMAN, J.D. Recommendations for treating Leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostan) and review of pertinent clinical studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:296-306, 1992.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, p. 1191, 1999.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARLEY, V.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 254, p. 73-75, 2003

KILICK-KENDRIX R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *In Biology of Kinetoplastida*, Vol. II (eds W.H.R. Lumsden & D.A. Evans) Academic Press, London/New York 395-460, 1979.

KILICK-KENDRIX R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et compare* 65 (suppl.1):37:42, 1990.

KILICK-KENDRIX R. Rioux J.A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Anales de Parasitologie Humaine et compare* 66(suppl. 1): 71-74, 1991.

LUKSIENE; Z. Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicine*. V.39, n.12, p.1137-1149, 2003.

MURRAY, N. A ; OLIVEIRA, A. W., S. Leishmaniose Tegumentar Americana (kazar): a decade of progress and future approach. *Inr. J. Infec. Dis.*,v.2, n.3, p.158-177, 2000.

NAME, RQ; BORGES, K. T.; NOGUEIRA. L. S. C.; TAUIL, P. L.; SAMPAIO, R. N. R. Clinical epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brazilian, DF, Brazil. *An Bras Dermatol* 80(3): 249-254, 2005.

NUNES, A. G. T., *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública.*, v.22, n.6, p.1343-1347, 2006.

NUNES S. M. T., SGUILLA F. S., TEDESCO A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloro aluminium phthalocyanine incorporate into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of medical and Biological Research.**, v. 37, p.273-284, 2004.

PIMENTEL, L. F.; JACOME, A. T.; MOSQUEIRA U. C. F. ; MAGALHÃES, N. S. S.; Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento de malária. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2007; 43(3): 503-514.

ROSS. R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishmanias bodies. *British Journal*, v.2, p. 1261-1401, 1903.  
RAYCHAUDHURY, B.; BANNERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R. V.; DATTA, S. C..Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*.2005; 95: 1-8.

RIDLLEY, R. G “Product R&D for neglected diseases: 27 years of TDR experiences with public-private partnerships.” *EMBO Rep.* 2003; 4, Spec No:S43-46.

SAMPAIO, R. N. R.; PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; FURTADO, R. S.; LEAL, P. P.; ROSA, T. T. , RODRIGUES, M. E.;VEIGA, J. P. R. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimoniato pentavalente administrado na dose de 40mgSb<sup>v</sup>/Kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutânea-mucosa de leishmaniose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.30, n.6, p.457-463, 1997.

SAMPAIO, R. N. R.; Case series study of mucocutaneous leishmaniasis (MCL): epidemiology and treatment.*An Bras Dermatol.* 2001; 76(1):51-62.

SAMPAIO, R. N. R., et al Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical.**, v.42, n.6, p.686-690, 2009.

SILVA, D. G., **Padronização do cultivo de amastigotas axênicas e intracelulares de *Leishmania spp* e análise da atividade leishmanicida de chalconas**, 2008 120f . Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em biotecnologia da Universidade de Santa Catarina, 2008.

SILVA, G. A; Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Sculgical Neurol.* ; 2004:61:216-220.



SILVEIRA FT; IAINSON R; De Castro Gomes CM; Laurenti MD; Corbett CD. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009, 31(8): 423-31.

SILVEIRA, F. T.; LAILSON, R.R; De CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT C. E.. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(8):423-31.

SMGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis *Journal of Postgraduate Medicine*, 49, n.1 p,55-60, 2003.

De SOUSA, M. C., de ASSIS, E. A.; GOMES, R. S.; MARQUES DA SILVA, Ede. A.; MELO, M. N.; FIETTO, J. L., AFONSO, L. C. The influence of ecto-nucleotidase on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57BL/6 mice. *Acta Trp.* 2010 Se; 115(3):262-9. Epub 2010 Apr 24

SOTO, J.; TOLEDO, J.; VEJA, J.; BERMAN J. Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.72, p.421-422, 2005.  
SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tro. Md. Int. Health*, v.6, p.849-854, 2001.

SURI, S. . ; FENNINE, H; SINGH, B. Nanotechnology based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2007; 2: 1-16.

URDAPILLETA. A. A. A. Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* 2006. 87 fd. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade de Brasília-Brasília –DF.

VIANNA, G.O. Tratamento de leishmaniose tegumentar por infecções intravenosas de tártaro emético. *Anais 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia* v.4, p.426-428, 1912.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 1990. 196-206, 1993.

World Health Organization. Disease information: Leishmaniasis[Internet]. Geneva; Suíça. 2010; Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

ZHANG, Z.; JIN, H.; BAO, J.; FANG, F.; WEI, J.; WANG, A. Intravenous repeated-dose toxic study of ZnPcS<sub>2</sub>P<sub>2</sub>-based-photodynamic therapy in Wistar rats. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.5, p.1006-1017, 2006.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de janeiro de 2012.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA NO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES CUTÂNEAS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL IN VITRO E IN VIVO.", UnBDOC n.º 150030/2011, sob responsabilidade da Profa. Raimunda N. R. Sampaio, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



*Aline Pic-Taylor*  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora da CEUA