

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS RELAÇÕES PARASITO-
HOSPEDEIRO

ALINE DO CARMO GONÇALVES

**Avaliação do efeito do Laser terapêutico de 660nm na Leishmaniose Tegumentar
experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de macrófagos.**

Goiânia

2015

ALINE DO CARMO GONÇALVES

Avaliação do efeito do laser terapêutico de 660nm na leishmaniose tegumentar experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de macrófagos.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção de título de
mestre

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia R. A.
Nagib Loyola

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Gonçalves, Aline do Carmo
Avaliação do efeito do laser terapêutico de 660nm na Leishmaniose
Tegumentar experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de
macrófagos. [manuscrito] / Aline do Carmo Gonçalves. - 2015.
90 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Resende Alo Nagib.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Terapia com laser de
baixa potência. 3. Macrófagos. 4. Cicatrização. 5. Citocinas. I. Nagib,
Patrícia Resende Alo, orient. II. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor (a):		Aline do Carmo Gonçalves			
Email:		goncalvesaline.c@gmail.com			
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:		Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior		Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Avaliação do efeito do laser terapêutico de 660nm na Leishmaniose Tegumentar experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de macrófagos.				
Palavras-chave:	Leishmaniose tegumentar americana; Terapia com laser de baixa potência; Macrófagos; Cicatrização; Citocinas.				
Título em outra língua:	Effect of therapeutic laser 660nm in experimental cutaneous leishmaniasis: cytokine expression and functional macrophage profile.				
Palavras-chave em outra língua:	American tegumentary leishmaniasis; Low-Level Laser Therapy; Macrophages; Healing; Cytokines				
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro				
Data defesa:	(22/05/2015)				
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro				
Orientador (a):	Dr ^a . Patrícia Resende Alo Nagib				
E-mail:	pnagib@gmail.com				
Co-orientador (a):*					
E-mail:					

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro

Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Aline do Carmo Gonçalves

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola

Membros:

1. Dra. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola
2. Dr. Hélio Gaudino Júnior
3. Dra. Jacy Gameiro

Goiânia, 22 de Maio de 2015

“Disseram-vos que a vida é escuridão; e no vosso cansaço repetis o que os cansados vos disseram. E eu vos digo que a vida é realmente escuridão, exceto quando há um impulso. E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.

E quando trabalhais com amor, vós vos unis

a vós próprios e uns aos outros.

E a Deus.”

Gibran Khalil Gibran

Aos meus pais pelo crédito, apoio incondicional e orgulho de sempre.

À minha irmã Káren pelo carinho e amor.

Ao meu namorado, Osmar Júnior, pelo apoio, e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor nosso Deus, pela oportunidade, e pelo privilégio que Ele me concede de poder sonhar e realizar. Tantos só sonham! Tantos podem realizar, mas não sonham! Tantos não podem nem sonhar, tampouco realizar! Agradeço infinitamente à Ele, que me deu a vida, e a vida de pessoas tão maravilhosas, as quais agradeço também abaixo.

Depois de Deus, o Divino, agradeço aos que, pra mim, são Deus na Terra, meu pai e minha mãe. Como poderia eu retribuir pessoas que abrem mão dos próprios sonhos em favor dos meus?! Gostaria de ter palavras muito maiores que essas que direi agora para fazer jus ao meu sentimento, mas infelizmente ainda não existem, só me restam essas: MUITO OBRIGADA ETERNAMENTE. Amo muito vocês!

À minha irmã Káren, meu orgulho, a minha forma de te agradecer, minha irmã, é te desejando o melhor presente e futuro. Muito obrigada pela amizade, pelo carinho, pelas risadas, por tudo que você me dá gratuitamente. Te amo, sempre!

Ao meu amor, Osmar Júnior, muito obrigada pelo apoio, carinho, incentivo, paciência, compreensão, conselhos (infalíveis). Você que está ao meu lado em todos os momentos, obrigada por fazer de todos mais especiais e mais felizes. Obrigada por dividir tudo comigo, tantas alegrias tornando-as maiores ainda, e tristezas tornando-as mais suportáveis. Te amo muito, paixão!

À todos os meus tios, tias, aos meus avós, aos meus primos e primas, que sonharam junto comigo. Pelo carinho, pelas orações, pela amizade, pelas alegrias que me proporcionaram nos momentos que eu passava por dificuldades, pelas preocupações que tiveram comigo. MUITÍSSIMO obrigada!

Agradeço imensamente à minha orientadora professora Patrícia, que tornou esse trabalho possível. Muito obrigada, por além de professora, orientadora, ter se tornado uma amiga. Muito obrigada, por ter me entendido nas horas difíceis, por ter me ensinado muito mais do que é atribuído a um orientador ensinar ao seu aluno. Pra você meu “muito obrigada” também é mais especial.

Agradeço também à professora Simone Fonseca pela sabedoria, pela amizade, pelo apoio. Muito obrigada a todas as companheiras e amigas do laboratório. Vocês tornaram meus dias muito mais leves e agradáveis. Obrigada a Nayche, Camila,

Maingredy, Fernanda Feitosa, Jacy. E de um modo muito especial e carinhoso agradeço à minha irmã científica, Fernanda Dias. O normal seria eu te ajudar, mas foi você quem me ajudou em absolutamente tudo. Muito obrigada! Agradeço-te muito pela sua amizade, e pelas conversas super agradáveis de sempre. Obrigada por mais que colegas de trabalho ter se tornado minha amiga.

Enfim, muito obrigada a todos vocês. Sem exceção, você foram muito importantes tanto na realização deste trabalho, quanto na minha vida. Mais uma vez, incansavelmente: Muito obrigada!

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete órgãos (leishmaniose visceral), pele e mucosas (leishmaniose tegumentar americana, LTA). O tratamento da LTA é eficaz, contudo causa inúmeros efeitos colaterais, e o não tratamento ou o tratamento incompleto está associado com casos de recidivas. Tratamentos alternativos, portanto, devem ser explorados, e os lasers de baixa potência apontam para a possibilidade de uma terapia não invasiva, sem efeitos colaterais e que podem atuar em conjunto com a terapia convencional. A LLLT (Low-Level Laser Therapy) foi aplicada sobre lesões experimentais de camundongos BALB/c, causadas por *Leishmania (leishmania) amazonensis* (MAB-6) e avaliado o tempo de cicatrização, por PCR em tempo real e ELISA o perfil de expressão de citocinas, e por Imunoistoquímica foi feita a quantificação de macrófagos M2 pelo anticorpo MP-23. Nas lesões tratadas com laser o tempo de cicatrização foi menor que no grupo de animais com lesões não tratadas. Além disso, foi constatada uma maior expressão de citocinas regulatórias e antiinflamatórias no infiltrado inflamatório. Avaliamos o efeito do laser sobre macrófagos RAW264.7 diferenciados ou não para o perfil M1 ou M2, e infectados *in vitro*. Foram avaliados os quesitos de atividade fagocítica através da quantificação de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófagos infectados às 4 e 24 horas após a infecção; e produção de óxido nítrico (NO). O tratamento com o laser aumentou a produção de NO e a atividade fagocítica nos diferentes perfis de macrófagos, inclusive naqueles macrófagos que não foram diferenciados antes da infecção. O laser de 660nm estimula os macrófagos e acelera a cicatrização. Dependendo da fase da infecção em que se inicia o tratamento o laser pode influenciar a fase inflamatória, para a eliminação do parasito, ou na fase proliferativa estimulando citocinas reguladoras e antiinflamatórias..

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana; Terapia com laser de baixa potência; Macrófagos; Cicatrização; Citocinas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which affects organs (visceral leishmaniasis), skin and mucous (American tegumentary leishmaniasis, ATL). The treatment of ATL is effective, however causes several collateral effects, and the absence treatment or incomplete treatment is associated with relapse. Alternative treatments should, therefore, be explored, and low potency lasers indicate the possibility of a noninvasive therapy without collateral effects and that can act together with conventional therapy. LLLT (Low-Level Laser Therapy) was applied on experimental mice BALB/c lesions, caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MAB-6) in order to evaluate the healing time. The cytokines profile expression was evaluated by real-time PCR and ELISA, and Immunohistochemistry was performed to quantify M2 macrophages using MP-23 antibody. In the lesions treated with laser, it was observed a lower healing time when compared with the group of animals with untreated injuries. Moreover, it was observed an increased expression of regulatory and anti-inflammatory cytokines in the inflammatory infiltrate. We evaluated the effect of laser on macrophages RAW264.7, differentiated or not for the M1 or M2 profile, and infected in vitro. Also, we evaluated the phagocytic activity by quantification of the infected macrophages and the number of amastigotes per infected macrophage at 4 and 24 hours after infection; and nitric oxide (NO) production. The laser treatment increased the NO production and phagocytic activity of macrophages in different profiles, including those macrophages that were not differentiated before the infection. The 660nm laser stimulates macrophages and accelerates the healing of experimental injuries caused by *L. amazonensis*. Depending on the stage of the infection that the treatment is initiated, the laser may affect the inflammatory phase for the elimination of the parasite or stimulate the proliferative phase regulators and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis; Low-Level Laser Therapy; Macrophages; Healing; Cytokines.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	15
LISTA DE ANEXOS, FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. LEISHMANIOSE.....	20
1.2. LEISHMANIA, O PARASITO.....	21
1.3. RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	22
1.4. CICATRIZAÇÃO E FATORES ENVOLVIDOS	27
1.5. TRATAMENTO CONVENCIONAL	29
1.6. LASERTERAPIA E CICATRIZAÇÃO	30
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. ANIMAIS.....	36
4.2. PARASITOS	36
4.3. INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS.....	37
4.4. MACRÓFAGOS	37
4.5. DIFERENCIAÇÃO E INFECÇÃO IN VITRO DE MACRÓFAGOS RAW264,7	38
4.6. O LASER	39
4.7. TRATAMENTO COM LASER <i>IN VITRO</i>	39
4.8. TRATAMENTO COM LASER <i>IN VIVO</i>	41
4.9. EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA	43
4.10. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL ..	44
4.11. EXTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TECIDO	46

4.12. DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA	46
4.13. QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS (M2) POR IMUNOISTOQUÍMICA EM LESÕES EXPERIMENTAIS	47
4.14. QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS <i>IN VITRO</i>	48
4.15. DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	49
4.16. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5. RESULTADOS	50
5.1. AVALIAÇÃO DO USO DO LASER <i>IN VIVO</i>	50
5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS <i>IN VIVO</i>	50
5.2.1. Dosagem de citocinas por ELISA	51
5.2.2. PCR em tempo real.....	51
5.3. EFEITO DO LASER DE 660NM SOBRE OS MACRÓFAGOS	54
5.3.1. Quantificação de macrófagos (M2) na lesão	54
5.3.2. Análise do efeito da LLLT in vitro na fagocitose e na atividade microbicida dos diferentes perfis de macrófagos	55
5.3.3. Fagocitose e atividade leishmanicida de macrófagos não diferenciados (M0) tratados com Laser.....	56
5.3.4. Efeito do laser na fagocitose e atividade leishmanicida na população de macrófagos diferenciados para M1	59
5.3.5. Fagocitose e atividade leishmanicida de Macrófagos Alternativamente Ativados (M2) tratados com Laser.....	60
5.3.6. Efeito do tratamento com laser após a infecção de macrófagos M1 com <i>Leishmania amazonensis</i>	62
5.3.7. Efeito do tratamento com laser após a infecção de macrófagos M2 com <i>Leishmania amazonensis</i>	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

ANEXO I92

ANEXO II93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%CI	_ Porcentagem de Células Infectadas
°C	_ Grau Celsius
µL	_ microlitro
ABC	_ complexo avidina-biotina peroxidase (do inglês, avidin-biotin-peroxidase complex)
ANOVA	_ Análise de Variância
CD	_ Grupos de Diferenciação (do inglês, Cluster of Differentiation)
cDNA	_ DNA complementar
cm ²	_ centímetro quadrado
cm ³	_ centímetro cúbico
CO ₂	_ dióxido de carbono
CT	_ Ciclo de início (ou limiar) da amplificação, (do inglês Cycle Threshold)
DE	_ Densidade de Energia
DNA	_ Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	_ ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid)
EGF	_ Fator de crescimento epidermal (do inglês, Epidermal Growth Factor)
ELISA	_ Ensaio Imunoenzimático
HDT	_ Hospital de Doenças Tropicais Doutor Anuar Auad
HE	_ Hematoxilina/Eosina
He	_ símbolo para o elemento químico Hélio
IFN-γ	_ Interferon gama
IHQ	_ Imuno-histoquímica
IL	_ Interleucina
iTregs	_ Células T reguladoras induzidas
J	_ símbolo para unidade de trabalho Joules
Kg ou kg	_ quilograma
LDC	_ Leishmaniose Cutânea Disseminada
Leishbank	_ Banco de Leishmanias do centro-oeste
LLL	_ Low-Level Laser
LLLT	_ Terapia com laser de baixa potência (do inglês, Low-Level Laser Therapy)
LPS	_ lipopolissacarídeo
LTA	_ Leishmaniose Tegumentar Americana

M0 _ macrófago indiferenciado
M1 _ Macrófago classicamente ativado
M2 _ Macrófago alternativamente ativado
Mg ou mg _ miligrama
MP-23 _ Anticorpo primário para marcação de macrófagos M2 por imuno-histoquímica
mW _ micro wats
MΦ _ Macrófago
Ne _ símbolo para o elemento químico Neônio
NK _ célula Natural Killer
nm _ nanômetro
NO _ Oxido Nítrico
nTregs _ Células T reguladoras naturais
OAT _ Ornitinas aminotransferase
ODC _ Ornitina descarboxilase
OMS _ Organização Mundial de Saúde
P/CI _ Parasitos por Célula Infectada
PAMP _ Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, Pathogen-associated molecular pattern)
PBS _ Tampão fosfato-salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)
PCR _ Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)
PCRq _ PCR em tempo real
rIFN γ _ Interferon gama recombinante murino
rIL-4 _ Interleucina 4 recombinante murino
RNA _ Ácido Ribonucleico
RNAm ou mRNA _ RNA mensageiro
SDS _ Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate)
TGF- β _ Fator transformante de crescimento (do inglês Transforming growth factor)
Th _ Linfócitos T auxiliar (do inglês, T helper)
TLR _ Receptores semelhantes a Toll (do inglês, Toll Like Receptors)
TNF- α _ Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor-alpha)

Tr1 _ Células Th1 produtoras de IL-10

Treg _ Linfócito T regulador

UFG _ Universidade Federal de Goiás

LISTA DE ANEXOS, FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Anexo I: Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG.

Anexo II: Primer e sondas referentes à citocinas _ Life Technologies.

Figura 1.: Organograma dos experimentos realizados *in vitro* com macrófagos RAW264,7.

Figura 2.: Organograma dos grupos experimentais *in vivo*.

Figura 3.: LLLT melhora o aspecto geral da lesão experimental causada por *L. amazonensis*.

Figura 4.: O tratamento com laser não altera a produção de citocinas.

Figura 5.: LLLT aumenta a expressão de citocinas regulatórias e antinflamatórias em lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis*.

Figura 6: Fotomicrografia de Imuno-histoquímica com marcação de M2.

Figura 7.: Semi-quantificação de macrófagos M2 em Imunoistoquímica.

Figura 8.: Produção de NO por macrófagos diferenciados em M1 e M2 e indiferenciados.

Figura 9.: Dosagem de IL-4 em sobrenadantes de cultura de diferentes perfis macrófago.

Figura 10.: Influência da LLLT em culturas de macrófagos não diferenciados M0, e infectados ou não com Leishmania.

Figura 11: Influência da LLLT em culturas de macrófagos M1, e infectados ou não com Leishmania.

Figura 12.: Influência da LLLT em culturas de macrófagos M2, e infectados ou não com Leishmania.

Figura 13.: LLLT sobre macrófagos M1 infectados com Leishmania inibe a produção de NO.

Figura 14: LLLT sobre macrófagos M2 infectados com Leishmania estimula a produção de NO.

Tabela 1.: Programação do ciclos para reação da transcriptase reversa.

Tabela 2.: Programação dos ciclos para a PCR em tempo real.

Tabela 3.: Valores da equação da reta (R^2) de padronização dos kits de ELISA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença negligenciada que ocorre principalmente nos países em desenvolvimento em regiões tropicais e subtropicais. Todos os anos atinge cerca de 2 milhões de novos casos em todo o mundo e estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estão em risco de ainda contraírem a doença. Segundo a OMS a leishmaniose é endêmica em 88 países distribuídos em 5 continentes do mundo. Destes, 22 pertencem ao novo mundo e 66 ao velho mundo. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem principalmente em países do velho mundo (Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Sudão e Síria), e apenas em dois países do novo mundo o Brasil e o Peru (OMS, 2010; Monzote, 2009; Palumbo, 2009).

As leishmanioses são zoonoses infecto-parasitárias que acometem o homem como hospedeiro acidental, e que são causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Brasil, 2010). Esta pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de leishmania envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro. As duas principais formas clínicas são a leishmaniose visceral, conhecida popularmente como Calazar ou Úlcera de Baurú, que acomete os órgãos internos; e a forma tegumentar conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que é caracterizada por lesões na pele e/ou mucosas. A LTA pode ainda ser subdividida em duas formas, a forma cutânea e a forma mucosa. Por sua vez a forma cutânea pode se apresentar, com uma ou poucas lesões na pele, cutânea disseminada, que se apresenta com até centenas de pequenas lesões acneiformes e cutânea difusa, com múltiplas lesões, ou em placas, não ulcerativas. Já a forma muco-cutânea, ocorre quando há o comprometimento de mucosas e/ou pele (Reithinger et al., 2007; Brasil, 2010).

Normalmente, nos casos de leishmaniose cutânea, o diagnóstico clínico é dado pelas próprias lesões ulceradas no paciente. São frequentes as ulcerações, geralmente indolores, que ocorrem em áreas expostas na pele, em formato ovalado ou arredondado com bordas elevadas, endurecidas e fundas, com tecido de granulação grosseiro, configurando a clássica lesão com borda em moldura (Reithinger et al., 2007). Observam-se também outros tipos de lesão como úlcero-crostosa impetigóide, ectimatóide, úlcero-vegetante e verrucosa crostosa, tuberosa, linquenóide e outras. Nestas formas é frequente a

linfangite e/ou adenopatia satélite, que poderia preceder a lesão de pele. Às vezes, no cordão linfático podem se desenvolver nódulos, que se ulceram, lembrando a esporotricose. Além disso, também podem ser observados pápulas na periferia das lesões (Brasil, 2010).

Estas lesões, além de serem focos dos parasitas, diminuem a qualidade de vida do paciente e devido à necessidade de um esquema terapêutico rígido e longo, trazem consequências emocionais e sociais para o indivíduo afetado (Gontijo & Carvalho, 2003).

As lesões não tratadas são geralmente levadas à cicatrização espontânea dentro de alguns meses ou poucos anos. No entanto, a cicatrização espontânea da lesão e/ou o tratamento inadequado ou interrompido, podem acarretar em recidivas da lesão cutânea ou reativação com a forma mais agressiva da Leishmaniose tegumentar, que é a forma mucocutânea. Isto ocorre, pois, os parasitos podem ainda manter-se vivos em fase de incubação por anos, mesmo após a cicatrização da lesão cutânea (Brasil, 2010; OMS, 2010; Von Stebut, 2015).

1.2. LEISHMANIA, O PARASITO

As regiões endêmicas da leishmaniose são os locais onde coexistem o parasito no hospedeiro vertebrado e o inseto vetor, pois assim é possível o ciclo do parasito ocorrer completamente e se manter.

O parasita causador da leishmaniose vive alternativamente em hospedeiros vertebrados mamíferos, e em insetos vetores, que são responsáveis pela transmissão do parasito ao homem e outros mamíferos durante o repasto sanguíneo. Nos hospedeiros mamíferos, o parasito invade macrófagos, células do sistema fagocítico, e assumem a forma amastigota. Esta se caracteriza como formas não flageladas que se multiplicam no interior dessas células, e com a lise de macrófagos são capazes de infectar outros macrófagos. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito vetor ingere essas células com as formas amastigotas e que no intestino médio destes insetos irão se transformar em formas promastigotas flageladas. As formas promastigotas inicialmente são chamadas procíclicas, e estas não são infectantes. Após aproximadamente 5 a 6 dias estes parasitos sofrem algumas mudanças morfológicas as quais são características da sua maturação e capacidade de infecção, sendo agora chamados de promastigotas metacíclicas. Estas formas infectantes migram para as glândulas salivares do flebótomo e, durante o repasto

sanguíneo por sua vez, inocula estas formas promastigotas metacíclicas flageladas no indivíduo (Gontijo & Carvalho, 2003; Von Stebut, 2015; OMS, 2010; Brasil, 2010).

A *Leishmania* é um gênero de parasitos protozoários os quais encontra-se inseridos na família Trypanosomatidae. Os Tripanossomatídeos são caracterizados pela presença de cinetoplasto, uma massa de DNA circular mitocondrial. Cerca de 21 espécies de *Leishmania* spp. foram identificadas sendo patogênicas em humanos.

A espécie do agente etiológico que acomete o indivíduo varia dependendo da região geográfica. No Brasil três espécies são as mais importantes. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais encontrada e, no homem, pode causar a LTA cutânea e mucocutânea. O vetor associado são os flebotomíneos *Lutzomyia whitmani* e o *Lutzomyia intermedia* presentes em toda a extensão da Mata Atlântica. *Leishmania (viannia) guyanensis* encontrado principalmente nas extensões de mata Amazônica, e principal vetor o *L. umbratilis*. Esta espécie costuma causar lesões cutâneas únicas, e mucosa. E a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* que é um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea, mas há indivíduos que podem desenvolver a forma anérgica ou cutânea difusa da LTA (Gontijo & Carvalho, 2003). Esta espécie já foi encontrada em todas as regiões do país, inclusive em Goiás, mas a maior prevalência é na região norte. Seu principal vetor é o *L. flaviscutellata*, que tem ampla distribuição no Brasil (Brasil, 2010).

A forma, a gravidade e/ou manifestação clínicas da leishmaniose está diretamente relacionada com a espécie do parasito e com a resposta imune do hospedeiro. Portanto, a relação parasito-hospedeiro é decisiva na manifestação clínica (Oliveira, 2004).

1.3. RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmania, quando no hospedeiro mamífero, é um parasito intracelular que vive no interior dos macrófagos, a principal célula do sistema fagocítico humano, a qual possui propriedades para eliminação do parasito. No entanto, a própria leishmania desenvolveu mecanismos para burlar a capacidade microbicida do macrófago. Dessa forma, ela o invade, e ainda se reproduz assexuadamente dentro da célula, até que a célula se rompa e libere as amastigotas que infectam outros macrófagos, propagando a infecção.

Por ser um parasito intracelular a forma de defesa contra a leishmania é principalmente a resposta imune mediada por células. Os macrófagos presentes no sítio de infecção são ativados através do reconhecimento de PAMPs (Padrões moleculares ligados a patógenos) via os receptores TLRs (Toll Like Receptors). Os PAMPs da leishmania são vários dentro das famílias dos lipofosfoglicanos, proteoglicanas, flagelinas e profilinas. Contudo, a amplificação da resposta se dá pela ação dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ ou T *helper* (Th). O IFN- γ produzido pelos linfócitos Th1 (Células T *helper* do tipo 1) ativa os macrófagos pela via do STAT-1, um ativador de fatores de transcrição. E os PAMPs da leishmania ativam os fatores de transcrição AP-1 e NF κ B (Akira et al., 2006; Broz & Monack, 2013). Estes fatores de transcrição, quando ativos, são responsáveis pela transcrição do mRNA da iNOS. O óxido nítrico produzido é um marcador de reação inflamatória, pois leva a morte parasitária. Neste sentido, o próprio macrófago infectado desempenha um papel muito importante, na eliminação do parasito e controle da infecção. (Ueno, N. & Wilson, M.E., 2012; Cunningham, A.C., 2002; Scott et al., 1988; Scott et al., 1983).

Os linfócitos T CD4⁺ são responsáveis pela modulação da resposta imune contra a leishmania. Esta modulação é feita pela produção diferencial de citocinas. Os linfócitos T CD4⁺ denominados de Th1 são produtores de citocinas com perfil inflamatório, como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12, e assim ativam as funções microbidas dos macrófagos. Linfócitos T *helper* 2 (Th2), por sua vez, produzem citocinas como a IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 que estão envolvidas com a susceptibilidade do individuo à doença pois não leva à ativação dos mecanismos microbidas dos macrófagos. O parasito, então, é capaz de se multiplicar livremente no interior desses macrófagos aumentando o parasitismo e, conseqüentemente, agravando as formas clínicas (Pirmez et al., 1993; Bourreau et al., 2003) .

Alguns trabalhos mostraram que o parasito, de fato pode modular a resposta imune do hospedeiro nas primeiras fases da infecção, induzindo o inicio da resposta para o perfil de linfócitos Th2, para evitar a ativação do macrófago e possibilitando a infecção (Nylen & Gautam, 2010; McMahon-Pratt & Alexander, 2004; Muraille & Leo, 1998; Bogdan & Rollinghoff, 1998; Cecilio et al., 2014). Outros trabalhos ainda mostraram que algumas espécies e até mesmo algumas cepas, expressam fosfatidilserina na membrana, e isso estaria induzindo a produção de TGF- β (Wanderley et al., 2013). O TGF- β é responsável por inibir a produção de IFN- γ e desativar o macrófago a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio tornando o macrófago permissivo à infecção por

Leishmania (Bottrel, 2001). Tratam-se de mecanismos de escape e fatores de virulência do parasito, pois no caso de um hospedeiro intermediário imunocompetente, este mecanismo é muito importante para que o parasito consiga infectar os macrófagos.

Experimentos realizados com camundongos infectados com *Leishmania major* mostraram que a determinação do perfil de linfócitos Th1 ou Th2 que irá modular a resposta imune é dada pela relação do parasito com o hospedeiro. Camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major* produziram IFN- γ e IL-12, que ativaram o macrófago a produção de óxido nítrico, levando à morte do parasita. Por isso, esta linhagem de camundongos é conhecida como a linhagem resistente à infecção com *L. major*. Enquanto que, camundongos BALB/c infectados com *L. major* produzem IL-4 que regula negativamente a expressão da subunidade $\beta 2$ do receptor de IL-12 nas poucas células Th1 presentes no local de infecção. Assim, as células não reconhecem a IL-12, não se diferenciam para Th1, logo não produzem IFN- γ , e consequentemente não ativa o macrófago à produção de NO para matar o parasito. Ao contrário, promove a diferenciação dos linfócitos para Th2 (Launois, 1998; Etges & Muller, 1998).

Os linfócitos Th2 durante uma infecção liberam IL-4, IL-13 e IL-10, que vão ativar fatores de transcrição como a STAT6, PPAR, KLF-4 e IRF4 (Sica & Mantovani, 2012). Macrófagos que são ativados por estas citocinas são chamados macrófagos alternativamente ativados (M2). Os macrófagos M2 ainda podem ser subdivididos, dependendo do estímulo que receberam para sua ativação. Macrófagos M2a são aqueles que foram diferenciados com IL-4 e/ou IL-13. Macrófagos M2b ativados por complexos imunes e/ou agonistas dos receptores TLRs, ou IL-1R. E macrófagos M2c, aqueles que foram ativados por IL-10 e glicocorticoides. (Mantovani et al., 2004; Mosser & Edwards, 2008).

Os macrófagos M2 induzem uma resposta anti-inflamatória, estimulam fibroblastos à produção de colágeno tipo IV, elemento da matriz extracelular essencial para o processo de cicatrização de lesões (Gordon, 2003; Rodriguez-Sosa & Riviera-Montoya, 2006). Os fatores de transcrição ativados em macrófagos M2 estão relacionados com o aumento da atividade da arginase que está diretamente relacionada com a produção de ureia e também a L-ornitina. No citoplasma, a arginase 1 produz ureia e L-ornitina, que pela ação da ornitina descarboxilase (ODC), produz putrecina, que gera espermidina e espermina relacionadas com o crescimento celular. Na mitocôndria a arginase 2 produz ureia e L-ornitina que pela ação da ornitina aminotransferase (OAT) produz prolinas e

poliaminas que estão relacionadas com a produção e deposição de colágeno (Bronte & Zanovello, 2005; Li et al., 2001). Por isso, macrófagos M2 são relacionados com a fase de resolução da infecção.

Ao passo que, quando o fator de transcrição de macrófagos M1, NF- κ B, é ativado ele regula positivamente a expressão de vários genes pró-inflamatórios incluindo os responsáveis pela expressão de TNF- α , IL-1, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), IL-6, e IL-12p40 (subunidade capaz de dar origem a IL-12 e a IL-23). Estas citocinas estão relacionadas com a destruição e reorganização da matriz extracelular (Kou & Babensee, 2011).

Os altos níveis de IFN- γ produzidos numa resposta Th1 contra a leishmania são importantes para a eliminação do parasito, mas também, são relacionados com lesão tecidual em decorrência da inflamação. A grande quantidade de NO e peróxido de hidrogênio produzidos no interior do macrófago ativado é capaz de matar o parasito intracelular, contudo, em seguida ocorre a lise celular. Com o rompimento dos macrófagos, as espécies reativas de oxigênio ganham o tecido, e isso levará a formação de lesão ulcerada na pele e mucosas (Bacellar et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). A própria lesão e a inflamação local pode facilitar a disseminação de parasitos em decorrência da destruição da matriz extracelular e também da hiperemia local consequente da inflamação (Barral et al., 1995).

Vários autores (Machado et al., 2002; Lessa et al., 2001; Bafica et al., 2003) já apontaram evidências de que a própria resposta Th1 do hospedeiro contra leishmania é um fator importante para a ocorrência de ulceração tecidual. Alguns justificam estas evidências baseados no fato de que esta resposta diminui a quantidade de parasitos na leishmaniose cutânea. No entanto, há uma contribuição direta do perfil de citocinas inflamatórias no desenvolvimento e na manutenção das lesões ulcerativas.

As células Th17 (linfócitos T *helper* 17) são um outro perfil de linfócitos, pró-inflamatórios, responsáveis pela produção de IL-17 e IL-22 (produzidas por células NK e Th17). Segundo Harrington e colaboradores (2005), IL-4 e IFN- γ inibem a ativação das células Th17. A IL-17 é encontrada em altos níveis tanto no sangue quanto nos tecidos de pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea. Em lesões causadas por *Leishmania (Viannia) brasiliensis* esta citocina também está aumentada (Bacellar et al. 2009; Boaventura et al. 2010). A IL-17 tem um importante papel no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos e por isso, é relacionada com a destruição tecidual. Contudo, não

confere nenhuma redução da carga parasitária (Lopez Kostka et al., 2009). Alguns estudos relatam que a IL-17, produzida pelas células Th-17, está relacionada com a cronicidade da doença devido a manutenção da inflamação (Bacellar et al. 2009; Bettelli et al., 2008).

Outro perfil de células T CD4⁺ são as células T reguladoras (Tregs) classificadas como nTregs, iTregs e Tr1. Elas podem tanto ser benéficas para o hospedeiro evitando a inflamação exacerbada, quanto podem favorecer a permanência do parasito na infecção (Sehrawat, 2011; Peters et al., 2006). Em lesões cutâneas causadas por *L. amazonensis* há presença de muitas células Treg e níveis elevados de citocina IL-10 produzida por Tr1, e isso tem sido associado à susceptibilidade à infecção e a não responsividade ao tratamento (Nyl'en, & Gautam, 2010; Trinchieri et al., 2007). Em linhagens de camundongo, BALB/c, quando suprimido o gene de IL-10, estes animais antes susceptíveis à doença, tornam-se resistentes à infecção. A IL-10 é uma importante citocina inibidora da produção de IFN- γ e leva à inibição do macrófago, e é uma citocina importante na expressão de receptores de TGF- β na membrana de linfócitos T efetores ativados (Cottrez & Groux, 2001). Além disso, parece ser um bom fator preditivo da persistência ou não do parasito nas lesões de pele e, importante para contrabalancear a resposta imune pró-inflamatória levando à resolução da lesão (Antonelli et al., 2004).

O TGF- β é outra citocina reguladora, produzida principalmente por células Treg e regula a resposta inflamatória suprimindo a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ efetores, e induzindo-os a se diferenciarem para Tregs. Além disso, suprime a atividade do macrófago, de células natural killers (NK) e células dendríticas inibindo a produção de IFN γ e de IL-2 (Yoshimura et al., 2010; Oliveira et al, 2014). Entretanto, o TGF- β também é importante nas primeiras horas da infecção ou de qualquer que seja a lesão, pois atua como um quimiotático recrutando células para o sítio de infecção ou de lesão.

Além do papel das células T CD4⁺ que é determinante para a cura ou não das lesões causadas por *Leishmania*, vem sendo estudado também o papel das células CD8⁺, que são os linfócitos citolíticos. Foi demonstrado células T CD8⁺ produzindo IFN- γ e influenciando na modulação de uma resposta Th1, sugerindo um ponto de interação entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Herath et al., 2003; Pompeu et al., 2001). Foi observada uma grande quantidade destas células no infiltrado inflamatório da infecção (Da-Cruz et al., 2005). E nas ultimas fases de infecção com *L. brasiliensis*, células T CD8⁺ mostraram-se reativas contra antígenos de leishmania (Da-Cruz et al., 2002). Para *L. major*, estas células foram relacionadas com a conferência de uma imunidade protetora (Nateghi Rostami et al.,

2010) mas também com a patogênese de lesões de leishmaniose mucocutâneas (Barral-Netto et al., 1995; Brodskyn et al., 1997), pois há presença de moléculas citotóxicas e proteases no sítio de infecção (Machado et al., 2002; Faria et al., 2009).

1.4. CICATRIZAÇÃO E FATORES ENVOLVIDOS

O processo de cicatrização possui três fases didaticamente definidas como: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação.

Na fase inflamatória a sequência de eventos é bem caracterizada. Inicia com o recrutamento de neutrófilos, seguido de macrófagos e finalmente linfócitos T. Os principais fatores humorais envolvidos são citocinas como a IL-8 e quimiocinas, seguidas de citocinas pró-inflamatórias, proteases e metaloproteases, e por fim IL-1 recrutando os linfócitos (Guo & DiPietro, 2010; DiPietro, 1995; Deodhar & Rana, 1997). Na fase proliferativa, é característico o tecido de granulação com presença de fibroblastos, aumento da produção de fatores de crescimento celulares e redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, no entanto IL-1, IL-6 e TNF- α permanecem no sítio da lesão e são importantes no recrutamento de queratinócitos (Raja Sivamani et al., 2007). A fase de remodelação pode perdurar por meses, é a fase da volta à homeostase (DiPietro, 1995).

A fase inflamatória é fundamental. Através das células e citocinas produzidas nesta fase ocorre a modulação das próximas fases da cicatrização. Uma importante célula nesta fase são os macrófagos recrutados para o sítio de infecção ou de lesão. Muitos autores atribuem a estas células recrutadas denominadas monócitos/macrófagos (Novak & Koh, 2013), e não para o macrófago residente, a importância de ser uma das principais células do infiltrado inflamatório (MacDonald et al., 2010).

Os monócitos/macrófagos na fase inflamatória da cicatrização reconhecem e reagem contra não apenas à leishmania, mas também, e ao mesmo tempo, a moléculas danificadas do próprio hospedeiro, com o objetivo de remover o tecido danificado (Lu et al., 2011; Meszaros et al., 2000). Nesta primeira fase da cicatrização, estes monócitos/macrófagos também produzem citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, TNF- α e IL-6. Embora a permanência destas citocinas no local da lesão possa ocasionar ainda mais injúria tecidual elas são essenciais para regular a proliferação de queratinócitos, miofibroblastos e fibroblastos (Hernández-Quintero et al., 2006; Cantini et al., 1995; Mateo et al., 1994; Detmar & Orfanos, 1990).

Muitos trabalhos vêm mostrando às consequências da fase inflamatória ser ocasionalmente interrompida ou pouco eficiente (Ventakaram et al., 2001; Botelho et al., 1998; Botelho, 2004). Casos de leishmaniose cutânea em que foi estabelecida a cura apenas baseada numa análise macroscópica de cicatrização da lesão foram eventualmente notificados também casos de recidivas. Estas recidivas tiveram duas causas principais: a reinfecção do hospedeiro pelo contato com o vetor, mas a principal atribuição foi a não eliminação por completo do parasito na primeira manifestação. Muitas vezes este segundo evento poderia se manifestar a forma mais grave de LTA, que é a forma mucocutânea. Por isso, a fase inflamatória da cicatrização é importante e determinante para as próximas fases. (Antonelli et al., 2005; Toledo et al., 2001).

Ainda na fase inflamatória da cicatrização é importante pontuar os macrófagos M2, aqueles que são ativados por citocinas produzidas por linfócitos Th2, como a IL-4, IL-13, IL-10. Estes não são eficientes na morte parasitária, mas são muito importantes nesta fase para contrabalancear a destruição tecidual com a proliferação celular e ativação de fibroblastos para produção de colágeno. (Zeyda, M. & Stulnig, T. M., 2007; Mantovani et al., 2004). Os macrófagos M2 estão presentes e são importantes no infiltrado inflamatório durante todas as fases da cicatrização.

Os monócitos/macrófagos são as células intermediadoras entre a fase inflamatória e a fase proliferativa da cicatrização. À medida que estas células diminuem no infiltrado inflamatório, dão espaço para a proliferação celular e preenchimento de matriz extracelular. Além disso, o marco do fim da fase inflamatória e início da fase proliferativa se dá com a presença de linfócitos T no infiltrado inflamatório. Nos primeiros momentos da fase proliferativa são secretadas citocinas pró-inflamatórias, Arginase e VEGF, que promovem a proliferação e recrutamento de células relacionadas à cicatrização tecidual (Mirza & Koh, 2011; Willenborg et al., 2012; Perdiguero et al., 2011).

À medida que a fase proliferativa progride os níveis de citocinas pró-inflamatórias diminuem, e começam a ser expressas citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento como a IL-10 e o TGF- β . Além de regular a resposta inflamatória estas citocinas são responsáveis pela regulação de proliferação e/ou diferenciação de várias células do sistema imunológico, mas também de queratinócitos e células endoteliais (Moore et al., 2001). Nesta fase são observados grande número de macrófagos que são ativados via STAT-6, característicos de M2a e M2c.

Na fase de remodelação ocorre vasoconstrição, e o número de capilares, aumentados pela angiogênese durante a fase inflamatória, diminui. Inicia-se a fase de maturação do tecido regenerado. O perfil de macrófagos agora passa a ser de M2 que continuam secretando TGF- β , mas diminuem a expressão de VEGF e arginase-1 (Mirza & Koh, 2011; Willenborg et al., 2012). Aos poucos até mesmo os níveis de citocinas anti-inflamatórias diminuem até o estabelecimento da homeostase.

1.5. TRATAMENTO CONVENCIONAL

O tratamento das lesões em pacientes acometidos pela LTA baseia-se no uso prolongado de fármacos de efeitos sistêmicos como o Glucantime, a Anfoterecina B e a Pentamidina.

No Brasil a droga de primeira escolha é o Glucantime (N-metilglucamina) que é um antimonial pentavalente liberado no Brasil para comercialização há mais de 50 anos. São administrados ao paciente com a forma cutânea da leishmaniose uma dose de 20 mg/Kg/dia com injeções mais comumente aplicadas por vias parenterais, em um esquema terapêutico intenso com ciclos de vinte a trinta dias (FUNASA, 2000; Brasil, 2010). No interior dos fagolisossomos a droga se torna ativa em contato com o microrganismo, porém os mecanismos de ação do Glucantime ainda não estão bem esclarecidos. O tratamento é contraindicado a pacientes gestantes, àqueles que concomitantemente apresentam outra doença como, tuberculose, malária, esquistossomose e à pacientes com mais de 50 anos, principalmente aos que apresentam cardiopatias, nefropatias, hepatopatias ou doença de Chagas (Brasil, 2010).

No caso do tratamento com o Glucantime não ser eficiente, ou oferecer muitos efeitos colaterais ao paciente de modo a inviabilizar o uso deste antimonial, é indicado a anfoterecina B e o isotionato de pentamidina.

A anfoterecina B é a droga de primeira escolha para pacientes gestantes e de segunda escolha quando o tratamento com o antimonial não foi eficiente. Indica-se uma dose de 1,0 mg/Kg/dia, aumentando gradativamente até 1,5 mg/Kg/dia diariamente ou em dias alternados. A administração é por via endovenosa gota a gota diluída em soro glicosilado. Por isso o paciente deve estar assistido por profissionais competentes, de preferência hospitalizado, durante o tratamento.

O isotionato de pentamidina é até 400 vezes menos eficiente que a anfoterecina B. Para este é recomendada a dose de 4 mg/Kg/dia por via intramuscular profunda de 2 em 2 dias. O paciente pode apresentar hipoglicemia por isso é recomendado repouso durante o tratamento, além disso, há casos de acometimento do paciente por diabetes mellitus após o tratamento como efeitos colaterais, pois a pentamidina tem ação no metabolismo da glicose e induz citólise nas células beta do pâncreas (Brasil, 2010).

Já existem trabalhos que mostram que, alguns isolados de leishmania já se tornaram resistentes às drogas de primeira linha para o tratamento da doença (Ashutosh, et al., 2007). Ademais, estes medicamentos apresentam significativos efeitos colaterais, sendo de modo geral, nefrotóxicos, cardiotóxicos e hepatotóxicos para os pacientes (Croft, et al., 2006; Mondal, S & Bhattacharya, P. A., 2010).

O critério de cura é clínico e caracterizado pela reepitelização e regressão total do infiltrado inflamatório e do eritema até três meses após o esquema terapêutico. Porém o paciente ainda deverá se manter em acompanhamento por até 6 meses após o fim do tratamento. Mediante a esta realidade, há de se considerar o número elevado de abandono voluntário do tratamento um dado relevante em termos de saúde pública (Lima et al., 2007).

Um estudo recente com pacientes tratados, foram observados cortes histológicos da região lesionada e considerada curada após diferentes esquemas terapêuticos. O relato mostra que estes fármacos não foram capazes de eliminar completamente todos os parasitos após esses pacientes terem sido aprovados segundo os critérios de cura. Estes indivíduos, portanto, ainda estão em risco de recidivas (Viana et al., 2013).

Neste cenário, iniciativas que busquem o desenvolvimento e o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas para a leishmaniose cutânea devem ser investigadas e exploradas, à medida que se apresentem mais eficientes, menos tóxicas, adequadas ao sistema de saúde público do país e que aumentem a adesão do paciente ao tratamento.

1.6. LASERTERAPIA E CICATRIZAÇÃO

Na dermatologia atual, estética ou clínica, o uso de lasers no tratamento de lesões cutâneas de diferentes etiologias vem sendo empregado com resultados muito satisfatórios e, principalmente, sem efeitos colaterais (Posten et al., 2005). Existe uma grande variedade

de lasers com diferentes efeitos sobre as mais diversas condições biológicas ou patológicas. Entre eles destacam-se os efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos (Ortiz et al., 2001; Woodruff et al., 2004).

O sucesso da utilização dos lasers deve-se a sua capacidade de interagir com o tecido vivo. Pesquisas comprovam que a terapia com o laser de baixa potência teria o efeito de acelerar a cicatrização de lesões, reduzir a dor, e reduzir a resposta inflamatória (Posten et al., 2005; Ferreira et al., 2006, 2008; Medrado et al., 2003). Estes seriam os principais motivos para afirmar o efeito benéfico deste tratamento em lesões cutâneas.

Alguns autores sugerem que o laser de 660nm reduz o tempo da fase inflamatória, tem efeito durante a fase proliferativa, o que interferiria também na fase de remodelação. Segundo estes autores, a LLLT interfere na produção aumentada de pró-colágeno I e III, metaloproteases, o que na fase de remodelação é importante para a melhor aparência da pele reconstituída (Orringer et al., 2008; Andrade et al., 2010).

O processo metabólico celular é exacerbado com a fotorrecepção mitocondrial pela luz monocromática. Estudos *in vitro* mostram que lasers de baixa energia induzem efeitos bioestimulatórios em cultura de células como também macrófagos a produzirem fatores de crescimento associados à produção de pró-colágeno e colágeno (Thomas et al., 1995; Mcdougall et al., 2006; Medrado et al., 2003). Tais efeitos são de suma importância para a o reparo tecidual.

Além disso, para possuir este papel fotobiorregulador, o fotorreceptor deve ser estrutura chave do caminho metabólico, sendo o citocromo C oxidase _ uma proteína que catalisa a etapa final do transporte de elétrons nas mitocôndrias – o principal cromóforo das células vivas (Karu, 1999) mais especificamente no Complexo IV. Vários estudos demonstram que as mitocôndrias são sensíveis à irradiação monocromática visível e infravermelha (Hu et al., 2007; Silveira et al., 2007). Segundo Campbell (2003) todas as células possuem citocromos, permitindo que o laser estimule todas elas, daí a justificativa para o laser ter este amplo espectro de ação e propriedades.

O Complexo IV da membrana mitocondrial é importante no transporte de elétrons da respiração celular (Karu, 1989). Alguns autores ressaltam a interação entre o laser e o Complexo IV resulta na produção de ROS e ativação de fatores de transcrição importantes para a produção de NO, como o NFκB (Karu & Kolyakov, 2005; Lohr et al., 2009; Hashmi et al., 2010). Outros, inclusive inferem mecanismos que podem ser responsáveis

por eventos de diferenciação celular tais como, modulação de citocinas e quimiocinas. Recentemente, foi demonstrada também a ação do laser sobre a acetilação de histonas possibilitando uma maior proliferação celular (Chen et al. 2013).

A maioria dos estudos que mensuraram a ação de lasers *in vitro* foi realizada em culturas de células e demonstraram um efeito estimulador da proliferação celular. Os estudos *in vitro* sobre fibroblastos descrevem um efeito proliferativo e/ou ativador da síntese proteica, dependendo das características e parâmetros do laser utilizado como: comprimento de onda, forma de emissão, densidade de potência e densidade de energia utilizada.

Até então não consta na literatura estudos que avaliam estes efeitos da terapia com laser de baixa potência (LLLT, do inglês *Low level laser therapy*) na leishmaniose experimental ou humana. No entanto, em leishmaniose cutânea existem estudos que avaliaram e confirmaram a eficácia de fototerapias onde a fonte de luz está associada ao uso de fotosensibilizadores (Baptista & Wainwright 2011; Barbosa et al, 2012; Kunzler 2013). Estes seriam moléculas mais sensíveis à excitação luminosa e que concentrariam e amplificariam a energia e, conseqüentemente, os efeitos biológicos do laser (Baptista & Wainwright 2011). Estes tratamentos são denominados de quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (PACT, do inglês *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*) (Baptista & Wainwright 2011) e já foram aplicados em lesões na leishmaniose humana (Gardlo et al. 2003; Asilian & Davami 2006; Evangelou et al. 2011) e experimental (Pelo et al. 2010; Barbosa et al, 2012) com resultados positivos e raros efeitos adversos, com melhora significativa das lesões e diminuição (e, em alguns casos, até a eliminação) dos parasitas nestas lesões. Contudo, há grande variação entre os estudos no que se referem às fontes emissoras de luz, comprimentos de ondas utilizados, dose e escolha de fotosensibilizadores.

Não existem muitos estudos, *in vivo* ou *in vitro*, que avaliem a ação do laser diretamente sobre parasitos de maior complexidade como os protozoários. Na literatura, encontram-se apenas trabalhos que descrevem a susceptibilidade de alguns fungos e bactérias aos tratamentos com lasers de baixa potência em estudos *in vitro* (Nussbaum, et al. 2003; Basso, et al. 2011; Franzen, et al. 2011). Alguns destacam ainda que o efeito da terapia pode ser espécie-específico, como visto por Nussbaum et al. (2003) onde a terapia com o mesmo laser influenciou positivamente a replicação de uma espécie de bactéria e negativamente outra espécie. Além disso, estes trabalhos apresentam grandes variações

quanto ao comprimento de onda (tipo de laser), dose e meios (suspensão ou sólido) e tais variáveis justificam a heterogeneidade dos resultados.

Estudos com o fungo *Paraccocidioides brasiliensis* mostraram que tratamentos de lesões causadas por esse fungo com o laser de baixa potência a uma dose de 3.0 J/cm^3 diminuíram o edema, acelerou o processo de cicatrização da lesão cutânea, diminuiu a quantidade de granulomas. Além disso, não foram encontrados fungos viáveis nas lesões das patas dos camundongos tratadas, enquanto que em patas de animais não tratados foram encontrados granulomas difusos com presença de fungos (Ferreira et al., 2006).

Nosso grupo, em estudos anteriores, observou que a LLLT, numa dose de 3 J/cm^2 em lesões ulceradas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* diminuiu o edema da lesão, favorecendo a ação microbicida dos macrófagos e ainda contribuindo para a produção, deposição e maturação do colágeno. Nossa avaliação, da incidência do laser nas mesmas condições sobre culturas “*in vitro*” de leishmania demonstrou que o laser de 660nm não possui ação microbicida eficiente, contudo apresenta uma ação estática sobre o crescimento do isolado de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Tais resultados promissores nos conduziram a uma avaliação mais específica da ação do laser sobre tecidos e principalmente sobre os macrófagos.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença de grande importância para a saúde pública do Brasil. As lesões da LTA podem causar, além dos problemas físicos, vários problemas psicológicos/emocionais e sociais ao indivíduo. O tratamento é longo, com muitos efeitos colaterais, fatos estes que justificam os inúmeros casos de abandono do tratamento por parte do paciente, permitindo a sobrevivência latente do parasito. A ocorrência de recidivas, muitas vezes com a forma mais grave da doença, a forma mucosa ou mucocutânea está associada ao não tratamento ou ao tratamento incompleto. O tratamento dos doentes é uma medida profilática, pois estes podem tornar-se reservatórios do parasito (FUNASA, 2000; Brasil, 2010).

Formas alternativas de tratamento que vise a eficácia na cicatrização das lesões, a diminuição do tempo de tratamento, a diminuição do abandono e consequentemente a diminuição das recidivas devem ser explorados. Neste sentido, os lasers de baixa potência (LLL) apontam para a possibilidade de uma terapia não invasiva, sem efeitos colaterais e que podem atuar em conjunto com a terapia convencional (Posten et al., 2005).

Os LLLs vêm sendo muito utilizado para diversas finalidades na dermatologia clínica, entre elas, na cicatrização de feridas. Contudo, existem poucos trabalhos que avaliaram a influência direta do LLL sobre lesões causadas por leishmania. E nestes raros trabalhos, não se teve a preocupação em investigar o efeito específico do laser nas células, tampouco em suas moléculas efectoras (Baptista & Wainwright 2011; Barbosa et al, 2012; Kunzler 2013).

A avaliação deste tipo de terapia (utilizando um laser comercial e comum para a clínica dermatológica e em tratamentos fisioterápicos) para uma doença tropical negligenciada pode abrir novas perspectivas no tratamento convencional atual. Para tanto, é necessária a avaliação do impacto celular do laser com objetivo de avaliar as funções imunobiológicas que estariam sendo influenciadas pela fototerapia de 660nm. Assim, o presente trabalho se insere no contexto da busca e do entendimento da ação do laser sobre lesões tegumentares características da LTA, avaliando a produção de citocinas e o efeito sobre os macrófagos.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento com laser de baixa potência na leishmaniose tegumentar experimental, determinando a expressão de citocinas envolvidas na cicatrização de lesões ulceradas em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (leishmania) amazonensis* e avaliando, *in vitro*, alterações funcionais em perfis de macrófagos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em animais BALB/c infectados (isolado MAB-6 de *L. amazonensis*) que tiveram lesões ulceradas tratadas ou não com o laser de 660nm, as metas foram:

- Avaliar os efeitos do laser na morfologia macroscópica de lesões cutâneas experimentais em camundongos BALB/c;
- Avaliar a ação do laser sobre a quantificação de M2 no infiltrado inflamatório de lesões de camundongos BALB/c;
- Comparar a expressão diferencial de citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 no infiltrado inflamatório das lesões, através de ELISA;
- Comparar a expressão gênica diferencial das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-17, TNF- α , TGF- β , IL-13 e IL-10, no infiltrado inflamatório de lesões cutâneas experimentais de camundongos BALB/c, tratadas e não tratadas com laser, através de PCR em tempo real;

Em cultura de macrófagos murinos, linhagem RAW264.7, diferenciados ou não para os perfis M1 e M2, co-cultivados com o isolado MAB-6 de *L. amazonensis* e, com ou sem irradiação do laser, as metas foram:

- Avaliar a ação do laser sobre a atividade fagocítica e microbicida frente à leishmanias pré-tratadas ou não;
- Avaliar a influência do laser sobre produção de NO frente à leishmanias pré-tratadas ou não.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 55 camundongos machos, da linhagem BALB/c, todos com 8 a 10 semanas de vida, mantidos em micro-isoladores acoplados a racks ventiladas em grupos de no máximo 5 animais por gaiola, com ração e água à vontade. Os animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás na cidade de Goiânia/Goiás e foram mantidos neste mesmo biotério com condições ambientais de temperatura e luminosidade controladas. Os micro-isoladores, os filtros, a maravalha, água e ração foram trocados duas vezes por semana por kits limpos e autoclavados. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG (Protocolo número 036/2010, em Anexo I).

4.2. PARASITOS

Previamente, em nosso laboratório, foi realizado um trabalho piloto onde foram testados diferentes isolados de *Leishmania (leishmania) amazonensis* e de *Leishmania (viannia) braziliensis* para estabelecer o melhor modelo de lesões ulceradas na infecção de camundongos da linhagem BALB/c. De acordo com a caracterização, o isolado MAB-6 da espécie *Leishmania (leishmania) amazonensis* foi utilizado neste trabalho para a análise da influência do laser sobre lesões ulceradas (*in vivo*) e sobre macrófagos infectados (*in vitro*).

O isolado MAB-6 de *Leishmania (leishmania) amazonensis*, foi obtido em 2006, de um paciente do Estado do Amazonas que foi atendido e acompanhado pelo Setor de Infectologia do Hospital de Doenças Tropicais Doutor Anuar Auad (HDT) em Goiânia. O paciente M. A. B. apresentava a leishmaniose na forma cutânea difusa, com nódulos localizados em diversas regiões do corpo, lesões vegetativas e ulceradas. O paciente não apresentou cura clínica, apenas melhora temporária do quadro, mesmo após anos sendo submetido a diferentes protocolos quimioterápicos (Pereira et al., 2009).

O isolado MAB-6 foi caracterizado molecularmente, e compõe o Leishbank (Banco de Leishmanias do Centro-Oeste), localizado no laboratório de Imunobiologia das Leishmanias, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia/Goiás.

Os parasitos, gentilmente cedidos, foram cultivados em placas de 24 poços em meio Grace (Grace's Insect Medium, da Sigma-Aldrich) completo (20% de SFB, Glutamina a 2mM/mL e antibiótico 100µg/mL) em estufa a temperatura de 26 °C. Nas culturas de leishmania foram feitos repiques de três em três dias, sempre iniciando com 5×10^5 parasitos/mL. Foram utilizados parasitos em cultura até o terceiro repique, visando a manutenção da viabilidade celular.

4.3. INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS

Os parasitos mantidos em cultura por seis dias tornam-se formas promastigotas metacíclicas (Silva-Jr et al., 2015). Formas promastigotas metacíclicas do isolado MAB-6 foram lavadas três vezes com PBS e centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 10°C para a retirada completa do meio Grace em que foram cultivadas. Na última lavagem, o precipitado foi ressuscitado com 1 mL de PBS e quantificados em hematocítômetro.

40 animais foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita com 5×10^6 parasitos. Os outros 15 animais, do total de 55 utilizados neste estudo, compuseram o grupo de animais não infectados. A lesão esperada era uma lesão local com inchaço da pata causado por uma inflamação exacerbada e com presença de ulceração única ou não. Estas condições ocorriam com 8 a 10 semanas de infecção. Ressalta-se ainda que num grupo de 40 animais, apenas de 30 a 32 apresentavam lesões nas condições desejadas para o tratamento. Os demais animais que não apresentavam lesões nestas condições após 8 a 10 semanas foram excluídos do estudo e eutanasiados.

4.4. MACRÓFAGOS

Para avaliar a influência do laser, *in vitro*, sobre macrófagos não diferenciados (M0), diferenciados como M1 ou M2, infectados ou não com *Leishmania (leishmania) amazonensis*, *in vitro*, foi utilizada uma linhagem de macrófagos murinos imortalizados denominada RAW 264,7. As células foram cultivadas em frascos para cultura celular (Corning) com meio RPMI (Cultilab) completo (10% SFB, Glutamina 2mM/mL, solução bicarbonato 7,5% a 12mM) em estufa (MCO 19AIC – UV, da Sanyo) com 5,0% de CO₂ e a 37°C. O meio de cultura foi trocado de 2 em 2 dias. E repiques foram feitos de 4 em 4 dias ou de 5 em 5 dias, dependendo da necessidade.

4.5. DIFERENCIAÇÃO E INFECÇÃO IN VITRO DE MACRÓFAGOS RAW264,7

Em placas de 24 poços (Corning) foi inicialmente depositada, no fundo de cada poço, uma lamínula redonda de vidro (13 mm, da Glasscyto), esterilizada em autoclave, para a adesão das células. Sobre a lamínula foram pipetados 1,49 mL de meio RPMI completo e 10^5 células num volume de 10 μ L, para que em cada poço tivesse um volume total de 1,5 mL. Após 24 horas de incubação, para a adesão das células sobre a lamínula, os poços foram separados em grupos que foram diferenciados para o perfil M1, outros para o perfil M2 e outros que não foram diferenciados (M0).

A diferenciação para macrófagos M1 foi feita com 5ng/mL de IFN γ (Peprotech) recombinante murino (rIFN γ) e 1 μ g/mL de LPS (Sigma-Aldrich) de *E.coli*. Para macrófagos M2 foram utilizados 20ng/mL de IL-4 (Peprotech) recombinante murino (rIL-4) (Protocolo adaptado de Solinas et al., 2010; Ambarus et al. 2012). As células foram mantidas nestas condições incubadas em estufa de 20 a 24 horas.

Após a diferenciação, foram identificados macrófagos M0, M1 e M2 que seriam infectados com *Leishmania*, e os que não seriam infectados. A infecção foi feita com formas promastigotas metacíclicas do isolado de *Leishmania (leishmania) amazonensis*, MAB-6, na proporção de 5 parasitos para cada célula (5×10^5 parasitos/poço).

Após 4 horas de infecção todos os poços (M0, M1, M2, infectados ou não com *Leishmania*) foram lavados três vezes com PBS (NaCl, Na₂(HPO)₄, KH₂PO₄, KCl, H₂O ultra pura, com pH 7,2) para a retirada de todos os parasitos que ainda se encontravam no sobrenadante. O sobrenadante e as lamínulas foram coletados e identificados para que se fossem analisados *a posteriori*, compondo o grupo de 4 horas após a infecção. Os sobrenadantes coletados foram armazenados à -20°C para dosagens de NO e as lamínulas foram fixadas e coradas com Corante Panótico (Reagente 1 por 10 segundos; Reagente 2 por 15 segundos; Reagente 3 por 18 segundos).

Os poços que compunham o grupo a ser analisado após 24 horas foram apenas lavados com PBS às 4 horas de infecção, mas não foram retiradas as lamínulas nem coletado o sobrenadante de cultura. Estes, após a lavagem, foram completados novamente com 1,5mL de meio RPMI completo, e mantidos em cultura em estufa de CO₂ até às 24 horas de infecção. Após este período foram coletados os sobrenadantes destes poços e

armazenados à -20°C. Coletou-se também as lamínulas nos fundos destes poços e igualmente foram fixadas e coradas.

Este experimento foi feito duas vezes, e em cada uma delas todos os grupos foram feitos em triplicatas.

4.6. O LASER

O equipamento utilizado para aplicação do laser foi o modelo ENDOPHTON com caneta aplicadora de 660nm (Kld Biosistemas). Este laser é um diodo de arseneto de gálio aluminizado (AsGaAl), com comprimento de onda de 660 nm, potência de 20 mW e área do feixe de 0,035 cm². A dose utilizada em todos os experimentos foi sempre a mesma 3J/cm², em modo de pulso contínuo por 5 segundos em aplicação puntual. Sendo considerados de dois a quatro pontos por lesão dependendo da extensão da mesma no tratamento das lesões em camundongos, e dois pontos em cada poço de cultura, seja de células ou de Leishmania, variando os pontos a cada dia de tratamento.

A dose ou densidade de energia (DE) é dada pela fórmula:

$$DE = \frac{\text{Potência} \times \text{Tempo}}{\text{Área do feixe}}$$

No aparelho utilizado era possível apenas ajustar o tempo, pois, a potência era fixa e a área do feixe também.

4.7. TRATAMENTO COM LASER *IN VITRO*

Nos experimentos e análises da infecção *in vitro* de macrófagos RAW264,7 foram propostos grupos em que o tratamento com laser fosse feito *in vitro*, diretamente sobre a célula (M0, M1 e M2) ou sobre o parasito antes da infecção, e ainda o tratamento da célula (M0, M1 e M2) após a infecção, mimetizando o que ocorre *in vivo*. Os tratamentos *in vitro*, tanto de células quanto de parasitos, foi feito sobre as culturas em placas de 24 poços, em cada poço, em 2 pontos de tratamento por dia. O que diferenciou no tratamento de células ou de parasitos foi o período, ou seja, o número de sessões de tratamento.

O grupo de células (M0, M1 e M2) para serem tratadas recebeu por 3 dias consecutivos a incidência direta e perpendicular do laser. O primeiro tratamento deste grupo foi feito após a passagem das células para a placa de 24 poços, outro tratamento após

a diferenciação das células para M1 ou M2, e o ultimo, minutos antes da infecção com *Leishmania*, totalizando 3 tratamentos.

Os parasitos, antes da infecção, cultivados em placas de 24 poços, foram divididos em dois grupos, o grupo que seria tratado com laser e o grupo controle (que não recebeu o tratamento). O tratamento *in vitro* dos parasitos foi feito diariamente por 7 dias consecutivos, período em que os parasitos se tornam formas promastigotas metacíclicas.

No grupo experimental *in vitro* que recebeu o tratamento com laser após a infecção dos macrófagos com a *Leishmania*, o primeiro tratamento ocorreu 4 horas após a infecção dos macrófagos, depois um segundo tratamento 8 horas após a infecção, e o terceiro e ultimo tratamento 12 horas após a infecção. Segue o organograma (Figura 1) ilustrando todos os passos do experimento *in vitro*.

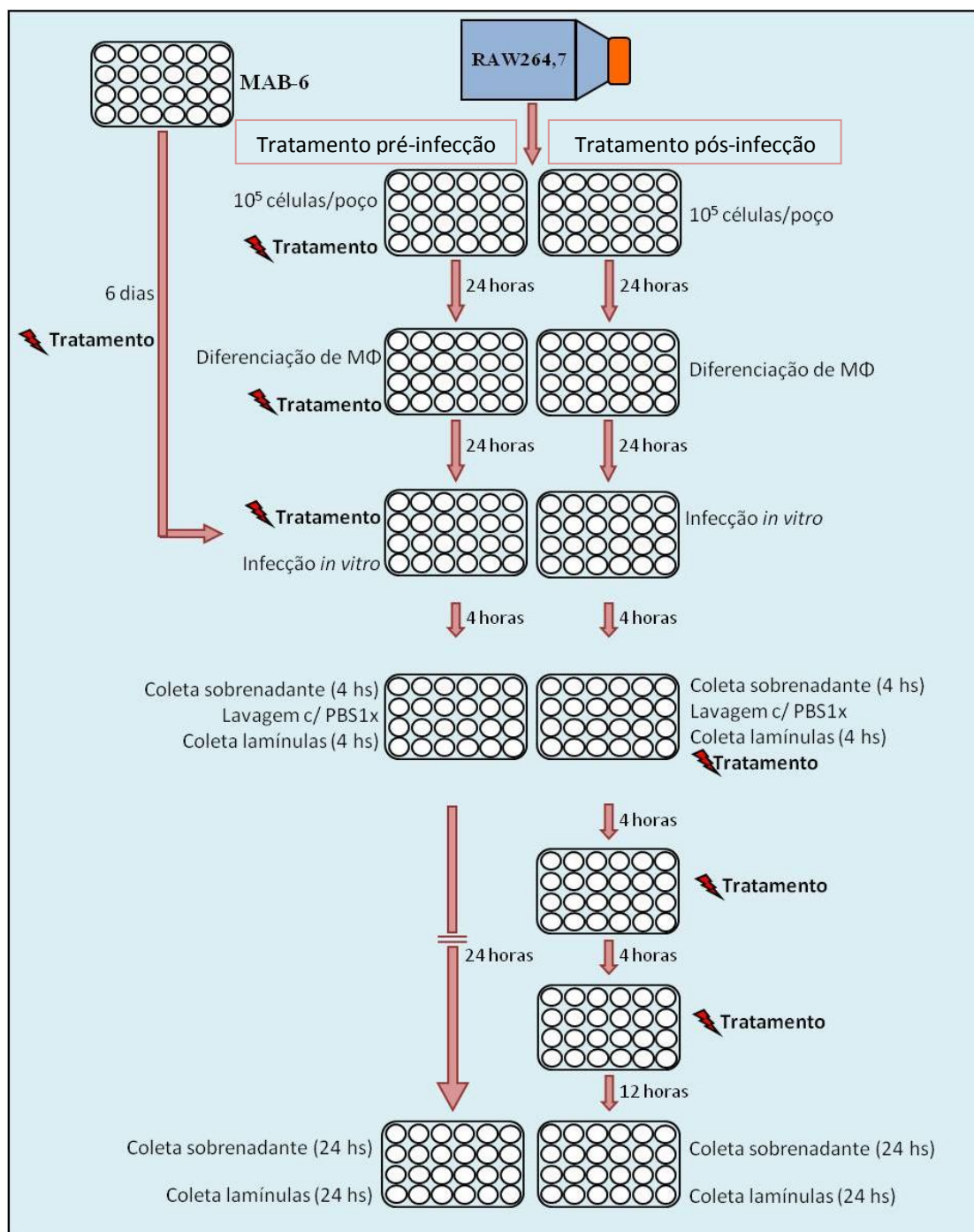


Figura 1.: **Organograma dos experimentos realizados *in vitro* com macrófagos RAW264,7.** Identificação dos grupos experimentais, delineamento dos tempos de tratamento.

4.8. TRATAMENTO COM LASER *IN VIVO*

Após um período entre 8 a 10 semanas de infecção tivemos o máximo de animais com patas ulceradas (75 a 80% do total de animais infectados). Os animais com lesões estabelecidas foram separados em dois grupos: camundongos tratados e camundongos não tratados com laser. Os camundongos tratados receberam diariamente a incidência do laser

com uma dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ durante 5 dias consecutivos. O tratamento foi feito imobilizando o animal e incidindo a luz do laser direta e perpendicularmente, a uma distância de aproximadamente 1 centímetro da lesão durante 5 segundos por ponto da lesão de cada animal. A quantidade de pontos foi determinada conforme a extensão da lesão. A máxima foram 4 pontos e a mínima de 2 pontos. Os animais não tratados foram submetidos a todas as condições adversas dos animais tratados, apenas não receberam o tratamento.

Logo após o último dia de tratamento todos os animais tratados e não tratados foram sacrificados, as patas foram coletadas. Parte delas, tanto de animais tratados quanto de animais não tratados com o laser, foram coletadas, mantidas em paraformoldeído 4% por 24 horas, fixadas em várias concentrações de etanol, e finalmente em xilol. Depois foram incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo para a confecção de lâminas histológicas para marcação de macrófagos M2 por Imuno-Histoquímica (IHQ). Outros animais tiveram suas patas coletadas de forma mais cuidadosa, com instrumentos cirúrgicos previamente tratados com SDS 0,01% e Água DEPC 0,01%, tornando-os livres de nucleases, e congeladas inicialmente a -20°C e depois de três dias, armazenadas à -80°C , destinadas à PCR em tempo real. Outras foram coletadas e congeladas à -20°C , e depois de três dias, armazenadas à -80°C , destinados à ELISA. Segue o organograma (Figura 2) ilustrando os passos dos experimentos *in vivo*.

Os animais controles ou calibradores desses experimentos foram 15 animais BALB/c, machos, de mesma idade, que passaram por todas as situações adversas dos animais infectados, porém não foram infectados com o parasito.

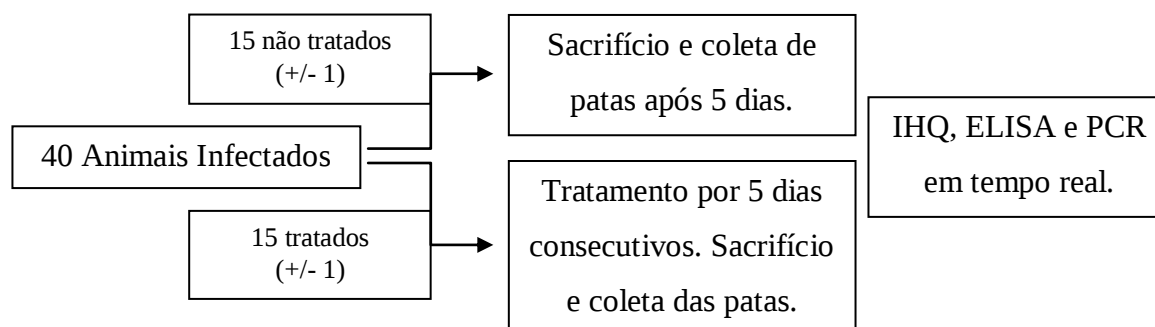


Figura 2.: **Organograma dos grupos experimentais *in vivo*.** Identificação de 40 animais infectados, a subdivisão em grupo tratado ou não tratado com laser e a separação de amostras para cada experimento Imuno-Histoquímica (IHQ), ELISA e PCR em tempo real. Não foram representados neste os animais que não foram infectados e serviram de controles calibradores.

4.9. EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

A extração de RNA do tecido das patas infectadas tratadas, não tratadas, e não infectadas foi realizada através do kit de extração PureLink® RNA Mini Kit Ambion.

O tecido congelado à -80°C foi processado com homogeneizador automático (Dispergerstation Ika Labortechnik) com Tampão de Lise (tampão estoque adicionado de 2-mercaptoetanol) por 40 segundos à velocidade média. Centrifugado, o extrato obtido, transferiu-se o sobrenadante para um microtubo livre de RNase. Adicionou-se ao microtubo Álcool 70% e homogeneizou-se no vortex até que não houvesse mais nenhum precipitado. Transferiu-se este volume para o spin cartridge (PureLink®) e após uma centrifugação descartou-se o sobrenadante. Esse processo foi repetido até que todo conteúdo passasse pelo spin, pois assim garantíamos que todo RNA extraído do tecido passasse pelo spin. Lavou-se o spin com os dois tampões de lavagem que compõem o kit e depois com água RNase free para que o RNA presente no spin eluísse para um microtubo coletor. O RNA extraído foi armazenado à -80°C e foi retirada uma alíquota para leitura no NanoDrop Spectrophotometers.

Após congelamento e análise da qualidade da extração de RNAm pelo NanoDrop as amostras consideradas de boa qualidade (quantidade de material e pureza) foram transformadas em cDNA pela reação da transcriptase reversa.

A reação da transcriptase reversa foi realizada segundo kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da Applied Biosystems. A reação foi feita toda no gelo. O método baseia-se no preparo do 2X Reverse Transcription Master Mix (10X RT buffer,

25X dNTP Mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, Água Nuclease Free) e para cada 10µL deste MasterMix foram adicionados 10µL de amostra de RNA. Foi feita uma centrifugação com alta rotação e de poucos segundos para eliminar bolhas de ar, e finalmente posicionados no Termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf) o qual foi programado para os seguintes ciclos:

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo (min)	10	120	5	∞

Tabela 1.: **Programação do ciclo para reação da transcriptase reversa.** Segundo fabricante do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da Applied Biosystems. Programação em termociclador dos ciclos de aquecimento e resfriamento para a atividade ótima da enzima transcriptase reversa, com o objetivo da transformação do RNA extraído do tecido se transformar em cDNA.

Ao final do processo os tubos agora com cDNA foram armazenados primeiramente a -20°C e após 24 horas armazenados a -80°C.

4.10. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL

Foram utilizados primers e sondas de metodologia TaqMan (LifeTechnologies) para análise da expressão gênica de todas as citocinas de interesse IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, TGF- β e TNF- α . O gene endógeno utilizado para parâmetro de comparação foi β 2-microglobulina. No Anexo 2 estão as sequências gênicas das sondas e primers utilizados. O aparelho PCR em tempo real para amplificação e leitura foi o LightCycler® 480 Systems, da Roche e o programa computacional utilizado foi o LightCycler® 480 Software, Versão 1.5.

Foi feita a curva de eficiência para testar cada sonda. Utilizando um pool de cDNA de três animais infectados, não tratados com laser, foi retirada uma alíquota e realizada a leitura no NanoDrop Spectrophotometers para se estabelecer a concentração inicial do início da curva. A curva iniciou com 100ng de cDNA e foi feita uma diluição seriada desta amostra, na base 2. Foram adicionados, em todos os poços da curva, a mesma quantidade de sonda e de Master Mix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). A eficiência do primer seria considerado de 100% caso, à medida que a

concentração de cDNA fosse reduzida pela metade, a amplificação também deveria se reduzir de maneira exponencial na base 2. Todos os primers foram testados na curva de eficiência, e as curvas foram feitas em duplicatas, e todos tiveram, segundo o programa computacional do aparelho, valores de R próximos a 2, ou seja a eficiência dos primers foi próxima de 100%.

Para a reação e teste das amostras foi feita uma diluição da amostra de modo que a cada 1µL se obtivesse 100ng de cDNA total. As diluições foram feitas para todas as amostras (obtidas de animais tratados, não tratados e controles não infectados) e todas elas foram testadas em duplicatas. Em cada poço da placa foram adicionados 8µL de Água Ultra-Pura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, da Invitrogen), 10µL de Master Mix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), 1µL de Sonda TaqMan (LifeTechnologies), e 100ng/µL de cDNA de cada amostra. Toda a reação é preparada no gelo. Após a pipetagem foi feita uma centrifugação rápida para eliminar bolhas de ar e baixar todos os volumes para o fundo da placa, e por fim programado o aparelho para a reação. Os ciclos foram programados segundo recomendado pela metodologia TaqMan (LifeTechnologies):

	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Pré-incubação	50 °C	02 min.	01
	95 °C	10 min.	
Amplificação	95 °C	15 seg.	40
	60 °C	01 min.	
Resfriamento	40 °C	01 seg.	01

Tabela 2.: **Programação dos ciclos para a PCR em tempo real.** Segundo determinação do fabricante LifeTechnologies.

Os valores de CT, ΔCT e $2^{-\Delta CT}$ foram calculados. O CT é o ciclo em que há amplificação gênica e foi fornecido pelo programa computacional acoplado ao LightCycler® 480 Systems. Os CTs inferiores a 25 e superiores a 29 para o gene endógeno foi um parâmetro de exclusão daquela amostra, que provavelmente estava danificada. Os CTs para os genes testes com valores superiores a 35 foram considerados negativos. Os ΔCT s foram calculados e baseia-se na diferença do CT testes com o CT do

gene endógeno. E, por fim o valor de $2^{-\Delta CT}$ que é o valor exponencial de amplificação do ciclo, este valor dos genes testes nos mostra quantas vezes o gene teste foi ou não mais encontrado que o gene constitutivo ou endógeno. Este valor obtido para cada amostra não tratada e tratada foi comprado para cada citocina.

4.11. EXTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TECIDO

Inicialmente foi preparado 100 mL de PBS (8g de NaCl, 0,2g de KCl e 2,89g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, diluídos em 1 litro de água MiliQ) acrescido de NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 5%; fluoreto de fenilmetilsufona (PMSF) 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 KIU (unidade inibitória de caliceína) de aprotinina. Fragmentos do tecido envolvendo lesão e infiltrado inflamatório armazenadas à -80°C foram pesados e macerados em homogeneizador automático (Dispergerstation Ika Labortechnik) na presença de 1 mL deste tampão preparado para cada 100mg de tecido. O extrato tecidual resultante foi centrifugado por 10min a 10000 r.p.m. a 4°C . O sobrenadante foi recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA e estocado a -80°C .

4.12. DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Para a realização da dosagem de citocinas por ELISA foram adquiridos kits comerciais específicos (Kit ELISA BD OptEIA), para cada citocina de interesse (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17). Cada kit foi testado através de curvas padrão, na qual varias concentrações de solução padrão para cada citocina específica testaram a eficiência dos seus anticorpos específicos, segue na Tabela 2 os valores de R^2 e a significância estatística de cada curva padrão.

Citocina	R^2	Valor P
IFN γ	0,9993	< 0.0001
IL-4	0,9993	< 0.0001
IL-10	0,9979	< 0.0001
IL-17	0,9983	< 0.0001

Tabela 3.: Valores da equação da reta (R^2) de padronização dos kits de ELISA. Todos os dados foram estatisticamente significativos, com $p < 0,0005$.

Todo o protocolo foi seguido conforme determinado pelo fabricante. As placas de ELISA de 96 poços (SantaCruz) foram seladas e incubadas a 4°C over-night com os anticorpos específicos para cada citocina de interesse, diluído em tampão de fosfato 0,2M ou carbonato, para um volume total de 100µL/poço segundo determinações do fabricante. Após a sensibilização (12 a 14 horas) as placas foram lavadas de 3 a 5 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas em 200µL/poço de solução de PBS com albumina bovina (BSA) ou com soro fetal bovino (SFB) a 1%, por 1 hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, foi feita a diluição das amostras e dos padrões em solução diluente (PBS com BSA ou SFB 0,1%, pH 7,4) num volume total de 100 µL/poço, e incubado de 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, anticorpos secundários biotinilados foram incubados à temperatura ambiente por 2 horas num volume de 100µL/poço. Após esse período de incubação e novo ciclo de lavagem, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada à placa na proporção de 1:4000 em solução diluente num volume de 100µL/poço e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A placa foi lavada novamente e adicionou-se a solução do substrato da enzima (H₂O₂) acrescida do cromógeno (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) acompanhando-se a formação da cor. A reação foi interrompida após 15 a 20 minutos de incubação no escuro com 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M.

A leitura das placas foi feita a 450 nm em leitora de ELISA (Thermo LabSystems Multiskan RC/MS/EX Leitor de Microplacas). O cálculo das concentrações das amostras foi feito com base na curva padrão (de acordo com informações da bula do kit) estabelecida com os recombinantes de cada citocina.

4.13. QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS (M2) POR IMUNOISTOQUÍMICA EM LESÕES EXPERIMENTAIS

Lâminas de todos os animais foram submetidas à marcação com anticorpo para detecção de macrófagos alternativamente ativados (M2) de tecido conectivo (anticorpos ER-MP23). Para tanto as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas ao processo de recuperação antigênica com Tampão Tris/EDTA em alta temperatura (96° C) em banho-maria. Após a recuperação procedeu-se com o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação do tecido na presença de peróxido de hidrogênio a 1%. Em seguida os anticorpos primários foram incubados por 12 a 18 horas a 4° C. Utilizou-se o sistema de

amplificação de sinal ABC (Santa Cruz, Califórnia, USA) que contém anticorpo secundário biotilado, o sistema avidina-biotina-peroxidase e o substrato para a peroxidase acrescido do cromógeno (diaminobenzidina). Procedeu-se conforme as recomendações do fabricante. As lâminas foram contracoradas em hematoxilina e montadas para posterior análise microscópica.

A quantificação foi feita pela contagem de células marcadas em 10 campos aleatórios no corte histológico, e os cálculos foram feitos baseados na proporção de densidade de células positivas.

4.14. QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS *IN VITRO*

Para se determinar a carga parasitária dos macrófagos nas diversas condições às que foram submetidos, todas as lamínulas que estavam durante a cultura celular, no fundo dos poços, e que foram fixadas e coradas com corante Panótico, foram coladas em lâminas de microscopia óptica (Global) com cola (VER-Mount, EasyPath) e analisadas em microscopia óptica de luz (Primo Star, Zeiss) no aumento de 1000X. Foram contadas 200 células por cada lamínula em vários campos e utilizando a metodologia de zigue zague ou de linha grega. Foram contados os macrófagos não infectados, os macrófagos infectados e o número de amastigotas no citoplasma de cada macrófago infectado.

Com estes dados foram calculadas a porcentagem de células infectadas (%CI) e o número de parasitos por célula infectada (P/CI). A %CI foi determinada segundo o cálculo:

$$\%CI = \frac{(\text{numero de células infectadas} \times 200)}{100},$$

e o P/CI foi determinado segundo o cálculo:

$$P/CI = \frac{\text{Total de parasitos contados}}{\text{Número de células infectadas}}$$

Apenas no grupo experimental em que o tratamento com o laser foi realizado após a infecção dos macrófagos com a leishmania, os dados de análise da fagocitose e atividade microbicida dos macrófagos, foram obtidos após uma normalização dos valores. Portanto, apenas estes dados foram analisados com base na metodologia da quantificação relativa. Adotou-se os valores do grupo normalizador como 1 e os demais dados foram analisados com relação ao normalizador.

4.15. DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

Os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e armazenados em tubos a -20°C, para posterior determinação da quantidade de nitritos. A reação baseia-se na detecção e semi-quantificação de Nitrito no sobrenadante das culturas de células e é também denominada Método ou Reação de Griess. Em placas de 96 poços fundo em U, foram pipetados 50µL de amostra ou de nitrito (para a curva padrão), em duplicatas. Foi previamente preparado o reagente de Griess (1% de Sulfanilamida, 2% de Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) e 0,1% de Naphthylethylene Diamina (NEED)) e adicionado 50µL em cada poço da placa, que foi incubada no escuro a temperatura ambiente por 10 minutos. A curva padrão foi feita, em duplicata, iniciada com 100µM de nitrito e seguido de diluições seriadas.

A leitura foi feita em espectrofotômetro (Thermo LabSystems Multiskan RC / MS / EX Leitora de Microplacas) com comprimento de onda de 450nm. O cálculo das concentrações de Nitrito das amostras foram feitos com base nos valores conhecidos da curva padrão. Todos os cálculos foram feitos no Microsoft Office Excel 2007.

4.16. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a confecção dos gráficos e análise estatísticas foi utilizado o programa computacional GraphPadPrism 5.0. Inicialmente foram utilizados testes de normalidade em cada grupo/variável analisado para a escolha dos testes paramétricos ou não paramétricos. Na avaliação entre apenas dois grupos o teste empregado foi o teste t de Student (paramétrico) ou o seu correspondente não paramétrico (Mann-Whitney), sendo estatisticamente significativo quando o p menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) para verificação da não aleatoriedade das diferenças entre grupos. Nas análises onde foram incluídos três ou mais grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguidos de testes *a posteriori*, par a par.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DO USO DO LASER *IN VIVO*

Para caracterizar a ação do laser nas lesões ulceradas na leishmaniose experimental, avaliamos aspectos morfológicos associados à cicatrização de feridas. Dessa forma o tratamento com laser foi acompanhado, diariamente, por análise macroscópica das lesões, considerando aspectos tais como: fechamento da ulceração, formação de crosta e tamanho da pata. Foi possível notar que todos os animais tratados com o laser apresentaram melhora clínica da lesão. No quinto dia de tratamento as úlceras estavam reduzidas ou fechadas, e o edema também estava reduzido com relação às patas dos animais que não receberam o tratamento. Estudo anterior do nosso grupo comparou a curva de crescimento *in vivo* (medida indireta pelo tamanho da pata) e demonstrou que o laser possui efeito transitório, porém, significativo, na redução da lesão.



Figura 3.: **LLLT melhora o aspecto geral da lesão experimental causada por *L. amazonensis*.** Lesão ulcerada na pata de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* (MAB-6). No mesmo dia, à esquerda lesão não tratada (5 dias, sem tratamento), à direita lesão tratada com laser após 5 dias consecutivos de tratamento.

5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS *IN VIVO*

Objetivando responder se o laser exerce influência sobre a expressão de citocinas envolvidas nas diferentes fases da cicatrização, nós avaliamos a expressão do mRNA específico de algumas citocinas bem como quantificamos seus níveis por ELISA.

5.2.1. Dosagem de citocinas por ELISA

A dosagem das citocinas IFN γ , IL-4, IL-10 e IL-17 extraídas do tecido do local da infecção (infiltrado inflamatório) por ELISA (Figura 4) não mostrou nenhuma diferença estatística quando o tecido é de lesão tratada com laser comparado com o tecido de lesão não tratada.

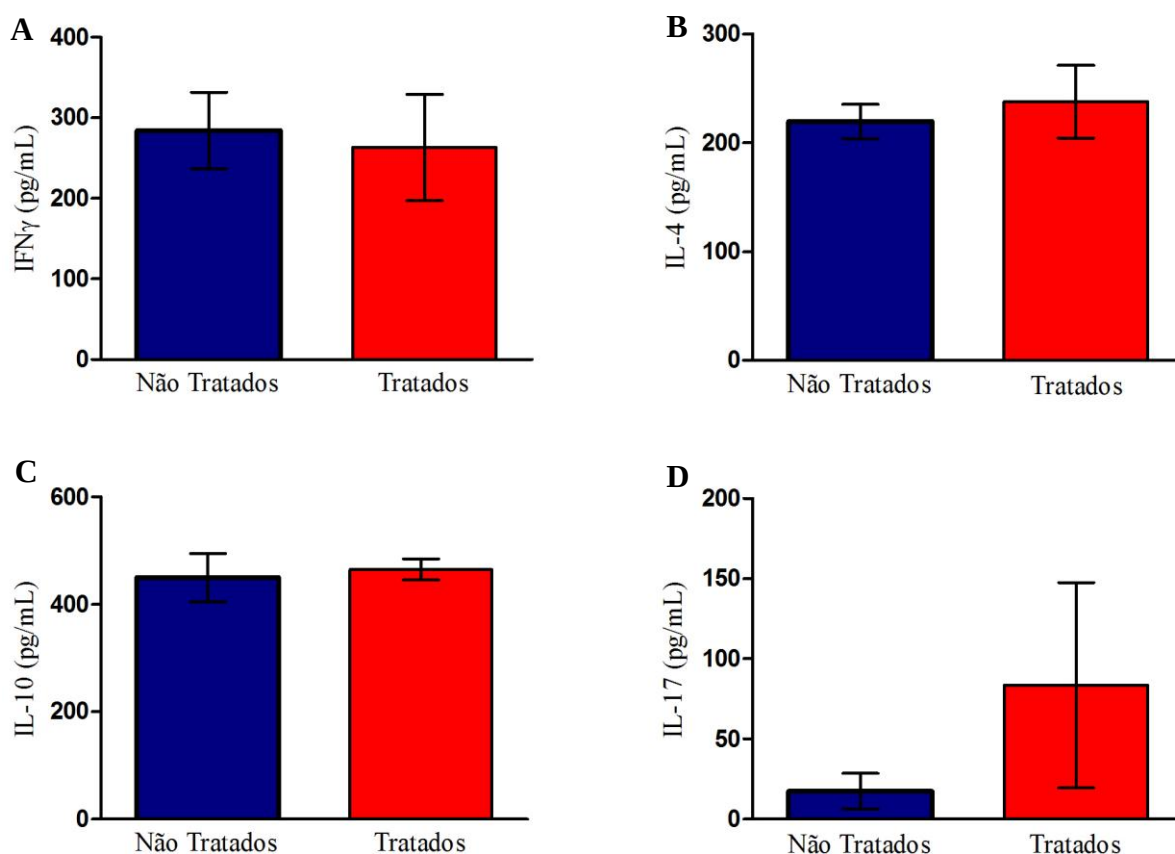


Figura 4.: **O tratamento com laser não altera a produção de citocinas.** Gráficos demonstrando a dosagem de citocinas por ELISA, extraídas do infiltrado inflamatório de animais BALB/c infectados com *Leishmania (leishmania) amazonensis* (MAB-6). Em A, dosagem de IFN γ ; Em B, dosagem de IL-4; Em C, dosagem de IL-10; Em D, dosagem de IL-17. Dados obtidos pela extração de citocinas do infiltrado inflamatório de cinco animais infectados e tratados e cinco animais infectados e não tratados. Foram feitas três ensaios de cada citocinas e todas as amostras foram dosadas em duplicatas.

5.2.2. PCR em tempo real

Após a análise dos dados foi possível observar que não houve diferença entre grupo tratado e não tratado em relação a expressão de mRNA para a síntese de IFN- γ , IL-4 e TNF- α , estes dados corroboram com nossos dados da dosagem por ELISA de IFN- γ e IL-4. Para a IL-17 é possível observar uma diferença no gráfico, porem não foi possível de

análise estatística, pois, apenas nos ensaios para animais tratados observamos amplificação anterior ao CT limite da técnica.

No entanto, para as citocinas IL-10, IL-13 e TGF- β houve um aumento nos animais tratados. Tais citocinas são conhecidamente relacionadas com propriedades anti-inflamatórias e regenerativas. Para TGF- β lesões previamente tratadas apresentaram média de expressão aproximadamente 3,2 vezes maior que lesões que não foram tratadas. IL-13 e IL-10 apresentaram média de expressão aproximadamente 3,3 vezes maior que as lesões que não receberam tratamento.

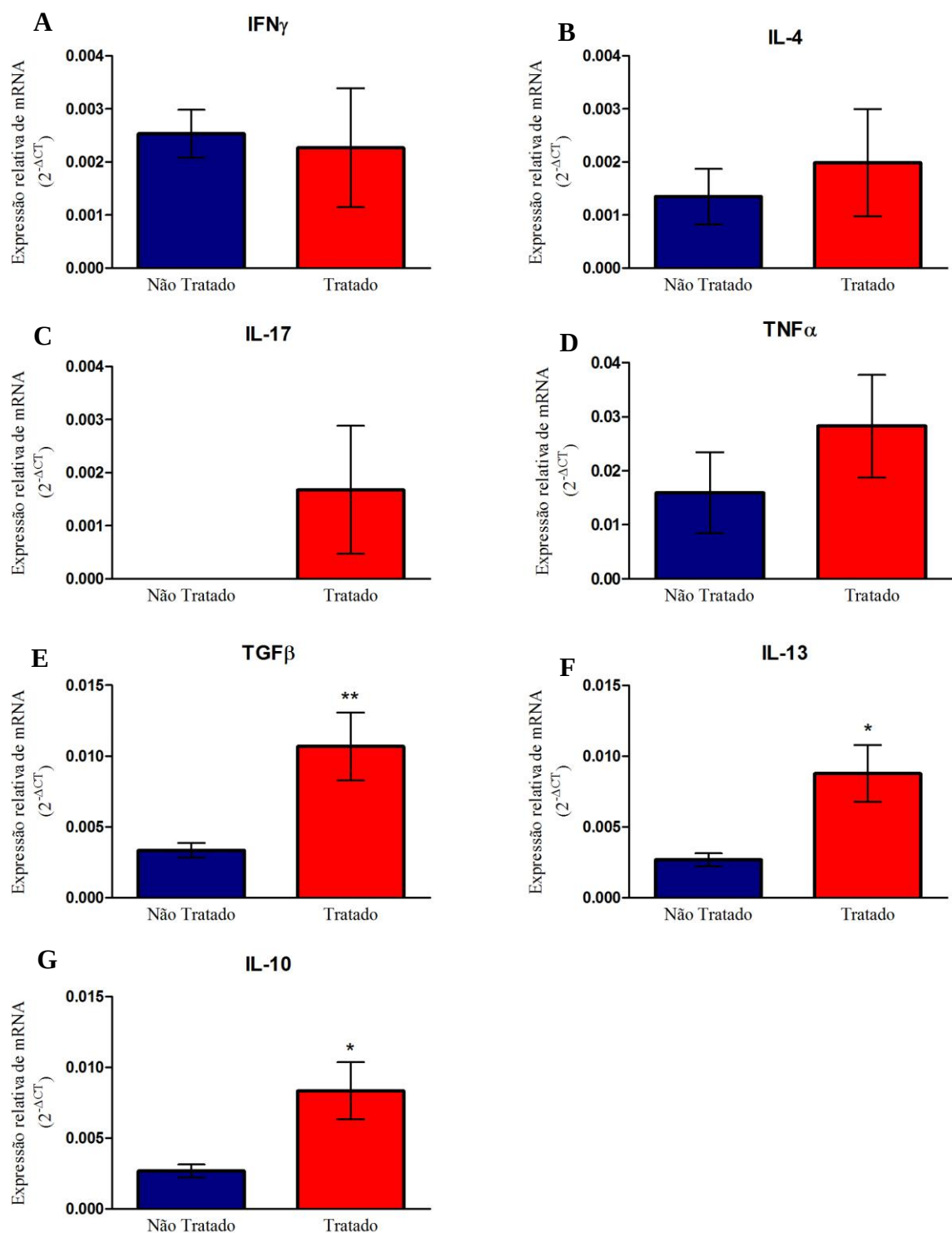


Figura 5.: LLLT aumenta a expressão de citocinas regulatórias e anti-inflamatórias em lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis*. Dados obtidos pela relação das expressões dos genes teste com o gene endógeno ($\beta 2$ -microglobulina). Foram testados pela PCR em tempo real seis amostras de RNA (cDNA) extraídos das lesões de animais não tratados e sete amostras extraídas de lesões de animais tratados, sendo que nestas estavam presentes amostras referentes a quatro experimentos distintos. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

5.3. EFEITO DO LASER DE 660NM SOBRE OS MACRÓFAGOS

Como os macrófagos são células abundantes no infiltrado inflamatório da lesão e podem apresentar perfis funcionais distintos, seria importante avaliar se o perfil de macrófago estaria sob influência do laser. Para tanto, foi realizada a quantificação de M2 *in vivo* e análises *in vitro* com macrófagos da linhagem RAW264-7 submetidos ou não ao laser em questão.

5.3.1. Quantificação de macrófagos (M2) na lesão

Assim, a partir da marcação imuno-histoquímica foi realizada a quantificação de células marcadas pelo anticorpo MP23 em cortes histológicos das patas com lesões ulceradas dos animais tratados e não tratados. Os dados demonstraram uma tendência à redução dos macrófagos M2 nos animais tratados quando comparados com o grupo que não recebeu a terapia. As fotomicrografias da marcação de macrófagos M2 pelo anticorpo MP23 sugerem a redução (Figura 6), contudo, a quantificação não confirmou a diferença entre os dois grupos (Figura 7). Entretanto, ressaltamos a alta variação entre indivíduos no grupo não tratado e a maior homogeneidade entre indivíduos tratados (barra de erro do Figura 7).

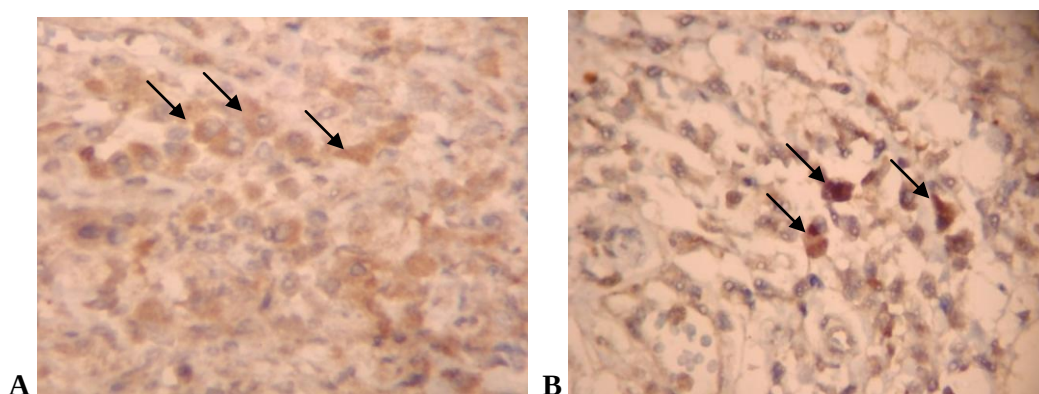


Figura 6: **Fotomicrografia de Imuno-histoquímica com marcação de M2.** Aumento de 40x. Em A corte histológico de lesões de animais não tratados e sacrificados ao fim de 5 dias, em B, corte histológico de lesões de animais tratados e sacrificados após o ultimo dia de tratamento. Nas setas, células marcadas com MP23, células M2.

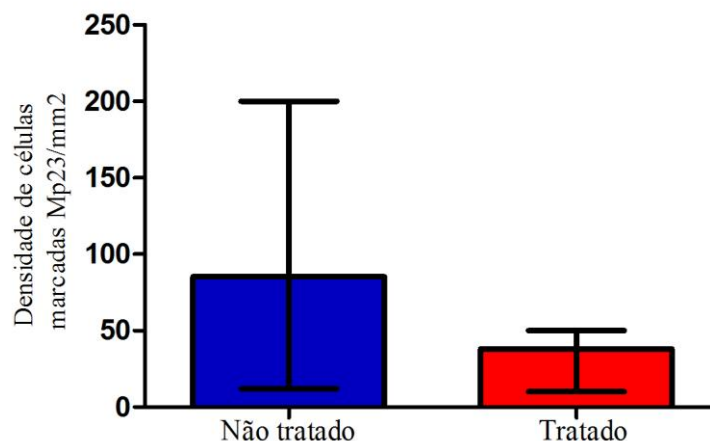


Figura 7.: **Semi-quantificação de macrófagos M2 em Imunoistoquímica.** Células marcadas com anticopo MP23 nas lesões de 5 animais tratados e sacrificados após o ultimo dia de tratamento com laser, e 5 animais não tratados e sacrificados ao fim de 5 dias. Mediana+/- interquartis.

5.3.2. Análise do efeito da LLLT in vitro na fagocitose e na atividade microbicida dos diferentes perfis de macrófagos

Para os experimentos *in vitro* as células RAW264-7 (linhagem de macrófagos murinos) foram previamente diferenciadas, para os perfis M1 ou M2, ou ainda, mantidos indiferenciados (M0). Para validar a diferenciação foi feita a dosagem de NO e IL-4 no sobrenadante das culturas. Na Figura 8 é possível observar que, como esperado, as células M1 foram capazes de produzir altos níveis de NO em detrimento das demais populações. Além disso, foi observado o aumento desta produção de NO por M1 após 48 horas quando comparado com o período de 24 horas.

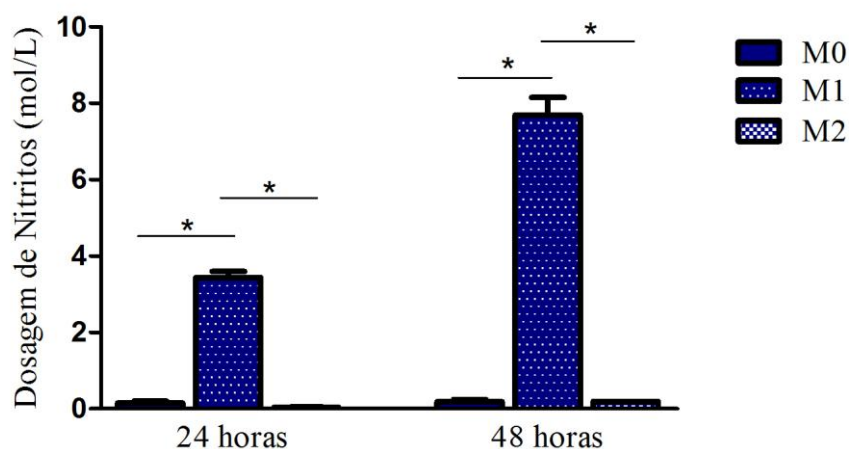


Figura 8.: **Produção de NO por macrófagos diferenciados em M1 e M2 e indiferenciados.** No primeiro grupo, a média aritmética da dosagem de NO após 24 horas de diferenciação, e no segundo grupo, a média aritmética dosagem de NO, 48 horas após a diferenciação. Dados resultantes de três experimentos diferentes, com todas as dosagens realizadas em duplicatas. *p<0,05.

A IL-4 foi detectada somente nas populações de macrófagos diferenciados para M2. A produção de IL-4 não se alterou após a estimulação com leishmania (M2 sem estímulo com dosagem média de 2,79 pg/mL e M2 com estímulo com dosagem média de 2,85). Não houve produção de IL-4 pelas células indiferenciadas tampouco pelas células M1 (Figura 9). A estimulação com *L. amazonensis* não induziu a produção desta citocinas nestas células.

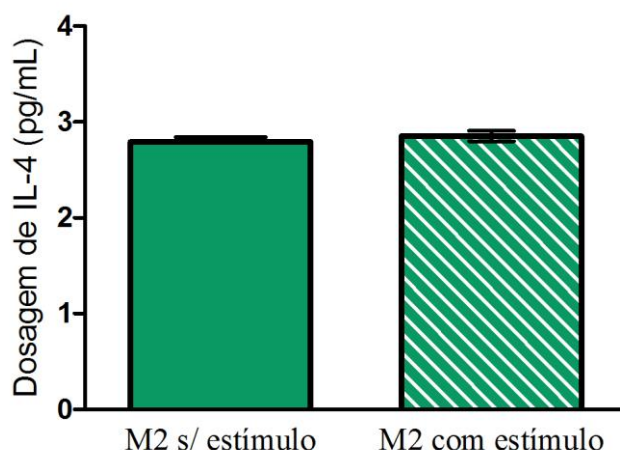


Figura 9.: **Dosagem de IL-4 em sobrenadantes de cultura de diferentes perfis macrófago.** No primeiro grupo, dosagem em sobrenadante de macrófagos diferenciados para o perfil M1 e M2 respectivamente sem estímulo, e no segundo dosagem em sobrenadante de cultura de macrófagos não diferenciados (M0) e diferenciados para M1 e M2 estimulados pela infecção com leishmania. Todas as dosagens foram feitas 24 horas após a diferenciação. Dados resultantes de dois experimentos diferentes e dosados em duplicatas. As dosagens de macrófagos M0 e M1, estimulados ou não foram indetectáveis, por isso no gráfico está representada apenas as dosagens de macrófagos M2. $p < 0,0005$ quando macrófagos diferenciados para M2 foram comparados com os grupos que não aparecem no gráfico, pois tiveram leitura igual a zero.

5.3.3. Fagocitose e atividade leishmanicida de macrófagos não diferenciados (M0) tratados com Laser

Para avaliar a possível ação do laser sobre macrófagos M0, não diferenciados, dosou-se o NO do sobrenadante das culturas de células que receberam ou não o tratamento, e ainda, na presença ou ausência de *Leishmania (leishmania) amazonensis* (MAB-6), que também poderiam estar previamente tratadas ou não. Nas culturas de macrófagos (tratados ou não) infectados (leishmania tratada ou não), foi avaliada a porcentagem de células infectadas bem como o número de amastigotas dentro de cada célula após 4 e 24 horas de infecção. Vale ressaltar que às 4 horas de infecção o sobrenadante de cultura foi lavado retirando os parasitos que ainda estavam no sobrenadante e não no interior das células. Portanto, se busca avaliar com os dados de 24 horas após a infecção, a atividade leishmanicida do macrófago e não mais a atividade fagocítica, pois esta será analisada às 4

horas de infecção, quando ainda haviam parasitos no sobrenadante, livres para serem fagocitados ou invadirem as células.

Foi observado que o laser não alterou o número de células infectadas 4 ou 24 horas após a infecção (Figura 10A).

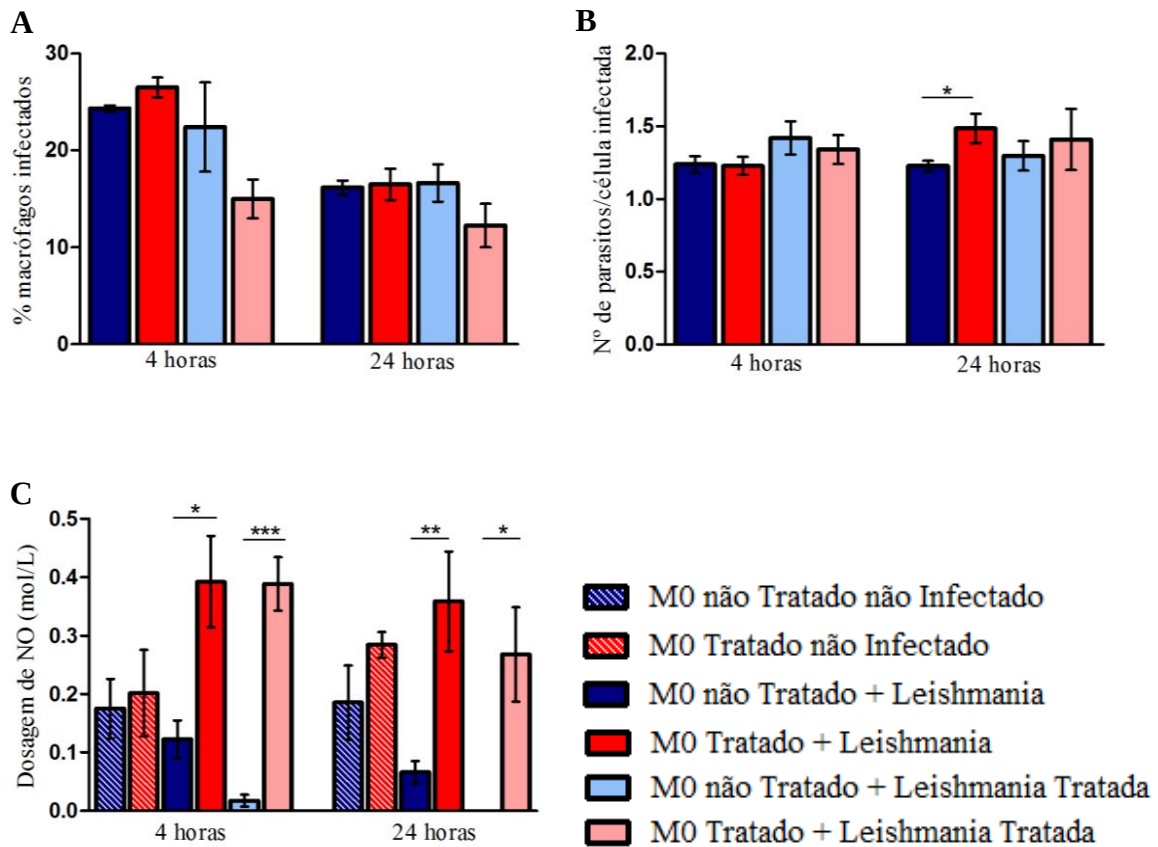


Figura 10.: **Influência da LLLT em culturas de macrófagos não diferenciados M0, e infectados ou não com Leishmania.** Em A, B, proporção do número de parasitos por célula infectada, às 4 e 24 horas. Os dados de A e B são resultantes de dois experimentos distintos. Em C, dosagem de NO dos sobrenadantes de cultura de macrófagos não diferenciados, avaliando a influência do tratamento com laser, sobre as células infectadas ou não, e sobre o parasito, às 4 e 24 horas após a infecção. Os dados de C foram resultantes de dois experimentos distintos com dosagens em duplicatas. A dosagem de NO do sobrenadante de cultura de macrófagos M0 não tratados e infectados com Leishmania tratada no tempo de 24 horas foi indetectável. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Nas primeiras 4 horas de infecção, foi possível observar que a produção de NO estava aumentada no sobrenadante de cultura apenas de células tratadas com o laser previamente e infectadas, independentemente do parasito também ter sido ou não previamente tratado (Figura 10C). Com 24 horas após a infecção este efeito se manteve mesmo com a descontinuidade do tratamento, pois o ultimo tratamento das células ocorreu antes da infecção, e mesmo na ausência ainda do estímulo (leishmania) no sobrenadante para a fagocitose. Mostrando que 24 horas após a infecção e ultima sessão de tratamento, o

efeito da LLLT na produção de NO por macrófagos M0, se mantém. E que o tratamento da leishmania não influencia a produção de NO pelo macrófago.

Além disso, estes dados demonstram que o efeito do tratamento com o laser em M0 são dependentes de estímulo, pois na ausência da leishmania não foram constatadas diferenças na produção constitutiva de NO nas células tratadas em nenhum dos dois períodos avaliados (Figura 10C). E, M0 não tratado e infectado mostraram uma produção de NO menor até mesmo que macrófagos não infectados, principalmente às 24 horas de infecção. Este efeito da leishmania foi ainda maior quando também foram tratadas com laser, pois reduziram ainda mais a produção de NO pelos macrófagos, chegando a indetectável às 24 horas após a infecção. Porém, este mecanismo da leishmania, mesmo que ampliado após o tratamento com laser, não foi observado quando os macrófagos também foram previamente tratados, pois estes foram capazes de produzir níveis normais de NO independente dos parasitos terem sido tratados ou não.

M0 tratados, após 24 horas de infecção e da interrupção do tratamento foram permissivos à proliferação de amastigotas, pois às 24 horas é possível observar um aumento do número de amastigotas por célula infectada (Figura 10B), e sabendo que o sobrenadante deste co-cultivo de células com leishmania foi lavado às 4 horas de infecção retirando-se os parasitos que ainda não haviam invadido as células. Entretanto, às 24 horas após a infecção estas células previamente tratadas, estavam mais estimulados à maior produção de NO (Figura 10C). Contudo, vale ressaltar que nos tempos de 4 e 24 horas, os níveis de NO obtidos nesta condição ainda são muito baixos quando comparados àqueles dosados no sobrenadante das células diferenciadas M1 (Figura 8).

Em resumo, a LLLT não influencia a fagocitose tampouco influencia na eliminação de leishmania no interior do macrófago M0. Porém a LLLT é capaz de aumentar a indução de NO em macrófagos M0. E quando a leishmania é tratada e invade o macrófago estas células reduzem sua capacidade de produzir NO. Mas, macrófagos tratados e co-cultivados com leishmania também tratadas não modifica a produção de NO. O laser, portanto pode aumentar a capacidade microbicida dos macrófagos com base na produção de NO.

5.3.4. Efeito do laser na fagocitose e atividade leishmanicida na população de macrófagos diferenciados para M1

O tratamento dos macrófagos M1 com laser aumentou a porcentagem de macrófagos infectados tanto em 4 quanto às 24 horas após a infecção (Figura 11A). Em 24 horas após a infecção a porcentagem de macrófagos infectados reduziu em todos os grupos de forma semelhante. No entanto, observou-se que macrófagos que foram previamente tratados permaneceram com maior porcentagem de células infectadas em comparação com os controles. Porém, não houveram diferenças no número de parasitos por célula infectada (Figura 11C), tampouco na produção de NO.

Foi observado também que macrófagos tratados, quando infectados, por 4 horas, com leishmania também tratada previamente com laser, produzem mais NO do que células M1 não tratadas e infectadas com leishmania tratada. Com 24 horas após a infecção este dado não foi observado (Figura 11C).

Em resumo, a LLLT melhora a capacidade fagocítica dos macrófagos M1, mas não tem influência nos mecanismos microbicidas destas células. No entanto, quando tanto macrófagos quanto parasitos são previamente tratados com laser há uma maior produção de NO.

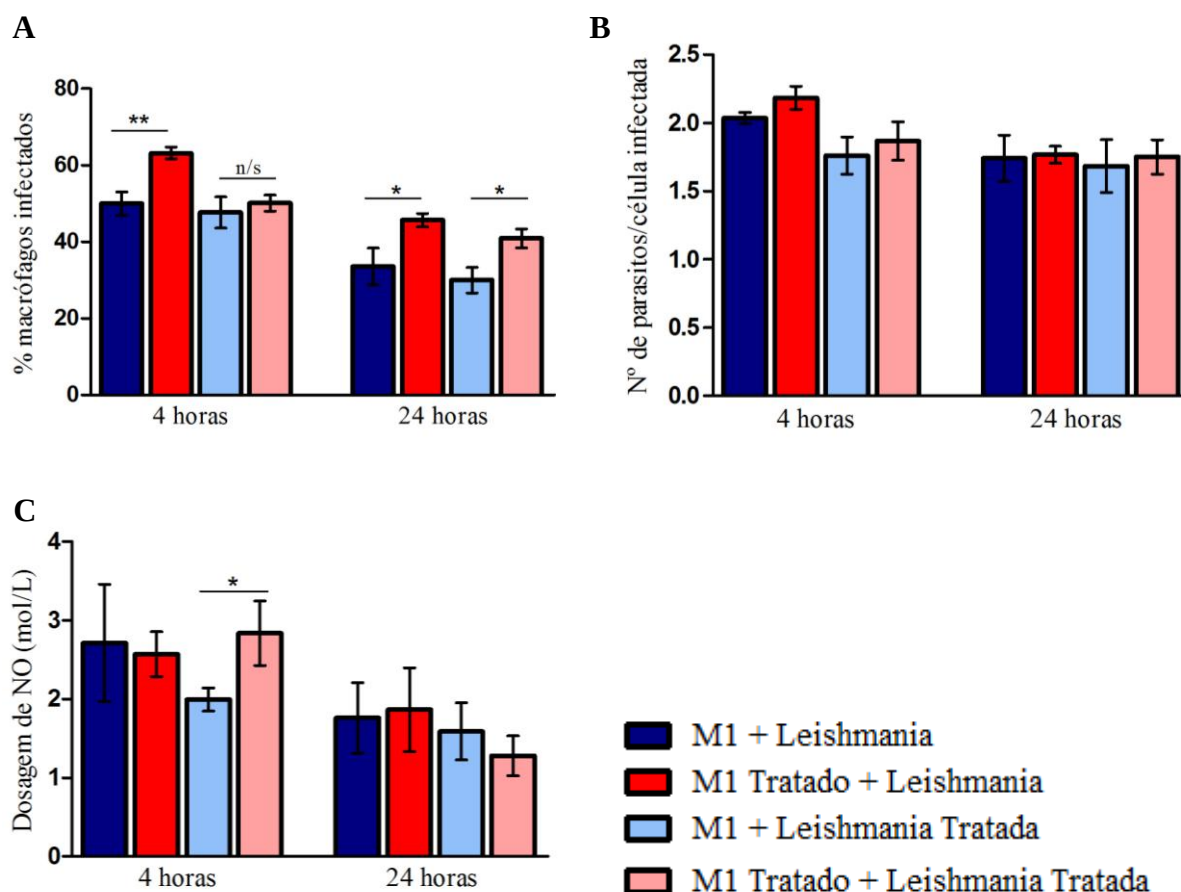


Figura 11: **Influência da LLLT em culturas de macrófagos M1, e infectados ou não com Leishmania.** Em A, influência do laser na função de fagocitose de macrófagos M1, às 4 e 24 horas, após a infecção com Leishmania tratada ou não. Em B, proporção do número de parasitos por célula infectada, às 4 e 24 horas. Os dados de A e B são resultantes de dois experimentos distintos. Em C, dosagem de NO dos sobrenadantes de cultura de macrófagos M1, avaliando a influência do tratamento com laser, sobre as células infectadas ou não, e sobre o parasito, às 4 e 24 horas após a infecção. Os dados de C foram resultantes de dois experimentos distintos com dosagens em duplicatas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n/s não significativo.

5.3.5. Fagocitose e atividade leishmanicida de Macrófagos Alternativamente Ativados (M2) tratados com Laser

Houve aumento significativo da porcentagem de macrófagos M2 infectados quando estes macrófagos foram previamente tratados com laser após 4 horas de infecção. E 24 horas após a infecção essa porcentagem de células previamente tratadas e infectadas diminuiu. A porcentagem de M2 infectados reduz quando a infecção se dá por leishmanias tratadas com o laser (Figura 12A).

Quanto à produção de NO, observou-se que as células previamente tratadas com laser produziram mais NO quando infectadas com leishmania tratada ou não tratadas em 4

horas de infecção. No entanto, com 24 horas após a infecção os M2 tratados mostraram claramente (Figura 12A) a atividade leishmanicida destes macrófagos pela redução da porcentagem de macrófagos infectados, somada à diminuição também do número de amastigotas no interior de macrófagos infectados (Figura 12B) e à maior produção de NO por estes macrófagos às 4 horas de infecção. Neste tempo então estes fagócitos produzem mais NO e começam a eliminar os parasitos intracelulares, e como consequência da imunidade celular, também morrem, por isso diminui o número de células infectadas.

Em macrófagos M2 o efeito do laser sobre a produção de NO, é transitório, pois às 24 horas todos os grupos passam a produzir doses semelhantes de NO independente de terem sido tratados ou não.

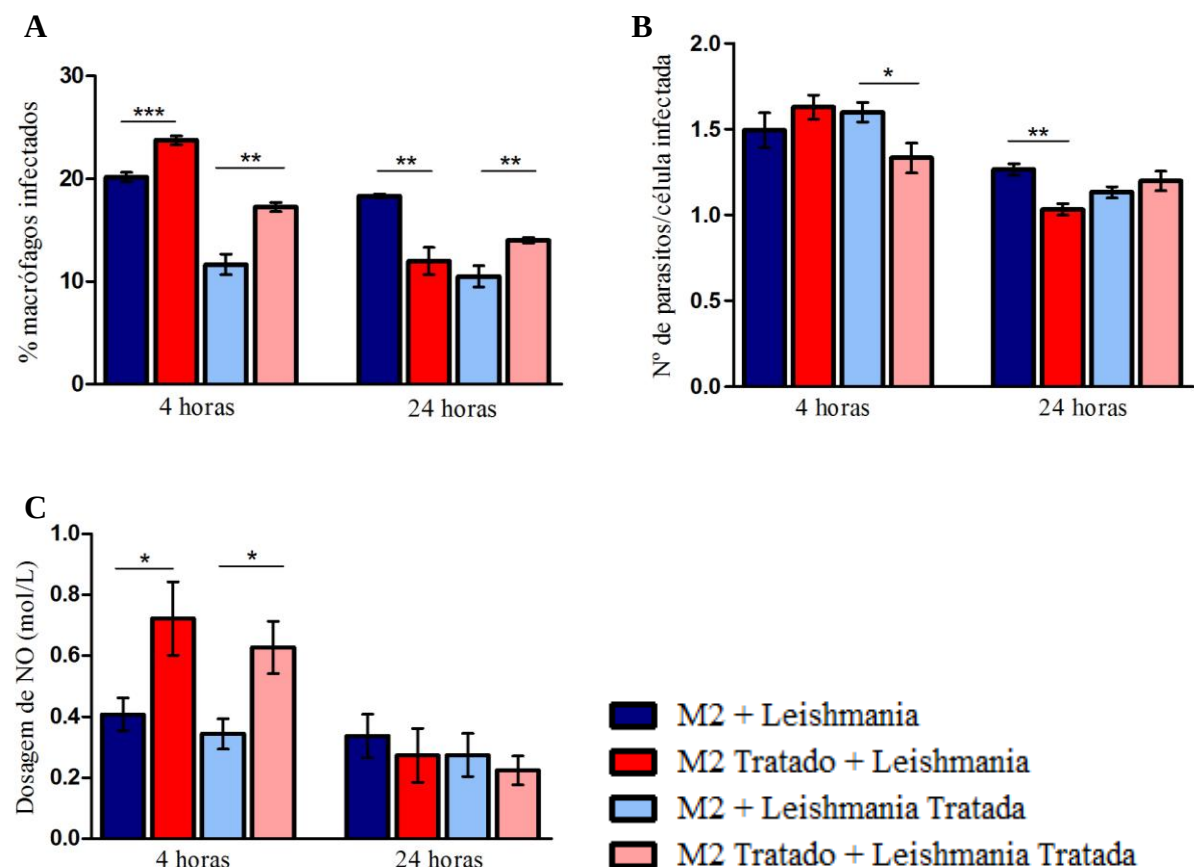


Figura 12.: **Influência da LLLT em culturas de macrófagos M2, e infectados ou não com Leishmania.** Em A, influência do laser na função de fagocitose de macrófagos M2, às 4 e 24 horas, após a infecção com Leishmania tratada ou não. Em B, proporção do número de parasitos por célula infectada, às 4 e 24 horas. Os dados de A e B são resultantes de um experimento representativo. Em C, dosagem de NO dos sobrenadantes de cultura de macrófagos M2, avaliando a influência do tratamento com laser, sobre as células infectadas ou não, e sobre o parasito, às 4 e 24 horas após a infecção. Os dados de C foram resultantes de dois experimentos distintos com dosagens em duplicatas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Após as 24 horas de infecção, o número de células infectadas diminui significativamente com relação às 4 horas de infecção, mas isso ocorre principalmente com as células que foram tratadas. E há diferença significativa da diminuição da quantidade de células até mesmo entre os grupos no tempo de 24 horas pós-infecção. Ou seja, macrófagos tratados com laser antes da infecção, quando são infectados são capazes de fagocitar mais e melhor, pois são capazes de eliminar o parasito intracelular, pois aumentam sua produção de NO, após 24 horas de infecção é possível observar a diminuição do numero de amastigotas por células e também do número de células infectadas. O valor de NO, em culturas de macrófagos não tratados, mantém os mesmos níveis com 24 horas de infecção, porém macrófagos tratados diminuem os níveis de NO no sobrenadante de cultura.

5.3.6. Efeito do tratamento com laser após a infecção de macrófagos M1 com *Leishmania amazonensis*

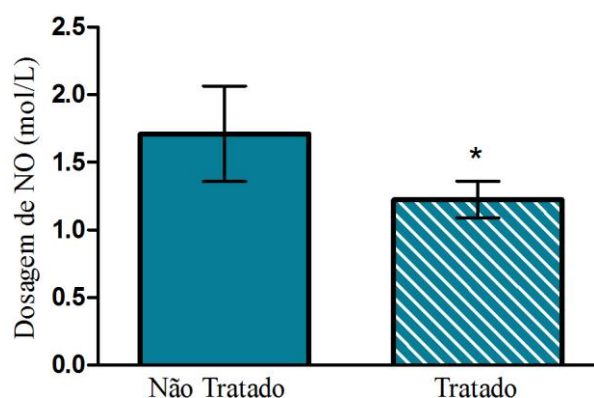


Figura 13.: **LLLT sobre macrófagos M1 infectados com *Leishmania* inibe a produção de NO.** Os dados foram obtidos 12 horas após o ultimo (de três) tratamento, e são resultantes de dois experimentos distintos, com dosagem em duplicatas. *p<0,05.

Foi vista redução da produção de NO por macrófagos M1 tratados, após 24 horas de infecção (12 horas da ultima sessão de tratamento) (Figura 13).

5.3.7. Efeito do tratamento com laser após a infecção de macrófagos M2 com *Leishmania amazonensis*

A LLLT foi capaz de aumentar a produção de NO por macrófagos M2 infectados com *L. amazonensis*, após 24 horas de infecção, sendo que a ultima sessão de tratamento ocorreu 12 horas antes da dosagem.

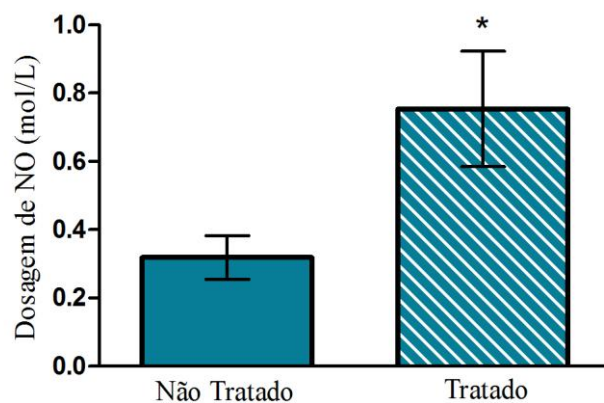


Figura 14: **LLLT sobre macrófagos M2 infectados com Leishmania estimula a produção de NO.** Todos os dados foram obtidos 12 horas após o ultimo (de três) tratamento. Todos os dados são resultantes de dois experimentos distintos, com dosagens em duplicatas. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O aumento do uso de fototerapias, principalmente na dermatologia, fisioterapia e odontologia, despertou o interesse sobre os mecanismos biológicos induzidos pelos LLL incluindo a possível ação microbicida destes (Baptista & Wainwright 2011; Farkhutdinov & Farkhutdinov, 2007). Assim, o presente trabalho testou a hipótese de que a terapia com laser de baixa potência (LLLT) interfere positivamente na cicatrização de lesões ulceradas na leishmaniose experimental. Com a parcial comprovação desta hipótese, buscou-se averiguar o mecanismo pelo qual o laser influenciaria para levar à cicatrização destas lesões causadas pela infecção com a leishmania.

Dados anteriores obtidos pelo nosso grupo mostraram que o laser foi capaz de reduzir o edema no local da lesão, e acelerou o processo de cicatrização da lesão causada pela leishmania. Na análise histopatológica, lesões tratadas com o laser mostraram o infiltrado inflamatório reduzido, com deposição de fibras de colágeno dispostas de forma organizada em regiões com restauração epitelial. Estes dados demonstram que, não apenas macroscopicamente, mas, histologicamente, o laser melhora o aspecto da lesão, podendo contribuir para a aceleração da cicatrização. Dados como redução do edema e infiltrado inflamatório, aceleração do processo de cicatrização, bem como deposição eficiente de colágeno na matriz extracelular do infiltrado inflamatório já foram semelhantemente descritas anteriormente empregando a laserterapia em lesões cutâneas de outras etiologias, com o mesmo comprimento de onda e dose, ou em doses menores de laser. Contudo, estes trabalhos utilizaram fotosensibilizadores no momento ou anteriormente a aplicação do laser (Silveira et al. 2011; Gonçalves et al. 2013; Novaes et al. 2014). Neste trabalho, não podemos afirmar que o laser de 660nm leva à cicatrização das lesões na leishmaniose cutânea experimental, pois, para tanto seria necessário o acompanhamento destas lesões tratadas até a completa re-epitelização. Mas, a melhora das lesões associada aos dados prévios da histopatologia demonstram que o laser é benéfico e que, provavelmente as lesões tratadas fechariam mais rapidamente devido a uma aceleração do processo de cicatrização. Como todo o processo de cicatrização está associado à produção diferencial de citocinas buscamos na análise proteica e gênica das mesmas, um respaldo molecular para os eventos biológicos apresentados.

A expressão diferencial de citocinas é essencial no processo de cicatrização, caracteriza as diferentes fases deste processo. A dosagem, por ELISA, de citocinas

extraídas do tecido da lesão, as quais estão envolvidas em cada perfil de linfócitos que poderiam estar presentes na fase inflamatória da cicatrização, não mostrou nenhuma diferença entre animais tratados e não tratados. Este resultado entretanto, deve ser validado por outra técnica como o western blot, por exemplo, pois, a padronização de extração de citocinas teciduais é muito complexa e apresenta muitas variações nos protocolos (Kaur et al., 2015; Yang et al., 2013; Freitas et al., 2014). Contudo, a análise de transcritos por PCR em tempo real mostrou diferenças devido ao tratamento. A maior quantidade de transcritos para citocinas de perfil anti-inflamatório ou supressor e, regenerativas nos animais tratados mostraram que diante de um complexo inflamatório causado pelo parasito, a laserterapia induziu a produção de citocinas que levavam à regeneração. Esses dados foram semelhantes aos já encontrados por outros autores (Oton-Leite et al., 2015). Dessa forma, infere-se que lesões de animais que receberam o tratamento com laser estavam mais sujeitos à cura e cicatrização.

Bourreau e colaboradores (2003) demonstraram em lesões cutâneas de LTA a citocina antinflamatória (ou, de perfil Th2) mais secretada é a IL-13. Isso pode justificar, o motivo de não termos encontrado maior expressão gênica de IL-4 e sim de IL-13 no infiltrado inflamatório da lesão. A IL-13, igualmente à IL-4, modula o macrófago para o perfil M2a, pois ambas possuem o mesmo receptor, e ativam STAT6 do mesmo modo. Portanto, podemos inferir que no sítio de infecção a maior expressão gênica de IL-13 em lesões tratadas com laser poderia levar a modulação de macrófagos para o perfil M2. Além disso, não foi observada diferenças na expressão gênica de IFN γ , que ocasionalmente poderia estar modulando os macrófagos pra o perfil M1.

Além de IL-13, pela PCR em tempo real, foram observados também o aumento de IL-10 e TGF- β em lesões tratadas. A IL-10 é responsável pela regulação da resposta imune, pois é uma citocina inibidora potente da resposta modulada por linfócitos Th1, além de contribuir para a diferenciação de macrófagos para o perfil M2c. Portanto, a IL-10 é fundamental para evitar uma resposta Th1 exacerbada, diminuir o dano e iniciar a reparação tecidual (Martinez & Gordon, 2014; O'Garra et al., 2004). Em estudos anteriores, também há relatos de que a IL-10 regula a produção de citocinas pró-inflamatórias (Oliveira et al., 2014), o que corrobora nossos dados, pois, vimos um aumento na expressão de IL-10 e TGF- β , mas não temos aumento na produção de IFN γ nem IL-17.

O TGF- β é o principal mediador das células Treg, sendo um potente supressor da atividade de células imunes ativadas. Contudo, em lesões teciduais, esta citocina também pode apresentar-se como inflamatória e está presente em todas as fases da cicatrização de feridas. A secreção de TGF- β por queratinócitos, plaquetas e macrófagos é estimulada no início da lesão e, neste momento exercerá um papel inflamatório quimiotático. Além disso, a expressão desta molécula está associada à contração da ferida e ao equilíbrio entre M1 e M2, dependendo da fase do processo de cicatrização. Em um modelo de diabetes induzida, ocorre deficiência na cicatrização de lesões, neste caso foi observada a ausência de TGF- β , que acarretou na redução do número de M2 (Okizaki et al., 2015). O TGF- β é uma importante citocina para a cicatrização, pois leva à formação do tecido de granulação e à remodelação tecidual.

Sabe-se que a LLLT no tratamento de lesões de pele tem efeitos sobre a produção e maturação de colágeno, sobre a proliferação de células mesenquimais, sobre a melhora dos sinais da inflamação, incluindo dor e edema (Lins et al. 2010; Peplow et al. 2010; Avci et al. 2013; Beckmann et al. 2014). Entretanto, permanecem ainda desconhecidos os mecanismos completos destes efeitos biológicos. Sabe-se que o laser de baixa potência leva à estimulação de fotorreceptores mitocondriais (Lins et al. 2010; Avci et al. 2013) levando ao aumento dos seus produtos, como ATP, NADH, proteínas e microRNA (Passarella, 1984; Karu, 1999). Alguns autores acreditam que a luz monocromática vermelha, principalmente, induz a regulação positiva da respiração celular tornando as células mais ativas (Greco, 1989). Porém, permanece a dúvida se em todos os tipos celulares o laser influencia da mesma maneira.

Os macrófagos são as principais células do sistema fagocítico humano e são as células que a leishmania infecta. Por estes motivos, estas células são responsáveis também pela eliminação do parasito e controle da infecção (Alexander & Russell, 1992; Liew et al., 1990; Green et al., 1991). Em nosso estudo, foram quantificadas as células marcadas com o anticorpo MP23 que se liga ao receptor CD301 (mMGL- lectina específica para galactose/Nacetilgalactosamina). Este receptor é considerado um dos possíveis marcadores de macrófagos M2, pois, sua expressão foi associada à estimulação por IL-4 e IL-13 (Raes et al., 2005). Nossos resultados apresentaram um grande desvio padrão nas quantificações, por isso não foi possível na análise estatística constatar uma diferença significativa entre os grupos. Apesar disso, estes resultados sugerem a redução de células marcadas com MP23 no infiltrado inflamatório das lesões tratadas com o laser. Contudo, é válido salientar que

um estudo de 2006, utilizando animais nocaute para receptor de IL-4 e IL-13 demonstraram que o CD301 pode ser estimulado em macrófagos mesmo na ausência do estímulo destas citocinas, apenas na presença de fatores de crescimento oriundo do ambiente dermal (Dupasquier et al., 2006). Assim, novas marcações são necessárias para outros marcadores de macrófagos M2 para validar os nossos resultados. Além disso, não realizamos marcações para moléculas específicas para M1. Apesar destas ressalvas quanto ao M2 no infiltrado das lesões tratadas nosso estudo anterior mostrou que deposição de colágeno nas patas tratadas em comparação com aquelas que não receberam o tratamento foi mais organizada e ocorreu nas regiões esperadas.

Para avaliação da LLLT sobre comportamento funcional de cada perfil de macrófagos, *in vitro*, utilizamos macrófagos murinos da linhagem RAW264,7. Inicialmente, padronizamos a diferenciação destas células em M1 e M2. Como esperado, macrófagos diferenciados com LPS e IFN γ apresentaram alto níveis de NO em detrimento dos macrófagos M2 e daqueles não diferenciados, os M0. Por outro lado, a secreção de IL-4 só foi observada em M2. Estes dados apenas serviram de confirmação da diferenciação.

Os macrófagos recrutados por quimiocinas e recém-chegados no sítio de infecção, ou no local da lesão, também chamados de monócitos/macrófagos são considerados, ainda, indiferenciados (M0). Nossos dados mostraram que, pelo menos *in vitro*, estes M0 não apresentaram alteração quanto à capacidade fagocítica pela incidência do laser. No entanto, os níveis de NO, nestes macrófagos, foram maiores que naqueles que não foram tratados previamente à exposição ao parasita. Portanto, o laser parece estar influenciando positivamente na via do óxido nítrico quando estimulado com a presença da leishmania, pois, sem o estímulo do parasito a produção de NO não foi alterada pelo laser. Este fato sugere que o laser tem uma ação de amplificação da via do NO, iniciada pelo reconhecimento dos PAMPs, neste caso de leishmania por macrófagos M0.

Em macrófagos M1 e M2 o índice de fagocitose por macrófagos previamente tratados com laser aumenta com relação aos não tratados. A morte parasitária intracelular também aumenta tanto em M1 quanto em M2 tratados. Para macrófagos M2 esta morte pode ser justificada pelo aumento concomitante da produção de NO por estas células previamente tratadas. Entretanto, não foi observado este aumento em macrófagos M1, provavelmente, pois estes macrófagos já produzem níveis altos de NO, talvez o limiar biológico, por isso a morte intracelular destes parasitos pode ser atribuída a outros fatores em macrófagos M1 e não apenas à NO. Entretanto, podemos observar que há uma

diferença na produção de NO por macrófagos M1 normais daqueles que foram tratados previamente com laser e ambos infectados com leishmania também tratadas. Estes macrófagos tratados são capazes de produzir mais NO que aqueles não tratados, por razões que discutiremos mais à frente.

Contudo, podemos inferir que independentemente se os macrófagos foram ou não diferenciados, e se foram tanto para M1 quanto para M2 todos eles, quando tratados com o laser, são estimulados à produção de NO. Estes resultados corroboram os dados da literatura de que o laser induz a produção de ROS por macrófagos (Karu et al., 2005; Ahn et al., 2014). Entretanto, quando macrófagos M1 e M2 foram tratados após a infecção, 12 horas depois da última sessão de tratamento, M1 apresentou redução e M2 aumento na produção de NO quando comparados com os respectivos controles não tratados. Ressalta-se que os níveis de NO dos macrófagos M1 em todas as condições experimentais sempre foi muito mais elevado do que aqueles registrados no sobrenadante de M2. Dessa forma, apesar do efeito estimulador do laser, macrófagos M2 ainda possuem uma atividade dependente de NO aquém daquela observada e esperada para M1.

A influencia da LLLT sobre M1 e M2 infectados com leishmania na produção de NO foi oposta nos diferentes perfis de macrófagos. M2 apresentou-se estimulado à produção de NO quando tratado após a infecção com leishmania. Neste caso podemos inferir que o laser teve influencia na modulação deste macrófago nestas primeiras fases da infecção. Enquanto que M1 apresentou redução na produção de NO quando tratado após a infecção, provavelmente neste caso a influencia da leishmania é maior que a influencia do laser sobre o perfil do macrófago.

A leishmania desenvolveu ao longo de vários anos de relação parasitária com os seus hospedeiros intermediários, mecanismos adaptativos que visam sua sobrevivência no interior dos macrófagos. Um destes mecanismos adaptativos que a leishmania é capaz e a inibição da produção de NO, interferindo na produção de IL-12 e de vias apoptóticas do macrófago. Assim, as formas amastigotas conseguem sobreviver e se reproduzir no interior do macrófago (Balestieri et al., 2002; Almeida et al., 2012; Calegari-Silva et al., 2009; Olivier et al. 2005). Em nosso estudo, foi possível observar este mecanismo sobretudo em macrófagos M0 e M2 não tratados. Estes ao serem infectados com leishmania apresentaram decréscimo na produção de NO. O mesmo não ocorre em M1, uma célula cuja produção de NO é bem mais relevante.

De acordo com Almeida et al (2012), a capacidade da leishmania de inibir a produção de NO pelo macrófago pode ser espécie-específico. Ainda, estes autores observaram que *L. amazonensis* não teria essa capacidade inibitória. Entretanto, quando o isolado MAB-6 de *L. amazonensis* foi previamente tratada com o laser, e posteriormente colocado em cultura com os macrófagos, independente do perfil de macrófago, a produção de NO foi menor do que a dos macrófagos infectados com parasitos não tratados.

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que o tratamento direto da leishmania com o laser tem efeito estático no crescimento das mesmas. E quando analisou-se a atividade mitocondrial destes parasitos tratados viu-se uma maior atividade mitocondrial. Assim podemos inferir com base nos nossos dados anteriores e com base nos dados de produção de NO deste trabalho (Figuras 10C, 11C e 12C) que o laser amplifica esta capacidade inibidora do parasito ao macrófago de produzir NO, por um mecanismo ainda desconhecido. Provavelmente este mecanismo também poderá justificar a menor capacidade dos macrófagos M2 em fagocitar estes parasitos tratados. Ademais a influência que o laser tem sobre a mitocôndria da leishmania, como foi visto por nosso grupo anteriormente, pode justificar a redução da produção de NO por macrófagos infectados com leishmanias tratadas, já que o tratamento pode desenvolver este mecanismo adaptativo do parasito.

No entanto, qualquer que seja o mecanismo que o laser induziu na leishmania, ele não foi observado quando os macrófagos foram previamente tratados. Os macrófagos tratados mantiveram sua capacidade fagocítica e a atividade leishmanicida mesmo na presença das leishmanias tratadas. Ou seja, o tratamento do macrófago com o laser antes da infecção amplifica funções tidas como características de M1. Contudo, vale ressaltar que o efeito do laser parece ser de pouca duração, transitório, pois, com 24 horas os níveis de NO tendem a ser mais baixos do que em 4 horas.

Neste modelo *in vitro* macrófagos M1 tratados foram mais capazes de fagocitar. Na produção de NO não houve diferença entre tratados e não tratados. O laser parece não afetar, pois, macrófagos M1 já produzem grandes quantidades de NO, provavelmente o limite da produção biológica, não sendo possível a amplificação. Já nos macrófagos M2 como a produção já é baixa, o laser pode amplificar a produção de NO. É importante salientar que este aumento da produção de NO pelo M2 são níveis muito baixos. O que se pode inferir sobre esta estimulação de produção de NO por um macrófago M2 é muito limitado. Obviamente, se faz necessária uma análise muito mais profunda quanto a estes

mecanismos, e o que este aumento poderia ser efetivo no sítio de infecção. Vale ressaltar também, que macrófagos M2 após a interrupção do tratamento voltam ao seu perfil natural e reduzem sua produção de NO (24 horas após a infecção).

Com relação às análises da influência da LLLT sobre macrófagos já infectados com *Leishmania*, podemos inferir então que naqueles macrófagos M1 a influência da leishmaniose com seu mecanismo de escape pode ter sido mais relevante, já que M1 é um produtor expressivo de NO. Enquanto que M2 que teoricamente, não produziria NO, não sofreu imediatamente após a infecção, com a ação deste mecanismo adaptativo da leishmaniose, e assim a ação do laser na estimulação da produção de NO se sobressaiu. Apesar de ainda não sabermos ao certo quais são estes mecanismos tanto do laser em estimular produção de NO, tampouco da leishmaniose em inibir, estas são inferências que podemos fazer com base nos dados deste trabalho.

Em alguns estudos que testaram a ação do laser sobre lesões de LTA cutânea já realizados em humanos (Gardlo et al. 2003; Asilian & Davami 2006; Evangelou et al. 2011) e experimentalmente em animais (Barbosa et al, 2012), foram observados a redução e até a eliminação do parasito das lesões. Nestes estudos, porém foram usados fotossensibilizadores antes do tratamento, o que não foi utilizado neste estudo. Porém, dados já obtidos por nosso grupo mostraram a redução de parasitos no infiltrado inflamatório das lesões que foram submetidas ao tratamento.

O perfil de citocinas avaliado pela expressão gênica de cada uma delas, por PCR em tempo real, juntamente com nossos estudos de cada perfil de macrófagos *in vitro*, nos ajuda a entender a influência do laser sobre a lesão *in vivo*. Sabe-se que na lesão *in vivo* coexistem M0, M1 e M2. Nos ensaios *in vitro* de macrófagos, vimos que macrófagos M2 e M0 são modulados a produção de NO quando estimulados pela luz monocromática do laser. Estes macrófagos tornam-se mais ativos tanto para a fagocitose quanto para a produção de NO e atividade leishmanicida. Portanto, a estimulação do laser sobre M0 e M2 somada com a produção de NO pelo M1, podem levar a eliminação dos parasitos.

Aparentemente, o laser exacerba as funções inflamatórias *in vitro* principalmente, quando age especificamente sobre macrófagos isolados. Contudo, na análise do perfil da expressão gênica de citocinas extraídas do infiltrado inflamatório de camundongos tratados com o laser vemos que a expressão de citocinas anti-inflamatórias e regulatórias está aumentada. Dessa forma, pensando na cinética do processo de cicatrização *in vivo* e,

extrapolando nossos dados *in vitro* para o modelo experimental, podemos sugerir que o laser de 660nm quando atua no início da lesão onde há maior recrutamento de macrófagos teria uma ação de contenção do parasita, pois aumentaria a produção de NO e a atividade microbicida independente do perfil. Dessa forma, o tempo da fase inflamatória seria reduzido. As demais fases aconteceriam precocemente, o que explicaria o aumento da expressão gênica das citocinas envolvidas no processo de remodelação e contração da lesão, já que o ponto temporal avaliado coincide com o início do fechamento da lesão pós-tratamento. Isso explica o porquê do fechamento das lesões tratadas mais rapidamente e a diminuição do edema e infiltrado inflamatório local.

7. CONCLUSÃO

Portanto, o laser de 660 em lesões de animais BALB/c causadas por *Leishmania (leishmania) amazonensis* foi capaz de reduzir o edema e melhora a aparência da lesão ao fim do tratamento. A quantificação de macrófagos M2 marcados pelo anticorpo MP-23 por imuno-histoquímica não foram conclusivos. Assim, são necessárias marcações mais específicas para macrófagos M2, e realizar macacão de macrófagos M1.

A identificação do perfil de citocinas secretadas no infiltrado inflamatório por ELISA não demonstrou nenhuma diferença entre lesões tratadas e não tratadas. Entretanto, esta técnica deve ser aperfeiçoada ou ainda, buscar técnicas mais sensíveis de identificação de citocinas, alternativas ao ELISA. Contudo, a análise de transcritos por PCR em tempo real mostrou que o laser estimula a expressão gênica de citocinas antiinflamatórias e regenerativas como a IL-13, TGF β e IL-10. Por isso, concluímos que lesões que receberam o tratamento com o laser estavam mais sujeitas à cura e cicatrização.

Macrófagos murinos da linhagem RAW264,7, diferenciados para os perfis M1 e M2 previamente tratados e infectados apresentaram um número maior de células com capacidade fagocitítica e de eliminação do parasito intracelular. Isso deveu-se à maior capacidade destes macrófagos após o tratamento de produzirem NO, inclusive os macrófagos que não foram diferenciados também se observou esta estimulação.

Leishmanias quando tratadas com o laser, cocultivadas com macrófagos e fagocitadas, inibem a produção de NO pelo macrófago. Entretanto quando o macrófago também é tratado previamente este efeito não é percebido.

Macrófagos M1 quando infectados com leishmania *in vitro* e posteriormente tratados apresentam uma redução na produção de NO, porém, macrófagos M2 quando infectados e posteriormente tratados apresentam um efeito mais positivo aumentando sua produção de NO. Nestes grupos será necessária análise por mais tempo após o tratamento, e com o tratamento mais prolongado e diário, para confirmar se o efeito observado foi decorrente do tratamento ou da infecção.

Em resumo, este estudo mostrou que o laser quando aplicado sobre lesões ulceradas, causadas por leishmania em camundongos estimulam a expressão de citocinas antiinflamatórias e reguladoras, tendendo a cicatrização. Porém, quando aplicado sobre uma infecção recente, como foi mimetizado *in vitro* neste estudo o laser é capaz de estimular os macrófagos à fagocitose, bem como à produção de NO para a eliminação do parasito.

REFERÊNCIAS

- Ahn, K.B., Kang, S.S., Park, O.J., Kim, T.I.. Irradiation by gallium-aluminum-arsenate diode laser enhances the induction of nitric oxide by *Porphyromonas gingivalis* in RAW 264.7 cells.. *J Periodontol*. Sep;85(9):1259-65. doi: 10.1902/jop. 2014.130744. Epub 2014 Feb 28. 2014.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015. 2006.
- Alexander, J., Russell, D.G.. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol*;31:175-254. 1992.
- Almeida, T.F., Palma, L.C., Mendez, L.C., Noronha-Dutra, A.A., Veras, P.S.. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunol*. Oct;34(10):492-8. 2012.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L.. Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages. *J Immunol Methods*. 375(1-2): 196-206. 2012.
- Andrade, A.G., Lima, C.F., Albuquerque, A.K.B.. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. *Rev Bras Queimaduras*; 9(1):21-30. 2010.
- Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Gollob, K.J.. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*;136:341–8. 2004.
- Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., Gollob, K.J.. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*; 101:226–30. 2005.
- Ashutosh, P.; Sundar, S.; Goyal, N.. Molecular mechanism of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med. Microbiol*. 56: 143-153, 2007.
- 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. *Clin Exp Dermatol*. Sep;31(5):634-7. Epub 2006 Jun 15. 2006.

Avci, P., Gupta, A., Sadasivam, M., Vecchio, D., Pam, Z., Pam, N., Hamblin, M.R.. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg.* ;32(1):41-52. Review. 2013.

Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Carvalho, E.M.. Upregulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection & Immunity* 70: 6734-6740. 2002.

Bacellar, O., Faria, D., Nascimento, M., Cardoso, T.M., Gollob, K.J., Dutra, W.O., Scott, P., Carvalho, E.M.. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infection Diseases* 200(1): 75-8. 2009.

Bafica, A., Oliveira, F., Freitas, L. A., Nascimento, E. C., Barral, A.. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *International Journal of Dermatology* 42(3): 203-7. 2003.

Balestieri, F.M., Queiroz, A.R., Scavone, C., Costa, V.M., Barral-Netto, M., Abrahamsohn, I. de A.. *Leishmania (L.) amazonensis* induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*; 4:23e9. 2002.

Baptista, M.S., Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Braz J Med Biol Res.*;44(1):1-10. Epub 2010 Dec 10. Review. 2011.

Barbosa, A.F., Sangiorgi, B.B., Galdino, S.L., Barral-Netto, M., Pitta, I.R., Pinheiro, A.L.. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. *Lasers Surg Med.*; 44(10):850-5. doi: 10.1002/lsm.22099. 2012.

Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A.L., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M.. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology* 34: 474-479. 1995.

Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., Carvalho, E.M., Reed, S.G.. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17:21–810.1111/j.1365-3024.1995.tb00962.x. 1995.

Basso, F. G.; Oliveira, C. F.; Fontana, A.; Kurachi, C.; Bagnato, V. S.; Spolidório, D. M.; Hebling, J.; de Souza Costa, C. A. In Vitro effect of low level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J.*; 22(6):502-10. 2011.

Beckmann, K.H., Meyer-Hamme, G., Schröder, S.. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med.* ;2014:626127. doi: 10.1155/2014/626127. 2014.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V.J.. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*; 453:1051–7. 2008.

Boaventura, V. S., Santos, C. S., Cardoso, C.R., de Andrade, J., Dos Santos, W.L., Clarêncio, J., Silva, J.S., Borges, V.M., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I. , Barral, A.. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines." *European Journal of Immunology* 40(10): 2830-6. 2010.

Bogdan, C., Röllinghoff, M.. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* ;28(1):121-34. Review. 1998.

Botelho, A.C.C., Tafuri, W.L., Genaro, O., Mayrink, W.. Histopathology of human american cutaneous leishmaniasis before and after treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* Jan-Feb;31(1):11-8. 1998.

Botelho, A.C.C.. Análise de marcadores fenotípicos das populações celulares no exsudato inflamatório da lesão e no sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após diferentes tratamentos [tese] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

Bottrel, R.L., Dutra, W.O., Martins, F.A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R.P., Mayrink, W., Locksley, R., Gollob, K.J.. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.*; 69(5):3232-9. 2001.

Bourreau, E., Gardon, J., Pradinaud, R., Pascalis, H., Prévot-Linguet, G., Kariminia, A., Launois P.. Th2 Responses Predominate during the Early Phases of Infection in Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis and Precede the Development of Th1 Responses. *Infect Immun.*; 71(4): 2244–2246. doi: 10.1128/IAI.71.4.2244-2246.2003. 2003.

Brasil. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. – 2. ed. – Brasilia : Editora do Ministerio da Saude. 2007.

Brasil. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude. – 2. ed. atual. – Brasilia : Editora do Ministerio da Saude, 2010.

Brodskyn, C.I., Barral, A., Boaventura, V., Carvalho, E., Barral-Netto, M.. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 159:4467–73. 1997.

Bronte, V. & Zanovello, P.. Regulamento das respostas imunes por L-arginina metabolismo. *Nature Reviews Immunology* 5 , 641-654 doi : 10.1038 / nri1668. Agosto, 2005.

Broz, P., Monack, D.M.. Newly described pattern recognition receptor steam up against intra cellular pathogens.. *NatRevImmunol*; 13(8):551–65. doi:10.1038/nri3479. 2013.

Calegari-Silva, T.C., Pereira, R.M., De-Melo, L.D., Saraiva, E.M., Soares, D.C., Bellio, M., Lopes, U.G.. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett.* 2;127(1):19-26. 2009.

Campbell, M. K. Fosforilação oxidativa. *Artmed.*;520-43. 2003.

Cantini, M., Massimino, M.L., Rapizzi, E., Rossini, K., Catani, C., Dalla Libera, L., Carraro, U.. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 216:49e53. 1995.

Carvalho, L.P., Passos, S., Dutra, W.O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K.J., Carvalho, E.M., Ribeiro de Jesus, A.. Effect of LACK and KM.P11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology* 61: 337-342. 2005.

Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Santarem, N., Maciel, J., Rodrigues, V., Cordeiro da Silva, A.. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol*; 5:480.10.3389/fimmu.2014.00480. 2014.

Cottrez, F., Groux, H.. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol.*; 167:773–8. 2001.

Croft, S. L; Sundar, S; Fairland, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin.Microbiol. Rev.* 19(1):111-26. 2006.

Cunningham, A.C.. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol.* Apr;72(2):132-41. 2002.

Da-Cruz, A.M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Nogueira, R., Pinho Ribeiro-V.. De células T mediada por respostas imunes em pacientes com cutânea ou mucosa leishmaniose: avaliação a longo prazo após a terapia . Clin Immunol Diagn Lab.. 9 (2): 251-610,1128 / CDLI.9.2.251-256. 2002.

Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G.. Citometria de fluxo e infiltrado celular a partir de lesões de leishmaniose tegumentar americana . Br J Dermatol.. 153 : 537-4.310,1111 / j.1365-2133.2005.06647. x. 2005.

Deodhar, A.K., Rana, R.E.. Surgical physiology of wound healing: a review. J Postgrad Med; 43(2):52–6. 1997.

Detmar, M., Orfanos, C.E.. Tumor necrosis factor-alpha inhibits cell proliferation and induces class II antigens and cell adhesion molecules in cultured normal human keratinocytes in vitro. Arch Dermatol Res, 282:238e245. 1990.

DiPietro, L.A.. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. Shock; 4(4):233–40. 1995.

Dupasquier, M., Stoitzner, P., Wan, H., Cerqueira, D., van Oudenaren, A., Voerman, J.S., Denda-Nagai, K., Irimura, T., Raes, G., Romani, N., Leenen, P.J.. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. J Leukoc Biol.;80(4):838-49. Epub 2006 Jul 18. 2006.

Etges, R. & Muller, I.. Progressive disease or protective immunity to Leishmania major infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. J. Mol. Med. 76, 372^390. 1998.

Evangelou, G., Krasagakis, K., Giannikaki, E., Kruger-Krasagakis, S., Tosca, A.. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional aminolevulinic acid

photodynamic therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*; 27(5):254-6. doi: 10.1111/j.1600-0781.2011.00610.x. 2011.

Faria, D.R., Souza, P.E., Durães, F.V., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., Machado, P.R.. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31:432–910.1111/j.1365-3024.2009.01125.x. 2009.

Farkhutdinov, U.R., Farkhutdinov, Sh.U.. Effect of laser radiation on production of reactive oxygen species in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Bull Exp Biol Med.*;144(2):238-40. 2007.

Ferreira, M. C.; Brito, V. N.; Gameiro, J.; Costa, M. R.; Vasconcellos, E. C.; Cruz-Hofling, M. A.; Verinaud, L.. Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J. Photochem. Photobiol. B.* 84: 141-149. 2006.

Franzen, R.; Gutknecht, N.; Falken, S.; Heussen, N.; Meister, J. Bactericidal effect of a Nd:YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 μm . *Lasers MedSci.*; 26(1):95-101.2011.

Freitas, J.S.; Alkmin, A.B.; Sant'Anna, L.B.; Cardoso, M.A.G.. Assesment of cytokines in liver fibrosis induced in rats by bile duct ligation. *Revista Univap – revista.univap.br* São José dos Campos-SP-Brasil, v. 20, n. 36,. ISSN 2237-1753. 2014.

Gardlo, K., Horska, Z., Enk, C.D., Rauch, L., Megahed, M., Ruzicka, T., Fritsch, C.. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* Jun;48(6):893-6. 2003.

Gonçalves, R.V., Novaes, R.D., Cupertino, M. do C., Moraes, B., Leite, J.P., Peluzio M.doC., Pinto, M.V., da Matta, S.L.. Efeitos dependentes do tempo de terapia laser de baixa intensidade sobre a resposta morfologia e oxidativo na cicatrização de feridas

cutâneas em ratos. *Lasers Med Sci* .; 28 (2): 383-90. doi: 10,1007 / s10103-012-1066-7. 2013.

Gontijo, B., Carvalho, M.deL. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*.;36(1):71-80. Review. 2003.

Gordon, S.. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*.. v.3, n.1, Jan, p.23-35. 2003.

Greco, M., Guida, G., Perlino, E.. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res. Commun*. 163:1428–1434. 1989.

Green, S.J., Nacy, C.A., Meltzer, M.S.. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J Leukoc Biol*;50:93e103. 1991.

Guo, S., Dipietro, L.A.. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*; 89(3):219–29. 2010.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T.. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6(11): 1123-32. 2005.

Hashmi, J.T., Huang, Y.Y., Osmani, B.Z., Sharma, S.K., Naeser, M.A., Hamblin, M.R.. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. 2(12 Suppl 2):S292-305. doi: 10.1016/j.pmrj.2010.10.013. 2010.

Herath, S., Kropf, P., Müller, I.. Cross-talk entre CD8 (+) e CD4 (+) em células T leishmaniose cutânea experimental: As células T CD8 (+) T são necessárias para a produção óptima de IFN-gama por linfócitos T CD4 (+) As células T . *Immunol Parasite*. 25 : 559-6710,1111 / j.0141-9838.2004.00668.x. 2003.

Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A., Castro-Muñozledo, F.. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res*, 325:77e90. 2006.

Hu, W. P.; Wang, J. J.; Yu, C. L.; Lan, C. C.; Chen, G. S.; Yu, H. S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Invest Dermatol.*; 127(8):2048-57. 2007.

Karu, T.. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.*;56:691–704. 1989.

Karu, T.. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.*;49:1–17. 1999.

Karu, T.I., Kolyakov, S.F.. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.*; 23:355–361. 2005.

Karu, T.I., Pyatibrat, L.V., Afanasyeva, N.I.. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.*; 36(4):307-14. 2005.

Kaur, K., Saxena, A., Larsen, B., Truman, S., Biyani, N., Fletcher, E., Baliga, M.S, Ponemone, V., Hegde, S., Chanda, A., Fayad, R.. Mucus mediated protection against acute colitis in adiponectin deficient mice. *J Inflamm (Lond)*. 12:35. doi: 10.1186/s12950-015-0079-y. 2015.

Kou, P.M. & Babensee, J.E.. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. Jan;96(1):239-60. doi: 10.1002/jbm.a.32971. Review. 2011.

Launois, P., Tacchini-Cottier, F., Parra-Lopez, C., Louis, J.A.. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. *Int. Rev. Immunol.* 17, 157^180. 1998.

Lessa, H. A., Machado, P., Lima, F., Cruz, A. A., Barcellar, O., Guerreiro, J., Carvalho, E. M.. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65(2): 87-9. 2001.

Li, H., Meininger, C.J., Hawker, J.R. Jr, Haynes, T.E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S.K., Morris, S.M. Jr, Wu, G.. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 280(1):E75-82. 2001.

Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M., Moncada, S.. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from Larginine. *J Immunol*; 144:4794e7. 1990.

Lima, E. B.; Motta, J. O. C.; Porto, C.; Sampaio, R. N.; Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol.* 82:111-24. 2007.

Lins, R.D., Dantas, E.M., Lucena, K.C., Catão, M.H., Granville-Garcia, A.F., Carvalho Neto, L.G.. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.*; 85(6):849-55. Review. 2010.

Lohr, N.L., Keszler, A., Pratt, P.. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* ;47:256–263. 2009.

Lopez Kostka, S., Dinges, S., Griewank, K., Iwakura, Y., Udey, M.C., von Stebut, E.. IL-17 promove a progressão da leishmaniose tegumentar em ratos suscetíveis. *J Immunol.*; 182 :. 3039-46. 2009.

Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R.M., Zhou, L.. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J*, 25:3344e3355. 2011.

MacDonald, K.P., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., Branstetter, D., Smith, J., Paxton, R.J., Cerretti, D.P., Bonham, L., Hill, G.R., Hume, D.A.. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*. 116:3955e3963. 2010.

Machado, P., Araujo, C., Da Silva, A.T., Almeida, R.P., D'Oliveira Jr, A., Bittencourt, A., Carvalho, E.M.. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious Diseases*. 34: E69-73. 2002.

Machado, P., Kanitakis, J., Almeida, R., Chalon, A., Araújo, C., Carvalho, E.M.. A evidência de citotoxicidade em situ na leishmaniose tegumentar americana. *Eur J Dermatol.* 12: 449-51. 2002.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena P., Vecchi A., Locati, M.. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25, 677–686. 2004.

Martinez, F.O.; Gordon, S..The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13. doi: 10.12703/P6-13. 2014.

Mateo, R.B., Reichner, J.S., Albina, J.E.. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol*, 266:R1840eR1844. 1994.

McDougall, S.; Dallon, J.; Sherratt, J.; Maini, P.. Fibroblast Migration and Collagen Deposition During Dermal Wound Healings: Mathematical Modelling and Clinical Implications. *Phil. Trans. R. Soc. A* 364: 1385-1405. 2006.

McMahon-Pratt, D. & Alexander, J.. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease. *Immunol Rev.* 201:206–24. doi:10.1111/j.0105-2896. 2004.00190.x. 2004.

Medrado, A. R.; Pugliese, L. S.; Reis, S. R. ; Andrade, Z. A. .Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 32(3): 239-44. 2003.

Meszaros, A.J., Reichner, J.S., Albina, J.E.. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol.* 165:435e441. 2000.

Mirza, R., Koh, T.J.. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine*; 56:256e264. 2011.

Mondal, S; Bhattacharya, P. A.. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert. Ver. Anti. Infect. Ther.*; 8 (8): 919-44. 2010.

Monzote, L.. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Op. Antimicrobial Ag. Journal.* 1, 9-19. 2009.

Moore, K. W., De Waal Maleffyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A.. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683–765. 2001.

Mosser, D.M., Edwards, J.P.. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958–969. 2008.

Muraille, E., Leo, O.. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol.* 47(1):1–9. doi:10.1111/j.1365-3083.1998-47-1.00383.x. 1998.

Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F.. CD8⁺ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis.. *PLoS negl Trop Dis.* 4 : E845 .10.1371 / journal.pntd.0000845. 2010.

Novaes, R.D., Gonçalves, R.V., Cupertino, M.C., Araújo, B.M., Rezende, R.M., Santos, E.C., Leite, J.P., Matta, S.L.. The energy density of laser light differentially modulates the

skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. *Int J Exp Pathol.*; 95(2):138-46. doi: 10.1111/ iep.12063. 2014.

Novak, M.L., Koh, T.J.. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol.* Nov;183(5):1352-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.034. Epub 2013 Sep 30. 2013.

Nussbaum, E. L.; Lilge, L.; Mazzulli, T. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. *J Clin Laser Med Surg.* 21(5):283-90. 2003.

Nylen, S.; Gautam, S.. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, vol. 2, no.2, pp. 135–146. 2010.

O'Garra, A., Vieira, P.L., Vieira, P., Goldfeld, A.E.. IL-10 producing and naturally occurring CD4⁺Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.*; 114:1372–8. 2004.

Okizaki, S., Ito, Y., Hosono, K., Oba, K., Ohkubo, H., Amano, H., Shichiri, M., Majima, M.. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- β 1 and impairs wound healing in streptozotocin induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother.*; 70:317-25. 2015.

Oliveira, C.C., Lacerda, H.G., Martins, D.R., Barbosa, J.D., Monteiro, G.R., Queiroz, J.W., Sousa, J.M., Ximenes, M.F., Jeronimo, S.M.. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop.*; 90(2):155-62. 2004.

Oliveira, W.N., Ribeiro, L.E., Albert Schrieffer, A., Machado, P., Edgar M. Carvalho, E.M., Bacellar, O.. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 66(2): 127–132. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016. 2014.

Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G.. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*;18:293e305. 2005.

OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.

Orringer, J. S.; Hamilton, T.; Johnson, T. M.; Kang, S.; Sachs, D. L. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol*. 144: 1296-1302. 2008.

Ortiz, M. C. S.; Carrinho, P. M.; Santos, A. A. S.; Gonçalves, R. C.; Parizzoto, N. A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 2. *Fisioter Bras.*; 2(6):337-52. 2001.

Oton-Leite, A.F., Silva, G.B., Morais, M.O., Silva, T.A., Leles, C.R., Valadares, M.C., Pinezi, J.C., Batista, A.C., Mendonça, E.F.. Effect of low-level laser therapy on chemoradio therapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med*. 47(4):296-305. doi: 10.1002/lsm.22349. Epub 2015 Mar 30. 2015.

Palumbo, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. *Am J Ther*. Mar-Apr;16(2):178-82.. 2009.

Passarella, S., Casamassima, E., Molinari, S.. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.*; 175:95–99. 1984.

Peplow, P.V., Chung, T.Y., Baxter, G.D.. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.*;28 Suppl 1:S3-40. doi: 10.1089/pho.2010.2771. Review. 2010.

Perdiguerro, E., Sousa-Victor, P., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Caelles, C., Serrano, A.L., Muñoz-Cánoves, P.. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J Cell Biol*; 195:307e322. 2011.

Pereira, L.I.A.; Dorta, M.L.; Pereira, A.J.C.S.; Bastos, R.P.; Oliveria, M.A.P.; Pinto, S.A ; Galdino, H.; Mayrink, W.; Barcelos, W.; Lima, G.M.C.A.; Toledo, V.P.C.P.; RibeiroDias, F.. Case Report: Increase of NK Cells and Proinflammatory Monocytes Are Associated with the Clinical Improvement of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis after Immunochemotherapy with BCG/Leishmania Antigens Case Report: Increase of NK Cells and Proinflammatory Monocytes Are Associated with the Clinical Improvement of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis after Immunochemotherapy with BCG/Leishmania Antigens Case. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 378-383. 2009.

Peters, N., Sacks, D.. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunol Rev*. Oct;213:159-79. Review. 2006.

Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceicao-Silva, F., Modlin, R. L.. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Investig*. 91:1390–1395. 1993.

Pompeu, M.M., Brodskyn, C., Teixeira, M.J., Clarêncio, J., Van Weyenberg, J., Coelho, I.C.. As diferenças na produção de interferon gama in vitro prever o ritmo da resposta in vivo para *Leishmania amazonensis* em voluntários saudáveis . *Infect Immun*.. 69 (12): 7453-6010,1128 / IAI.69.12.7453-7460. 2001.

Posten, W.; Wrone, D. A.; Dover, J. S.; Arndt, K. A.; Silapunt, S.; Alam, M.. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol.Surg*. 31(3): 334-340, 2005.

Raes, G., Brys, L., Dahal, B.K., Brandt, J., Grooten, J., Brombacher, F., Vanham, G., Noël, W., Bogaert, P., Boonefaes, T., Kindt, A., Van den Bergh, R., Leenen, P.J., De Baetselier, P., Ghassabeh, G.H.. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for

alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.*; 77(3):321-7. 2005.

Raja Sivamani, K., Garcia, M.S., Isseroff, R.R.. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*; 12:2849–68. 2007.

Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* Sep;7(9):581-96. Review. 2007.

Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O., Carvalho, E.M.. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 31: 143-148. 1998.

Rodriguez-Sosa, M., Riviera-Montoya, I. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol*, v.242, n.2, Aug, p.61-71. 2006.

Scott, P., Sacks, D., Sher, A.. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.*; 131(2): 966-71. 1983.

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., Sher, A.. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine* 168: 1675-1684. 1988.

Sehrawat, S., Rouse, B.T.. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *J Leukoc Biol.* Dec;90(6):1079-87. doi: 10.1189/jlb.0611271.. Review. 2011.

Sica, A. & Mantovani, A.. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J ClinInvest.* 122(3):787–95.doi:10.1172/JCI59643. 2012.

Silva-Jr, I.A., Morato, C.I., Quixabeira, V.B.L., Pereira, L.I.A, Dorta, M.C.L., Oliveira, M.A.P., HORTA, M.F., Ribeiro-Dias, F.. In Vitro Metacyclogenesis of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. Biomed Res Int; v. 2015, p. 1-15. 2015.

Silveira, P. C.; Streck, E.L.; Pinho, R. A.. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low level laser therapy. *J Photochem Photobiol*; 86(3): 279-82. 2007.

Silveira, P.C., Silva, L.A., Freitas, T.P., Latini, A., Pinho, R.A.. Effects of low power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*.;26(1):125-31. doi: 10.1007/s10103-010-0839-0. 2011.

Solinas, G.; Schiarea, S., Liguori, M., Fabbri, M., Pesce, S., Zammataro, L., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chiabrando, C., Mantovani, A., Allavena, P.. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, Influencing tumor cell motility. *J Immunol* 185(1): 642-652. 2010.

Thomas, D. W.; O'Neill, I. D.; Harding, K. G.; Shepherd, J. P. Cutaneous Wound Healing. *J Oral Maxillofac Surg*.; 53: 442-447. 1995.

Toledo, V.P.C.P., Mayrink, W., Gollob, K.J., Oliveira, M.A.P., da Costa, C.A., Genaro, O.. Immunotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.; 96:89–98. 2001.

Trinchieri, G.. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *Journal of Experimental Medicine*, vol.204, no. 2, pp. 239–243. 2007.

Ueno, N. & Wilson, M.E.. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* Aug;28(8):335-44. 2012.

Ventakaram, M., Moosa, M., Devi, L.. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: A study in Oman. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*; 67:294–8. 2001.

Viana, A.G., Mayrink, W., Fraga, C.A., Silva, L.M., Domingos, P.L., Bonan, P.R., Paula, A.M. , Botelho, A.C.. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *An Bras Dermatol.*; 88 (1): 32-40. 2013.

Von Stebut, E.. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges.* ;13(3):191–200; quiz 201. doi: 10.1111/ddg.12595. 2015.

Wanderley, J.L., Thorpe, P.E., Barcinski, M.A., Soong, L.. Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol.* 35(3–4):109–19. doi:10.1111/pim.12019. 2013.

Werner, S.; Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev. U.S.A.*, v. 83, n. 3, p. 835-870. 2003.

Willenborg, S., Lucas, T., van Loo, G., Knipper, J.A., Krieg, T., Haase, I., Brachvogel, B., Hammerschmidt, M., Nagy, A., Ferrara, N., Pasparakis, M., Eming, S.A.. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*, 120: 613e625. 2012.

Woodruff, L. D.; Bounkeo, J. M.; Dawes Jr, K. S.; Barham, C. D.; Waddel, D. L.; The efficacy of laser therapy in wound repair: a metaanalysis of the literature. *Photomed Laser Surg.* 22(3):241-7. 2004.

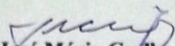
Yang, Q., Zheng, F.P., Zhan, Y.S., Tao, J., Tan, S.W., Liu, H.L., Wu, B.. Tumor necrosis factor- α mediates JNK activation response to intestinal ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol.*;19(30):4925-34. doi: 10.3748/ wjg.v19.i30.4925. 2013.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., Mori, T.. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem.*; 147:781–92. 2010.

Zeyda, M. & Stulnig, T. M.. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 112(2): 61-7. 2007.

ANEXO I

Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG.

	SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS HOSPITAL DAS CLÍNICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
PROTOCOLO CEP/HC/UFG Nº 036/2010	Em, 07/06/2010	
 INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL: <u>Profª. Drª. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola</u>		
PESQUISADORES PARTICIPANTES: <u>Farm. Miriam Cristina Leandro Dorta, Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira e Farm. Fátima Ribeiro Dias.</u>		
 TÍTULO: <u>"Avaliação do uso terapêutico do laser de hélio-neônio na cicatrização de lesões cutâneas na leishmaniose experimental causada por leishmania (viannia) braziliensis"</u>		
 Área Temática: <u>Grupo III</u>		
Local de realização: <u>Depto. de Microbiologia, Umunologia e Parasitologia do IPTSP/UFG.</u>		
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa. Após início do estudo, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões). O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (<i>Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13</i>)		
  Farm. José Mário Coelho Moraes Coordenador do CEP/HC/UFG		
1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 3269.8338 - FAX: 3269.8426 GOIÂNIA - GOIÁS		

ANEXO II

Primer e sondas referentes às citocinas _ Life Technologies

Citocinas	Primer	Sonda FAM/MGB
B2m	5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'; 5'-CAATCCAAATGCGGCATCT-3'	TGGTTCACACGGCAGGCATACTCA-3'
IFN-γ	5'-GGTTCCTGGACTGATTCCTGCACC-3'; 5'-GGTTCCTGGACTGATTCCTGCACC-3'	TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG-3'
IL-4	5'-AGGCTGAAAGGGGAAAGC-3'; 5'-CTGTTACCTCAACTGCTCC-3'	TCCTCACAGCAACGAAGAACACCACA-3'
IL-17	5'-AATCTCCACCGCAATGAGGA-3' 5'-ACGTTCCCATCAGCGTTGA-3'	CGGCACCTTGCCTCCCAGATCACA-3'
TNF-α	5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3'; 5'-GTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3'	CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA-3'
TGF-β	5'-TGACGTCACTGGAGTTGTACGG-3'; 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'	TTCAGCGCTCACTGCTCTTGTGACAG-3'
IL-13	5'-AGACCAGACTCCCCTGTGCA-3'; 5'-TGGGTCCTGTAGATGGCATTG-3'	CGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCC-3'
IL-10	5'-ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG-3'; 5'-ATTCGAGGTTCTGGTTCCACAGAT-3'	TGAGGCGCTGTCGTCATCGATTTCTCCC-3'