



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

JEFFERSON BRUNO PEREIRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXIDADE DO TRATAMENTO COM O
ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA SISTÊMICO ASSOCIADO À TERAPIA
FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO-ALUMÍNIO LIPOSSOMAL EM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM C57BL6**

Brasília

2018



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

JEFFERSON BRUNO PEREIRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXIDADE DO TRATAMENTO COM O
ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA SISTÊMICO ASSOCIADO À TERAPIA
FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO-ALUMÍNIO LIPOSSOMAL EM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM C57BL6**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção
do título de doutor.**

Orientadora: Professora Doutora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Luisa Miranda-Vilela

Brasília

2018

JEFFERSON BRUNO PEREIRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXIDADE DO TRATAMENTO COM O
ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA SISTÊMICO ASSOCIADO À TERAPIA
FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO-ALUMÍNIO LIPOSSOMAL EM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM C57BL6**

Aprovada em 7 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Presidente: Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Membro Titular: Prof. Dr. Antonio Macho Quirós

Membro Titular: Prof^a Dr^a Adriana de Oliveira Santos Alfani

Membro Titular: Prof^a Dr^a Carmen Dea Ribeiro de Paula

Suplente: Prof^a Dr^a Ada Amália Ayala Urdapilleta

Brasília

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PJ45a Pereira Ribeiro, Jefferson Bruno
 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXIDADE DO TRATAMENTO COM O
ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA SISTÊMICO ASSOCIADO À
TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA CLORO-ALUMÍNIO
LIPOSSOMAL EM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM C57BL6 /
Jefferson Bruno Pereira Ribeiro; orientador Raimunda Nonata
Ribeiro Sampaioa; co-orientador Ana Luisa Miranda-Vilela. -
Brasília, 2018.
 185 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2018.

 1. Leishmaniose cutânea. 2. Terapia fotodinâmica. 3.
Antimoniato de N-metil-glucamina. 4. Ftalocianina Cloro
Alumínio. I. Ribeiro Sampaioa, Raimunda Nonata, orient. II.
Miranda-Vilela, Ana Luisa, co-orient. III. Título.

Dedicatória

Dedico este estudo a Deus, aos meus pais e aos pacientes humanos e veterinários que foram acometidos pela leishmaniose (...).

Agradecimentos

Confesso que esta talvez essa seja uma das partes mais difíceis de escrever em minha tese, por “parecer” ser a última e talvez porque aqui o valor de p não seja tão importante quanto descrever o papel de todos os atores que fizeram com que esse trabalho acontecesse. Fazer pesquisa em um país, onde a educação, pesquisa, ciência e desenvolvimento ainda são negligenciados, é um grande desafio que precisa ser vencido com a colaboração e participação de todos. Por mais que isto não esteja diretamente relacionado às etapas de realização do trabalho final, é certo que carecemos de maiores políticas de ensino e pesquisa.

Primeiramente e, sobretudo, agradeço a Deus, por ser meu grande psicólogo nos dias difíceis, por me fortalecer em todos os momentos e por Ele permitir que eu seja um de Seus filhos.

Agradeço à minha querida orientadora, a professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, por me apoiar e direcionar nas diversas etapas de realização deste trabalho. Agradeço pelo voto de confiança concedido a mim e por ter sido minha mentora no mundo da pesquisa. Agradeço ainda todas as contribuições feitas para o tratamento e combate a leishmaniose no Brasil e no mundo.

Agradeço à minha querida coorientadora, a professora Ana Luisa Miranda-Vilela, que sempre contribuiu de forma muito profissional e formativa para a realização deste trabalho; por sempre buscar respostas para que os resultados desta pesquisa fossem realmente relevantes para a comunidade acadêmica e para a sociedade.

Também agradeço ao professor Cláudio Tedesco, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, que criou, manipulou e gentilmente cedeu a ftalocianina de cloro-alumínio em formulação lipossomal para viabilizar a realização desta pesquisa.

Agradeço aos 54 animais deste estudo que involuntariamente foram submetidos a todo o processo deste trabalho.

Aos meus pais, José Maria Ribeiro e Maria Silvana Pereira, que, apesar de todas as dificuldades, conseguiram sempre viver com muita honestidade e dignidade e serem minhas referências de formação como pessoa e ser humano. Agradeço ainda a minha querida mãe que vivenciou um período muito difícil e mesmo assim demonstrou toda a bravura e força que uma pessoa pode ter.

Aos meus irmãos, Gabriel Bruno e Jéssica Bruna, por acreditarem em mim.

Às minhas duas avós, Maria Martins e Maria Aparecida, por todas as orações direcionadas a mim.

Agradeço ao querido companheiro e amigo Dr. Jonathan Rosa Moreira, pela indispensável ajuda sem a qual não teria sido possível realizar este trabalho e por ter se tornado um exemplo acadêmico e de pessoa a ser seguido. Agradeço ainda pelo companheirismo de todos os tempos e paciência em todo período de realização deste trabalho.

Agradeço a proteção de Nossa Senhora Aparecida que sempre intercede por mim.

Agradeço a toda equipe do Centro Universitário Projeção, que me viabilizam espaços de trabalhos, cujos resultados me subsidiam pesquisas na área de educação.

À CAPES, por oportunizar-me bolsa de estudos em pesquisa durante o período regular para realização deste estudo. Agradeço também à UnB, UNICAMP, HUB e ao Departamento de Genética e Morfologia (UnB), por permitirem a irreparável atuação de seus profissionais neste estudo.

Agradeço ao Sabin pela colaboração para a realização dos exames de sangue e, também, ao prof. Ricardo Bentes de Azevedo por ter cedido o aparelho de laser utilizado no experimento.

Um agradecimento especial para a amiga Erika Silva pelas orações e torcida.

Aproveito para agradecer aos técnicos de laboratório, Viviane Medeiros Silva e Tércio Rodrigues Pereira, pela valorosa contribuição com seus conhecimentos altamente especializados.

Obrigado.

J.B.P.R.

“Se fosse ensinar a uma criança a beleza da música não começaria com partituras, notas e pautas. Ouviríamos juntos as melodias mais gostosas e lhe contaria sobre os instrumentos que fazem a música. Aí, encantada com a beleza da música, ela mesma me pediria que lhe ensinasse o mistério daquelas bolinhas pretas escritas sobre cinco linhas. Porque as bolinhas pretas e as cinco linhas são apenas ferramentas para a produção da beleza musical. A experiência da beleza tem de vir antes” (Rubem Alves).

RESUMO

A leishmaniose cutânea tem sido uma preocupação em diversos países e isso tem culminado em uma grande quantidade de experimentos que buscam a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento e combate desta doença. Apesar disso, os antimoniais pentavalentes ainda permanecem como os fármacos mais amplamente utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea. Nos últimos anos, os parasitas das leishmanioses cutâneas têm desenvolvido mecanismos de resistência aos antimoniais pentavalentes, implicando na necessidade de novas drogas que tratem ou que participem como adjuvantes no tratamento. Como alternativa, há a busca por substâncias leishmanicidas de ação tópica. Por isso, o **objetivo geral** deste trabalho foi verificar a eficácia *in vivo* da utilização sistêmica do antimoniato de N-metil-glucamina associado à terapia fotodinâmica tópica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal para o tratamento da leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis*. Para tanto, a **metodologia** empregada foi experimental com testes em 54 camundongos isogênicos - C57BL/6 espécie *Mus musculus* que foram divididos em 09 grupos, cada um com um esquema terapêuticos distinto, utilizando ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal e antimoniato de N-Metil glucamina. Para a verificação da eficácia do tratamento, foram avaliadas medida das patas, culturas, lâminas e MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiliazol-2,5-difenil-tetrazólio)). A comparação dos níveis de toxicidade foi feita por avaliação histopatológica e bioquímica do sangue. Os **resultados** demonstraram que a utilização associada do antimoniato de N-metil-glucamina e terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal foi mais eficiente no tratamento contra o parasita da *Leishmania (L.) amazonensis*, principalmente na dose de 20 mg do SbV por kg por dia. O grupo N-Metil-glucamina 10mg com terapia fotodinâmica demonstrou resultados muito parecidos com o grupo tratado com N-Metil-glucamina 20 mg (padrão ouro). Um dos desafios no tratamento da leishmaniose cutânea é a recidiva da doença após o esquema terapêutico preconizado pelas agências reguladoras de saúde, portanto esta associação de drogas (N-Metil Glucamina e ftalocianina) representa uma esperança nesta abordagem do problema.

Palavras chaves: Leishmaniose cutânea; Terapia fotodinâmica; Antimoniato de N-metil-glucamina; Ftalocianina Cloro-Alumínio.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis has been a concern in several countries and this has culminated in a large number of experiments that seek the discovery of new substances that can be used in the treatment and combat of this disease. Despite this, pentavalent antimonials still remain as the most widely used drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis. In recent years, parasites of cutaneous leishmaniasis have developed mechanisms of resistance to pentavalent antimonials, implying the need for new drugs that treat or participate as adjuvants in treatment. Alternatively, there is the search for leishmanicidal substances of topical action. Therefore, the general objective of this work was to compare the in vivo efficacy of the systemic use of N-methyl glucamine antimoniate associated with topical photodynamic therapy with chloro-aluminum phthalocyanine liposomal formulation for the treatment of leishmaniasis caused by Leishmania (L) amazonensis. To do so, the methodology used was experimental with tests in 54 isogenic mice - C57BL / 6 Mus Musculus species that were divided into 09 groups, each with a distinct therapeutic scheme, using phthalocyanine chloro-aluminum of liposomal formulation and N-Methyl antimoniate glutamine. To verify the efficacy of the treatment, the measurement of legs, cultures, slides and Total Mass of Tubers were evaluated. The toxicity levels were compared by histopathological and biochemical evaluation of the blood. The results demonstrate that the associated use of systemic N-methyl glucamine associated with photodynamic therapy with phthalocyanine chloro-aluminum of liposomal formulation were more efficient in the treatment of the Leishmania (L) amazonensis parasite, especially at 20 mg/day dose. The N-methyl glucamine 10mg group with photodynamic therapy showed results very similar to the group treated with N-methyl glucamine 20mg (gold standard). One of the challenges in the treatment of cutaneous leishmaniasis is the relapse of the disease after the therapeutic regimen recommended by the health regulatory agencies, so this drug association (N-Methyl Glucamine and phthalocyanine) represents a hope in this approach to the problem.

Keywords: *Cutaneous leishmaniasis; Photodynamic therapy; N-methylglucamine antimonate; Phthalocyanine Chlorine-Aluminum.*

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea ha sido una preocupación en varios países y eso ha culminado en una gran cantidad de experimentos que buscan el descubrimiento de nuevas sustancias que puedan ser utilizadas en el tratamiento y combate de esta enfermedad. A pesar de ello, los antimoniales pentavalentes aún permanecen como los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. En los últimos años, los parásitos de la leishmaniasis cutánea han desarrollado mecanismos de resistencia a los antimoniales pentavalentes, implicando en la necesidad de nuevas drogas que traten o que participen como adyuvantes en el tratamiento. Como alternativa, hay la búsqueda de sustancias leishmanicidas de acción tópica. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue comparar la eficacia in vivo de la utilización sistémica del antimoniato de N-metil-glucamina asociado a la terapia fotodinámica tópica con ftalocianina cloro-aluminio de formulación liposomal para el tratamiento de la leishmaniasis causada por Leishmania (L) amazonensis. Para ello, la metodología empleada fue experimental con pruebas en 54 ratones isogénicos - C57BL / 6 especie Mus musculus que fueron divididos en 09 grupos, cada uno con un esquema terapéutico distinto, utilizando ftalocianina cloro-aluminio de formulación liposomal y antimoniato de N-Metil glutamina. Para la verificación de la eficacia del tratamiento, se evaluaron medidas de las patas, cultivos, láminas y masa total de tubérculos. La comparación de los niveles de toxicidad fue hecha por evaluación histopatológica y bioquímica de la sangre. Los resultados demuestran que la utilización asociada del antimoniato de N-metil-glucamina sistémicas asociadas a la terapia fotodinámica con ftalocianina cloro-aluminio de formulación liposomal, fueron más eficientes en el tratamiento contra el parásito de Leishmania (L) amazonensis, principalmente a la dosis de 20 mg/día. El grupo N-Metil-glucamina 10 mg con terapia fotodinámica demostró resultados muy parecidos al grupo tratado con N-Metil-glucamina 20 mg (patrón de oro). Uno de los desafíos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea es la recidiva de la enfermedad después del esquema terapéutico preconizado por las agencias reguladoras de salud, por lo que esta asociación de drogas representa una esperanza en este abordaje del problema.

Palabras claves: *Leishmaniasis cutánea; Terapia fotodinámica; Antimoniato de N-metil-glucamina; Ftalocianina Cloro-Aluminio.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FÊMEA DE FLEBOTOMÍNEO INGURGITADA	19
FIGURA 2: SITUAÇÃO ENDÊMICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	20
FIGURA 3: CARACTERÍSTICAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL	24
FIGURA 4: CARACTERÍSTICAS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	25
FIGURA 5: CARACTERÍSTICAS DA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA	26
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO ANUAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA E MUCOSA EM PAÍSES ENDÊMICOS DAS AMÉRICAS.....	27
FIGURA 7: CARACTERÍSTICAS DA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA	28
FIGURA 8: CICLO DE VIDA – LEISHMANIA.....	29
FIGURA 9: ESTÁGIOS DE FLEBOTOMÍNEOS E EM HUMANOS	31
FIGURA 10: LEISHMANIA – FORMA FLAGELADA OU PROMASTIGOTA.....	32
FIGURA 11: LEISHMANIA – FORMA AFLAGELADA OU AMASTIGOTA	32
FIGURA 12: INCIDÊNCIA DE CASOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA E MUCOSA	35
FIGURA 13: MOSQUITO DO GÊNERO PHLEBOTOMUS.....	40
FIGURA 14: REAÇÃO FOTOQUÍMICA PRESENTE NA TFD.....	47
FIGURA 15: TFD - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA	48
FIGURA 16: CÂMARA DE NEUBAUER UTILIZADA NA CONTAGEM DOS PARASITAS	55
FIGURA 17: ADAPTAÇÃO DA CÂMARA PARA MICROSCÓPIO DE CAMPO CLARO	56
FIGURA 18: FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO	58
FIGURA 19: FLUXO DO DESENHO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	60
FIGURA 20: SEDAÇÃO SOB EXPOSIÇÃO À LUZ VERMELHA.....	62
FIGURA 21: FOLHA DE ALUMÍNIO NA PATA DIREITA APÓS APLICAÇÃO DA ALCLPC	62
FIGURA 22: HOMOGENEIZADOR UTILIZADO PARA A TRITURAÇÃO E PREPARO DAS PATAS DOS CAMUNDONGOS	64
FIGURA 23: PAQUÍMETROS MILIMÉTRICOS UTILIZADOS PARA MEDIÇÃO DAS PATAS DOS ANIMAIS EM DIFERENTES MOMENTOS	65
FIGURA 24: MICROPLACA DE ELISA DE 96 POÇOS A DILUIÇÃO LIMITANTE	67
FIGURA 25: DIÂMETRO MÉDIO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL.....	71
FIGURA 26: FRAGMENTOS CÚBICOS E LISOS DE ALUMÍNIO.....	71
FIGURA 27: PRESENÇA DOS ÍONS Si, Na, Mg, Al, K, Ca.....	72
FIGURA 28: PATAS DO CAMUNDONGO C57BL/6 - GRUPO NÃO INFECTADO (ESQUERDA) E INFECTADO (DIREITA)	73
FIGURA 29: DIÂMETROS DAS PATAS ANTES DA INFECÇÃO, 02 E 30 DIAS APÓS A INFECÇÃO (CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO E INÍCIO DO TRATAMENTO), 10 E 20 DIAS APÓS O TRATAMENTO, E 60 DIAS APÓS O FIM DO TRATAMENTO.....	75
FIGURA 30: LESÃO CUTÂNEA APÓS 60 DIAS DO TÉRMINO DO TRATAMENTO	76
FIGURA 31: PARASITAS VISUALIZADOS EM CULTURAS REALIZADAS EM MEIO NNN	77
FIGURA 32: TUBOS DE CULTURAS DE LEISHMANIOSE.....	78
FIGURA 33: LÂMINAS DE EXTENSÃO FIXADAS PARA AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA.....	83
FIGURA 34: DISTRIBUIÇÃO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS (A) E DO NÚMERO DE PARASITAS POR PATA (B) EM CAMUNDONGO C57BL/6 INFECTADOS POR LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS, APÓS 10 DIAS DE TRATAMENTO, APÓS 20 DIAS DE TRATAMENTO E 60 DIAS APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO.....	84
FIGURA 35: PESO DOS ANIMAIS EM DIFERENTES PERÍODOS DO TRATAMENTO.	89
FIGURA 36: MÉDIAS E O ERRO PADRÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS 9 GRUPOS.....	92
FIGURA 37: FOTOMICROGRAFIA DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS AOS DIVERSOS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS	96

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: ESPÉCIES DA LEISHMANIOSE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	23
QUADRO 2: POSIÇÃO SISTEMÁTICA DOS PARASITAS - <i>LEISHMANIA</i>	27
QUADRO 3: ESPÉCIES ENVOLVIDAS LC NO BRASIL	36
QUADRO 4: PADRÕES EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	38
QUADRO 5: EPIDEMIOLOGIA LEISHMANIOSE POR REGIÃO.....	39
QUADRO 6: ESPÉCIE DE <i>LEISHMANIA</i> E INDICAÇÃO TERAPÊUTICA	41
QUADRO 7: TIPO DE ADMINISTRAÇÃO EM FUNÇÃO DA DROGA CONTRA LEISHMANIOSE	41
QUADRO 8: CLASSIFICAÇÃO DOS FS POR FAMÍLIAS	49
QUADRO 9: CLASSIFICAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZANTES.....	49
QUADRO 10: TRATAMENTO COM TFD COM ALCLPC ASSOCIADAS AO ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA	57
QUADRO 11: RESULTADOS QUANTITATIVOS PARA SDS	72
QUADRO 12: ALTERAÇÕES HEPÁTICAS NOS ANIMAIS TRATADOS DURANTE 10 DIAS (TEMPO1)	94
QUADRO 13: ALTERAÇÕES HEPÁTICAS NOS ANIMAIS TRATADOS DURANTE 20 DIAS (TEMPO2)	95
QUADRO 14: ALTERAÇÕES HEPÁTICAS NOS ANIMAIS, APÓS 60 DIAS DO TÉRMINO DO TRATAMENTO	95
QUADRO 15: ALTERAÇÕES RENAIIS NOS CAMUNDONGOS, NO TEMPO 1 (APÓS 10 DIAS DE TRATAMENTO)	98
QUADRO 16: ALTERAÇÕES RENAIIS NOS CAMUNDONGOS, NO TEMPO 2 (APÓS 20 DIAS DE TRATAMENTO)	98
QUADRO 17: ALTERAÇÕES RENAIIS NOS CAMUNDONGOS, NO TEMPO 3 (APÓS 60 DIAS DO TÉRMINO DO TRATAMENTO)	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO DOS ANIMAIS POR PESQUISA DIRETA DO PARASITA POR CULTURAS EM MEIO NNN	78
TABELA 2: RELAÇÃO DE CULTURAS NEGATIVAS E POSITIVAS 30 DIAS APÓS A INFECÇÃO, APÓS 10 DIAS DE TRATAMENTO, APÓS 20 DIAS DE TRATAMENTO E 30 DIAS APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO	79
TABELA 3: CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO DOS ANIMAIS POR PESQUISA DIRETA DO PARASITA POR LÂMINAS DE EXTENSÃO.....	81
TABELA 4: RELAÇÃO DE LÂMINAS DE EXTENSÃO NEGATIVAS E POSITIVAS 30 DIAS APÓS A INFECÇÃO, APÓS 10 DIAS DE TRATAMENTO, APÓS 20 DIAS DE TRATAMENTO E 60 DIAS APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO.....	82
TABELA 5: ESQUEMA TERAPÊUTICO PARA ANÁLISE DA TOXIDADE	89
TABELA 6: RESULTADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DE CAMUNDONGOS <i>Mus MUSCULUS</i> C57BL/6 FÊMEAS INOCULADOS COM <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	91

LISTA DE SIGLAS

AA	Alteração Arquitetural
ALB	Albumina
AICIPC	Ftalocianina Cloro-Alumínio
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
BT	Bilirrubina Total
CC	Cilindros Proteicos
DG	Degeneração Gordurosa
DH	Degeneração Hidrópica
DT	Degeneração Tubular
EDS	Energia Dispersiva de Raio-X
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativas de Oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
GE	Glomeruloesclerose
GGT	Gama-Glutamil Tranferase
IDP	Índice de Poldispersão
IG	Infiltrado Inflamatório Glomerular
IL	Infiltrado Inflamatório Lobular
IP	Infiltrado Inflamatório Portal
ITI	Infiltrado Inflamatório Túbulo Intersticial

LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg/dL	Miligramas por Decilitro
MET	Microscópio Eletrônico Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico Varredura
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiliazol-2,5-difenil-tetrazólio)
NTA	Necrose Tubular Aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
SbV	Antimônio Pentavalente
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TFD	Terapia Fotodinâmica
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
U/L	Unidades por Litro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	23
1.1.1 <i>Leishmaniose – aspectos gerais e manifestações</i>	23
1.1.2 <i>Leishmaniose – ciclo de desenvolvimento</i>	28
1.1.3 <i>Leishmaniose no Brasil – cenários e desafios</i>	33
1.1.4 <i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)</i>	34
1.1.5 <i>Epidemiologia</i>	37
1.1.6 <i>Tratamento</i>	40
1.1.6.1 <i>Miltefosina</i>	44
1.1.6.2 <i>Antimoniato de N-metil-gluamina</i>	44
1.1.6.3 <i>Terapia fotodinâmica (TFD)</i>	45
1.1.6.4 <i>Fotosensibilizadores</i>	48
1.1.6.5 <i>Ftalocianina cloro-alumínio (AICIPC)</i>	50
1.1.7. <i>Importância do modelo experimental C57BL no estudo da Leishmania</i>	52
2 OBJETIVOS	54
2.1 OBJETIVO GERAL	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 TIPO DE ESTUDO	55
3.2 CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i>	55
3.3 CONTAGEM DOS PARASITOS	55
3.4 ANIMAIS.....	56
3.5 AMOSTRAS.....	58
3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS	58
3.7 VIA DE ADMINISTRAÇÃO	59
3.8 QUESTÕES ÉTICAS.....	59
3.9 DESENHO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	59
3.9.1 <i>Infecção</i>	61
3.9.2 <i>Confirmação da infecção</i>	63
3.10 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	64
3.11 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA.....	65
3.12 MEDIÇÃO DAS PATAS	65
3.13 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA POR MEIO DE CRITÉRIOS PARASITOLÓGICOS	66
3.14 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE TOXIDADE	67
3.15 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA POR LÂMINA	67
3.16 EXAMES BIOQUÍMICOS REALIZADOS EM PARCERIA COM OS LABORATÓRIOS SABIN..	68
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3.18. PROCEDIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA PARTÍCULA DE LIPOSSOMA	70
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	70
4.1 PARTÍCULAS DE LIPOSSOMA	71
4.2 DIÂMETRO DAS PATAS EM DIFERENTES MOMENTOS	73
4.2.1 <i>Avaliação clínica</i>	73
4.3 EFICÁCIA POR MEIO DA CONFECÇÃO DE 54 CULTURAS EM MEIO BIFASICO NNN.....	77

4.3.1 Avaliação por culturas em meio NNN.....	77
4.4 EFICÁCIA DO TRATAMENTO POR MEIO DA CONFECÇÃO E ANÁLISE DE LÂMINAS DE EXTENSÃO FIXADAS E CORADAS COM GIEMSA	81
4.4.1 Avaliação por pesquisa direta do parasita por lâminas de extensão.....	81
4.5 EFICÁCIA DO TRATAMENTO POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS POR PATA	84
4.6 TOXIDADE DOS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS	88
4.6.1 Peso dos animais durante e após o término do tratamento.....	88
4.6.2. Comparação dos níveis de toxicidade foi feita por avaliação histopatológica e bioquímica do sangue.....	89
5 DISCUSSÃO.....	100
6 CONCLUSÃO.....	112
7 REFERÊNCIAS	113
APÊNDICES	126
APÊNDICE I - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – DECLARAÇÃO	127
APÊNDICE II: TESTE DE NORMALIDADE DOS DADOS DAS MEDIDAS DAS PATAS.....	128
APÊNDICE III: ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS DAS MEDIDAS DO PAQUÍMETRO	129
APÊNDICE IV: ANÁLISE DO TESTE DE NORMALIDADE VIABILIDADE CELULAR.....	132
APÊNDICE V: ANÁLISE DESCRITIVA DA VIABILIDADE CELULAR	133
APÊNDICE VI: ANÁLISE DO TESTE DE NORMALIDADE VIABILIDADE CELULAR.....	134
APÊNDICE VII: RELATÓRIO ESTATÍSTICO	135

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa e não contagiosa causada por parasitas do gênero *Leishmania* que pertencem a várias espécies difundidas por todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), existem mais de 20 espécies de *Leishmania*¹ (WHO, 2016). É uma doença em grande expansão e ainda é negligenciada, tendo diferentes formas de manifestação nos Velho e Novo Mundos, sendo causada por várias espécies de *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos (COX, 2002).

Estão envolvidos no ciclo de desenvolvimento da leishmaniose, o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. Tratando especificamente dos vertebrados, pode-se citar o homem, os roedores e o cão. O vetor disseminador da doença é o flebótomo (WHO, 2017), também conhecido popularmente como mosquito palha, pertencente à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*. (Figura 1).

Figura 1: Fêmea de flebotomíneo ingurgitada



Fonte: Brasil (2007).

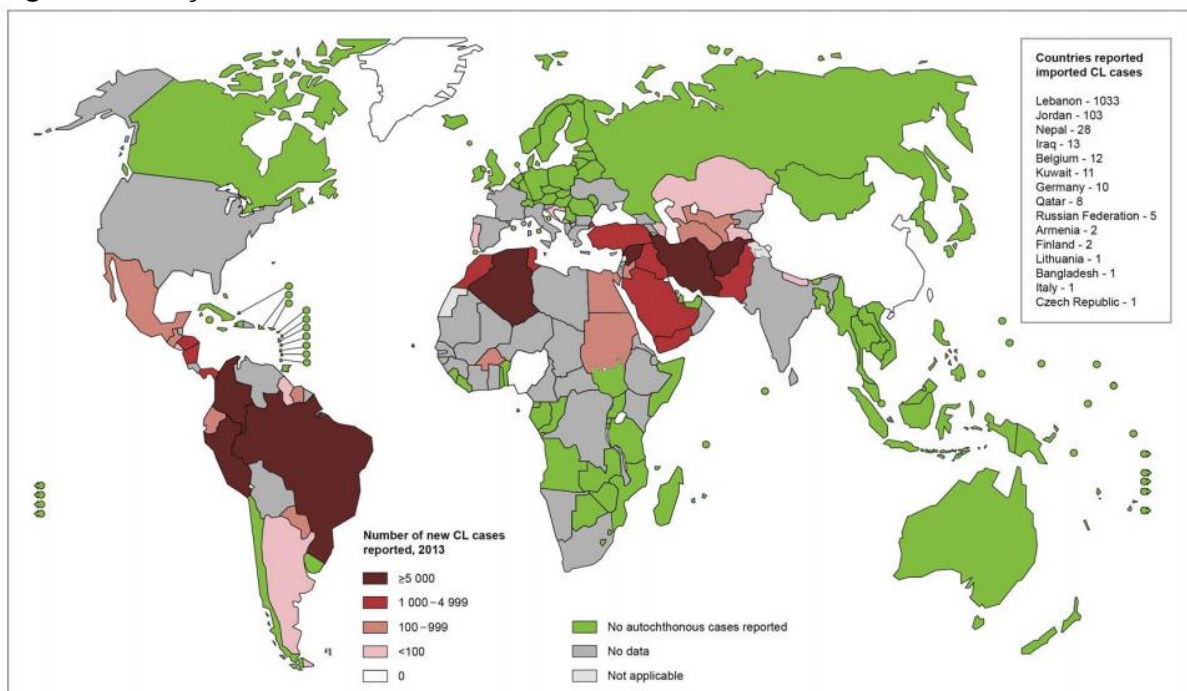
Os flebótomos, que inicialmente habitavam apenas regiões rurais e de mata, têm cada vez mais se aproximado do ambiente urbano devido à grande expansão das cidades. Por se desenvolver em matéria orgânica, o flebótomo é de difícil controle. Após picar o hospedeiro e reservatório contaminado, a fêmea passa a transmitir a doença a novos vertebrados susceptíveis.

¹ Disponível em: < <http://www.who.int/leishmania/disease/en/> >. Acesso em: 01 dez 2017.

A manifestação clínica da doença se dá de forma tegumentar e visceral, sendo a visceral a mais grave. Segundo a OMS, quando analisou os casos mundiais de leishmaniose, constatou que 90% dos casos foram reportados em apenas seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2017).

A forma tegumentar possui especificações em sua manifestação que variam dependendo da região ou do país em que se apresenta. A Figura 2 mostra a situação endêmica da leishmaniose cutânea (LC), segundo a OMS. A patogênese da LC envolve uma resposta imune desregulada com superprodução de citocinas pró-inflamatórias, deficiência reguladora de citocinas, e mecanismos de lise pelos quais os parasitas intracelulares escapam.

Figura 2: Situação endêmica da leishmaniose cutânea



Fonte: (WHO, 2017).

No Brasil, há ocorrência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e o tratamento tem sido feito com os mesmos fármacos há muitos anos, como antimoniato de metil-glucamina, a anfotericina B (SUNDAR, CHAKRAVARTY, 2012), a pentamidina e miltefosina (DORLO *et al.*, 2012). No entanto, a resistência que o parasita tem desenvolvido a esses fármacos pode representar uma preocupação para a comunidade científica da área, pois, em muitos casos, a resistência ao tratamento pode chegar a mais de 90%. Assim, persiste a necessidade de se encontrar novas

formas de tratamento que envolva tanto a utilização de novas drogas, quanto tratamentos alternativos que visem a cura dos pacientes e erradicação da doença em questão. Infelizmente, as terapias utilizadas para o tratamento da infecção de *Leishmania* ainda são limitadas, sendo os antimoniais pentavalentes (Sb^v) os fármacos de escolha por mais de 60 anos (SANTAREM *et al.*, 2014).

Desde a descoberta dos primeiros fármacos para o tratamento da leishmaniose (por exemplo, os antimoniais pentavalentes - Sb^v), até os dias atuais, a procura de substâncias com atividade antileishmania sem efeitos tóxicos e capaz de superar cepas resistentes aos medicamentos permanece como desafio (SANTOS *et al.*, 2008). A definição pelo tipo de tratamento a ser adotado contra a leishmaniose depende das espécies causais, tendo ainda os antimoniais sistêmicos como padrão ouro para o tratamento da doença (MINODIER; PAROLA, 2006).

O tratamento tópico tem sido estudado com diferentes substâncias e as ftalocianinas têm apresentado resultados interessantes na manifestação tegumentar por causar uma reação tóxica na região com potencial de morte dos parasitas. Para o tratamento, é preciso determinar a espécie de *Leishmania* e o tipo de infecção (WHO, 2017). Quando Ribeiro *et al.* (2015) associaram terapia fotodinâmica (TFD) com ftalocianina cloro-alumínio (AICIPC) para o tratamento de LTA, promoveram redução significativa da viabilidade e no número de parasitas quando comparado com outros grupos infectados. Assim, é importante realizar cada vez mais estudos relacionados a efetividade destas drogas, bem como a toxicidade causada por elas.

Segundo Gonzáles (2016), diante da expansão da leishmaniose no Brasil, além das características epidemiológicas da doença, é necessário o estabelecimento de medidas que a limite. O tratamento da leishmaniose preconizado no Brasil utiliza múltiplas injeções de antimoniais pentavalentes, que têm efeitos colaterais e toxicidade, mesmo com compostos recentes que têm efeitos positivos no combate desta doença.

Como afirmam Pacheco *et al.* (2017), leishmaniose cutânea representa relevante problema de saúde pública no Brasil e em muitos países do mundo. São registrados, por ano, aproximadamente 25 mil casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, sendo este o primeiro país da América Latina em matéria de número de casos e um dos mais endêmicos do mundo.

A leishmaniose é uma enfermidade de origem parasitária presente em mais de 98 países, com incidência anual de mais de 02 milhões de casos (LOPERA SEPÚLVEDA, 2017). Para que a leishmaniose seja erradicada, é preciso fazer o constante controle em áreas infestadas com o vetor responsáveis pela transmissão dos parasitas e possíveis reservatórios urbanos, incluindo ações de combate aos insetos com o uso de inseticidas. Se estas ações forem cumpridas a ocorrência da doença na população pode ser reduzida. Ações de prevenção devem ser sempre a primeira opção. Para os casos de pacientes acometidos, o diagnóstico rápido e preciso que propicie um tratamento adequado é o melhor caminho para evitar o aumento dos casos.

Para Sundar e Chakravarty (2012), há uma urgência necessária para novos estudos exploratórios com combinações terapêuticas mais eficientes contra a leishmaniose para atender, sobretudo, áreas negligenciadas e os pacientes que apresentam resistência ao tratamento. Neste sentido, portanto, este estudo traz uma abordagem nova para o tratamento da LC, pois apresenta um esquema terapêutico que associa droga de aplicação tópica e o fármaco padrão ouro com ação sistêmica, ressaltando a necessidade da realização da análise tóxica da ftalocianina.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Leishmaniose – aspectos gerais e manifestações

A leishmaniose compreende um conjunto complexo de enfermidades causadas por mais de vinte espécies de protozoários hemoflagelados do gênero *Leishmania* (WHO, 2017), os quais são transmitidos por mais de trinta espécies de vetores do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (REITHINGER *et al.*, 2007) e um variado espectro de manifestações clínicas (Quadro 1), que podem ser classificadas em três grupos de leishmaniose: (i) leishmaniose visceral (LV); (ii) LC; e (iii) leishmaniose mucocutânea (LMC).

Quadro 1: Espécies da leishmaniose e manifestações clínicas

ESPÉCIE IMPLICADA	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA
Leishmania do Novo Mundo	
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LMC
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LC
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LC
<i>L. (Leishmania) amazonenses</i>	LC, LV, LCD
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LC
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LC
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LC
Leishmania do Velho Mundo	
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LC
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC
Leishmania do Novo/Velho Mundo	
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC

LC: Leishmaniose cutânea, **LMC:** Leishmaniose mucocutânea, **LCD:** Leishmaniose cutânea difusa, **LV:** Leishmaniose visceral.

Fonte: Adaptado de PEÑARANDA (2010)

Para Desjeux (2004), a LV é a manifestação mais severa, também conhecida como kalazar, que pode ocasionar a morte dos pacientes que não são submetidos a tratamento. Segundo Laveram e Mesnil (1903), pode ser causada pela *Leishmania (L.) donovani*, e pela *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) chagasi*, sendo as duas últimas do Velho Mundo e do Novo Mundo, respectivamente. A LV caracteriza-se pela presença de esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso, febre,

linfadenopatia e anemia (Figura 3). Alguns pacientes em recuperação podem desenvolver LC crônica, também conhecida como leishmaniose dérmica pós kalazar”.

Segundo a OMS², se não for tratada, a LV pode ser fatal em 95% dos casos. É altamente endêmica no subcontinente indiano e na África Oriental. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorrem a nível mundial a cada ano. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

Figura 3: Características da leishmaniose visceral



Fonte: (WHO, 2017³)

A LC é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas na pele (Figura 4), que podem ser únicas ou múltiplas e, em alguns casos, são curadas espontaneamente, enquanto outros tiram a capacidade ou deixam cicatrizes nos pacientes. Segundo Gonzáles (2016, p.6), a LC “pode ser causada por *L. tropica*, *L. aethiopica* no velho mundo, e por *L. mexicana*, *L. major*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, entre as mais estudadas, no Novo Mundo”.

² Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 29 jan 2017.

³ Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 29 dez 2017.

Segundo a OMS⁴, cerca de 95% dos casos da LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LC ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que entre 0,6 milhão e 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2017). Sobre a LTA, segundo a OMS, está incluída entre as seis doenças infectoparasitárias mais importantes do mundo, afetando a pele e/ou membranas mucosas; apresenta duas formas clínicas mais frequentes, a cutânea e a mucocutânea (NAME *et al.*, 2005).

Figura 4: Características da leishmaniose cutânea



Fonte: (WHO, 2017⁵)

A LMC causa inflamação destrutiva das mucosas, com lesões desfigurativas na face (Figura 5), em decorrência da destruição das cavidades oral, nasal e da faringe, e é causada na maioria das vezes por espécies como *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (RIBEIRO, 2014). Esta forma clínica se caracteriza pela presença de lesões destrutivas e desfigurantes na região oral e nasofaríngea, com granuloma constituído de linfócitos e macrófagos, com poucos parasitos (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

⁴ Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 29 jan 2017.

⁵ Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 29 jan 2017.

Figura 5: Características da leishmaniose mucocutânea



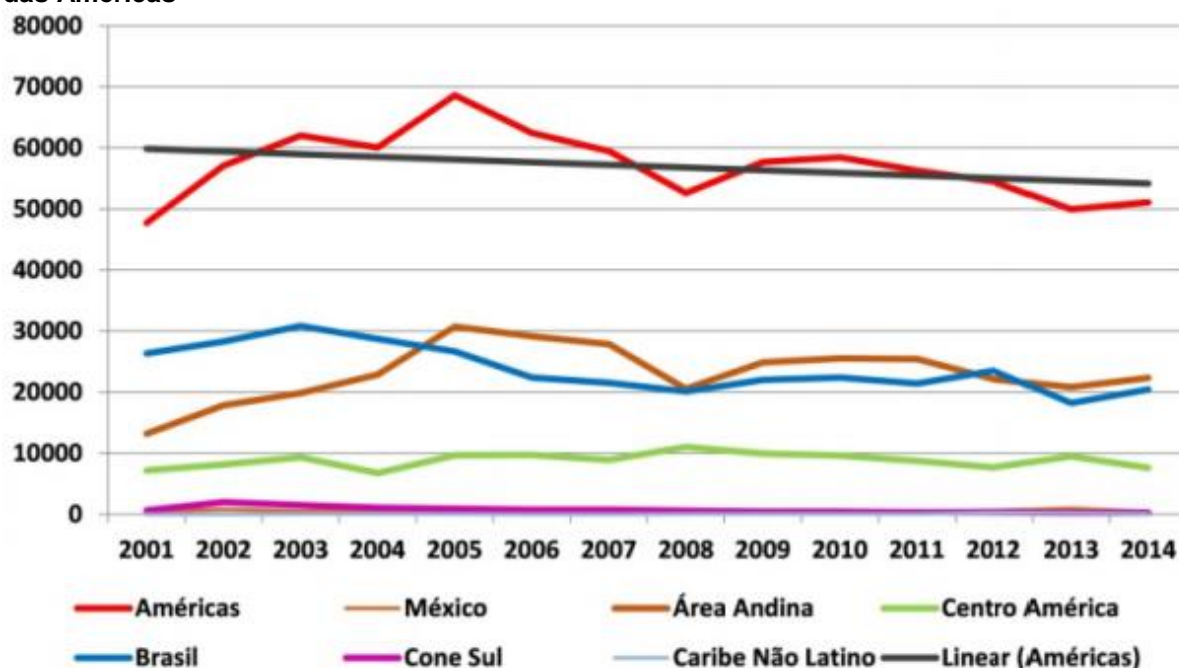
Fonte: (WHO, 2017⁶)

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) se manifesta em pacientes com deficiência na resposta imune mediada por células e se caracteriza pelo aparecimento de nódulos na pele. Segundo Costa *et al.* (1992, p.115), “as primeiras descrições da LCD, sob o ponto de vista clínico, histopatológico e parasitológico, ocorreram no Brasil em 1945”. O complexo *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi* está associado à LCD no continente Americano, observando-se, como caracterizações clínicas a formação de mácula, pápula ou nódulo no local da inoculação.

A leishmaniose mucocutânea (LMC) leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de LMC ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2017). A Figura 6 apresenta a relação entre casos e distribuição temporal de leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas.

⁶ Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 29 jan 2017.

Figura 6: Distribuição anual de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS (2017).

As leishmanioses são, portanto, doenças infeto-parasitárias que apresentam diferentes formas clínicas, em função da espécie de *Leishmania* envolvida e de sua relação de parasita e hospedeiro (SARAVIA, 1989). O Quadro 2 apresenta a posição sistemática dos parasitas, conforme Levine *et al.* (1980).

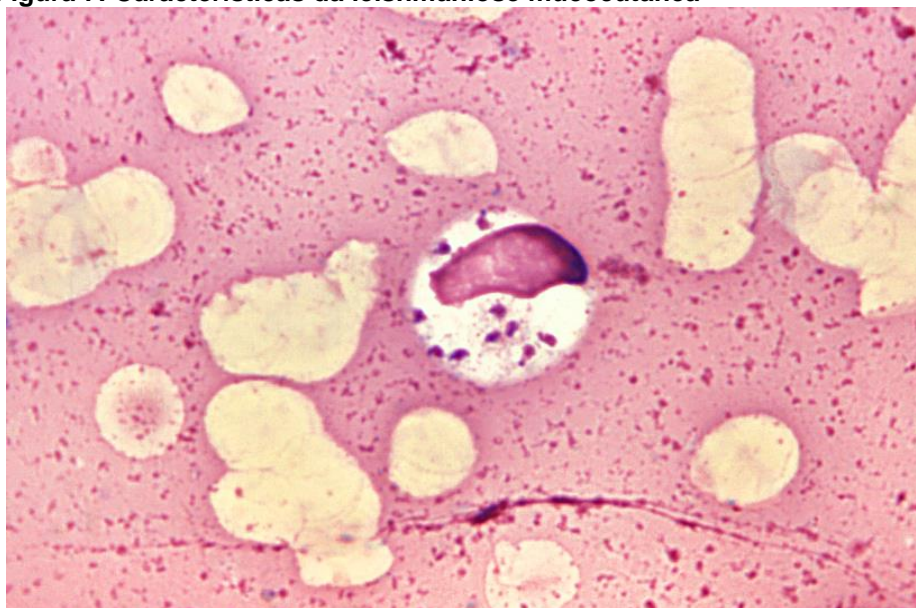
Quadro 2: Posição sistemática dos parasitas - *Leishmania*

Reino:	PROTISTA
Sub-reino	PROTOZOA
Filo	SARCOMASTIGOPHORA
Sub-filo	MASTIGOPHORA
Classe	ZOOMASTIGOPHOREA
Ordem	KINETOPLASTIDA
Sub-ordem	TRYPANOSOMATINA
Família	TRYPANOSOMATIDAE
Gênero	<i>Leishmania</i>

Fonte: Adaptado de Levine *et al.*(1980).

Como exemplo, a Figura 7 mostra formas amastigotas de *Leishmania donovani* em uma célula da medula óssea.

Figura 7: Características da leishmaniose mucocutânea



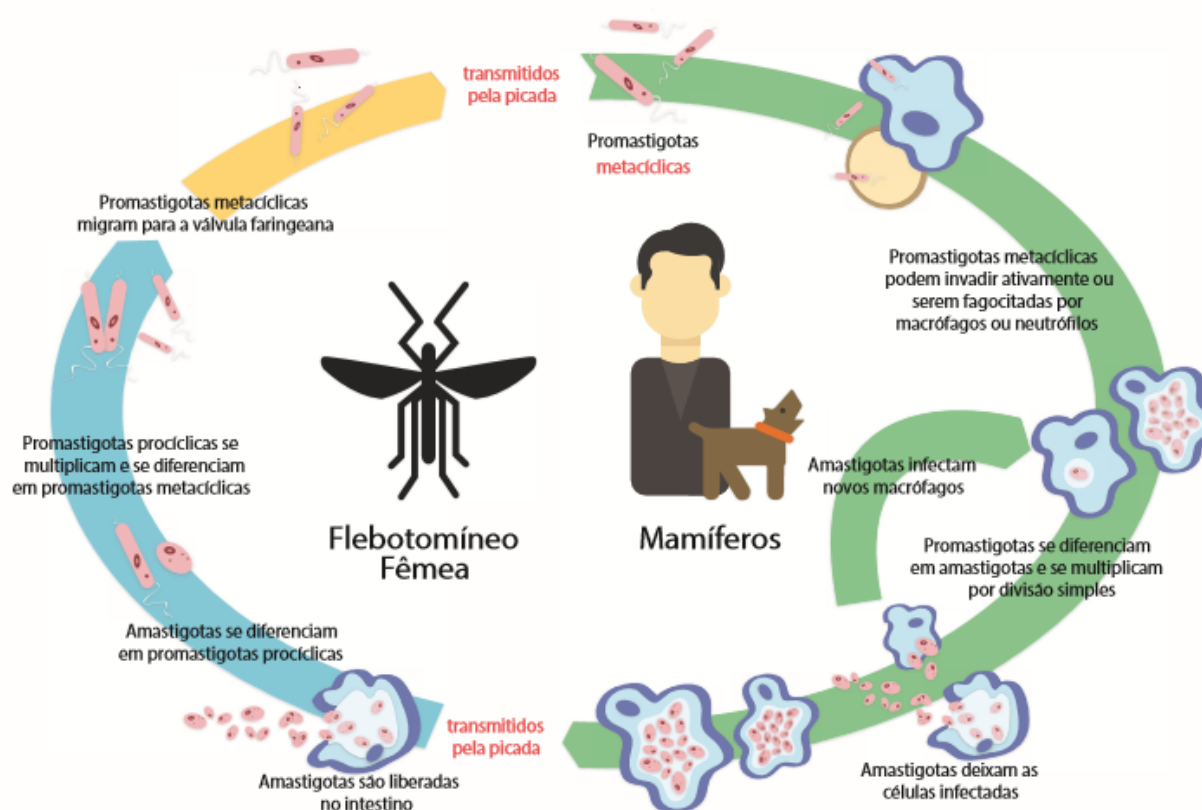
Fonte: WHO (2017)

A leishmaniose, com raras exceções, como afirmaram Gontijo e Carvalho (2003), constitui zoonoses de animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo marsupiais, desdentados, carnívoros e mesmo primatas. Nesse sentido, o homem seria representado como hospedeiro acidental e não determinante para a manutenção do parasita na natureza.

1.1.2 Leishmaniose – ciclo de desenvolvimento

O gênero *Leishmania*, para Gontijo e Carvalho (2003, p.72), compreende “protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro”. O ciclo de vida da leishmaniose está apresentado na Figura 8.

Figura 8: Ciclo de vida – Leishmania



Fonte: FRÉZARD (2015). Adaptado pelo Autor.

A Figura 8 apresenta o ciclo de vida da *Leishmania* com um fluxo que mostra a transmissão desde a picada do flebótomo infectado, o qual transmite a *Leishmania*, que é um protozoário da família *Trypanosomatidae* o qual apresenta duas formas principais: (i) a forma flagelada ou promastigota; e (ii) a forma aflagelada ou amastigota. A primeira forma, refere-se àquela encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. A segunda forma, aflagelada ou amastigota, pode ser observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2007).

O ciclo de vida das leishmanias inclui uma fase extracelular, que ocorre na parte interior do trato digestivo, e outra fase intracelular, que ocorre dentro de macrófagos dos mamíferos (RAMOS *et al.*, 2011). Os flebótomos injetam o estágio infeccioso, promastigotas metacíclicas. Os promastigotas metacíclicos que atingem a ferida de punção são fagocitados, com redução da imunidade, por macrófagos e transformados em amastigotas, com liberação de interleucinas no processo inflamatório (OTA *et al.*, 2008). Os amastigotas multiplicam-se em células infectadas e afetam diferentes tecidos, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. Estas especificidades teciduais causam as diferentes manifestações clínicas e formas de leishmaniose. Os

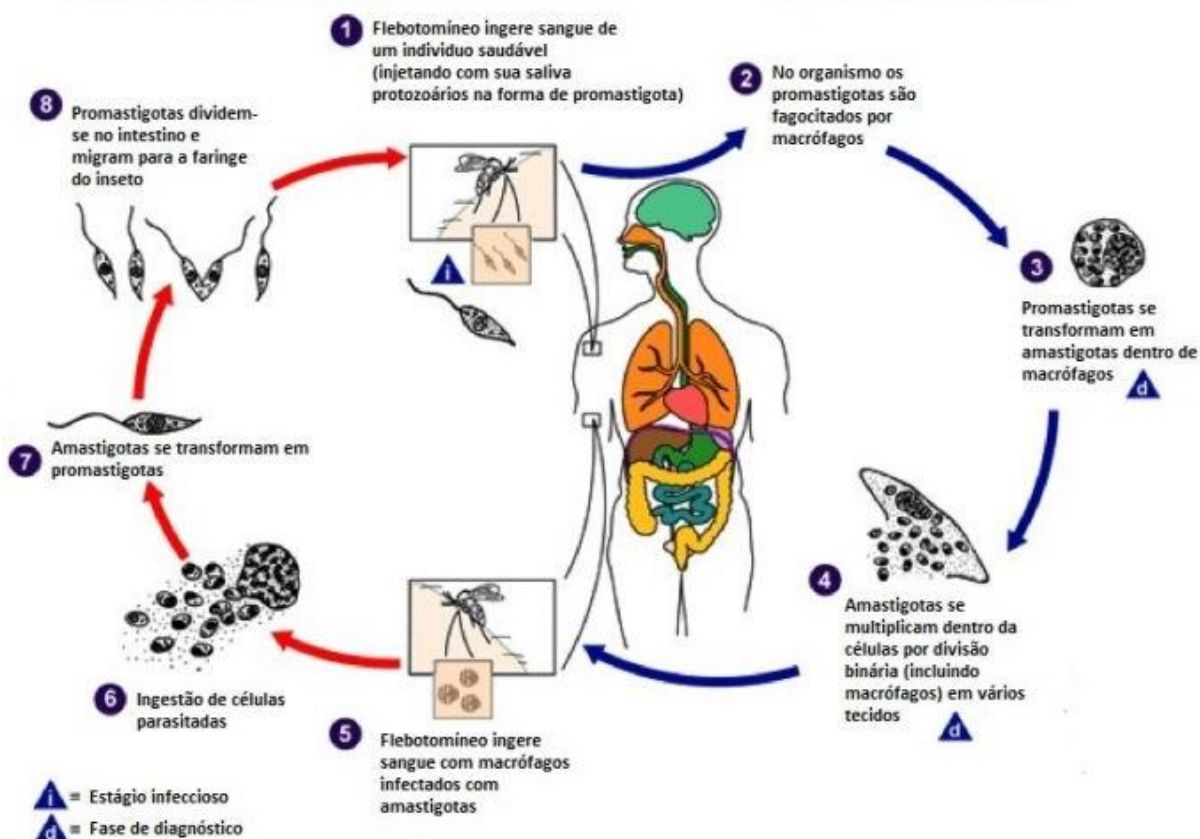
flebotomíneos fêmeas são infectados durante a ingestão de sangue em hospedeiros infectados quando ingerem macrófagos infectados com amastigotas. No intestino médio do mosquito, os parasitas se diferenciam em promastigotas, que se multiplicam, se diferenciam em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide.

As formas infectantes de *leishmanias* são denominadas metacíclicas, e as formas não infectantes são conhecidas como procíclicas, e ambas podem ser encontradas em culturas de células livres. As formas não infectantes são mais abundantes na fase estacionária, quando uma variedade de genes apresenta diferentes padrões, e algumas codificam fatores virulentos (RAMOS *et al.*, 2011).

O ciclo biológico da *Leishmania* é favorecido pelo estímulo ao recrutamento de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) pelas formas promastigotas metacíclicas, as quais estão localizadas no local do repasto sanguíneo (GONÇALES, 2016).

Segundo Carvalho (2011), a invasão do patógeno não causa a doença em si, mas é necessária para estabelecer a infecção sendo um pré-requisito para a virulência. O autor agrega que dois mecanismos de virulência da *Leishmania* têm sido propostos por envolver dois grupos diferentes de moléculas do parasita, sendo que um deles é constituído principalmente na superfície celular e em substâncias secretadas, e o outro inclui moléculas intercelulares, denominadas patoantígenos. O primeiro grupo é constituído por determinantes invasivos que protegem os parasitas e evitam que as células do hospedeiro sofram lise prematuramente, contribuindo para a manutenção da infecção pelas formas amastigotas, por conta do crescimento baixo em vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro. Nesse sentido, as manifestações clínicas são decorrentes do segundo grupo que causa imunopatologia da doença. Tais moléculas são altamente conservadas por proteínas citoplasmáticas, nas quais são encontradas por possuírem epíteto *Leishmania*-único, imunologicamente ativo na leishmaniose. As leishmanias passam por citólise periódica durante a infecção natural, feita a exposição dos antígenos intracelulares ao sistema imune do hospedeiro (CHANG *et al.*, 2003).

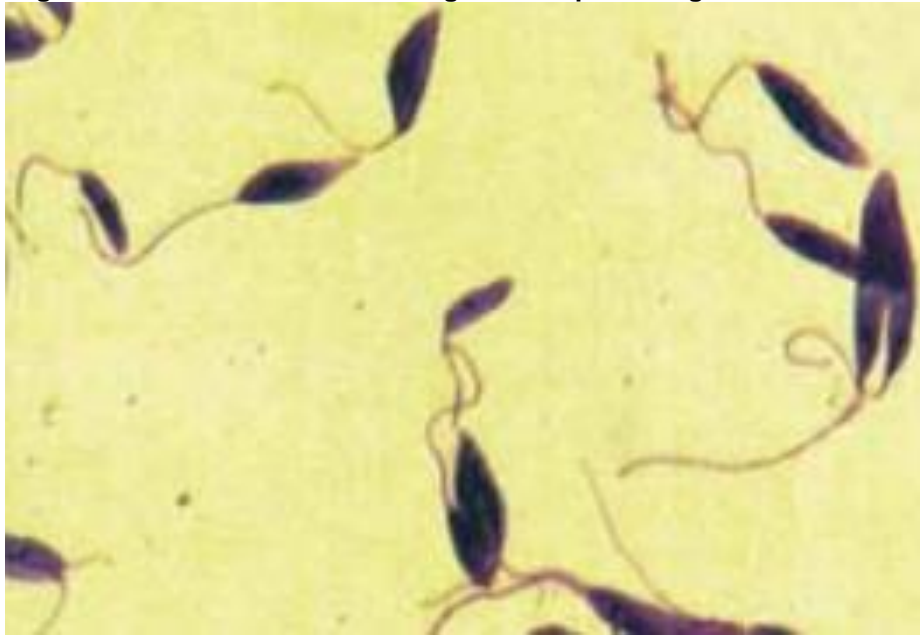
Figura 9: Estágios de flebotomíneos e em humanos



A Figura 9 apresenta os estágios humano e do parasita do gênero *Leishmania*. No que se refere ao estágio humano, o mosquito injeta promastigota na pele ao se alimentar com sangue, em nível infeccioso.

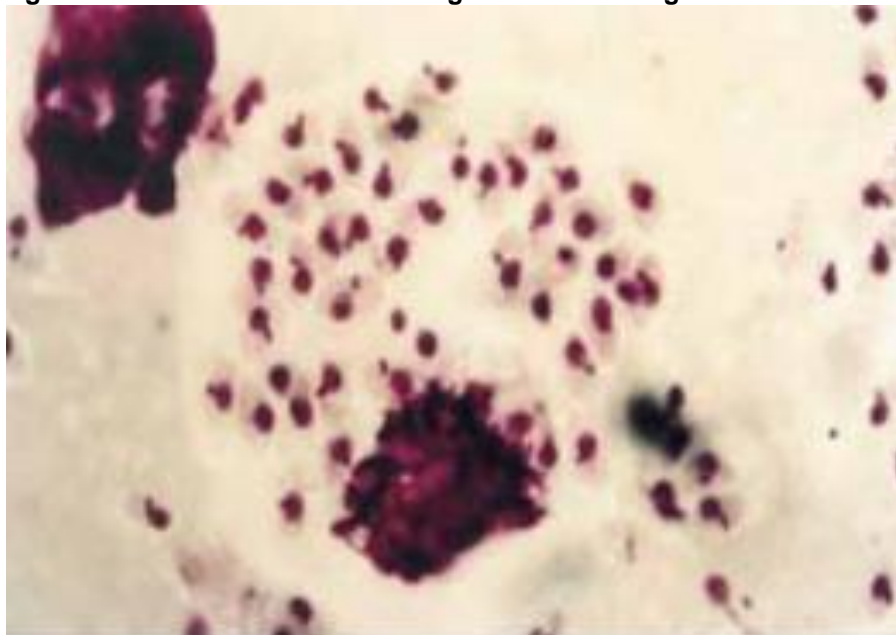
Segundo Desjeux (2001) existem duas formas principais no ciclo da leishmania, que são a forma flagelada promastigota (Figura 10) e a forma amastigota (Figura 11). Sobre a primeira forma, a flagelada promastigota encontra-se no tubo digestivo, assim como na saliva do inseto vetor. A segunda forma, a amastigota tem seu desenvolvimento no vacúolo fagolisossômico dos macrófagos quando é inoculada no mamífero pelo vetor hematófago (RIBEIRO, 2014).

Figura 10: Leishmania – Forma flagelada ou promastigota



Fonte: BRASIL, 2007

Figura 11: Leishmania – Forma aflagelada ou amastigota



Fonte: BRASIL, 2007

As formas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos que são rapidamente recrutados para o local da picada. Os neutrófilos infectados libertam as leishmanias, que, então, são consumidos por macrófagos, em nível de diagnóstico. Os amastigotas são multiplicados em células (incluindo macrófagos) de vários tecidos. Para os estágios do parasita, este ingere macrófagos infectados quando sofre uma reação sanguínea. Há ingestão de células parasitadas. Os amastigotas se dividem e migram

para o intestino anterior e médio. O mosquito injeta promastigota na pele durante a picada.

1.1.3 Leishmaniose no Brasil – cenários e desafios

Quando Maia-Elkhoury *et al.* (2008) analisaram o cenário da leishmaniose no Brasil, considerando o período de 1980 até 2005, perceberam a expansão gradativa da doença, sendo que o controle vetorial e de reservatórios representavam os maiores desafios para o controle da doença, dado a necessidade de melhor conhecer o comportamento do vetor no ambiente urbano, as dificuldades operacionais e o alto custo de execução (p.2946), mesmo com os investimentos do Ministério da Saúde (MS) em “pesquisas sobre diagnóstico laboratorial humano e canino, tratamento dos pacientes, avaliação da efetividade das estratégias de controle, bem como de novas tecnologias que possam contribuir na implementação das ações de vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil” (p.2946). Considerando a crescente expansão da LV no Brasil e as características epidemiológicas da doença, é necessário o desenvolvimento de medidas que limitem a transmissão da doença (GONÇALES, 2016).

Para Marcondes e Rossi (2013), a leishmaniose visceral continua entre as doenças transmitidas por vetores mais importantes no Brasil, pois está presente em quase todo o território nacional e o tratamento ainda representa um desafio para médicos veterinário e demais agentes de saúde pública. Tal expansão da leishmaniose visceral é um fenômeno decorrente também da urbanização (WERNECK, 2008), entretanto, não há evidências suficientes para afirmar que há idiosincrasias na transmissão urbana, ao contrário do que ocorre nas zonas rurais. Essa heterogeneidade acarreta nuances em relação ao padrão epidemiológico rural. Há de se compreender os processos de introdução e disseminação da leishmaniose no meio urbano, por meio de métodos de análise das transformações demográficas e ambientais (WERNECK, 2008).

Para Lainson e Shaw (1974), no que se referia à Amazônia brasileira, tratando especificamente da leishmaniose cutânea difusa, já havia estudos de referência sobre o seu ciclo ecológico, sendo o *Proechimys guyanensis* o reservatório primário e os marsupiais e outros roedores como reservatórios secundários. Por outro lado,

Grimaldi *et al.* (1989) já apontavam a leishmaniose tegumentar como endêmica e um dos maiores problemas de saúde no Brasil.

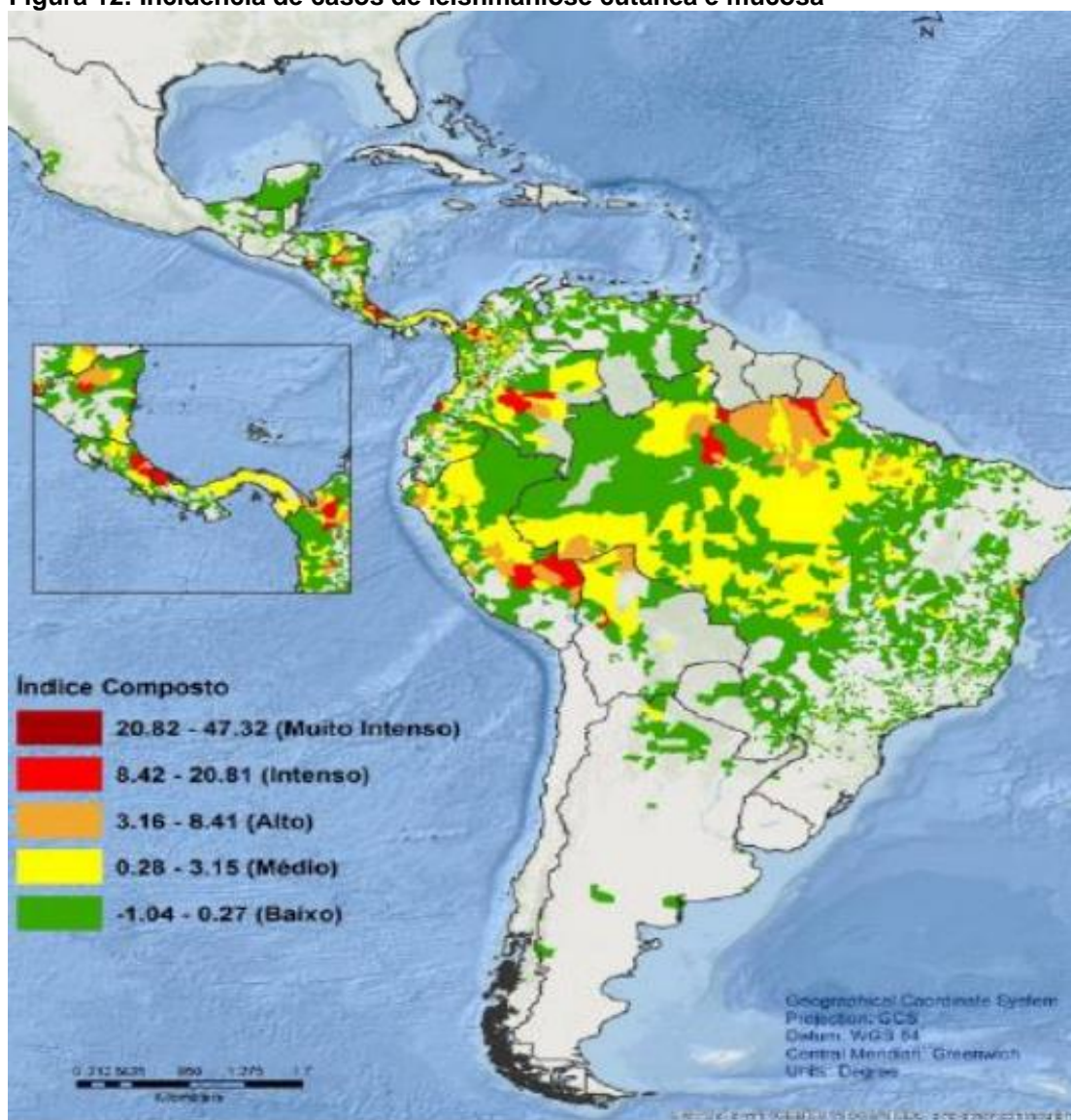
Para Domingos (2012, p.11), no Brasil, as leishmanioses caracterizam-se como “enfermidades emergenciais em franca expansão. A Portaria Ministerial nº 1943 de 18 de outubro de 2001, determina a doença como um agravo de notificação compulsória em todo o território nacional. As formas tegumentares foram notificadas em 27 unidades federativas brasileiras, e casos autóctones de leishmaniose visceral americana foram notificados nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste”. As leishmanioses persistem, portanto, um importante impacto para a saúde pública, com influência nos âmbitos sociais e econômicos (BRASIL, 2003).

1.1.4 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa transmitida por um vetor e causada pelo protozoário intracelular do gênero *Leishmania* (JIRMANUS *et al.*, 2012). A LTA é “uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente” (BRASIL, 2007, p.20). Com exceção do Uruguai e do Chile, está compreendida em todos os países das Américas. No Brasil, também está presente praticamente em todos os Estados da Federação (GONTIJO; CARVALHO, 2003), com sete espécies identificadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. “As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste” (BRASIL, 2007, p.21).

A Figura 12 apresenta a incidência e a densidade de casos de leishmaniose cutânea e mucosa no Brasil, com nível regional conforme risco de transmissão, diferenciadas pela intensidade das cores.

Figura 12: Incidência de casos de leishmaniose cutânea e mucosa



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS (2017).

Segundo Gontijo e Carvalho (2003), Alexandre Cerqueira foi o primeiro a identificar a doença em 1885, sendo que, em 1991, Gaspar Vianna denominou o agente específico de LTA no Brasil de *Leishmania braziliensis*. Sua primeira citação está no livro de Tello, “Antiguidadde la Syphilis en el Peru”, da Pastoral Religiosa Político-Geográfica (1827), que relatava a viagem do Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga ao Peru.

No seu estudo de 2003, Gontijo e Carvalho destacavam que, daquele ano há vinte anos atrás, a incidência da leishmaniose tegumentar no Brasil veio aumentando em praticamente todos os Estados da Federação, constituindo um problema de saúde pública, residindo sua importância na sua alta incidência e ampla distribuição

geográfica, e também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo. No Brasil, a LTA é “uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle” (BRASIL, 2007, p.13). O Quadro 3 apresenta uma adaptação de Gontijo e Carvalho (2003, p.72-73) com as principais espécies de *Leishmania* envolvidas na leishmaniose tegumentar no Brasil.

Quadro 3: Espécies envolvidas LC no Brasil

Espécie	Descrição
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	“É a espécie mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do País, desde o norte até o sul, tanto em áreas de colonizações antigas ou recentes, estando geralmente associada à presença de animais domésticos. É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como <i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lu. wellcomei</i> e <i>Lu. intermedia</i> , dentre outras”(p.72).
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	“Causa sobretudo lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada com desdentados e marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a <i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> e <i>Lu. whitman</i> ” (p.73).
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	“Ocorre na Amazônia, nos Estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural. O parasita causa LTA de evolução benigna e seus principais vetores são a <i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> e <i>Lu. Ayroza</i> ” (p.73)
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	“Responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos e como vetor a <i>Lu. whitman</i> ”(p.43).
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	“Registrada apenas na Amazônia, tem a paca como animal suspeito de reservatório natural e como vetor a <i>Lu. ubiquitalis</i> ”(p.73)
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	“Agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a <i>Lu. flaviscutellata</i> e <i>Lu. olmeca</i> os principais vetores”(p.73).

Fonte: Gontijo e Carvalho (2003, p.72-73)

1.1.5 Epidemiologia

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonoses de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas (BRASIL, 2007, p.13).

Sobre os diferentes fatores que intervêm na difusão e propagação de doenças, como se comportam suas frequências e distribuições, bem como o posicionamento dos meios necessário para sua prevenção, no que se refere ao Brasil, “existem atualmente 6 espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, e mais de 200 espécies de flebotomíneos implicados em sua transmissão”, tendo ocorrência geográfica ampla, em todos os Estados brasileiros, porém com diferentes coeficientes de ocorrência. Ainda segundo os autores, as características periurbanas de transmissão estão relacionadas à saneamento básico, a situação econômica precária, a migração da população para as periferias das cidades, aos materiais de construção inadequados e ao convívio com animais ermos ou mesmo domesticados que servem de novos reservatórios da doença, aliados ao aumento da população de ratos que se concentram nos “depósitos” de lixo destas áreas (BASANO; CAMARGO, 2004).

A LTA ocorre também em função de surtos endêmicos que ocorrem em regiões em situação de colonização, com massiva derrubada de matas, grande ocorrência do ser humano na biocenose do meio e conseqüente infecção por meio de animais silvestres (MARSDEN; JONES, 1985). Segundo Rocha *et al.* (2015, p.49), no Brasil, há ampliação dos casos de LTA, “principalmente por meio de surtos epidêmicos nas Regiões Nordeste, Sul, Sudeste, Centro-Oeste, e, mais recentemente, na Região Norte (área amazônica), que tem como destaque epidêmico o Estado do Amazonas, uma região que, em 2011, apresentou uma incidência de 64,5 casos por 100.000 habitantes”.

Há três perfis epidemiológicos da LTA (BRASIL, 2007) (Quadro 4):

Quadro 4: Padrões epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana

Padrão epidemiológico	Descrição
Silvestre	“Ocorre em área de vegetação primária e é, fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia” (p.25).
Ocupacional e Lazer	“Associado à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo” (p.25).
Rural e periurbano em áreas de colonização	“Relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais” (p.26).

Fonte: Brasil (2007).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que demandam maiores atenções, em decorrência de suas dimensões e pelas implicações clínicas no ser humano, refletindo nos âmbitos psicológicos, sociais e econômicas (BRASIL, 2007).

Segundo a OMS, de um modo geral a epidemiologia da leishmaniose depende das características de cada espécie, ecologia local, exposição corrente e passada da população ao parasita. O Quadro 5 apresenta a epidemiologia por região (WHO, 2017). No que se refere à LTA, o modo de transmissão é através da picada de insetos transmissores infectados. Não há transmissão de pessoa a pessoa (BRASIL, 2007).

Quadro 5: Epidemiologia Leishmaniose por Região

Bacia mediterrânea	leishmaniose visceral	Na bacia do Mediterrâneo, a leishmaniose visceral é a principal forma da doença. Ocorre em áreas rurais, aldeias em regiões montanhosas, e também algumas áreas periurbanas onde os parasitas de <i>Leishmania</i> vivem principalmente em cães.
Sudeste Asiático	leishmaniose visceral	No Sudeste Asiático, a leishmaniose visceral é a principal forma da doença. A transmissão ocorre geralmente em áreas rurais com uma precipitação anual pesada, uma umidade média acima de 70%, um intervalo de temperatura de 15-38 ° C, vegetação abundante, água do subsolo e solo aluvial. A doença é mais comum em aldeias agrícolas onde as casas são frequentemente construídas com paredes de lama e pisos de terra, e gado e outros animais vivem perto de seres humanos. As pessoas são consideradas como o único reservatório dos parasitas de <i>Leishmania</i> nesta região.
Leste da África	leishmaniose visceral leishmaniose cutânea	Na África Oriental, há frequentes surtos de leishmaniose visceral na savana de acácia-balanite do norte e nas áreas de savana e floresta do sul, onde os mosquitos vivem em torno de montículos de cupins. Os seres humanos são considerados o reservatório principal dos parasitas de <i>Leishmania</i> que causam a leishmaniose visceral nesta parte de África. A leishmaniose cutânea ocorre nas terras altas da Etiópia e em outros lugares da África Oriental, onde o aumento do contato humano-mosca ocorre em aldeias construídas em colinas rochosas ou nas margens de rios, que são o habitat natural de hyraxes.
África do Norte-Eurásia	leishmaniose cutânea	No norte da África-Eurásia, a leishmaniose cutânea é a principal forma da doença. Projetos agrícolas e sistemas de irrigação podem aumentar a prevalência de leishmaniose cutânea. Grandes surtos em cidades densamente povoadas também ocorrem, especialmente durante a migração populacional em larga escala. Os parasitas que causam a leishmaniose cutânea vivem principalmente em humanos ou roedores.
Américas	leishmaniose visceral leishmaniose cutânea	A leishmaniose visceral nas Américas é muito semelhante à encontrada na bacia do Mediterrâneo. A epidemiologia da leishmaniose cutânea nas Américas é muito complexa, com variações nos ciclos de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores de mosquitos, manifestações clínicas e resposta à terapia e múltiplas espécies de <i>Leishmania</i> circulantes na mesma área geográfica.

Fonte: Adaptado de WHO (2017)⁷.

Segundo Carneiro (2013), a leishmaniose é transmitida por uma dolorosa picada por fêmeas infectadas dos dípteros da subfamília *Phlebotominae*, constituintes do gênero *Lutzomyia* (nos casos do Novo Mundo) e *Phlebotomus* (nos casos do Velho Mundo).

A LTA causada por *Leishmania (V.) braziliensis* é caracterizada por cronicidade, latência e tendências metastáticas. Em alguns casos, após a aparição de uma lesão cutânea inicial, podem ocorrer lesões cutâneas múltiplas e/ou lesões mucosas como consequência da disseminação do parasita através dos sistemas

⁷ Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >. Acesso em: 01 dez 2017.

sanguíneo e linfático. As lesões cutâneas podem permanecer ativas por muitos anos e podem coexistir com lesões mucosas, como exibido na forma de leishmaniose mucocutânea (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 13: Mosquito do gênero Phlebotomus.



Fonte: Oliveira *et al.* (2013)

Conforme Basano e Camargo (2004), a LTA está distribuída em todo o Brasil. O principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys sp.* (rato-soiá), além de outros roedores, tais como *Oryzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp.* e *Dasyprocta sp.*; os marsupiais *Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.*; e a raposa *Cerdocyon thous*. Segundo Carneiro (2013), há outros pequenos animais silvestres no ciclo da doença, como macacos, tatus e preguiças. O vetor *Lutzomyia flaviscutellata* tem hábito noturno e pouco antropofílico, sendo responsável pela leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa, e cutânea difusa anérgica. Esta última forma ainda é pouco conhecida e não responde favoravelmente ao tratamento (BASANO; CAMARGO, 2004).

1.1.6 Tratamento

Minodier e Parola (2006) discutiram os tratamentos disponíveis, relacionando as formas de administração dos medicamentos mais comuns para cada espécie de *Leishmania* estudada. O Quadro 6 apresenta a relação entre espécie de *Leishmania* e terapia indicada, segundo Minodier e Parola (2006).

Quadro 6: Espécie de *Leishmania* e indicação terapêutica

ESPÉCIE	TERAPIA
<i>Leishmania major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. mexicana</i> , e <i>L. panamensis</i>	Pomadas de paromomicina, antibiótico da classe dos aminoglicosídeos
<i>L. braziliensis</i>	Paromomicina
<i>L. major</i>	Fluconazol oral e sulfato de zinco Azitromicina oral (eficaz em ratos; necessita de investigação adicional em leishmaniose humana).
<i>L. donovani</i> (leishmaniose visceral)	Miltefosina oral
<i>L. guyanensis</i> (leishmaniose cutânea)	Pentamidina intramuscular
<i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> (leishmaniose cutânea americana)	Anfotericina B lipossomal

Fonte: Adaptado de Minodier e Parola (2006).

Por outro lado, e ainda conforme Minodier e Parola (2006), o Quadro 7 apresenta a relação entre o tipo de administração em função da medicação utilizada para o tratamento contra a Leishmaniose.

Quadro 7: Tipo de administração em função da droga contra Leishmaniose

ADMINISTRAÇÃO	DROGAS
Tratamentos tópicos e injeções intralesionais	Injeções intralesionais de antimônio pentavalente
	Outras injeções intra-lesionais
	Pomadas de paromomicina (aminosidina)
	Imiquimod
	Anfotericina B tópica
	Crioterapia
	Calor controlado localizado
	Laser de CO ₂
Tratamentos orais	Terapia fotodinâmica
	Azoles
	Azitromicina
	Miltefosina
Medicamentos intramusculares ou intravenosos	Sulfato de zinco oral
	Antimonial sistêmico
	Combinações de medicamentos com antimoniais
	Pentamidina
	Anfotericina B

Fonte: Adaptado de Minodier e Parola (2006).

O tratamento clássico requer administração de fármacos tóxicos e pouco toleráveis. Os Sb^v, como o antimoniato de meglumina (Glucantime) e o estibogluconato sódico (Pentostam), são a primeira linha de componentes usados para tratar da leishmaniose (TIUMAN *et al.*, 2011). Para Frezard *et al.* (2009), os Sb^v, como o antimônio de meglumina, Glucantime®, estibogluconato de sódio, como o Pentostam®, têm sido utilizados há mais de 60 anos como medicamentos de primeira linha. Não se conhece a estrutura exata destas moléculas e o mecanismo de ação

ainda não foi bem definido. Há indícios de que os Sb^V se comportam como um pró-fármaco que ao ingressar na célula é reduzido à sua forma trivalente Sb^{III} , a qual é tóxica para a *Leishmania*, além de inibir a síntese de ADN, ARN e proteínas do parasita, reduzir os níveis de tripanotión e glutatión e induz à fragmentação de ADN e a expressão de fosfatidilserina (SERENO *et al.*, 2001). A anfotericina B e a pentamidina são os fármacos anti-*Leishmania* de segunda linha, embora necessitem de longos períodos de administração parentérica. A escolha do tratamento depende da espécie de *Leishmania* que causa a doença (TIUMAN *et al.*, 2011).

Segundo Tiunan *et al.* (2011), a maioria dos medicamentos utilizados para o tratamento contra a leishmaniose não é muito eficaz, muitas vezes, em decorrência da quimiorresistência. Assim, torna-se ainda mais relevante o estudo de alternativas terapêuticas para substituir ou alterar os tratamentos atuais, sendo que há avanços na quimioterapia nos últimos anos. Os Sb^V são utilizados para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose. Uma meta-análise de 23 estudos mostrou que 76% dos pacientes com LC no Novo Mundo respondem à terapia com Sb^V , sendo a *L. braziliensis* a espécie que prevalece, com 87,5% dos casos (TUON *et al.*, 2008). Segundo Tuon *et al.* (2008), foram observadas diferenças na resposta ao tratamento com antimoniato de N-metil-glucamina segundo a região estudada, como no caso de 310 pacientes no Brasil que apresentaram uma média de cura de 71,3%, enquanto que em 449 dos pacientes na Colômbia, foi de 91,0%. Não foram observadas diferenças nas atividades entre Glucantime e o Pentostam.

A dose de Sb^V administrada aos pacientes tem aumentado muito. Em meados dos anos 70, a dose total para um paciente adulto de 65 kg era de 4,25 g de antimônio (~6,5mg/Kg x 10 dias). Em 1984, a OMS aumentou a dose e recomendou que fosse administrada a um paciente de 65 Kg o total de 26 g (20mg/Kg por dia durante 20 dias), critério que ainda se mantém vigente (RIBEIRO, 2014). As maiores desvantagens que se apresentam neste tratamento são a aparição de cepas resistentes aos antimoniais, como o caso de Bihar na Índia, que em algumas regiões passa de 50% (SUNDAR, 2001), e os numerosos efeitos colaterais, como: dores no local de aplicação durante a injeção intramuscular, vômito, náuseas, elevação de transaminases, mialgias, artralgias, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cefaleia, diarreia, alterações eletrocardiográficas, falhas cardíacas e morte associada à fibrilação ventricular (SAMPAIO *et al.*, 1997). Em estudos com pacientes com LV, na Índia,

Sundar *et al.* (2007) verificaram que a paromomicina administrada por injeção intramuscular glútea profunda (11 mg/kg/dia) durante 21 dias foi igualmente eficaz como a perfusão de anfotericina B (1mg /kg/dia) durante 30 dias.

Peñaranda (2010) considera o tratamento baseado no uso de antimoniato de N-metil-glucamina administrado parenteralmente em doses de 20 mg/Kg durante 20 dias para o tratamento da LC e 28 dias para LCM e LV. Agrega que quando há falha terapêutica, administra-se novamente Sb^v 20 mg/Kg por mais 20 dias. Como tratamento de segunda opção, utiliza-se o isotionato de pentamidina (Pentacarinat®) em dose de 3mg/Kg/dia, com aplicação de quatro vezes em dias alternados para LC, enquanto que para LMC o tratamento deve ser aplicado durante 22 dias, o que aumenta os riscos de toxicidade. Em tratamentos de maior complexidade, aplica-se a anfotericina B (Fungizone®), que é um antibiótico polienomacrólido produzido por *Streptomyces nodosus*, cujo mecanismo de ação está relacionado com a afinidade do medicamento pelos esteróis que causam a permeabilidade da membrana celular pela formação de poros aquosos. Para este caso, quando há ocorrência de falha terapêutica e para o tratamento de LMC e LV, aplica-se com Sb^v com dose de 0,5-1,0mg/Kg durante 20 a 40 dias por administração intravenosa, seguindo a resposta clínica do paciente (BRAJTBURG; BOLARD, 1996). A anfotericina B apresenta uma excelente atividade leishmanicida e tem sido de grande utilidade para o tratamento de LMC, LCD e LV (RODRIGUEZ *et al.*, 1995). Duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde que são (i) o desoxicolato de anfotericina B e (ii) a anfotericina B lipossomal, com eficácias comparáveis, sendo que esta última apresentou menor toxicidade em trabalhos desenvolvidos na Índia (THAKUR; NARAYAN, 2004; MEYERHOFF, 1999). Os maiores limitantes da anfotericina B são o custo, a hospitalização do paciente para tratamento e os efeitos colaterais, uma vez que pode ser cardiotoxíco e nefrotóxico (CLEMENTS; PEACOCK, 1990).

A despeito dos fármacos comumente utilizados, as plantas são uma fonte potencial de novas drogas antiprotozoários. A atividade biológica dos extratos de plantas tem sido atribuída a compostos pertencentes a diversos grupos químicos, incluindo alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides e terpenoides (TIUMAN *et al.*, 2011).

1.1.6.1 Miltefosina

A miltefosina (Impavido®) foi incluída ao tratamento da leishmaniose e constitui a primeira opção em caso de tratamento oral. A miltefosina (hexadecilfosfocolina), medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, tem ação eficaz sobre as leishmanias (COSTA FILHO, LUCAS, SAMPAIO, 2008). Estudos comprovam sua atividade antiprotozoária em *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica* e *Leishmania*, exibindo um considerável potencial microbicida (SEIFERT *et al.*, 2001). Paris *et al.* (2004) consideram que seu mecanismo de ação está relacionado com a interferência em vias de sinalização celular, ativação de macrófagos citotóxicos, alterações na membrana lipídica e apoptose. Perez-Victoria *et al.* (2006) falam sobre os efeitos teratogênicos e reações adversas resultantes da miltefosina, sugerem que o desenvolvimento de cepas resistentes pode ser decorrente da larga vida média do composto no organismo humano.

Segundo Costa Filho, Lucas e Sampaio (2008), corroborando Mohebbali *et al.* (2007), a miltefosina tem ação que interfere na membrana celular do parasita, não interage com o DNA, e “modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidos, induzindo morte celular por apoptose” (p.424), ressaltando-se como medicamento promissor para o tratamento contra a LT, com administração por via oral e menor índice de efeitos colaterais. Outros estudos apresentam resultados de eficácia da miltefosina para o tratamento contra a leishmaniose. Soto *et al.* (2008) utilizaram miltefosina para o tratamento de LT, em estudos envolvendo humanos na Bolívia, e obtiveram cerca de 88% de eficácia no tratamento de lesões cutâneas. Em outros estudos, Vélez *et al.* (2010), Machado *et al.* (2010), e Chrusciak-Talhari *et al.* (2011), obtiveram percentuais de cura de, respectivamente, 69,8%, 88,2% e 71,4%.

1.1.6.2 Antimoniato de N-metil-glucamina

O antimoniato de N-metil glucamina surgiu na França como um medicamento alternativo ao antimônio sódico, comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina (RATH *et al.*, 2003), obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina. Segundo Costa Filho, Lucas e Sampaio (2008, p.424), o tratamento de primeira linha da LMC é N-metil-glucamina administrado por via parenteral. Da mesma forma, Alvarenga *et al.*, 2010

também consideraram o antimoniato de N-metil-glucamina como fármaco de primeira escolha para o tratamento contra a leishmaniose, recomendando cuidados que devem ser observados: “avaliação e estabilização das condições clínicas e comorbidades presentes no diagnóstico da leishmaniose visceral, além da realização do eletrocardiograma” (p.194), além de contra indicar para pacientes que fazem uso de “beta-bloqueadores e medicamentos antiarrítmicos, com insuficiência renal ou hepática, em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres de gestação” (p.195).

O antimoniato de N-metil-glucamina, segundo Rath *et al.* (2003, p.552), “é especialmente eficaz no tratamento de LC, LMC e LV. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasita”. Devido a sua alta toxicidade, a OMS não recomenda o uso de antimoniato de N-metil-glucamina em quantidade superior a 20mg/kg/dia e sem ultrapassar o limite de 850mg de antimônio e pode haver ocorrência de efeitos colaterais, tais como mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (RATH *et al.*, 2003) e é ineficaz em alguns casos (COSTA FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008).

No Brasil, a formulação distribuída pelo Ministério da Saúde para o tratamento da leishmaniose foi antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) até 1996, entretanto, com valor muito elevado. Por conta disto, o Ministério da Saúde passou a licitar a produção chinesa do estibogluconato de sódio BP88®, distribuída pela Shandong Xinhua Pharmaceutical Factory (DEPS *et al.*, 2000).

Quando Deps *et al.* (2000) compararam a eficácia e a toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de sódio BP88® no tratamento da LC localizada, avaliaram que houve cura de 81% dos pacientes tratados com antimoniato de N-metil-glucamina, sendo que o grupo tratado com estibogluconato de sódio BP88® apresentou 77% de cura e com maior toxicidade. “A toxicidade e o índice de recidivas e resistência às drogas justificam a busca de novas drogas para tratar a LT” (COSTA FILHO, LUCAS, SAMPAIO, 2008, p.424).

1.1.6.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

Segundo, Simplicio *et al.* (2002, p.802), há evidências de que há mais de 4.000 anos atrás os egípcios deram início a essa terapia, por meio da ingestão de plantas

(contendo os psoralenos, furo[3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofuranoacrilico δ -lactona) e luz solar, para tratar doenças como o vitiligo. A TFD é uma reação fotoquímica associada a um fotossensibilizador (luz e oxigênio) (DAI *et al.*, 2009) e seu manuseio inicial foi para o tratamento de câncer cutâneo (O'RIORDAN *et al.*, 2005), ainda em 1903, por Von Tappeiner. Por outro lado, para Dolmans *et al.* (2003), a TFD foi desenvolvida por Oscar Raab em 1900 e Thomas Dougherty realizou o primeiro estudo clínico em 1978. Trata-se de uma modalidade terapêutica que parte da administração de agente fotossensibilizador (FS) com aplicação de laser (MOSTAFA; TARAKJI, 2015) para o tratamento de neoplasias malignas (TEDESCO *et al.*, 2003) e, posteriormente, adotada para o tratamento de doenças como câncer, displasias, liquen plano, periodontite, entre outras (GURSOY *et al.*, 2013), para reparo de tecidos e cicatrização, com efeito analgésico, anti-inflamatório e antibacteriano (PRIMO *et al.*, 2008). A TFD é adequada em casos de tumores médios e pequenos e degeneração macular do tipo clássica, desde que com rigoroso diagnóstico e avaliação, com processo de infusão lento e cuidadoso para que se evite extravasamento (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

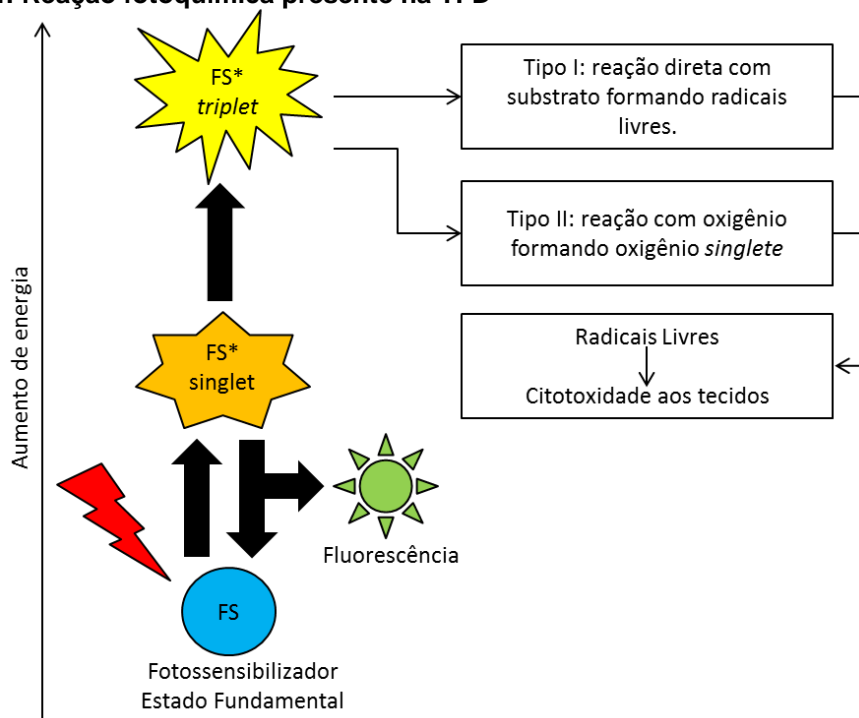
1.1.6.3.1 Funcionamento

Segundo Lambrechts (2005), a TFD pode ser administrada tópica ou sistemicamente por meio de agente fotossensibilizador não tóxico, com irradiação em comprimento de onda adequado, que produzem radicais livres e transferem energia e oxigênio, reagindo, portanto, com as moléculas de oxigênio das células. Essa administração deve ser compatível ao espectro de absorção do FS (TOREZAN *et al.*, 2009). Da mesma maneira, segundo Machado (2000, p.237), a TFD “parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotosensibilizador) e oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células”, causando a morte de microrganismos, compreendendo três fases: (i) excitação do FS, produção de Espécie Reativas de Oxigênio (ERO); e (iii) morte celular (CHATTERJEE *et al.*, 2008). Segundo Longo (2008), essa geração de agentes citotóxicos – decorrentes das interações dinâmicas entre FS – ativam geração de fótons, decorrendo em instabilidades químicas nas moléculas, alterando o padrão de organização eletrônica normal. A molécula retoma seu estado original por meio da excitação eletrônica em intensidade de energia um pouco menor do que da absorção

de fóton pelo fármaco FS. Segundo Issa e Manela-Azulay (2010, p.502), para o tratamento de tumores gastrointestinais, cerebrais ou broncopulmonares, os fotossensibilizantes são administrados via oral ou endovenosa; para tumores do endométrio e carcinoma da bexiga, por instilação predominantemente; e para tratamento de tumores cutâneos, as drogas podem ser aplicadas topicamente, com boa eficácia.

No que se refere aos grupos de fontes de luz correlacionados à TFD, a ação de cada um varia em função do espectro de emissão, da irradiação, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho, e Toreza *et al.* (2009) apontaram três: (i) lâmpadas de amplo espectro, (ii) lâmpadas de diodo; e (iii) lasers. A Figura 14 apresenta o esquema de funcionamento da reação fotoquímica presente na TFD, descrevendo a produção de radicais livres após excitação do FS com irradiação a laser (RIBEIRO, 2014).

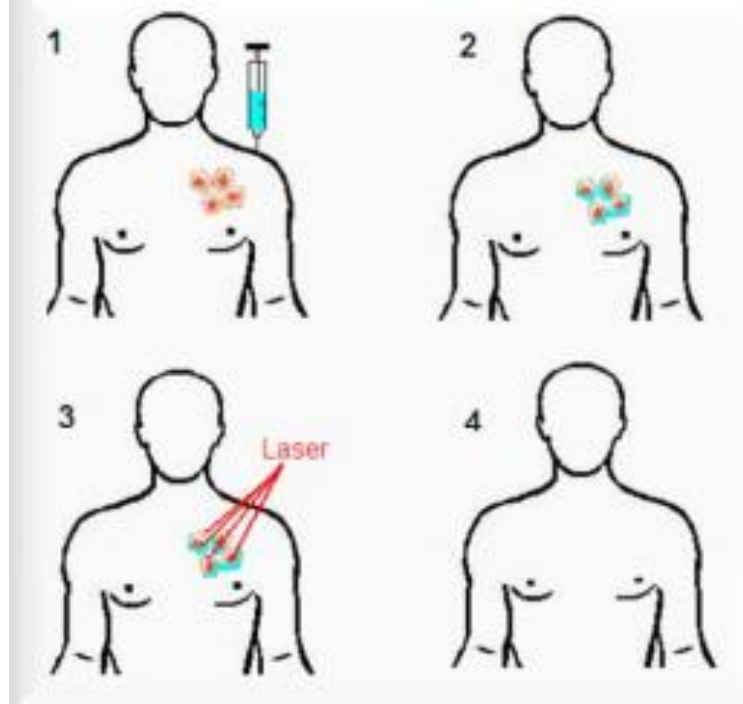
Figura 14: Reação fotoquímica presente na TFD



Fonte: Ribeiro (2014).

Silva (2013) representou o esquema da sequência de eventos que ocorrem na TFD, conforme apresentado da Figura 15, onde: (i) administração do FS; (ii) acúmulo do FS preferencialmente no tecido neoplásico; (iii) irradiação com laser, LED ou fonte de luz monocromática para ativação do FS; e (iv) morte do tecido neoplásico lesionado.

Figura 15: TFD - Representação esquemática



Fonte: Silva (2013).

Simplicio, Maionchi e Hioka (2002, p.803) enumeraram 09 características das drogas a serem utilizadas em TFD:

1. aspectos fotofísicos favoráveis;
2. baixa citotoxicidade;
3. fotossensibilidade não prolongada;
4. simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de 2 anos);
5. farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
6. facilidade de manuseio sintético, permitindo modificações de propriedades;
7. disponibilidade e baixo custo, com boa reprodutibilidade;
8. facilidade de análise total dos componentes da fórmula, com fornecimento de roteiros de validação; e
9. alta penetração no tecido doente.

1.1.6.4 Fotossensibilizadores

Os FS são “compostos que absorvem energia da luz em comprimentos de onda específicos e utilizam essa energia para induzir reações de foto oxidação na presença

de oxigênio molecular em outras moléculas que não absorvem energia” (SILVA; SANTOS; RICCI-JÚNIOR, 2009, p.213), com acúmulo no tecido tumoral para gerar agentes citotóxicos, induzindo o efeito fotobiológico desejado. Segundo Dougherty *et al.* (1998), os FS são essenciais à TFD, por meio de energia luminosa, gerando espécies químicas altamente reativas para destruição das células-alvo. Ainda conforme os mesmos autores, os FS podem ser classificados em três gerações, sendo: (i) a primeira, desenvolvida ao final dos anos setenta; (ii) a segunda, nos anos noventa; e (iii) a terceira, com associações terapêuticas aos FS. Como apresenta o Quadro 8, outros autores classificam famílias de FS conforme semelhanças químicas entre os fármacos (ALISSON *et al.*, 2004).

Quadro 8: Classificação dos FS por famílias

Família	Precursor Químico	Nome Comercial
Porfirinas	Derivados de hematoporfirina	Photofrin®
	Ácido aminolevulínico (ALA)	Levulan®
	Verteporfirina	Visudyne®
Clorinas	Temoprofina	Foscan®
	Talaprofin	LS11®
	Photochlor (HPPH)	Photochlor®
Ftalocianina	Alumínio-Sulfonada-Ftalocianina	Photosesns®

Fonte: Alisson *et al.*, 2004.

Por outro lado, Silva *et al.* (2009) também classificaram os fotossensibilizadores em famílias, de acordo com a estrutura química (Quadro 9).

Quadro 9: Classificação dos fotossensibilizantes

FAMÍLIAS DE FOTOSENSIBILIZANTES
Derivados da Porfirina
Hematoporfirina, Benzoporfirina e Ácido 5-aminolevulínico e Metil-aminolevulinato
Derivados da Clorofila
Clorinas e Bacterioclorinas
Corantes
Ftalocianinas e Naftalocianinas

Fonte: Silva, Santos e Ricci-Júnior (2009).

No que se refere aos FS, há vários tipos, sendo que os mais adotados para TFD são as classes das porfirinas, clorinas e ftalocianinas. Segundo Longo (2008) a escolha pelo FS depende de cada caso, da “toxicidade e carcinogenicidade dos fármacos, seletividade pelas células-alvo, possíveis efeitos adversos ocasionados

pela exposição à luz branca, via de administração, custos, capacidade de eliminação das drogas, e comprimento de onda para ativação e efetividade clínica”.

1.1.6.5 Ftalocianina cloro-alumínio (AICIPC)

Segundo Oliveira *et al.* (2015), as ftalocianinas estão contidas na classe de compostos aromáticos com átomos de nitrogênio, com estruturas de elevada conjugação eletrônica e absorção. As ftalocianinas são FS promissoras em TFD, conforme Silva (2013, p.06), contudo “são solúveis apenas em solventes orgânicos, uma vez que sua estrutura química é altamente conjugada”, apresentando vantagens como alta estabilidade térmica, alta absorção de luz visível e capacidade de ajustar seu potencial de oxidação e redução, “quando é alterado o átomo central do anel pirrólico permitindo a inserção de substituintes periféricos que mudam suas propriedades químicas” (p.07).

A ftalocianina cloro-alumínio (AICIPC) tem sido associada às terapias para tratamentos dermatológicos e parasitários, como o estudo de Bastos *et al.* (2013), que apresenta a análise de sua ação com a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana. As ftalocianinas foram desenvolvidas para reduzir os problemas com as hematoporfirinas e seus derivados, isso por apresentarem características de serem puras, eficientes geradoras de oxigênio singlete e “apresentarem alta absorção entre 650 a 800nm, que é a faixa de comprimento de onda onde ocorre máxima transmitância da luz pelos tecidos e, portanto, a mais utilizada no tratamento de cânceres de pele” (SILVA; SANTOS; RICCI-JÚNIOR (2009, p.215), além de alta seletividade para tecidos tumorais e rápida eliminação do organismo, o que minimiza a fotossensibilização sistêmica. Isso porque a ftalocianina é um fármaco fotossensível classificado como de segunda geração e que apresenta grande lipofilicidade (BASTOS, NITSCHKE, PARIZOTTO, 2013). Segundo Çamur *et al.* (2011), a penetração tecidual da luz é maior em decorrência de sua alta absorção na faixa de espectro de luz por sua propriedade fotossensibilizadora.

Segundo Bastos *et al.* (2013), a TFD associada a AICIPC apresentou ação sobre a proliferação fibroblástica em feridas de ratos, resultando em re-epitelização e maior presença de colágeno no local da lesão. Outros estudos e ensaios pré-clínicos demonstraram resultados promissores para a sua aplicação na TFD. Dentre suas

vantagens, as ftalocianinas são ativadas por luz em comprimento de onda elevados (650-750 nm), o que permite maior penetração. Outro fator é sua hidrofobicidade que a incorpora a sistemas de liberação de drogas específicas para que possam circular por meio do plasma sanguíneo (ALISSON *et al.*, 2004). Segundo Carneiro (2013, p.10), “as propriedades fotofísicas desses compostos estão diretamente relacionados ao íon metal central, que deve ser escolhido de acordo com a aplicação de TFD”. Carneiro (2013, p.10) complementa que “as ftalocianinas são fortes candidatas à utilização em TFD pela eficiente incorporação nas células alvo, por exibir altas taxas de geração de tripletos e induzem a uma ótima penetração tecidual da luz, devido aos seus altos coeficientes de absorção na faixa de 650 a 680 nm”.

Assim como em Ribeiro (2014), para o presente estudo, a AICIPC foi microencapsulada dentro de lipossomas, com o objetivo de se alcançar uma maior absorção da pele das moléculas. Segundo Oliveira *et al.* (2006), a associação de ftalocianinas a lipossomas permite maior captação por células tumorais. A presença de lipídio na parede lipossomal amplia a captação dos fármacos pelos tecidos tumorais, pelo aumento de receptores de membrana, e essa afinidade química permite maior captação de FS pelas células neoplásicas.

A microencapsulação é uma técnica que tem sido amplamente adotada por indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis e cosméticas, em decorrência de sua característica de proteção de substâncias lábeis e voláteis, controle da liberação do fármaco, apoiando, desta forma, a melhoria na biodisponibilidade, redução de doses terapêuticas e toxicidade. Lasic (1998) apontou a aplicabilidade da microencapsulação como modelo para técnicas mais sofisticadas, em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas. Com a descoberta dos lipossomas na década de 60, a quantidade de tecnologias para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica aumentou com sistemas lipídicos para vetorização de fármacos, permitindo posteriormente o desenvolvimento de nanossistemas, como lipossomas e nanopartículas e microssistemas, como micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões (SILVA, 2004).

Lasic (1998) definiu lipossomas como vesículas aquosas circundadas por bicamada concêntrica de fosfolipídios, que agem de forma sistêmica na liberação de fármacos devido à sua flexibilidade estrutural (tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica), e também à sua capacidade de incorporar variedade de compostos

hidrofílicos e hidrofóbicos, como afirmou Pontes *et al.* (1999). Diebold *et al.* (2006) consideraram que os lipossomas são os sistemas nanométricos mais estabelecidos clinicamente para a entrega de fármacos citotóxicos, genes e vacinas. O tamanho dos lipossomas varia de 20 nm até alguns micrometros, com espessura de bicamada lipídica em torno de 6 nm. Para Bergstrand *et al.* (2003), os lipossomas possibilitam a vetorização e a proteção do fármaco e o possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos.

1.1.7. Importância do modelo experimental C57BL no estudo da *Leishmania*

Os modelos experimentais animais têm sido utilizados desde a antiguidade para o conhecimento humano, como Aristóteles e Hipócrates, para o conhecimento médico. No decorrer da história são inúmeros os ganhos de conhecimento vindos do uso de animais de pesquisa. Atualmente, ainda são necessários. O uso de animais experimentais permite o conhecimento de fatos que não são possíveis utilizando métodos *in vitro*.

Na busca do conhecimento dos fenômenos fisiopatológicos que ocorrem na leishmaniose, o uso de animais tem sido de intensa importância. Os modelos mais utilizados são o C57BL/6, C57BL/10 e BALB/C, além de outras linhagens, utilizadas quando são procurados aspectos mais específicos.

A linhagem C57BL é composta de animais geneticamente idênticos (isogênicos) e foi desenvolvida em 1921, por Charles Cook Little, no centro de pesquisa Cold Spring Harbour. A partir dessa linhagem inicial, em 1932, no Jackson Laboratory, foram criadas as linhagens C57BL/6 e C57BL/10 (SNELL; LITTLE, 1975). A sub linhagem C57BL/6J foi a primeira a ter seu sequenciamento genético finalizado, em 2002, e cujo código genético foi comparado ao humano, em 2009 (WATERSTON *et al.*, 2002, CHURCH *et al.*, 2009), o que tem gerado inúmeras pesquisas em genética e transgenia. Por serem isogênicos, é possível coletar dados e combiná-los com outros obtidos anteriormente, levando a uma caracterização fenotípica bem definida. Esse conhecimento permite que a pesquisa seja mais acurada, clara e objetiva, explorando os fatos conhecidos, considerando pontos de susceptibilidade e resistência, de interações que permitem avanços precisos.

Estudos realizados com a sub linhagem C57BL/6 demonstraram que a resistência à *Leishmania major* é relacionada com a resposta imunológica associada ao linfócito CD4+ Th1, que respondem a infecções, produzindo Th1, que induz a produção de interferon gama (INF- γ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Ambos induzem a produção de óxido nítrico, que é tóxico para o parasita (LORÍA, 2011; LIEW *et al.*, 1997; MURRAY, DELPH-ETIENNE, 2000). Além disso, devido à resposta do tipo Th1, há diminuição da resposta do tipo Th2, comum em animais susceptíveis a essa espécie de *Leishmania* (MILLS, 2000).

Ainda que a infecção cutânea pela *Leishmania major* esteja bem conhecida, há ainda a necessidade de conhecer como agem as outras espécies e a patofisiologia dos diferentes tipos de quadros clínicos. O camundongo C57BL/6, resistente a *L. (L.) major*, é susceptível a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* e apresenta quadro clínico crônico. Entre as espécies do parasito, existem fatores de virulência diferentes, que resultam em ações diferenciadas no sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente, patologias diferenciadas (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004) A susceptibilidade varia, de acordo com a linhagem, como também a resposta imunológica. Ainda não é conhecido como a *L. (L.) amazonensis* age nesses animais. E, quanto à *L. (L.) mexicana*, sabe-se que a resposta está, em parte, relacionada à Interleucina 12 (IL-12) no estágio tardio da doença, mas não no início da infecção (AGUILAR-TORRENTERA *et al.*, 2002) e que a resposta Th2 é presente, ainda que em baixo nível, com controle da replicação do parasito e da disseminação visceral, demonstrando uma susceptibilidade intermediária (AGUILAR-TORRENTERA *et al.*, 2002; ROSAS *et al.*, 2005)

A partir do conhecimento da patofisiologia da infecção, é possível desenvolver medicamentos e vacinas. A partir dos estudos na linhagem C57BL/6 sobre a patologia da *L. (L.) major*, foi possível iniciar o desenvolvimento de uma vacina, que tem proteção de até 80%. Diante do desconhecimento da forma como se desenvolve a doença causada por outras espécies de *Leishmania*, ainda é necessário o uso de modelos animais como o camundongo C57BL/6. O fato de ser parcialmente susceptível permite a avaliação de tratamentos e a eficácia de vacinas nessa linhagem.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia *in vivo* da utilização sistêmica do antimoniato de N-metil-glucamina associado à terapia fotodinâmica tópica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L) amazonensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia do tratamento da leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (L) amazonensis* por meio da associação da terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal e tratamento sistêmico com N-metil-glucamina.
- Comparar os resultados do tratamento por meio da associação da terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal e tratamento sistêmico com antimoniato de N-metil-glucamina com o tratamento considerado como padrão ouro.
- Avaliar a possibilidade de redução das doses do antimoniato de N-metil-glucamina associadas à terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio lipossomal no tratamento da Leishmaniose cutânea.
- Investigar a possibilidade de redução dos efeitos adversos do antimoniato de N-metil-glucamina, associada à terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio lipossomal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo *in vivo*, do tipo experimental em modelo animal camundongo C57BL/6.

3.2 CEPAS DE *Leishmania*

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/PH8) oriundas da OMS, identificadas pela técnica de isoenzimas e anticorpos monoclonais, mantidas em culturas crio preservadas em nitrogênio líquido (-196°C). As culturas foram periodicamente inoculadas em camundongos isogênicos para assegurar a infectividade e garantir a virulência dos inóculos.

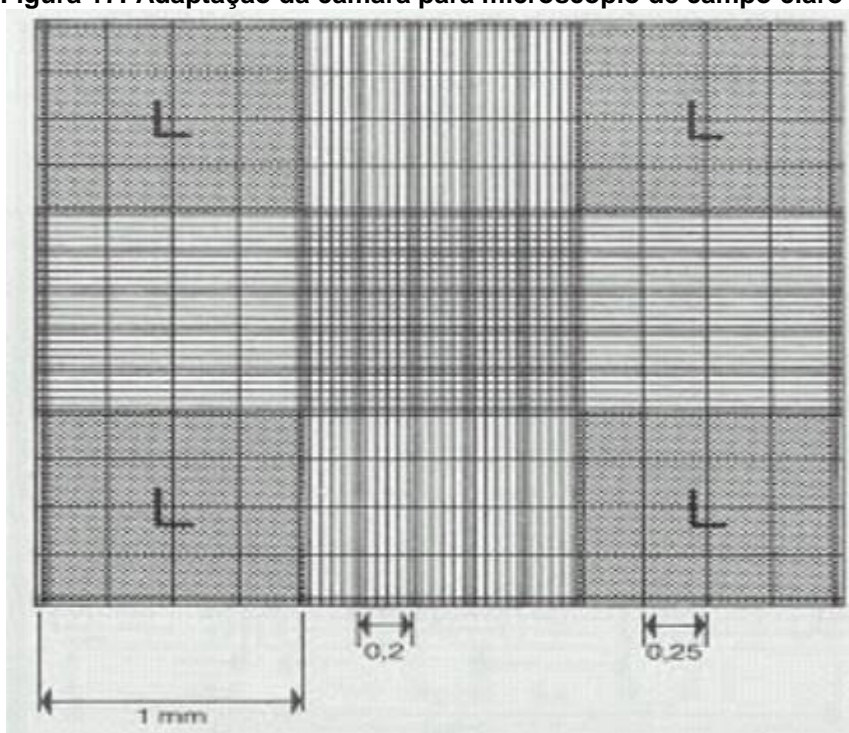
3.3 CONTAGEM DOS PARASITOS

Feita a replicação das formas promastigotas, a contagem de parasitos foi realizada com o uso da câmara de Neubauer Inlab (São Paulo, Brasil) (FIGURA 16). Dois quadrantes opostos foram contados calculada a média, e o número de parasitos foi dividido por dois. Os parasitos foram suspensos em uma diluição com 10 μL do meio de cultura e 90 μL de PSB, homogeneizada, e a câmara de Neubauer foi preenchida com uma porção alíquota dessa suspensão, na fase logarítmica de crescimento.

Figura 16: Câmara de Neubauer utilizada na contagem dos parasitas



Figura 17: Adaptação da câmara para microscópio de campo claro



A Figura 17 mostra a câmara de contagem adaptada para microscópio de campo claro. Ainda conforme a Figura 16, a área destacada com “L” corresponde à parte da câmara para contagem de parasitos. Foram estabelecidos os critérios de contagem: não foram contadas rosetas ou emaranhados e as formas promastigotas em divisão avançada foram contadas como dois. Por outro lado, as formas no início da divisão foram contadas como um. As formas que estavam sobre a linha e muito próximas ao quadrante também foram contadas. A quantidade em volume de meio de cultura que contém 3×10^6 formas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* por poço foi obtida após três contagens em câmara de Neubauer e obtenção da média das formas promastigotas.

3.4 ANIMAIS

Foram adotados 9 grupos, cada grupo composto por 6 animais fêmeas adultas, (n = 54 animais) da espécie *Mus musculus*, cepa C57BL/6, com aproximadamente 23g, e provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todos os animais utilizados neste estudo possuíam atestado sanitário,

que comprova que os animais estavam livres de agentes patogênicos. Desses grupos, 7 foram de tratamento. O oitavo grupo foi mantido com infecção e sem tratamento para servir como controle comparativo. O nono grupo foi o controle saudável, sem infecção e sem tratamento.

Sobre a imunologia da *Leishmania amazonensis*, é possível descrever que ela induz uma resposta imune de células T auxiliares do tipo Th2, isso ajuda a ativar células B, que por sua vez atua na produção de anticorpos. Já a *L. major* induz resposta do tipo Th1 em camundongos CBA, atuando na ativação de macrófagos, possibilitando a ocorrência de resposta imune mediada por células. É possível que a suscetibilidade dos camundongos C57BL/6 para *L. amazonensis* à ausência de resposta imune Th1, entretanto ela não é controlada exclusivamente por células Th2. Existem relatos demonstrando que a infecção desencadeada por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/10 esteja relacionada à falta da resposta do tipo Th1 e por ela ser suficiente para causar a multiplicação parasitária e como consequência o desenvolvimento da lesão (RIBEIRO, 2014).

O Quadro 10 apresenta o esquema com padrões gerais para o tratamento com terapia fotodinâmica tópica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal associadas ao antimoniato de N-metil-glucamina.

Quadro 10: Tratamento com TFD com AICIPC associadas ao antimoniato de N-metil-glucamina

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICAÇÃO
Cepa de Camundongo	C57BL/6
Peso Médio por Camundongo	23g
Sexo dos Camundongos	Fêmea
Idade dos Camundongos	3-4 meses
Via de Administração	Tópica e intraperitoneal
Tempo de Tratamento	20 dias
Ftalocianina Cloro-Alumínio de formulação lipossomal (AICIPt)	0,5 ml
Antimoniato de N-metil-glucamina	10 e 20mg/kg/dia

Fonte: Dados da pesquisa.

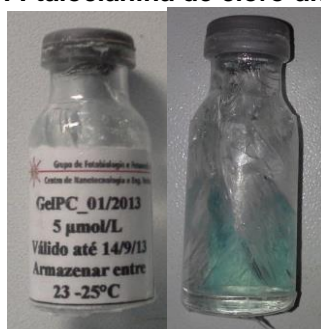
A Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FMUB) possui Biotério com ambiente adequado com gaiolas forradas com maravalha esterilizada e controle de luminosidade, para a manutenção dos camundongos, cuja idade mínima para início do tratamento era de 10 semanas. Há médico veterinário responsável pelo Biotério. O controle de luminosidade foi feito com ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro,

e com água e ração *ad libitum* durante todo experimento. Os camundongos C57BL/6 foram adotados por ser o modelo experimental que mais se aproxima do modelo humano na resposta ou manifestação de LC. A maioria das lesões em cepas de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*, não tem cura espontânea e a suscetibilidade à infecção apresenta diferentes graus podendo desenvolver lesões crônicas que não curam.

3.5 AMOSTRAS

Os fármacos empregados para o grupo de tratamento foram fornecidos por duas Universidades, sendo o antimoniato de N-metil-glucamina fornecido pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília (UnB), e a AICIPC lipossomal GelPC fornecido professor Cláudio Tedesco por meio da Universidade de São Paulo (USP), *campus* Ribeirão Preto (FIGURA 18).

Figura 18: Ftalocianina de cloro-alumínio



3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os 9 grupos definidos para esta pesquisa foram estabelecidos de acordo com os seguintes critérios:

- (i) Grupo Controle Negativo;
- (ii) Grupo Controle Positivo;
- (iii) N-metil glucamina 10mg Sb^V/kg/dia-20 dias;
- (iv) N-metil glucamina 20mg Sb^V/kg/dia-20 dias (padrão ouro);
- (v) Somente laser 10 dias, em dias alternados;
- (vi) Somente AICIPC lipossomal 10 dias, em dias alternados;

- (vii) Somente TFD com AICIPC lipossomal 10 dias, em dias alternados;
- (viii) N-metil glucamina 10 mg Sb^V/kg/dia-10 dias + TFD com AICIPC lipossomal 10 dias, em dias alternados;
- (ix) N-metil glucamina 20mg Sb^V/kg/dia-20 dias + TFD com AICIPC lipossomal em dias alternados.

3.7 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Antimoniato de N-metil-glucamina intraperitoneal e AICIPC lipossomal tópica.

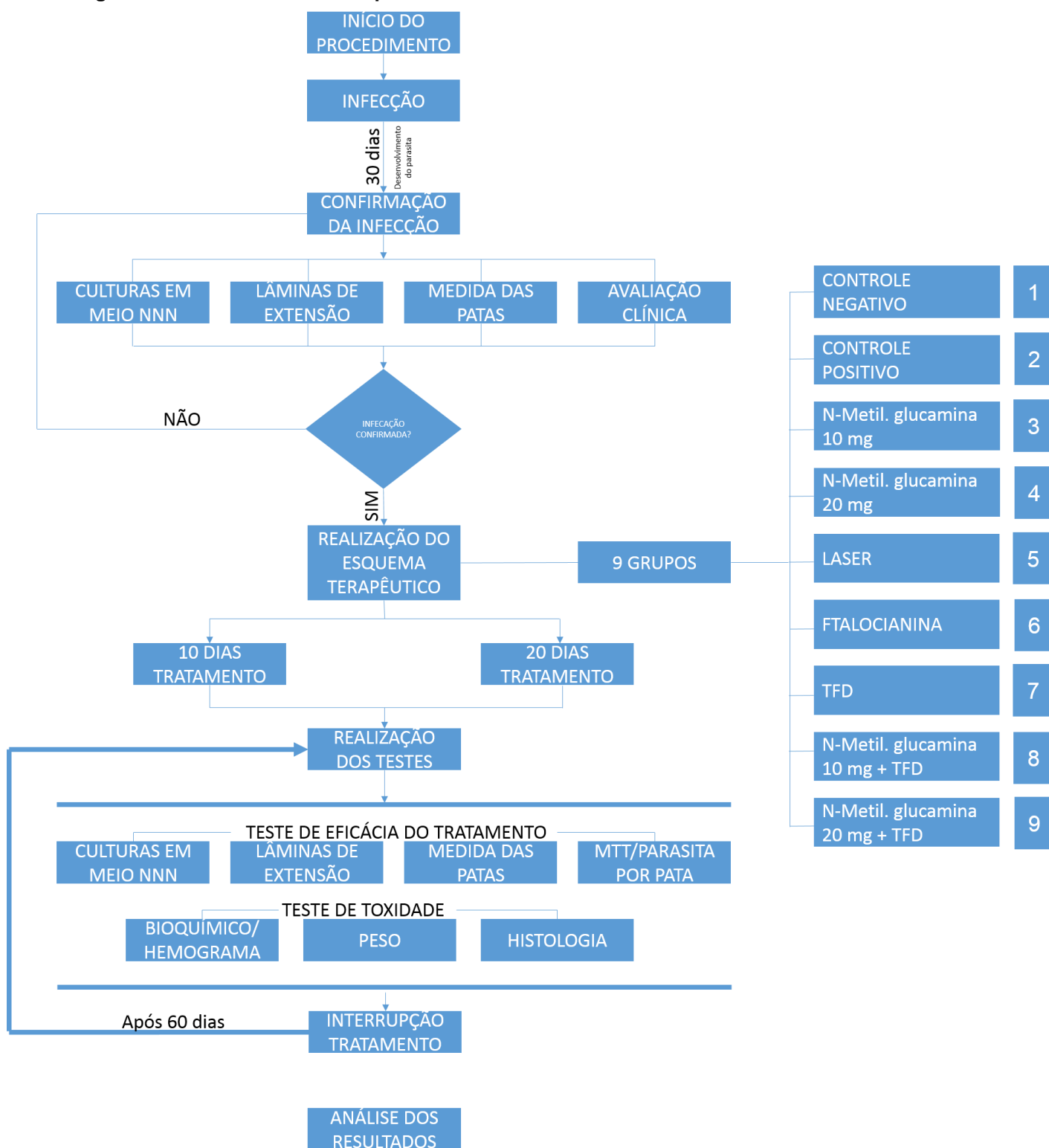
3.8 QUESTÕES ÉTICAS

A Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília aprovou todos os procedimentos metodológicos do estudo (UnBDoc 83795/2012) (APÊNDICE I).

3.9 DESENHO EXPERIMENTAL *in vivo*

O desenho experimental definido para este estudo segue o fluxo conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19: Fluxo do desenho experimental *in vivo*.



3.9.1 Infecção

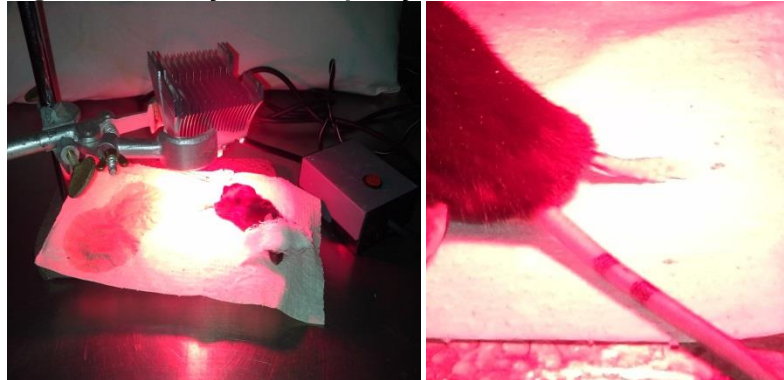
Todos os sete grupos que receberam os tratamentos e o grupo controle positivo, que foi o infectado e não tratado, foram infectados com 100 µL concentrado parasitário de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) na pata traseira direita, via intradérmica com o auxílio de uma seringa de insulina contendo 3×10^6 parasitos.

Após 30 dias da inoculação, realizou-se a confirmação da infecção: (i) por meio da medida das patas; (ii) com a coleta do exsudado das patas traseiras direitas, o qual foi analisado mediante a confecção de dezesseis lâminas de extensão coradas com Giemsa, sendo duas para cada grupo, e observação em microscópio luz Zeiss Axiophot (Jena, Alemanha); e (ii) o exsudado foi colocado em meio de cultura NNN, também avaliado em microscópio de luz invertida Zeiss Axiophot (Jena, Alemanha). Confirmada a infecção dos animais, iniciou-se o tratamento dos grupos TFD e Sb^v.

Os animais dos grupos 3 a 9 foram tratados durante o período de 20 dias, período que é preconizado pela OMS para tratamento em humanos. Para animais dos grupos 3, 4, 8 e 9, nos 20 dias, foram realizadas aplicações diárias do antimoniato de N-metil-glucamina. Neste tratamento de 20 dias, a aplicação de TFD foi realizada em dias intercalados, totalizando 10 aplicações para os grupos.

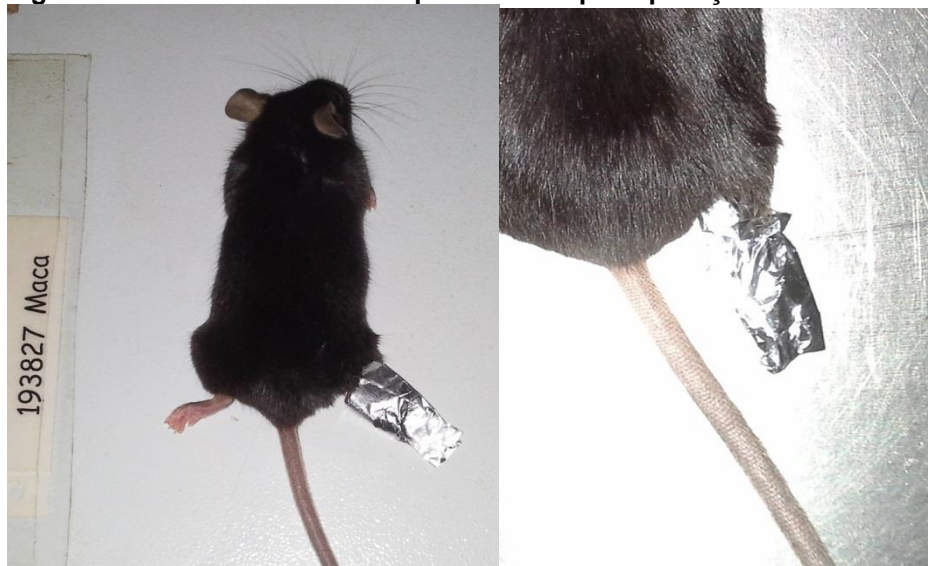
Para os dias de aplicação da TFD, foi necessário manter o animal sedado para a aplicação do laser sobre a pata. Para tanto, optou-se por anestésiar e sedar os animais com associação e aplicação intramuscular de xilazina (cloridrato de xilazina), que produz sedação no animal com analgesia e o animal retorna ao seu estado normal, e quetamina (cloridrato de ketamina), que leva normalmente 1 a 5 minutos para produzir sedação na qual o animal apenas adormece. Os animais foram mantidos anestesiados por 40 minutos para aplicação das medicações (FIGURA 20).

Figura 20: Sedação sob exposição à luz vermelha



Esta técnica consiste na imobilização do camundongo em decúbito ventral, extensão do membro posterior esquerdo e injeção da solução na região postero-lateral da coxa. A associação padrão é de 10 mg/kg de xilazina e 90 mg/Kg de quetamina, sendo o cálculo realizado para o peso médio do animal, que foi de 23g. Para isso, foi utilizada uma seringa de 1 ml. Então, esperou-se cerca de 3 minutos até que a associação dos anestésicos fizesse efeito e, com o animal sedado, foi aplicado 500 μ L do gel contendo AICIPC sobre a lesão, perfazendo uma camada de 1 a 2 mm na pata direita traseira, que foi envolvida em folha de alumínio de 3x4 cm para evitar penetração da luz (FIGURA 21).

Figura 21: Folha de alumínio na pata direita após aplicação da AICIPC



Este valor foi determinado pela área da lesão (tamanho da pata). Após a sedação, os animais foram levados à uma sala reservada do laboratório de cirurgia

experimental (CIEX), por apresentar um ambiente totalmente escuro, impedindo a ativação da ftalocianina antes da absorção. Foram aguardados mais 15 minutos até que houvesse absorção (pelo menos parcial) do gel pela pele do animal. A aplicação do gel foi feita com o auxílio de uma haste flexível estéril descartada após a aplicação para cada animal. A folha de alumínio foi removida e então a pata contendo o gel foi exposta à irradiação de luz visível, com comprimento de onda 670 nm, liberando 100 J/cm² a uma intensidade de 80 mW/cm², o que determina um tempo de exposição de 15 minutos. Durante os 15 minutos de aplicação do laser, optou-se por aplicar gaze embebida em solução fisiológica a 0,9% para evitar o ressecamento do globo ocular dos animais. A distância entre a fonte de luz e a lesão foi de 05 cm. Após cada sessão de TFD, os resíduos do gel foram removidos utilizando-se soro fisiológico 0,9% e o animal retornou ao seu estado de alerta após cerca de 10 minutos do término da aplicação, em sala específica sob observação para avaliação do retorno anestésico. Confirmado o retorno anestésico, os animais foram devolvidos ao biotério da Faculdade de Medicina.

No grupo Sb^v, os animais receberam aplicações de Sb^v (N-metil-glucamina/antimoniato de N-metil-glucamina[®]) por via intraperitoneal na dose 0,04 e 0,02g Sb^v/mg/dia (adaptado da dosagem humana usada que é de 20mgSb^v/Kg/dia), com seringas de 1mL durante 20 dias corridos, realizando-se uma aplicação diária, no período das 14 às 16 horas. Para chegar a essa concentração, optou-se por realizar a diluição do antimoniato de N-metil-glucamina: 1 mL de antimoniato de N-metil-glucamina foi diluído em 19 mL de água de injeção. Desta forma, foi possível realizar a aplicação com seringa de 1 mL. Já a TFD com AICIPC lipossomal foi feita em dias alternados. Para evitar vieses na avaliação de lesão hepática e renal ocasionada pelo anestésico todos os animais foram anestesiados, independente da necessidade da utilização da TFD, e os animais que não estavam em tratamento, ou seja, grupo infectado sem tratamento (Grupo 08) e o grupo saudável (Grupo 09) receberam a mesma dose de solução fisiológica a 0,9% para que passassem pelo mesmo estresse que os demais grupos.

3.9.2 Confirmação da infecção

Após 30 dias da inoculação das formas promastigotas de *L. amazonensis*, os camundongos foram submetidos à avaliação que objetivou confirmar a infecção para que o tratamento fosse iniciado. Para tanto, foram utilizados três testes: (i) o primeiro

foi teste clínico, com avaliação das patas dos camundongos; (ii) realizou-se também culturas em meio NNN; e (iii) lâminas de extensão coradas com Giemsa.

3.10 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Para a coleta de sangue que ocorreu no momento que antecedeu a eutanásia, os animais foram anestesiados com 10mg/kg de xilazina e 90mg/kg de quetamina, ou seja, a mesma dose administrada no tratamento com TFD. Entretanto, como foi realizada a punção intracardíaca, para evitar o sofrimento, foi feito um botão anestésico com 0,02ml de xilocaína logo abaixo do externo do animal.

Após anestesia dos animais por via intramuscular, foi feita a coleta do sangue por punção cardíaca para envio ao Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) dos laboratórios SABIN, para avaliações hematológicas e bioquímicas. Feita a coleta, os animais foram levados à câmara de saturação de CO₂ (fornecida pelo Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília), fechada de maneira a atingir uma saturação superior a 70%, onde os animais foram eutanasiados individualmente até a parada cardiorrespiratória. Na sequência, realizou-se a dissecação mais asséptica possível da pata traseira direita de dois camundongos de cada grupo. Esta técnica consistiu em fazer assepsia das patas inoculadas com álcool iodado que, em seguida, foram maceradas com o auxílio do homogeneizador (FIGURA 22), em meio de cultura Schneider acrescido de 20% de soro fetal bovino inativado a 0,2% de sulfato de gentamicina.

Figura 22: Homogeneizador utilizado para a trituração e preparo das patas dos camundongos



Após a retirada da pata, foi realizada uma incisão na linha alba dos animais para extração do rim e do fígado para a avaliação de toxicidade da droga, conforme será apresentado no item 3.14. Logo após, o rim e o fígado foram retirados e levados à solução de formalina a 10% a fim de serem encaminhados à confecção de lâminas histológicas. Para o descarte, os cadáveres foram devidamente alocados em sacos plásticos brancos e mantidos sob refrigeração à -20°C , no freezer do biotério da Faculdade de Medicina da UnB, para posterior incineração.

3.11 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA

Após as formas de tratamento indicadas, os animais foram avaliados segundo os critérios de: (i) medição das patas; e (ii) critérios parasitológicos (diluição limitante, esfregaço de linfa).

3.12 MEDIÇÃO DAS PATAS

O diâmetro das patas inoculadas dos camundongos foi medido com o auxílio de dois paquímetros milimétricos Mitutoyo® (São Paulo, Brasil) (Figura 23), com precisão de décimos de milímetro. A medição ocorreu em seis momentos distintos: (i) antes de infectar os animais; (ii) dois dias após a infecção; (iii) 30 dias após a infecção; (iv) após 10 dias de tratamento; (v) após 20 dias de tratamento; e (vi) 60 dias após o término do tratamento.

Figura 23: Paquímetros milimétricos utilizados para medição das patas dos animais em diferentes momentos



A medição das patas foi realizada de forma duplicada durante todo o experimento, de forma a garantir a integridade dos resultados métricos, sendo adotada a média dos valores obtidos em cada medição. Sobre o processo de medição, o paquímetro foi posicionado na parte central do coxim plantar dos animais, para padronizar a realização das medidas.

3.13 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA POR MEIO DE CRITÉRIOS PARASITOLÓGICOS

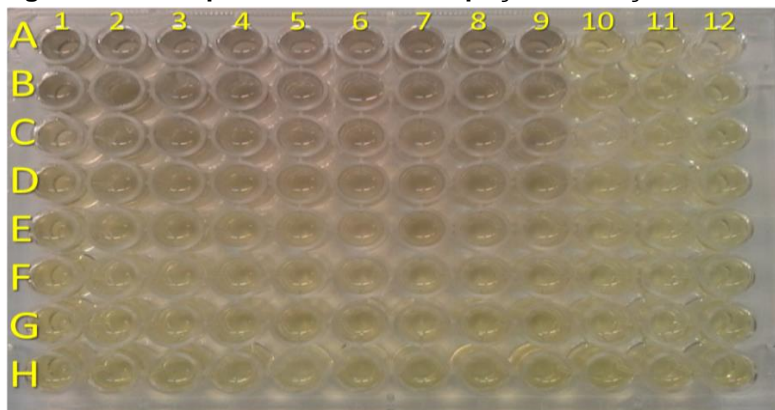
Após 10 e 20 dias que os animais estavam sendo tratados e após 60 dias do término do tratamento, foram coletadas amostras por punção das patas inoculadas de todos os animais do experimento para a confecção das culturas tradicionais suspensas no meio bifásico NNN e pesquisa de amastigotas em esfregaços fixado e posteriormente corado pela coloração de Giemsa em lâminas de extensão.

A avaliação das lâminas foi feita com o auxílio do microscópio de luz Zeiss Axiopt um dia após a confecção das lâminas e as culturas foram avaliadas diariamente por um período de um mês. Como critério parasitológico, foi feito também o método da diluição limitante. Por meio deste método, é possível fazer a estipulação da quantidade provável de formas amastigotas de *Leishmania* viáveis na pata do animal, feito a partir da sua dissecação e assepsia para evitar contaminação. Para isso, foi feita a trituração em meio de cultura líquido Schneider (Sigma®) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 0,2% de gentamicina, seguido de culturas em placas tipo ELISA (96 poços) em sucessivas diluições de 10 vezes. Para esse método, foram utilizadas as patas de dois camundongos diferentes por grupo de estudo. Caso houvesse uma amastigota em cada poço, cresceriam formas promastigotas após cerca de 24 a 72 horas em estufa a 26°C.

Para a realização da leitura, utilizou-se microscópio de luz invertida com objetiva de aumento 40 vezes, onde observou-se a presença ou ausência de formas promastigotas em cada poço que foram anotadas para controle. Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do software ELIDA que calculou o número provável de formas amastigotas por pata utilizada. A confecção das culturas de diluição limitante seguida pelo método colorimétrico com o uso de MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiliazol-2,5-difenil-tetrazólio) teve o objetivo de estimar as formas amastigotas de *L.*

amazonensis viáveis na pata do animal, ou seja, é analisado se o tratamento diminui o número de *Leishmanias*, por meio do processo de dissecação da pata do animal, sua trituração em meio de cultura líquido Schneider (Sigma®), seguida de culturas em placas ELISA de 96 poços em sucessivas diluições de 10 vezes da linha A até a H sendo as três últimas colunas deixadas sem a solução com a pata macerada para servir de controle negativo.

Figura 24: Microplaca de Elisa de 96 poços a diluição limitante



Conforme a Figura 24, que apresenta a microplaca de Elisa de 96 poços a diluição limitante, a linha A representa a linha mais densa e a H, a mais diluída. No caso das colunas, as de número 10, 11 e 12 são os controles negativos.

3.14 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE TOXIDADE

Para a avaliação da toxicidade do protocolo de tratamento estabelecido para este estudo, foram confeccionadas lâminas histológicas do rim e do fígado, bem como realizadas dosagens bioquímicas de albumina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO ou AST), transaminase glutâmico pirúvica (TGP ou ALT), fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase (GGT), bilirrubinas (total, direta e indireta), ureia e creatinina, a partir do sangue coletado por punção cardíaca (antes da eutanásia, com os animais previamente anestesiados).

3.15 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA POR LÂMINA

Após a eutanásia dos animais por saturação de oxigênio CO₂ foi realizada uma incisão, mais asséptica possível, na cavidade abdominal, para a extração do rim e do fígado, sendo dois animais por grupo, considerando o conjunto total. Os órgãos foram

lavados com solução salina a 0.9% e colocados no fixador Davidson/ácido acético, na proporção de 1:9, por 10 horas, a 4°C. Feito isso, o fixador foi substituído pelo álcool à 70° e então o material foi mantido à 4°C até a próxima etapa. Para a inclusão em parafina, os órgãos foram mantidos na solução de álcool 70°C e passaram por sucessivas fases de desidratação em álcool 80°, 90°, 100°. Os fragmentos foram diafanizados com uma solução álcool/xileno na proporção de 1:1, seguida de 3 banhos em xileno. Após isso, foram colocados em 3 banhos de parafina a 56°C e o material foi incluído na parafina com o auxílio de barras metálicas (3x3cm). Todas as etapas, da desidratação até os banhos de parafina, tiveram duração de uma hora. Quando a parafina solidificava, o material era retirado das barras.

Os órgãos foram cortados com o uso de um micrótomo. Os cortes tiveram espessura aproximada de 4 a 5 micrômetros, e então levados ao banho-maria a 35°C e coletados com lâminas limpas e identificadas. As lâminas foram mantidas por 24 horas na estufa a 37°C para que o material tivesse perfeita adesão. A análise foi realizada em microscopia de luz Zeiss Axiophot (Jena, Alemanha), sob supervisão de um patologista.

3.16 EXAMES BIOQUÍMICOS REALIZADOS EM PARCERIA COM OS LABORATÓRIOS SABIN

Logo após o término do tratamento, que ocorreu no 21º dia, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina por via intramuscular e então foi procedida a coleta de sangue por punção cardíaca, utilizando-se seringa de insulina sem EDTA, sendo este transferido para microtubos próprios para soro, fornecidos pelos Laboratórios Sabin. O soro foi separado por centrifugação, devidamente etiquetado pelos pesquisadores, e levado aos Laboratórios Sabin para as dosagens solicitadas.

Aos Laboratórios Sabin couberam as dosagens de albumina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO ou AST), transaminase glutâmico pirúvica (TGP ou ALT), fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase (GGT), bilirrubinas (total, direta e indireta), ureia e creatinina nos animais dos grupos de 1 ao 9, totalizando 54 animais.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software IBM SPSS Statistics versão 22.0. As variáveis quantitativas foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação das médias do diâmetro das patas entre os grupos analisados (comparações verticais), foi usada Análise de Variância (ANOVA; dados normalizados), seguida pelo pós-teste de Tukey. Possíveis diferenças dentro de cada grupo (comparações horizontais: antes da infecção, 2 e 30 dias após a infecção, 10 e 20 dias após o tratamento, e 60 dias após o fim do tratamento) foram verificadas pelo teste T para amostras pareadas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para análise estatística da variável “MTT” foi aplicado o teste de Kruskal Wallis para a comparação entre os grupos (dados não-normalizados) e, *a posteriori*, o teste de Mann Whitney, para as comparações 2-a-2. Para avaliar a diferença entre os tempos, dentro de um mesmo grupo, foi utilizado o teste de Friedman e, após, o teste de Wilcoxon. Valores com p-valor $< 0,05$ foram considerados significativos.

Como base de cálculo do MTT, cálculo de % de células viáveis, foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância das amostras} - \text{absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do branco}}$$

A média usada para os cálculos do % de células viáveis dos controles positivos foi a média de após 20 dias de tratamento (mais alta e considerada como 100% em relação aos controles positivos). Para os tratamentos, as médias usadas foram aquelas dos controles positivos de cada tempo de tratamento (consideradas como 100% em relação aos tratamentos).

Para avaliar a associação das variáveis culturas em meio NNN e lâminas de extensão com o grupo após 30 dias de infecção, 10 e 20 dias após o tratamento e 60 dias após o fim do tratamento, foi aplicado o Teste Exato de Fisher que, esse teste quando significativo, indica que há associação entre as variáveis em estudo, ou seja, demonstra que o grupo influencia o resultado nas lâminas de extensão ou cultura em meio NNN (FIELD, 2009).

A fim de comparar o peso entre os grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as comparações 2 a 2, aplicou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para avaliar estatisticamente a toxicidade dos dados bioquímicos, utilizou-se o software SPSS.

3.18. PROCEDIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA PARTÍCULA DE LIPOSSOMA

As amostras de partículas de lipossoma em gel foram colocadas com auxílio de espátula sobre as telas de MET previamente cobertas com Formvar®, aguardou-se 3h para secagem em temperatura $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, as eletromicrografias foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico Transmissão (MET), JEOL 1011 (Jeol, Tóquio, Japão). As partículas foram levadas para Microscópio de Varredura (MEV), JEOL JSM-7001F (Jeol, Tóquio, Japão / sistema EDS (Energia dispersiva de raio-X) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB. Dessa forma, foi possível verificar as características morfológicas e arquitetônicas da solução em gel do lipossoma e a constituição de seus átomos. O diâmetro médio das partículas de lipossoma foi calculado pelo programa Image-Pro Plus 6.0 com imagens do MET.

Para verificar o índice de polidispersão (I_{dp}), potencial Zeta e diâmetro hidrodinâmico das partículas lipossomais, utilizou-se o equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB. As amostras da solução em gel do lipossoma foram diluídas na proporção 1:50 com água destilada para leitura no ZetaSizer.

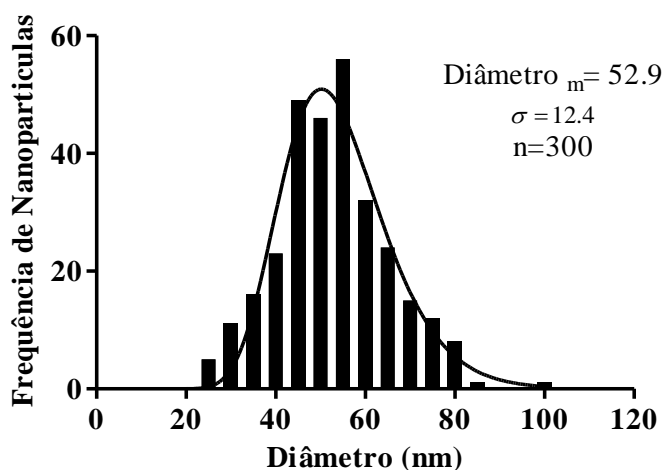
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Esta sessão tem uma estrutura na qual os resultados são apresentados por categoria, as quais sejam: partículas de lipossoma; diâmetro das patas; eficácia por meio da confecção de culturas em meio bifásico NNN; eficácia do tratamento por meio da confecção de lâminas de extensão; eficácia do tratamento por meio da avaliação da viabilidade celular.

4.1 PARTÍCULAS DE LIPOSSOMA

O diâmetro médio da solução lipossomal analisadas pelo MET foi 52.9 ± 12.4 nm (FIGURA 25). A característica morfológica foi obtida pelo MEV, a solução em gel de lipossoma apresentou várias camadas e entre elas presença dos lipossomas em formatos disformes provavelmente pelo processamento da técnica.

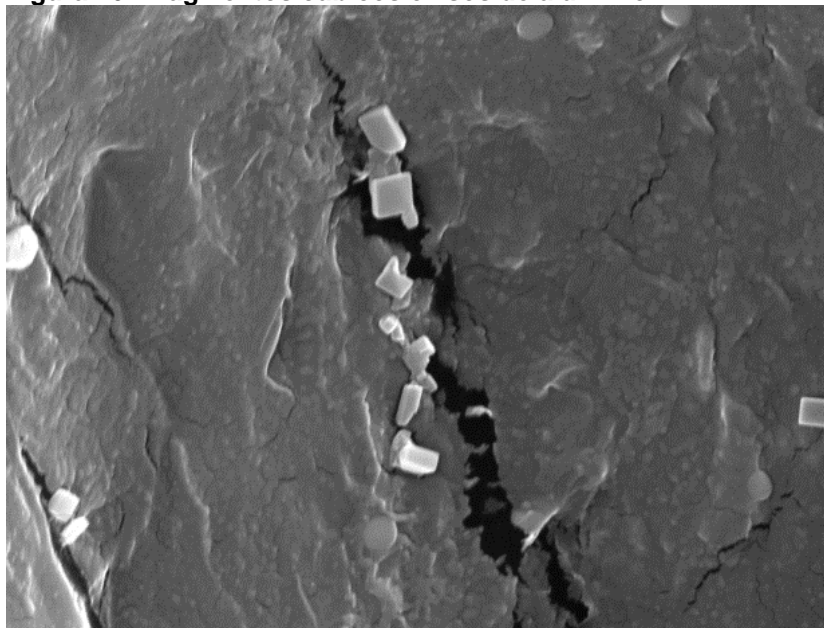
Figura 25: Diâmetro médio da solução lipossomal



Fonte: Ribeiro (2014).

Foi possível também observar mais livres (fora das camadas do gel) a presença de fragmentos do alumínio no formato cúbico com superfície lisa (FIGURA 26).

Figura 26: Fragmentos cúbicos e lisos de alumínio



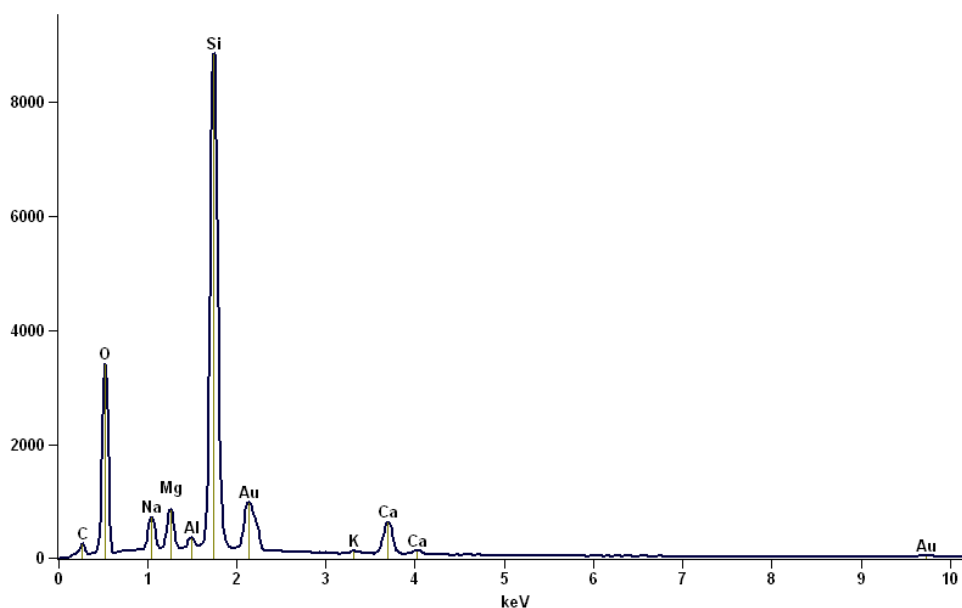
Fonte: Ribeiro *et al.* (2015).

O sistema EDS confirmou a presença marcante dos íons Si, Na, Mg, Al, K, Ca em toda amostra analisada (FIGURA 27). Esses dados confirmam a natureza dos compostos presente nas amostras sintetizadas.

Figura 27: Presença dos íons Si, Na, Mg, Al, K, Ca

Full scale counts: 8831

Base(11)



Fonte: Ribeiro *et al.* (2015).

Quadro 11: Resultados quantitativos para SDS

Linha Elemento	Contagem líquida	Peso %	Atom %	Fórmula	Compnd %
C K	1327	2.89	5.87	C	2.89
O K	20709	34.07	51.95	O	34.07
Na K	4706	2.83	3.00	Na	2.83
Mg K	5516	2.70	2.71	Mg	2.70
Al K	1162	0.51	0.46	Al	0.51
Si K	79930	34.66	30.11	Si	34.66
K K	640	0.48	0.30	K	0.48
Ca K	7238	5.95	3.62	Ca	5.95
Au M	13891	15.91	1.97	Au	15.91
Total		100.00	100.00		100.00

Fonte: Ribeiro *et al.* (2015).

O diâmetro médio das partículas lipossomais medido pela ZetaSize foi 266.9±5.2. O índice de polidispersão da solução lipossomal ficou em 0.55±0.04.

4.2 DIÂMETRO DAS PATAS EM DIFERENTES MOMENTOS

Este tópico apresenta as medidas das lesões cutâneas (diâmetro das patas): antes da infecção; 02 dias após a infecção; após 10 dias de tratamento; após 20 dias de tratamento; e 60 dias após o término do tratamento.

4.2.1 Avaliação clínica

Em avaliação clínica, foi possível perceber que os animais dos grupos que receberam o concentrado parasitário apresentaram aumento do diâmetro da pata após 30 dias de infecção. Esse aumento pode ter ocorrido pelo desenvolvimento dos parasitas na pata do animal que teve, por consequência, edema, eritema e reações inflamatórias, que causaram irregularidade e aumento dos tecidos da pata.

A Figura 28 demonstra a diferença entre as patas dos animais que receberam infecção parasitária e os que não receberam a infecção parasitária. A pata do camundongo à esquerda, é representada por um dos animais do grupo controle negativo, ou seja, que não recebeu infecção, apenas solução fisiológica aplicada da mesma forma que os animais que receberam infecção.

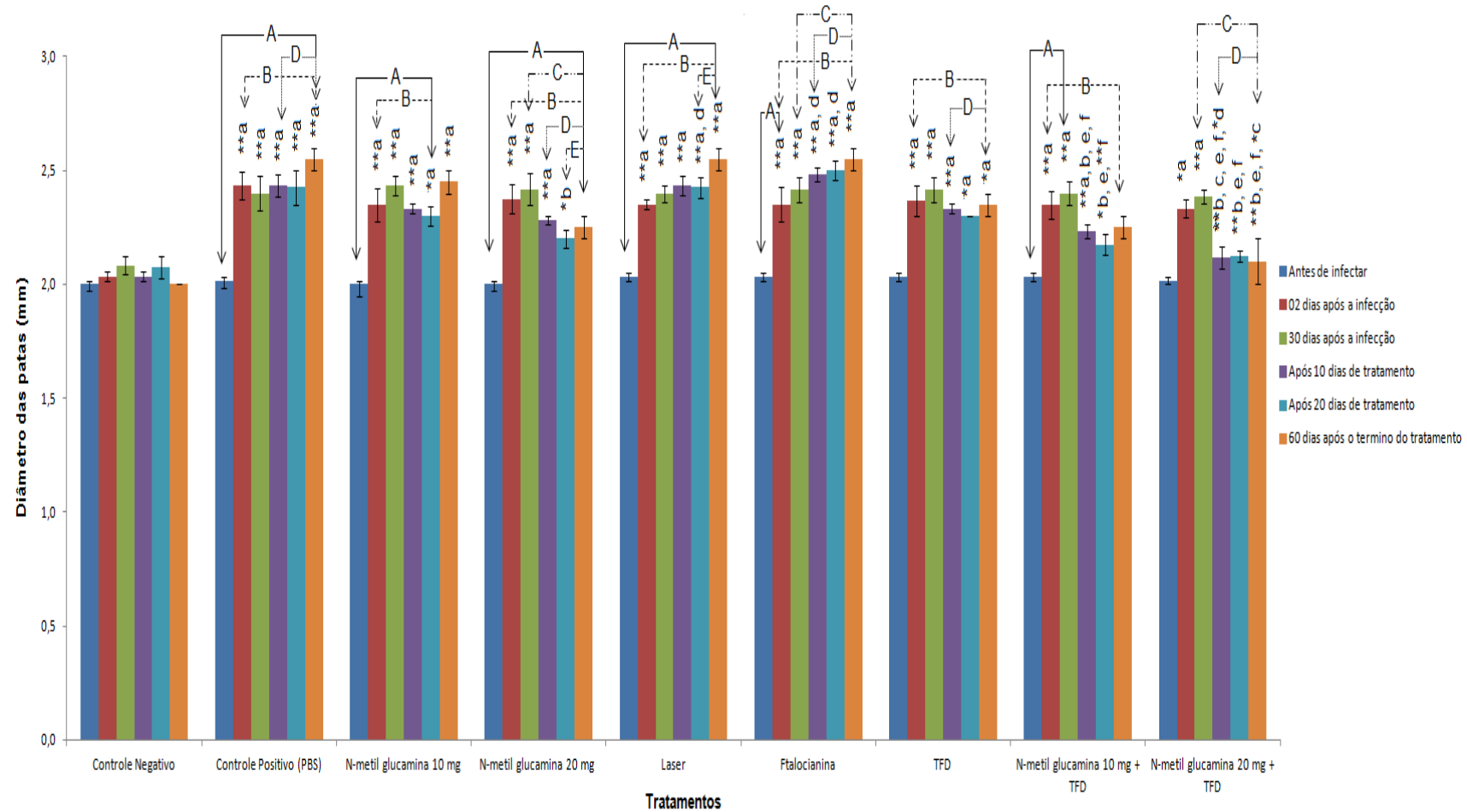
Figura 28: Patas do camundongo C57Bl/6 - Grupo não infectado (esquerda) e infectado (direita)



Não houve aumento do diâmetro da pata, os tecidos não apresentam alterações. A Figura 28, à direita, mostra a pata de um dos camundongos que foi infectado com o concentrado parasitário de 3×10^6 de formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase metacíclica. Para os animais que receberam o concentrado

parasitário, foi possível perceber, após 30 dias de infecção, que houve aumento das patas e grande sensibilidade na pisada. Os camundongos evitavam a pisada com a pata que recebeu a infecção.

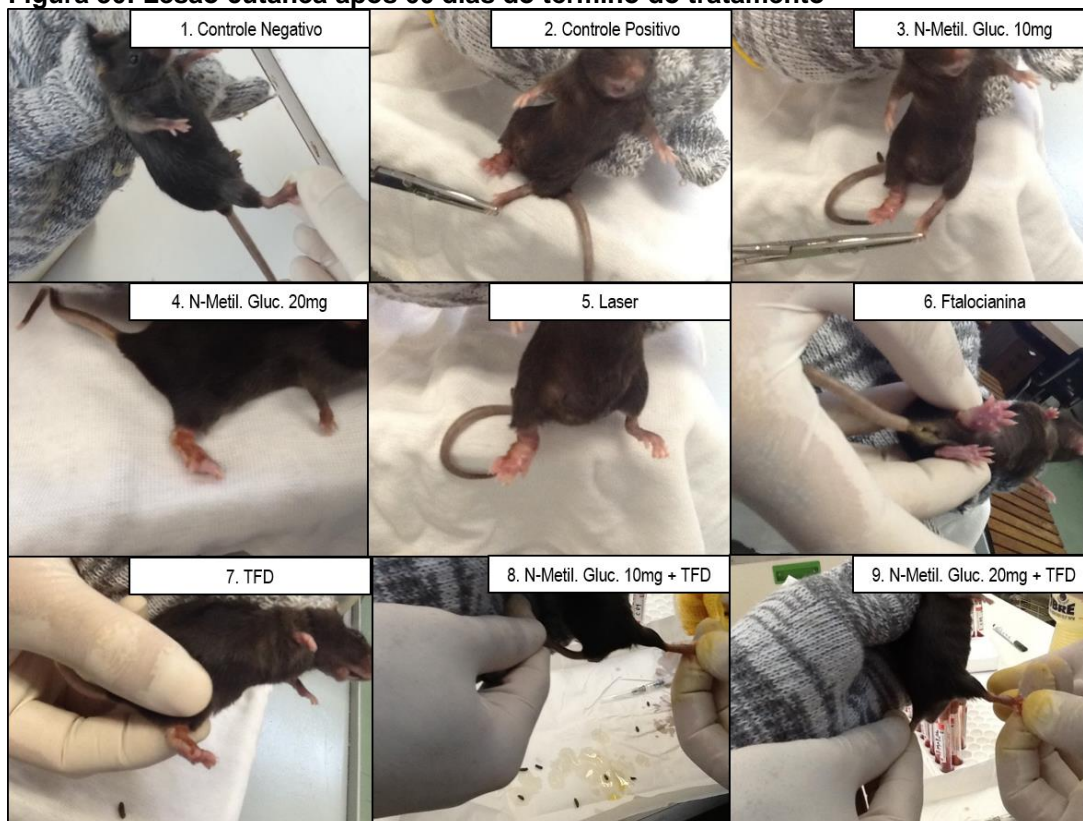
Figura 29: Diâmetros das patas antes da infecção, 02 e 30 dias após a infecção (confirmação da infecção e início do tratamento), 10 e 20 dias após o tratamento, e 60 dias após o fim do tratamento



Conforme a Figura 29, os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste de Tukey nas comparações verticais (entre os grupos), sendo a= significativo comparado com o controle negativo; b= significativo comparado ao controle positivo (PBS); c= significativo comparado ao grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg; d= significativo comparado ao grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg; e= significativo comparado ao grupo tratado com laser; f= significativo comparado ao grupo tratado com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal. Os asteriscos indicam diferenças significativas ao nível de * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações horizontais (dentro de cada grupo) detectadas pelo teste T para amostras pareadas, sendo: A (—) = significativo comparado a antes da infecção; B (-----) = significativo comparado a 02 dias após infecção; C (-----) = significativo comparado a 30 dias após infecção; D (-----) = significativo comparado a 10 dias após o tratamento; E (-----) = significativo comparado a 20 dias após o tratamento.

A Figura 30 demonstra a pata de um animal de cada grupo fotografada após 60 dias do término do tratamento.

Figura 30: Lesão cutânea após 60 dias do término do tratamento



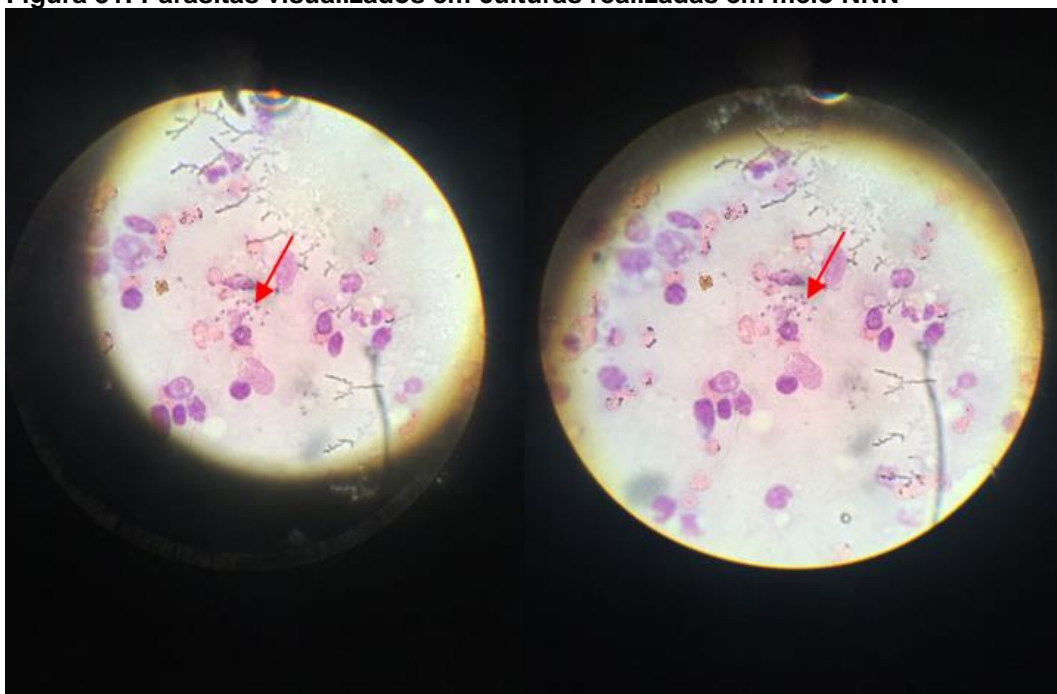
Foi possível verificar que dentre os grupos que receberam a infecção, o diâmetro da pata que mais se aproximou ao grupo do Controle Negativo foi o diâmetro da pata dos animais do grupo N-Metil. 20 mg + TFD. Os demais grupos apresentaram lesão cutânea indicando menor regressão de infiltrado e possível maior abundância de desenvolvimento do parasita.

4.3 EFICÁCIA POR MEIO DA CONFECÇÃO DE 54 CULTURAS EM MEIO BIFASICO NNN

4.3.1 Avaliação por culturas em meio NNN

Por meio de culturas em meio NNN, após 30 dias da infecção dos animais, confirmou-se que praticamente todos os animais que receberam o concentrado parasitário apresentaram positividade e crescimento dos parasitas nas culturas (FIGURA 31).

Figura 31: Parasitas visualizados em culturas realizadas em meio NNN



Para a confecção das culturas de *Leishmania*, foi feita punção aspirativa de formas amastigotas do parasita nas patas direitas de dois camundongos por grupo de

estudo (FIGURA 32). Assim, as formas amastigotas do parasita, inoculadas em meios de cultura, contendo ágar e sangue de coelho, transformaram-se em formas promastigotas. Foi utilizado meio líquido Scheneider sobre o NNN para o crescimento da cultura. As culturas foram mantidas entre 24- 26°C e observadas em microscopia óptica invertida.

Figura 32: Tubos de culturas de Leishmaniose



A Tabela 1 demonstra que em apenas dois dos 48 animais que receberam a infecção não foi possível visualizar o parasita antes do início do tratamento, para que assim a infecção fosse confirmada, sendo um animal do grupo controle positivo e outro animal do grupo que foi submetido à ação do laser como tratamento. Entretanto, após 10 dias de tratamento, foi feito novamente o teste de culturas em meio NNN e nos dois grupos os 6 animais positivaram ao teste. Isso comprova que ao início do tratamento todos os animais dos grupos que receberam a infecção desenvolveram a doença.

Tabela 1: Confirmação da infecção dos animais por pesquisa direta do parasita por culturas em meio NNN

	Culturas			p-valor
	Negativo	Positivo	Total	
<i>30 Dias Após a Infecção</i>				
Controle Negativo	6	0	6	0,000
Controle Positivo	1	5	6	
N-Metil. glucamina 10 mg	0	6	6	
N-Metil. glucamina 20 mg	0	6	6	
Laser	1	5	6	
Ftalocianina	0	6	6	
TFD	0	6	6	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	0	6	6	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	0	6	6	
Total	8	46	54	

No decorrer do desenvolvimento da pesquisa, as culturas em meio bifásico foram realizadas em 04 momentos diferentes. A primeira confecção de cultura foi feita 30 dias após os animais serem infectados, com o objetivo de confirmar a infecção antes do início do tratamento. Neste momento, 95,89% das culturas realizadas dos animais que foram infectados positivaram, apresentando crescimento dos parasitas. Apenas 4,1% das culturas realizadas não apresentaram positividade. O grupo controle negativo, no qual os animais receberam aplicação de solução fisiológica na pata, apresentou negatividade em 100% das culturas realizadas, como já era esperado.

Tabela 2: Relação de culturas negativas e positivas 30 dias após a infecção, após 10 dias de tratamento, após 20 dias de tratamento e 30 dias após o término do tratamento

Teste Exato de Fisher	Culturas		p-valor
	Negativo	Positivo	
30 Dias Após a Infecção			
Controle Negativo	6	0	0,000
Controle Positivo	1	5	
N-Metil. glucamina 10 mg	0	6	
N-Metil. glucamina 20 mg	0	6	
Laser	1	5	
Ftalocianina	0	6	
TFD	0	6	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	0	6	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	0	6	
Total	8	46	
Após 10 dias de Tratamento			
Controle Negativo	6	0	0,000
Controle Positivo	0	6	
N-Metil. glucamina 10 mg	0	6	
N-Metil. glucamina 20 mg	1	5	
Laser	0	6	
Ftalocianina	1	5	
TFD	1	5	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	2	4	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	3	3	
Total	14	40	
Após 20 dias de Tratamento			
Controle Negativo	4	0	0,000
Controle Positivo	0	4	
N-Metil. glucamina 10 mg	1	3	
N-Metil. glucamina 20 mg	2	2	
Laser	0	4	
Ftalocianina	0	4	
TFD	1	3	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	3	1	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	4	0	
Total	15	21	
60 Dias Após o término do tratamento			
Controle Negativo	2	0	0,167
Controle Positivo	0	2	

N-Metil. glucamina 10 mg	0	2
N-Metil. glucamina 20 mg	1	1
Laser	0	2
Ftalocianina	0	2
TFD	0	2
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	1	1
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	2	0
Total	6	12

As culturas foram realizadas novamente após 10 dias de tratamento, utilizando o esquema terapêutico estabelecido em estudo. Para este momento, cinco dos 09 grupos em estudo apresentaram culturas negativas. Nos grupos N-Metil. glucamina 20 mg, Ftalocianina e TFD 16% das culturas foram negativas. Já os grupos N-Metil. glucamina 10 mg e Laser todas as culturas positivaram, ou seja, 100% estavam positivas indicando que o esquema terapêutico não surtiu efeito esperado. O grupo N-Metil. glucamina 10 mg + TFD apresentou negatividade em 33,3% das culturas realizadas, sendo o segundo grupo em tratamento com maior efetividade.

Após 20 dias de tratamento, dois dos 07 grupos em tratamento continuaram 100% positivos: o grupo tratado com Laser e o grupo tratado apenas com Ftalocianina. Os grupos tratados com N-Metil. glucamina 10 mg e o tratado apenas com TFD foram equivalentes com 25% das culturas negativas. No grupo N-Metil. Glucamina 20 mg, apenas 50% das culturas foram positivas. O melhor esquema terapêutico para a avaliação por culturas foi o grupo N-Metil. glucamina 20 mg + TFD, com 100% das culturas negativas.

As culturas foram realizadas novamente após 60 dias do término do tratamento. Neste momento, os grupos N-Metil. glucamina 10 mg, Laser, Ftalocianina e TFD apresentaram 100% das culturas positivas. O grupo padrão ouro apresentou 50% das culturas realizadas positivas. O grupo N-Metil. glucamina 10 mg + TFD permaneceu com percentual de culturas negativas 50%, após 60 dias de cessado o tratamento. O grupo N-Metil. glucamina 20 mg + TFD apresentou 100% de culturas negativas.

4.4 EFICÁCIA DO TRATAMENTO POR MEIO DA CONFECÇÃO E ANÁLISE DE LÂMINAS DE EXTENSÃO FIXADAS E CORADAS COM GIEMSA

Neste subitem, apresenta-se a avaliação por pesquisa direta do parasita por lâminas de extensão, com a demonstração da infecção dos animais e a relação de lâminas de extensão negativas e positivas 30 dias após a infecção, após 10 dias de tratamento, após 20 dias de tratamento e 60 dias após o término do tratamento.

4.4.1 Avaliação por pesquisa direta do parasita por lâminas de extensão

Para a avaliação por meio da confecção de lâminas de extensão, foi feita a coleta do exsudado das patas traseiras direitas de todos os animais do experimento. Em seguida, foi feita a análise das 54 lâminas de extensão que foram coradas com Giemsa, sendo seis para cada grupo, avaliadas em microscópio invertido para a presença ou ausência do parasita.

Tabela 3: Confirmação da infecção dos animais por pesquisa direta do parasita por lâminas de extensão

	Culturas			p-valor
	Negativo	Positivo	Total	
<i>30 Dias Após a Infecção</i>				
Controle Negativo	6	0	6	0,811
Controle Positivo	4	2	6	
N-Metil. glucamina 10 mg	4	2	6	
N-Metil. glucamina 20 mg	4	2	6	
Laser	4	2	6	
Ftalocianina	5	1	6	
TFD	4	2	6	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	3	3	6	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	5	1	6	
Total	39	15	54	

Para este teste não foi possível encontrar o parasita em todos os animais que receberam a infecção, em apenas 15 das 48 lâminas de extensão confeccionadas foi possível identificar a fixação dos parasitas. Este resultado, que demonstra baixa sensibilidade, pela pouca quantidade de parasitas coletadas da pata do camundongo.

Como a pata é muito pequena, muitas vezes a quantidade de material coletada é pequena e isso pode prejudicar a fixação em lâmina.

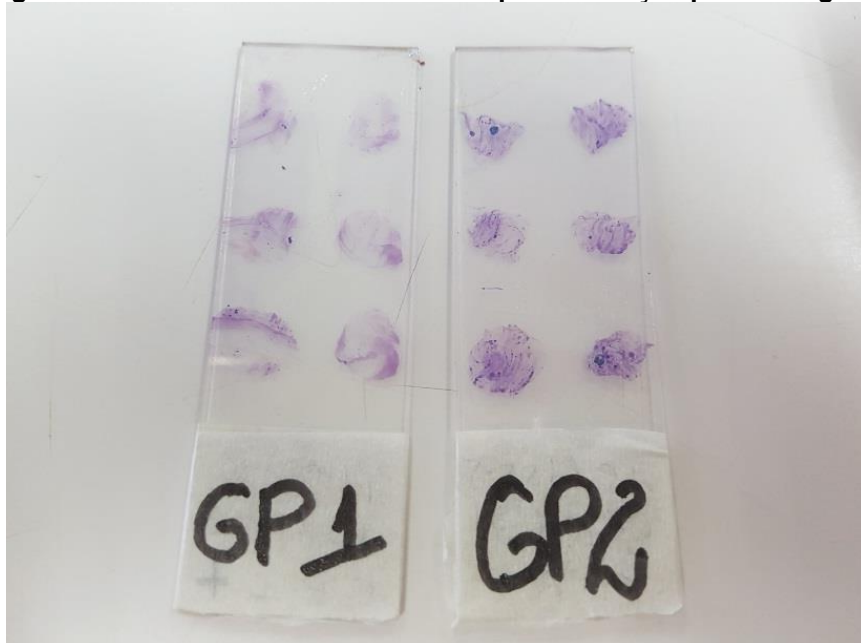
Tabela 4: Relação de lâminas de extensão negativas e positivas 30 dias após a infecção, após 10 dias de tratamento, após 20 dias de tratamento e 60 dias após o término do tratamento

Teste Exato de Fisher	Lâminas de Extensão		p-valor
	Negativo	Positivo	
30 Dias Após a Infecção			
Controle Negativo	6	0	0,811
Controle Positivo	4	2	
N-Metil. glucamina 10 mg	4	2	
N-Metil. glucamina 20 mg	4	2	
Laser	4	2	
Ftalocianina	5	1	
TFD	4	2	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	3	3	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	5	1	
Total	39	15	
Após 10 dias de Tratamento			
Controle Negativo	6	0	0,507
Controle Positivo	4	2	
N-Metil. glucamina 10 mg	4	2	
N-Metil. glucamina 20 mg	4	2	
Laser	3	3	
Ftalocianina	4	2	
TFD	4	2	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	5	1	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	6	0	
Total	40	14	
Após 20 dias de Tratamento			
Controle Negativo	4	0	0,484
Controle Positivo	2	2	
N-Metil. glucamina 10 mg	2	2	
N-Metil. glucamina 20 mg	3	1	
Laser	2	2	
Ftalocianina	1	3	
TFD	3	1	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	3	1	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	4	0	
Total	24	12	
60 Dias Após o término do tratamento			
Controle Negativo	2	0	1,000
Controle Positivo	1	1	
N-Metil. glucamina 10 mg	1	1	
N-Metil. glucamina 20 mg	2	0	
Laser	1	1	
Ftalocianina	1	1	
TFD	1	1	
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	2	0	
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	2	0	
Total	13	5	

No decorrer do período experimental, foram confeccionadas lâminas de extensão em quatro períodos distintos: (i) aos 30 dias, para confirmar a infecção, permitindo o início do tratamento; (ii) com 10 dias de tratamento, para verificar a eficácia do esquema terapêutico utilizado; (iii) após 20 de tratamento, novamente para verificar se houve eficácia no tratamento; e (iv) após 60 dias que o tratamento havia sido finalizado, e verificar se após cessar o tratamento os parasitas voltariam a se desenvolver na pata do camundongo (Tabela 4).

Para confecção das lâminas de extensão (FIGURA 33), foram feitas punções de exsudato das patas traseiras direitas dos animais e, em seguida, fixadas com metanol absoluto por 1 minuto e coradas pela coloração de Giemsa.

Figura 33: Lâminas de extensão fixadas para avaliação parasitológica



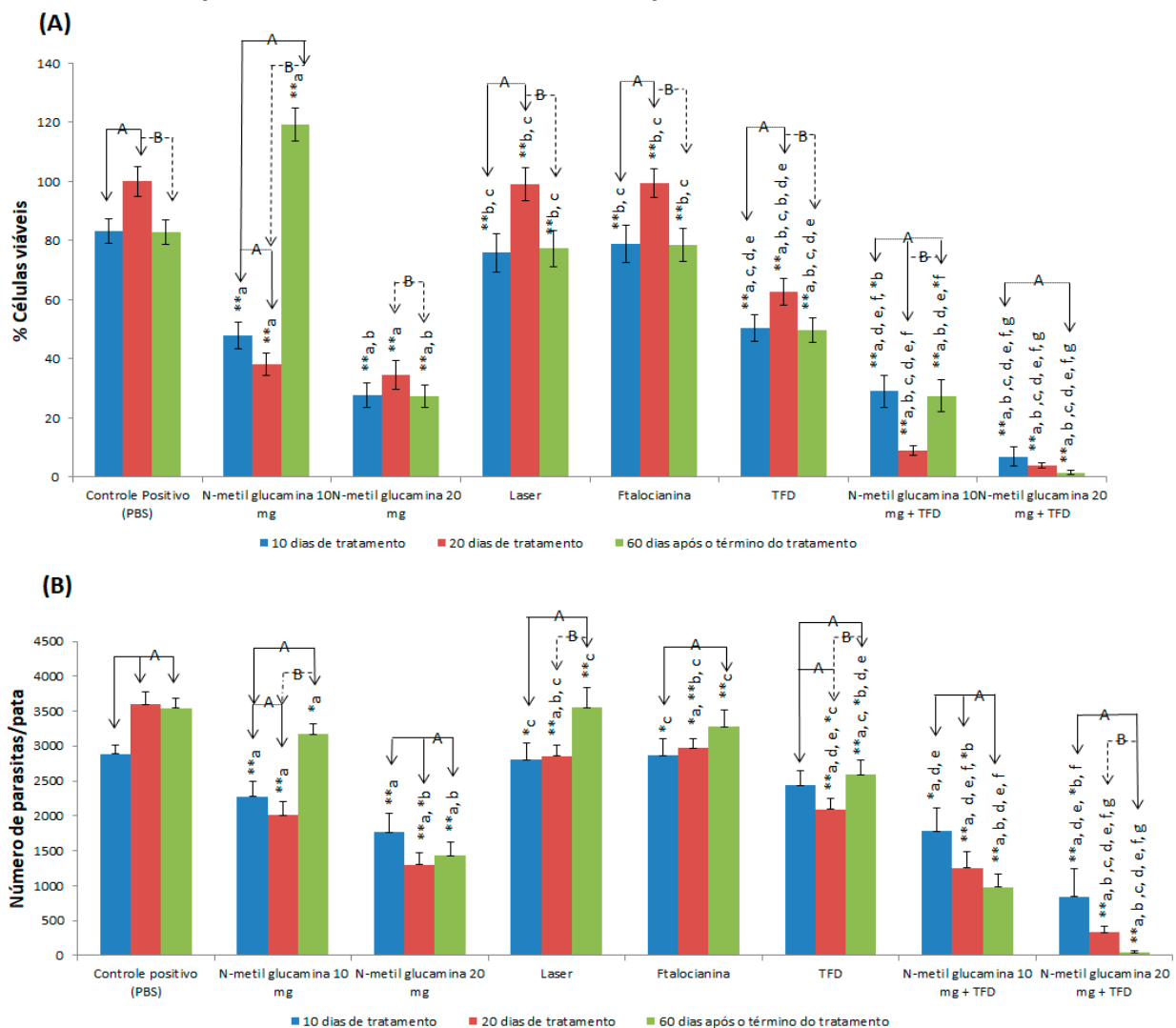
Após 10 dias de tratamento, os grupos Controle Positivo, N-Metil. glucamina 10 mg, Laser, Ftalocianina e TFD demonstraram resultados, com aproximadamente 33,3 das lâminas positivas, ou seja, com a presença do parasita fixado e corado.

Com 20 dias de tratamento, como pode ser observado na Tabela 4, os grupos Controle Negativo, N-Metil 20 mg + TFD e N-Metil 10 mg + TFD tiveram resultados diferentes dos demais grupos. O grupo N-Metil. glucamina 10 mg + TFD apresentou apenas 75% das lâminas positivas e o grupo N-Metil 20 mg + TFD teve 100% das lâminas negativas. Após 60 dias do término do tratamento, foi possível observar que os grupos N-Metil. glucamina 20 mg, N-Metil 20 mg + TFD e N-Metil 10 mg + TFD tiveram 100% das lâminas negativas.

4.5 EFICÁCIA DO TRATAMENTO POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS POR PATA

Como descrito na metodologia deste estudo, no decorrer do experimento, o teste MTT, que analisa a viabilidade celular, e o teste de quantificação de parasitas por pata na pata dos animais foram feitos em três momentos: (i) após 10 dias de tratamento, realizados para verificar a eficácia do esquema terapêutico utilizado; (ii) após 20 dias de tratamento, novamente para verificar se houve eficácia no tratamento ao qual os camundongos foram submetidos; e (iii) após 60 dias que o tratamento havia sido finalizado, e assim verificar se após cessar o tratamento os parasitas voltariam a se desenvolver na pata do camundongo.

Figura 34: Distribuição da porcentagem de células viáveis (A) e do número de parasitas por pata (B) em camundongo C57BL/6 infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*, após 10 dias de tratamento, após 20 dias de tratamento e 60 dias após o término do tratamento.



Na Figura 34, as letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste de Mann-Whitney nas comparações verticais (2-a-2; entre os grupos), sendo a= significativo comparado com o controle positivo (PBS); b= significativo comparado ao grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg; c= significativo comparado ao grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg; d= significativo comparado ao grupo tratado com laser; e= significativo comparado ao grupo tratado com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal; f= significativo comparado ao grupo tratado com TFD; g= significativo comparado ao grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg + TFD. Os asteriscos indicam diferenças significativas ao nível de * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações horizontais (dentro de cada grupo) detectadas pelo teste de Wilcoxon pareado, sendo: A (—) = significativo comparado a 10 dias de tratamento; B (-----) = significativo comparado a 20 dias de tratamento.

Após 10 dias de tratamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e os tratamentos com laser e ftalocianina, que também não apresentaram diferença entre si. Os demais tratamentos reduziram significativamente o % células viáveis em relação a este controle ($p = 0,001$ para os tratamentos com N-metil glucamina 10 mg, N-metil glucamina 20 mg, TFD e N-metil glucamina 10 mg + TFD; $p = 0,002$ para o tratamento com N-metil glucamina 20 mg + TFD). O grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg apresentou resultado semelhante ao grupo tratado com TFD ($p = 0,462$), e ambos foram estatisticamente diferentes dos demais grupos de tratamento. Já o grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg foi semelhante ao grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg + TFD ($p = 0,700$), e ambos apresentaram diferenças significativas em relação aos demais tratamentos ($p = 0,000$), enquanto o percentual de células viáveis do grupo tratado apenas com N-metil glucamina 20 mg+ TFD foi estatisticamente menor ao dos demais grupos ($p < 0,01$) (Figura 34a).

Em relação ao número de parasitas por pata, após 10 dias de tratamento não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e os tratamentos com laser, ftalocianina e TFD, enquanto os tratamentos com N-metil glucamina 10 mg ($p = 0,009$), N-metil glucamina 20 mg ($p = 0,003$), N-metil glucamina 10 mg + TFD ($p = 0,16$) e N-metil glucamina 20 mg + TFD ($p = 0,002$) reduziram

significativamente o número de parasitas em relação a este controle. Outras diferenças podem ser observadas na Figura 34b.

Após 20 dias de tratamento, o % de células viáveis do controle positivo continuou estatisticamente semelhante aos tratamentos com laser e ftalocianina, que também continuaram sem apresentar diferença entre si. Os demais tratamentos continuaram reduzindo significativamente o % células viáveis em relação a este controle ($p=0,001$ para os tratamentos com N-metil glucamina 10 mg, N-metil glucamina 20 mg, TFD e N-metil glucamina 10 mg + TFD; $p=0,002$ para o tratamento com N-metil glucamina 20 mg + TFD). O tratamento com N-metil glucamina 10 mg promoveu redução significativa da viabilidade celular comparado ao tratamento com TFD ($p=0,005$), e não se diferenciou do grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg, enquanto os grupos tratados com N-metil glucamina + TFD foram os que apresentaram maior redução no % de células viáveis e se diferenciaram de todos os outros tratamentos, particularmente o grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg+ TFD, que continuou estatisticamente menor aos dos demais grupos ($p<0,01$) (Figura 34a).

Todos os tratamentos promoveram redução significativa do número de parasitas por pata em relação ao controle positivo após 20 dias de tratamento, inclusive aqueles dos grupos tratados com laser e ftalocianina (N-metil glucamina 10 mg, N-metil glucamina 20 mg, TFD, N-metil glucamina 10 mg + TFD e N-metil glucamina 20 mg + TFD: $p= 0,001$; laser: $p=0,009$; ftalocianina: $p=0,012$). Outras diferenças podem ser observadas na Figura 34b.

Com 60 dias após o final do tratamento, o % de células viáveis do controle positivo continuou semelhante àqueles dos tratamentos com laser e ftalocianina, se diferenciando dos demais grupos ($p=0,000$). O grupo tratado com N-metil glucamina 10 mg se diferenciou dos demais, por apresentar aumento significativo na viabilidade celular, inclusive quando comparado ao controle positivo. Os tratamentos com N-metil glucamina 20 mg e N-metil glucamina 10 mg + TFD apresentaram resultado de viabilidade celular semelhante entre si e, juntamente com o tratamento com N-metil glucamina 20 mg + TFD continuaram se diferenciando dos demais ($p<0,01$), sendo que a maior redução na viabilidade celular continuou sendo observada no grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg + TFD (Figura 34a).

As análises do número de parasitas por pata mostraram resultados semelhantes em relação ao controle positivo, embora algumas diferenças tenham sido encontradas nas comparações entre alguns os tratamentos. Entretanto, a maior redução no número de parasitas por pata continuou sendo observada no grupo tratado com N-metil glucamina 20 mg + TFD (Figura 34b).

Em análise horizontal das Figuras 34a e 34b, ou seja, análise entre os tempos de tratamento, foi possível perceber que não houve diferença estatística entre os grupos do controle positivo (PBS), do Laser e o grupo da Ftalocianina. No teste que avalia a viabilidade celular, (Figura 34a) ocorreu um pico no desenvolvimento dos parasitas no período de 20 dias de tratamento com uma leve redução após 60 dias do término do tratamento. Já no teste que avalia o número de parasitas por pata, estes três grupos também foram semelhantes e apresentaram a maior concentração de parasitas na avaliação entre os tempos de tratamento ($p < 0,05$).

O grupo N-metil glucamina 10 mg, tanto no teste que avalia a células viáveis quanto no teste que avalia o número de parasitas por pata (Figuras 34a e 34b), apresentou diminuição da quantidade de parasitas entre o período de 10 dias de tratamento e 20 dias de tratamento. Entretanto, teve um aumento significativo após 60 dias do término do tratamento ($p < 0,05$). Isso indica que o parasita voltou a se desenvolver após o encerramento do tratamento.

O grupo N-metil glucamina 20 mg, que é considerado o tratamento padrão ouro no teste que avalia a viabilidade celular (Figura 34a) teve aumento da quantidade de parasitas entre os períodos de 10 e 20 dias, mas após 60 dias do término do tratamento, permaneceu estável com relação ao desenvolvimento dos parasitas. Já no teste que avalia o número de parasitas por pata (Figura 34b), ocorreu diminuição da quantidade de parasitas entre os períodos de 10 e 20 dias de tratamento com um leve aumento após 60 dias que o tratamento havia sido finalizado ($p < 0,05$).

O grupo TFD, no teste que avalia o % de células viáveis (Figura 34a), teve um aumento da quantidade de parasitas entre os períodos de 10 e 20 dias. Após 60 dias, os resultados foram os mesmos do período 10 dias de tratamento. Já na avaliação de parasitas por pata (Figura 34b) ocorreu diminuição da quantidade de parasitas entre os tempos de 10 e 20 dias de tratamento e aumento do desenvolvimento dos parasitas

após 60 dias que o tratamento havia sido finalizado, indicado que o parasita voltou a se desenvolver ($p < 0,05$).

Na avaliação do % de células viáveis (Figura 34a) do grupo N-metil glucamina 10 mg + TFD, houve redução significativa entre os períodos de 10 e 20 dias de tratamento. Entretanto, houve aumento da quantidade de parasitas após 60 dias que o tratamento havia sido finalizado. No teste que avalia o número de parasitas por pata (Figura 34b), ocorreu diminuição da quantidade de parasitas no tratamento realizado após 10 e 20 dias de tratamento e uma nova redução após 60 dias do término do tratamento ($p < 0,05$).

Na avaliação horizontal entre os diferentes tempos de tratamentos no grupo N-metil glucamina 20 mg + TFD, nos testes que avalia o % de células viáveis e parasitas por pata, houve redução da quantidade de parasitas entre os períodos de 10 e 20 dias de tratamento e uma nova redução após 60 dias do término do tratamento ($p < 0,05$), indicando que após o encerramento do tratamento o parasita não voltou a se desenvolver ($p < 0,05$).

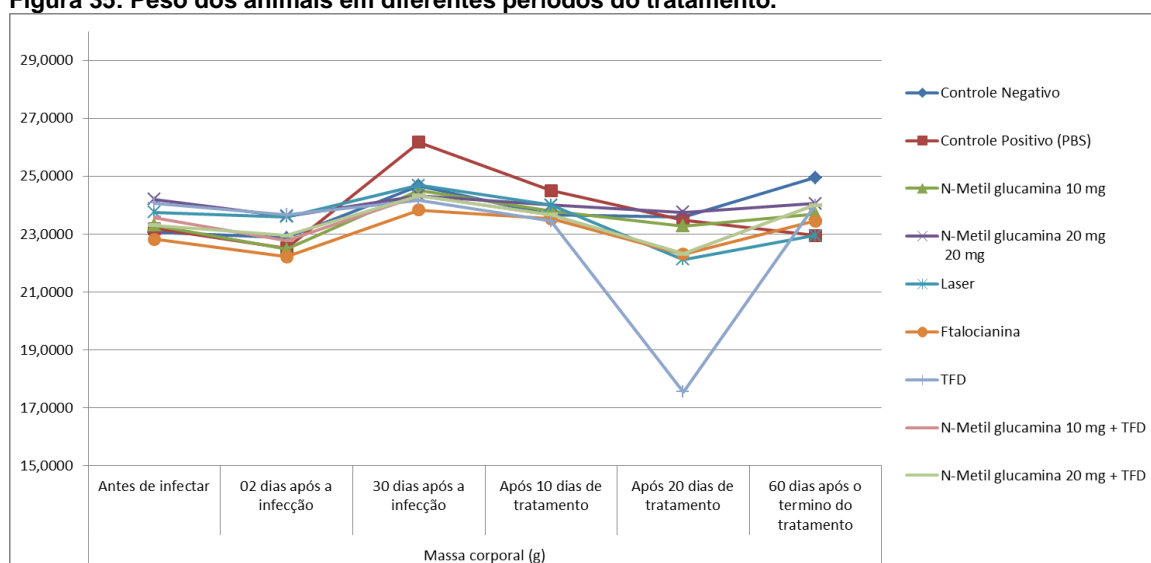
4.6 TOXIDADE DOS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS

Neste subitem serão apresentados os resultados do peso dos animais durante e após o término do tratamento e da comparação dos níveis de toxicidade feita por avaliação histopatológica e bioquímica do sangue.

4.6.1 Peso dos animais durante e após o término do tratamento

A Figura 35 apresenta o peso dos animais nos diferentes períodos de tratamento conforme metodologia proposta para este estudo.

Figura 35: Peso dos animais em diferentes períodos do tratamento.



Na Figura 35, é possível perceber que não houve diferença significativa entre os grupos, exceto no momento de 20 dias de tratamento. Foi feito o teste Mann-Whitney para comparação 2 a 2 em todos os momentos.

4.6.2. Comparação dos níveis de toxicidade foi feita por avaliação histopatológica e bioquímica do sangue

Os grupos foram tratados de acordo com os seguintes esquemas terapêuticos (Tabela 5):

Tabela 5: Esquema terapêutico para análise da toxicidade

Grupo	Representação cor	Número
Controle Negativo	Azul Escuro	1
Controle Positivo	Laranja	2
N-Metil. glucamina 10 mg	Cinza	3
N-Metil. glucamina 20 mg	Vermelho	4
Laser	Azul Claro	5
Ftalocianina	Roxo	6
TFD	Preto	7
N-Metil. glucamina 10 mg + TFD	Amarelo	8
N-Metil. glucamina 20 mg + TFD	Verde	9

Outra ferramenta proposta para o estudo da toxicidade dos tratamentos foi a análise histopatológica do fígado e do rim. Para o fígado definiram-se cinco critérios: alteração arquitetural (AA), infiltrado inflamatório lobular (IL), infiltrado inflamatório

portal (IP), degeneração hidrópica (DH) e degeneração gordurosa (DG). Para o rim foram definidos seis critérios: glomeruloesclerose (GE), infiltrado inflamatório túbulo intersticial (ITI), infiltrado inflamatório glomerular (IG), degeneração tubular (DT), necrose tubular aguda (NTA) e presença de cilindros proteicos (CC). Os achados foram graduados de 0 até 4+. Sendo 0 = ausência; + = baixa frequência; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = frequência alta. Além disso, outros achados histopatológicos não esperados também foram registrados.

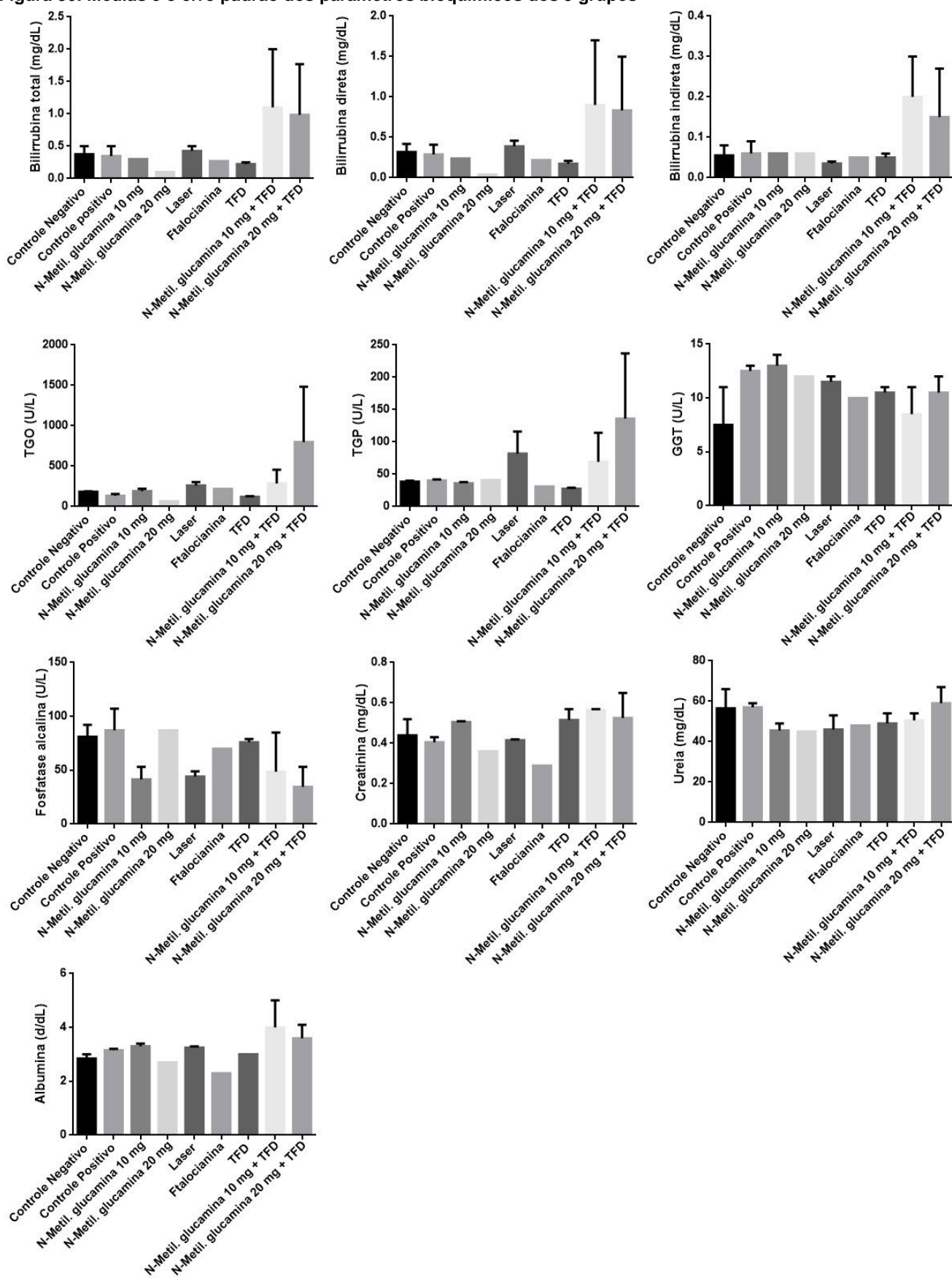
A análise estatística dos dados bioquímicos, realizada no programa SPSS, foi feita com o objetivo de comparar os nove grupos entre si considerando a média de cada parâmetro pesquisado. As amostras foram coletadas no 20º dia de tratamento e os dados bioquímicos estudados estão representados, de acordo com os grupos, no Tabela 6 e graficamente na Figura 36.

Tabela 6: Resultados das dosagens bioquímicas de camundongos *Mus Musculus* C57BL/6 fêmeas inoculados com *Leishmania amazonensis*

GRUPO	TRATAMENTO	BILIRRUBINA TOTAL (mg/dL)	BILIRRUBINA DIRETA (mg/dL)	BILIRRUBINA INDIRETA (mg/dL)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	GGT (U/L)	FOSFATASE ALCALINA (U/L)	CREATININA (mg/dL)	UREIA (mg/dL)	ALBUMINA (d/dL)
AZUL ESCURO	Saudável	0,38 +/- 0,125	0,32 +/- 0,100	0,06 +/- 0,025	183 +/- 5,000	38,50 +/- 1,500	7,50 +/- 3,500	81 +/- 11,000	0,44 +/- 0,080	56,50 +/- 9,500	2,85 +/- 0,150
LARANJA	Infectado s/ tto	0,35 +/- 0,150	0,29 +/- 0,120	0,06 +/- 0,030	132,50 +/- 22,500	40,50 +/- 1,500	12,50 +/- 0,500	87,00 +/- 20,000	0,41 +/- 0,025	57,00 +/- 2,000	3,15 +/- 0,050
CINZA	Nmg 10 mg	0,30 +/- 0,000	0,24 +/- 0,000	0,06 +/- 0,000	190,50 +/- 29,500	36,00 +/- 2,00	13,00 +/- 1,00	41,50 +/- 11,500	0,51 +/- 0,005	45,50 +/- 3,500	3,30 +/- 0,100
VERMELHO	Nmg 20 mg	0,1	0,04	0,06	66,00	41,00	12,00	87,00	0,36	45,00	2,70
AZUL CLARO	Laser	0,43 +/- 0,075	0,39 +/- 0,070	0,04 +/- 0,005	260,00 +/- 42,00	82,00 +/- 34,00 0	11,50 +/- 0,500	44,00 +/- 5,000	0,42 +/- 0,005	46,00 +/- 7,00	3,25 +/- 0,050
ROXO	FCL	0,27	0,22	0,05	219,00	31,00	10,00	70,00	0,29	48,00	2,30
PRETO	TFD	0,23 +/- 0,025	0,18 +/- 0,035	0,05 +/- 0,010	120,50 +/- 7,500	27,50 +/- 1,500	10,50 +/- 0,500	76,00 +/- 3,000	0,52 +/- 0,055	49,00 +/- 5,000	3,00 +/- 0,000
AMARELO	Nmg 10 mg + TFD	1,10 +/- 0,900	0,90 +/- 0,800	0,20 +/- 0,100	286,50 +/- 169,50 0	69,00 +/- 45,00 0	8,50 +/- 2,500	48,50 +/- 36,500	0,57 +/- 0,005	50,50 +/- 3,500	4,00 +/- 1,000
VERDE	Nmg 20 mg + TFD	0,99 +/- 0,785	0,84 +/- 0,665	0,15 +/- 0,120	798,50 +/- 685,50 0	136,0 0 +/- 101,0 0	10,50 +/- 1,500	34,50 +/- 18,500	0,53 +/- 0,125	59,00 +/- 8,000	3,6 +/- 0,500

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Onde: TGO = transaminase glutâmico oxalacética; TGP = transaminase glutâmico pirúvica; GGT=gama-glutamil tranferase; mg/dL= miligramas por decilitro; U/L= unidades por litro.

Figura 36: Médias e o erro padrão dos parâmetros bioquímicos dos 9 grupos



O outro critério para o estudo da toxicidade dos tratamentos por meio da análise histopatológica foi feito de acordo com as imagens adquiridas em microscópio de luz Zeiss Axiophot. Neste estudo, os animais de todos os grupos apresentaram macroscopicamente fígado aparentemente normal, com coloração marrom avermelhada e consistência firme. Ao microscópio de luz, a organização histológica do fígado dos camundongos consistia em arranjo dos hepatócitos em cordões dispostos radialmente a partir de uma veia centro lobular contendo sinusoides e células de Kupffer. As alterações encontradas nas lâminas foram as seguintes:

- (1) Controle Negativo: Grupo azul escuro**, os 2 animais do tempo 1 apresentaram alterações. Um deles apenas IL(1+) e o outro IL(1+) e IP(1+), sendo que nesse animal também foram vistas células de Kupffer. No tempo 2, um dos animais apresentou IL(1+) e IP(1+).
- (2) Controle Positivo: Grupo laranja**, houve alterações em 4 animais: 2 animais do tempo 1, ambos apresentaram IL(1+) e IP(1+); e 2 animais do tempo 3, sendo que um deles apresentou apenas IL(1+) e o outro apresentou alterações arquiteturais(2+), IL(1+), IP(3+) e necrose em ponte entre 2 espaços porta.
- (3) N-Metil glucamina 10 mg: Grupo cinza**, um dos animais no tempo 2 apresentou degeneração hidrópica(1+) e o outro animal apresentou IL(1+), IP(1+) e degeneração hidrópica portal/zona3 (1+). No tempo 3 apenas um dos animais apresentou IL(1+) e IP(1+).
- (4) N-Metil glucamina 20 mg: Grupo vermelho**: a única alteração encontrada foi IL(1+) em um dos camundongos tratados no tempo 1. Em um dos camundongos do tempo 3 foram encontrados IL(1+) e um IP(1+).
- (5) Laser: Grupo azul claro**, um dos animais do tempo 1 apresentou IL(1+) e IP(1+); já no tempo 3 um dos animais apresentou IL(1+), IP(2+) e o outro animal apresentou IP(1+) e degeneração hidrópica(1+).
- (6) Ftalocianina: Grupo roxo**, um dos animais do tempo 2 apresentou IL(1+), IP(1+) e degeneração hidrópica(1+); os dois animais do tempo 3 apresentaram alterações - um apresentou IP(1+) e o outro degeneração hidrópica(1+).

(7) TFD: Grupo preto apresentou alterações nos 3 tempos: no tempo 1 um dos camundongos apresentou AA(1+), IP(1+) e fibrose portal(1+) com formação de septo entre dois espaços portais; no tempo 2 um dos camundongos apresentou IL(1+) e degeneração hidrópica(1+); no tempo 3 os dois camundongos apresentaram alteração - um deles com IL(1+) e o outro com degeneração hidrópica(1+).

(8) N-Metil glucamina 10 mg + TFD: Grupo amarelo: apenas um camundongo do tempo 1 apresentou IL(1+) e IP(1+) e um camundongo do tempo 2 apresentou apenas degeneração hidrópica (1+).

(9) N-Metil glucamina 20 mg + TFD: Grupo verde: somente um camundongo do tempo 2 apresentou IL(1+), IP(1+) e degeneração hidrópica(1+)

Vide Quadros 12, 13 e 14.

Quadro 12: Alterações hepáticas nos animais tratados durante 10 dias (tempo1)

GRUPOS	ALTERAÇÃO ARQUITETURAL	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO DE HEPATOCITOS		TEMPO
		LOBULAR	PORTAL	HIDRÓPICA	GORDUROSA	
1	0	1+	1+	0	0	1
1	0	1+	0	0	0	1
2	0	1+	1+	0	0	1
2	0	1+	1+	0	0	1
3	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	1
4	0	1+	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	1
5	0	1+	1+	0	0	1
5	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	1
7	+1	0	+1	0	0	1
8	0	0	0	0	0	1
8	0	1+	1+	0	0	1
9	0	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	0	1

Onde: Foram selecionados ao acaso 02 animais por grupo para coleta dos órgãos.

Quadro 13: Alterações hepáticas nos animais tratados durante 20 dias (tempo2)

GRUPOS	ALTERAÇÃO ARQUITETURAL	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO DE HEPATOCITOS		TEMPO
		LOBULAR	PORTAL	HIDRÓPICA	GORDUROSA	
1	0	0	0	0	0	2
1	0	1+	1+	0	0	2
2	0	0	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0	2
3	0	1+	1+	1+	0	2
3	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0	2
6	0	1+	1+	1+	0	2
6	0	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	0	2
7	0	1+	0	1+	0	2
8	0	0	0	0	0	2
8	0	0	0	1+	0	2
9	0	0	0	0	0	2
9	0	1+	1+	1+	0	2

Onde: Foram selecionados ao acaso 02 animais por grupo para coleta dos órgãos.

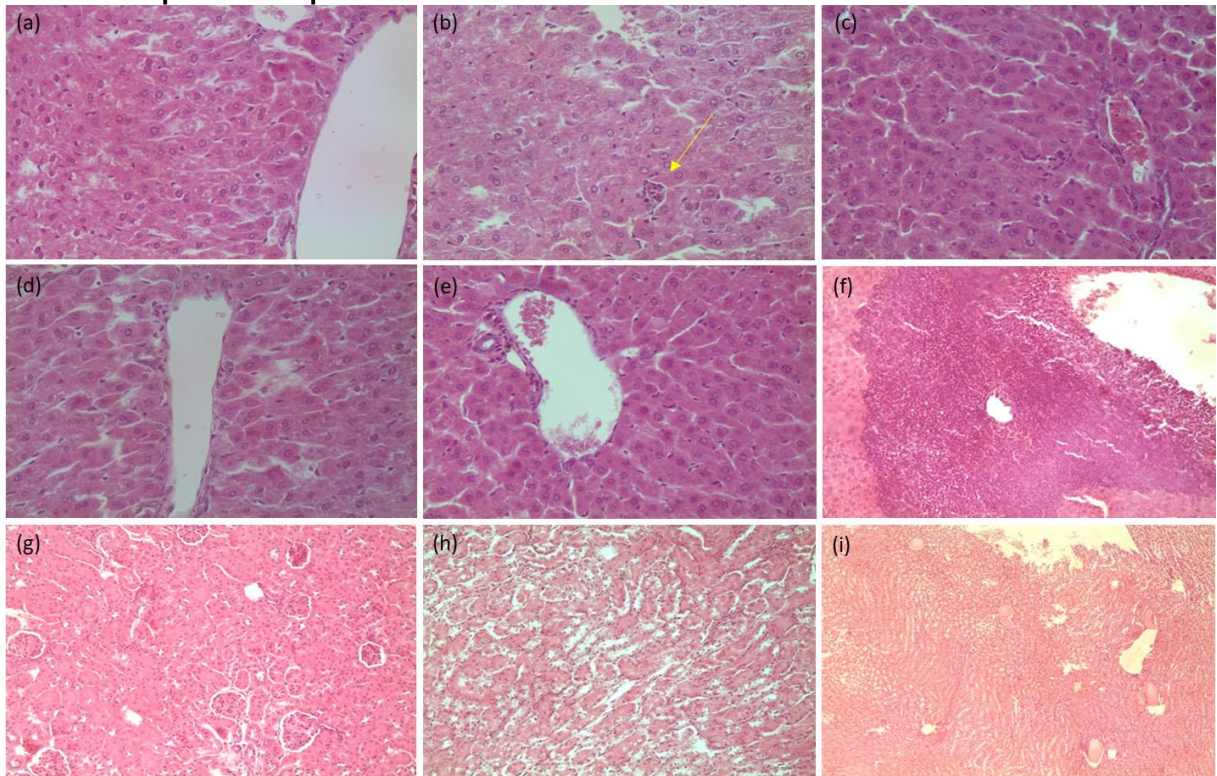
Quadro 14: Alterações hepáticas nos animais, após 60 dias do término do tratamento

GRUPOS	ALTERAÇÃO ARQUITETURAL	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO DE HEPATOCITOS		TEMPO
		LOBULAR	PORTAL	HIDRÓPICA	GORDUROSA	
1	0	0	0	0	0	3
1	0	0	0	0	0	3
2	2+	1+	3+	0	0	3
2	0	1+	0	0	0	3
3	0	1+	1+	0	0	3
3	0	0	0	0	0	3
4	0	1+	1+	0	0	3
4	0	0	0	0	0	3
5	0	1+	2+	0	0	3
5	0	0	1+	1+	0	3
6	0	0	0	1+	0	3
6	0	0	1+	0	0	3
7	0	0	0	1+	0	3
7	0	1+	0	0	0	3
8	0	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	0	3

Onde: Foram selecionados ao acaso 02 animais por grupo para coleta dos órgãos.

Com relação ao rim, todos os animais deste estudo apresentaram macroscopicamente aparência normal, com coloração rosa-vermelha e consistência firme. Ao microscópio de luz, os rins de todos os animais apresentavam-se divididos em duas zonas: cortical localizada mais externamente, e medular com localização mais central (Figura 37). Na região cortical, encontram-se os corpúsculos renais e os túbulos contorcidos proximais e distais.

Figura 37: Fotomicrografia do tecido hepático e renal de camundongos C57BL/6 expostos aos diversos esquemas terapêuticos



Onde: (a) fígado com degeneração hidrópica; (b) infiltrado inflamatório lobular (seta); (c) fígado com infiltrado lobular (grupo laranja); (d) fígado infiltrado lobular portal; (e) fígado com infiltrado portal (grupo laranja); (f) fígado com infiltrado portal (grupo laranja); (g) glomérulos renais (grupo preto); (h) túbulos renais sem alterações (grupo azul escuro); e (i) rim com cilindros proteicos (grupo verde).

As alterações encontradas nas lâminas foram as seguintes:

Controle Negativo: Grupo azul escuro: no tempo 1 um dos animais apresentou um CC e o outro três CC. Já no tempo 3, um dos animais apresentou um CC e o outro do mesmo tempo apresentou três CC.

Controle Positivo: Grupo laranja: foram encontrados no tempo 1 um animal contendo um CC e o outro com ITI (1+) além de três CC; No tempo 2, um dos animais com quatro CC e o outro com apenas 1.

N-Metil. glucamina 10 mg: Grupo cinza: nenhum dos animais apresentou achados em nenhum dos 3 tempos.

N-Metil glucamina 20 mg: Grupo vermelho: apenas um camundongo do tempo 3 apresentou um CC.

Laser: Grupo azul claro: não foi encontrado nenhum achado nos 3 tempos observados.

Ftalocianina: Grupo roxo: um animal do tempo 1 apresentou ITI (1+); um animal do tempo 2 apresentou quatro CC e ITI(1+); no tempo 3 um dos animais apresentou quatro CC.

TFD: Grupo preto: foram encontrados achados nos três tempos: três CC em um dos camundongos do tempo 1; três CC em um dos camundongos do tempo 2; No tempo 3, um dos camundongos apresentou um CC e o outro animal desse mesmo tempo apresentou edema intersticial além de três CC.

N-Metil. glucamina 10 mg + TFD: Grupo amarelo: três animais apresentaram os seguintes achados: três CC em um dos animais do tempo 1; um CC em um dos animais do tempo 2 e no outro desse mesmo tempo foi encontrado quatro CC.

N-Metil glucamina 20 mg + TFD: Grupo verde: um animal do tempo 1 apresentou um CC e um dos animais do tempo 2 apresentou 9 cilindros.

Vide Quadros 15, 16 e 17.

Quadro 15: Alterações renais nos camundongos, no tempo 1 (após 10 dias de tratamento)

GRUPO	GLOMEROESCLEROSE	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO TUBULAR	NECROSE TUBULAR AGUDA	CILINDROS	TEMPO
		TUBULO INTERSTICIAL	GLOMERULAR				
1	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	3	1
2	0	0	0	0	0	1	1
2	0	1+	0	0	0	3	1
3	0	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	1
6	0	1+	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	3	1
7	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	3	1
9	0	0	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	0	1	1

Onde: Foram selecionados ao acaso 2 camundongos por grupo para coleta dos órgãos.

Quadro 16: Alterações renais nos camundongos, no tempo 2 (após 20 dias de tratamento)

GRUPO	GLOMEROESCLEROSE	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO TUBULAR	NECROSE TUBULAR AGUDA	CILINDROS	TEMPO
		TUBULO INTERSTICIAL	GLOMERULAR				
1	0	0	0	0	0	0	2
1	0	0	0	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0	4	2
2	0	0	0	0	0	1	2
3	0	0	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0	0	2
6	0	0	0	0	0	0	2
6	0	0	0	0	0	4	2
7	0	0	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	0	3	2
8	0	0	0	0	0	1	2
8	0	0	0	0	0	4	2
9	0	0	0	0	0	0	2
9	0	0	0	0	0	9	2

Onde: Foram selecionados ao acaso 2 camundongos por grupo para coleta dos órgãos.

Quadro 17: Alterações renais nos camundongos, no tempo 3 (após 60 dias do término do tratamento)

GRUPO	GLOMEROESCLEROSE	INFILTRADO INFLAMATÓRIO		DEGENERAÇÃO TUBULAR	NECROSE TUBULAR AGUDA	CILINDROS	TEMPO
		TUBULO INTERSTICIAL	GLOMERULAR				
1	0	0	0	0	0	1	3
1	0	0	0	0	0	3	3
2	0	0	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	1	3
4	0	0	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	0	4	3
7	0	0	0	0	0	1	3
7	0	0	0	0	0	3	3
8	0	0	0	0	0	0	3
8	0	0	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	0	0	3
9	0	0	0	0	0	0	3

Onde: Foram seleccionados ao acaso 2 camundongos por grupo para coleta dos órgãos.

5 DISCUSSÃO

Pesquisas relacionadas ao tratamento de pacientes diagnosticados com leishmaniose têm sido realizadas em todo o mundo. Apesar disso, ainda não vivemos um cenário favorável no que se refere ao arsenal terapêutico que pode ser utilizado para o tratamento de doentes acometidos por essa parasitose. Para Lopera Sepúlveda (2017), as formas de tratamento atuais consistem em administração de fármacos (parenteral), sobretudo de compostos antimoniais pentavalentes, com efeitos adversos e alto grau de toxicidade que alteram a saúde do paciente. A descoberta de medicamentos efetivos e substâncias que auxiliem no tratamento pode ser o caminho que representa uma medida de controle para a diminuição da ocorrência de infecção e desenvolvimento da doença na população. Nesse sentido, os resultados deste estudo podem contribuir para a configuração de novos cenários para o tratamento da leishmaniose. O esquema terapêutico que apresentou os resultados mais promissores foi o que utilizou a associação do tratamento tópico com o antimonial pentavalente. Tal associação é positiva por permitir que as doses do antimonial pentavalente sejam reduzidas, reduzindo, assim, os efeitos tóxicos causados por altas doses prescritas para a cura dos pacientes. Resultados semelhantes e significativos foram encontrados nos estudos de Escobar *et al.* (2006) e Dutta *et al.* (2005), quando demonstraram que houve redução na viabilidade de células que receberam quimioterapia fotodinâmica, quando comparadas às do grupo controle, comprovando ação fototóxica e possível alternativa aos tratamentos atuais.

Existem estudos demonstrando a expansão da doença em diversas partes do mundo, indicando a alta capacidade de progressão e estabelecimento da doença entre os mamíferos susceptíveis, sobretudo, o homem. A contenção dessa parasitose é outro fator muito difícil de ser realizado principalmente por possuir um ciclo que permite o estabelecimento de reservatórios urbanos e de zona rural e silvestre. Conforme Negrão e Ferreira (2009), a LTA é considerada uma das grandes endemias no Brasil e na América Latina, com ocorrências desde o norte da Argentina até a península de Yucatã. Essa expansão tornou estudos com este são essenciais, por permitirem que médicos humanos e veterinários tenham a oportunidade de utilizar mais de uma forma de tratar os pacientes que são acometidos por esta parasitose.

O diagnóstico da leishmaniose em pacientes humanos e veterinários ainda é muito demorado sobretudo quando os testes são realizados em estabelecimentos que não são equipados para a realização de testes mais complexos que isolem o parasita ou detectem a presença do DNA do parasita em pacientes com suspeitas clínicas. Tal enfermidade é agravada pela incapacidade diagnóstica, baixa ocorrência de capacitação técnica dos profissionais de saúde e programas específicos e dificuldade de acesso a cuidados de saúde dessas populações rurais (ROCHA *et al.*, 2015).

Diante deste cenário, a resistência do parasita tem se desenvolvido de forma muito agressiva e progressiva. Muitos pacientes têm sido tratados por anos com esquemas terapêuticos que não surtem efeitos desejados, mas melhoram o quadro clínico e mantêm a infecção. Deste cenário, ressalta-se a necessidade de novas descobertas de substâncias e tratamentos que possam agir no combate aos parasitas de forma mais eficaz. A frequência de recidivas após o tratamento foi semelhante à encontrada por Netto *et al.* (1999) em outra área de LTA por *L. braziliensis*.

Conforme a Organização Mundial da Saúde, a ocorrência superior à 90% de recidivas em até um ano destaca necessidade de controle clínico por, pelo menos, um ano após o tratamento (WHO, 2014). Segundo Saravia (1990), a recidiva de LTA pode ser decorrente de infecções persistentes ou reinfecções, sendo que o autor somente considerou como recidiva aquela lesão que ocorresse na cicatriz da lesão original ou de forma primária na mucosa, o que pode indicar a reativação de infecção devido à falência do tratamento ou, no caso da leishmaniose por *L. braziliensis*, a cura clínica seria alcançada sem a erradicação dos parasitas. Os resultados da associação da medicação sistêmica com a medicação tópica que foram alcançados neste estudo podem ser um dos caminhos para a realização de um tratamento mais eficaz. Isso porque, além do tratamento realizado de dentro para fora, ou seja, com medicação sistêmica, foi realizado também o tratamento tópico com ftalocianina e TFD, que teve ação no local específico da lesão, onde havia muitos parasitas.

O alto custo do tratamento é outro fator que precisa ser observado. Além disto, Lopera *et al.*, (2017) relacionaram outras desvantagens das drogas tradicionais usadas para o tratamento da LC, tais como alta toxicidade e, mais recentemente, o aparecimento de parasitas resistentes às drogas. A opção de um tratamento tópico que ajude ou que trate definitivamente o paciente pode representar um grande avanço para evolução dos pacientes diagnosticados com LC em todo o mundo. A TFD é uma

terapia de interesse atual para o tratamento de enfermidades localizadas e tem demonstrado efeito anti-*Leishmania* (LOPERA SEPÚLVEDA, 2017). Neste estudo, a terapia tópica demonstrou ter eficácia e esse resultado pode impactar nos custos do tratamento dos pacientes acometidos pela LC Isso porque os pacientes precisam fazer o tratamento em ambiente ambulatorial e o tratamento tópico pode dispensar a ida do paciente ao ambiente hospitalar.

A toxicidade do tratamento medicamentoso realizado atualmente é outro fator muito importante e que requer atenção. Já na década de 90, Cucé *et al.*, (1990) apontaram a grande toxicidade do tratamento convencional como sendo um fator limitante para a cura de pacientes acometidos por LC e descreveram a ocorrência de insuficiência renal aguda associada a necrose tubular e hipersensibilidade desenvolvida no decorrer do tratamento com antimoniato de metil-glucamina que regrediram após a suspensão do tratamento. Um resultado promissor deste estudo foi que o grupo N-Metil 10 mg + TFD teve resultado semelhante os do grupo N-Metil 20 mg (tratamento padrão ouro), isso porque em muitos casos as doses terapêuticas dos pacientes tratados com LC é bastante alta. A possibilidade de redução destas doses pode representar avanços para o tratamento de leishmaniose.

Muitos pacientes que desenvolvem a doença possuem o sistema imunológico debilitado por estarem sendo tratados de outras enfermidades como o HIV e outras doenças que deprimem o sistema imunológico. Nestes casos, a toxicidade pode ser associada à alta quantidade de medicamentos que o paciente é submetido ao decorrer do tratamento. Neste sentido, a possibilidade de utilização de tratamento adjuvantes, principalmente os tópicos, pode diminuir os fatores agressivos ao organismo, aprimorando o tratamento dos pacientes diagnosticados com LC. Nesta perspectiva, há de se considerar o uso de fotossensibilizantes, como afirmou Py-Daniel (2017), com resultados promissores na TFD, destacado o uso das ftalocianinas. Os resultados deste estudo podem contribuir para os pacientes que estão com o sistema imunológico deprimido causado por alguma enfermidade e já tomam uma grande quantidade de medicamentos sistêmicos e são acometidos com leishmaniose, porque o tratamento tópico causa menores efeitos colaterais e interações medicamentosas nos pacientes.

A principal forma de tratamento do LC consiste na administração parenteral de SbV que apresenta alto grau de toxicidade, e cuja resistência tem sido demonstrada

de forma progressiva e preocupante. Nesse cenário, esquemas terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos representariam um avanço como medida de controle da doença, uma vez que o tratamento até agora representa a primeira arma a combater a leishmaniose (NAME et al., 2005; SHARMAN; ALEEN; VAN LIER, 1999).

A TFD é uma terapia tópica e promissora de interesse atual para o tratamento de doenças localizadas que emprega a associação da tríade de oxigênio, fonte de luz e agente fotossensibilizante, fatores que quando combinados produzem substâncias citotóxicas letais que podem destruir seletivamente células e parasitas como a *Leishmania* (AURELIANO et al., 2014; LOPERA et al., 2018; SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999; PELLOSI; DE JESUS; TEDESCO, 2017). O uso de ftalocianina de alumínio e ftalocianina de zinco sob ação da luz visível a 670 nm inibiu o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis* (ESCOBAR et al., 2006). Estudos de TFD no tratamento do LC experimental em roedores têm sido promissores, com redução significativa da carga parasitária e diminuição da extensão da lesão (RIBEIRO et al., 2016; SBEGHEN et al., 2015; AKILOV et al., 2007), além da ocorrência de modulação do processo inflamatório (AKILOV et al., 2007). Em humanos com LC, o uso de TFD obteve bons resultados, embora os dados ainda sejam limitados (EVANGELOU et al., 2011; VAN DER SNOEK et al., 2008).

O diâmetro médio das partículas lipossomais medido pela Zetasizer foi $266,9 \pm 5,2$. Esse tamanho é extremamente importante para condução de estudos *in vivo* e *in vitro*. Caso o tamanho dos lipossomas fosse grande, acima de 500 nm, comprometeria sua utilização como veículo de entrega de fármacos, pois ele seria rapidamente removido da corrente sanguínea por células de defesa (macrófagos) (IMMORDINO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). O índice de polidispersão da solução lipossomal ($0,55 \pm 0,04$), ~~indicando~~ indicou pouca homogeneidade de dispersão. Isso pode ter sido provocado pela adição do fármaco, gerando perda da homogeneidade da composição lipossomal. No que se refere ao índice de polidispersão, alguns fatores puderam ser determinantes, assim como a adição de compostos, os quais sejam alumínio, ftalocianina, entre outros. Foram identificados fragmentos de alumínio na superfície dos lipossomas, caracterizando os lipossomas com ftalocianina de cloro alumínio. O hidróxido de alumínio é um adjuvante utilizado em vacinas humana e veterinária (SILVA et al., 2004), e aumenta a migração macrofágica e neutrofílica para o local de inoculação (RESENDE et al., 2004), o que é positivo, pois pode auxiliar no tratamento

local da lesão causada pela leishmaniose (RIBEIRO, 2014). Logo, pode ser considerado que o alumínio pode ter contribuído para a eficácia do resultado deste estudo.

~~Além disso, o~~ fato de que fragmentos de alumínio foram encontrados em superfícies de lipossomas não pode ser ignorado. O alumínio, amplamente utilizado como adjuvante na composição de vacinas (GUPTA; SIBER, 1995; DA SILVA *et al.*, 2004), tem sua atividade biológica baseada em pelo menos 3 aspectos: (i) formação de depósito de antígeno em tecidos que produzem uma exposição prolongada; (ii) produção de antígenos particulados e ativação do complemento e estimulação dos macrófagos; e (iii) ativação de linfócitos auxiliando no tratamento local da lesão causada por LC (RIBEIRO *et al.*, 2016; COX; COULTER, 1997; MOTA; LIMA; MELO, 2006; RESENDE *et al.*, 2004).

Ressalta-se nesta pesquisa a possibilidade de esquema terapêutico que associa a terapia tópica com uma substância fotossensível, que quando unidas possam melhorar a resposta ao tratamento contra LC. Nesse contexto, como indicado por Py-Daniel (2017), a nanotecnologia tem servido como importante aliada no uso de AICIPC com a sua associação a lipossomas, nanoemulsões, dentre outros (LONGO, 2008). A nanotecnologia permite o desenvolvimento de fatores sensibilizadores de entrega específica, possibilitando eficácia fotodinâmica para aprimorar o conceito de outros protocolos de tratamentos, com impacto em várias aplicações biomédicas (PELLOSI *et al.*, 2017).

A nanotecnologia tem contribuído muito para o desenvolvimento de sensibilizadores específicos para o parto, resultando em maior eficácia fotodinâmica e melhores protocolos de tratamento, com impacto em diversas áreas médicas (PELLOSI; DE JESUS; TEDESCO, 2017). Desta forma, a ftalocianina de cloro-alumínio na formulação lipossomal (AICIPC) foi desenvolvida para mediar a terapia fotodinâmica (TFD) como uma nova abordagem para tratar o CL, com base em experiências ao longo de seus 50 anos de uso no tratamento do câncer (ESCOBAR *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2016). Os lipossomas são sistemas de liberação de drogas (DDS) interessantes, pois suas propriedades podem ser reguladas de acordo com a composição lipídica, tamanho, carga superficial e método de preparo (PELLOSI; DE JESUS; TEDESCO, 2017).

A disponibilização da AICIPC dentro dos lipossomas pode ter representado um grande avanço no que se refere a biodisponibilização da substância para a ação no foco da lesão cutânea. Os lipossomas facilitam a absorção e ação da substância no organismo. Como afirmaram Almeida *et al.* (2011), a ampla disposição de possibilidades que a nanotecnologia viabiliza por meio dos nanossistemas indica que a biodisponibilização seja avaliada, pois implica na eficácia e segurança nos sistemas de liberação de fármacos. Assim, no contexto deste estudo, outro ponto que precisa ser esclarecido está relacionado à absorção dos lipossomas contendo AICIPC, pois, como afirmou Py-Daniel (2017), a biodistribuição de nanossistemas é influenciada por uma miríade de fatores, dentre eles a via de administração, propriedades dos nanossistemas e o ambiente fisiológico onde são administrados.

Pela avaliação horizontal de cada grupo nos diferentes tempos em que as patas dos animais foram medidas, foi possível inferir que o diâmetro da pata dos animais de todos os grupos apresentava valores semelhantes antes da infecção.

A avaliação dos diâmetros da pata dos animais antes e após o tratamento é um critério de cura que se aproxima do que é feito na prática clínica com o paciente no seguimento da involução da lesão durante o tratamento. Além disso, a diluição limitante para a quantificação de *Leishmania* é um método estabelecido e mais comumente usado (RIBEIRO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2010; SAMPAIO; LUCAS; COSTA FILHO, 2009). Os resultados da diluição limitante corroboram os achados de medidas do diâmetro da pata, onde o grupo tratado com N-metil glucamina 20mg + TFD superou todos os grupos, incluindo aqueles tratados apenas com N-metil glucamina, mantendo a redução no diâmetro da pata, % de células viáveis e número de parasitas por pata, mesmo 60 dias após o final do tratamento. Isto aproxima-o do controle negativo (animais saudáveis), indicando que o AICIPC foi eficaz como agente fotossensibilizador. Os resultados da contagem de amastigotas e culturas confirmaram isso.

Além disso, pode ser reduzida a dose do Sbv quando associado a TFD com AICIPC, sem prejuízos de eficácia em relação ao esquema terapêutico já padronizado (20mg Sbv/kg/dia -20) para a LC. O estudo de Cabral (2017) que utilizou TFD para o tratamento de LC em modelo murino constatou o efeito benéfico da TFD em duas

sessões, sugerindo a ocorrência de modulação do processo inflamatório. Os resultados do estudo de Carneiro (2013), que também avaliou a quantidade de parasitas por pata por meio do método de diminuição limitante, indicaram que o tratamento da leishmaniose com a associação de TFD com ftalocianina cloro-alumínio *in vivo* reduziram os parasitas da espécie *L. amazonensis*. Por outro lado, também não houve diferença estatística entre os resultados do grupo que foi tratado somente com ftalocianina cloro-alumínio e o grupo tratado com antimonial pentavalente.

A descoberta de culturas positivas e aumento do número de parasitas após 60 dias do final do tratamento na maioria dos grupos, incluindo N-metil glucamina 10mg e N-metil glucamina 20mg, pareceu tornar esses grupos vulneráveis à recorrência. Doses baixas e descontínuas de SbV e o uso de uma única droga parecem ser a principal causa de recaídas e resistência à leishmaniose (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; SUNDAR *et al.*, 2001). Os melhores resultados do grupo N-metil glucamina 10 mg + TFD que o N-metil glucamina 10mg e sua semelhança com os grupos N-metil glucamina 20mg 60 dias após o tratamento poderiam indicar a possibilidade de resistência ao fármaco isolado e reiteram os achados de redução da viabilidade celular com TFD com AICIPC, corroborando outros estudos (RIBEIRO *et al.*, 2016; DUTTA *et al.*, 2005; ESCOBAR *et al.*, 2006).

Sobre a negatividade das lâminas, para Barbosa (2012), a sensibilidade está relacionada com o grau de infecção parasitaria, do tipo de material biológico coletado e do modo que for feito o processamento e coloração. A baixa sensibilidade do teste pode estar associada à pequena quantidade de material coletada da pata do camundongo. Como a pata é muito pequena, fica difícil coletar grandes quantidades de material. O isolamento dos parasitas para exame em microscópico é diretamente dependente de uma grande quantidade de parasitas na amostra coletada (DISCH *et al.*, 2006).

No estudo de Escobar *et al.* (2006), que testaram um método para determinar se as promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis* eram sensíveis à TFD *in vitro*, demonstraram que o tratamento de promastigotas de *Leishmania* com cloreto de ftalocianina de alumínio e ftalocianina de zinco seguido de iluminação com luz visível a 670 nm inibiu o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis*, concluindo que a TFD contra *Leishmania* pode ser uma estratégia promissora para o tratamento da leishmaniose.

Para os três momentos após o início do tratamento, ou seja, com 10 dias, 20 dias e 60 dias após a finalização do tratamento, foi possível observar que o grupo N-metil glucamina 20 mg + TFD foi também o mais eficaz entre os grupos analisados. Nos três momentos, este grupo não positivou em nenhuma das lâminas e se igualou ao controle negativo. Outro resultado importante foi que o grupo N-metil glucamina 10 mg + TFD se igualou ao resultado do grupo N-metil glucamina 20 mg, demonstrando que a associação da terapia fotodinâmica com a ftalocianina cloro-alumínio em formulação lipossomal e o antimoniato de N-metil glucamina pode superar os resultados do uso isolado do antimoniato de N-metil glucamina. Quando acompanharam pacientes com lesão cutânea ocasionada por leishmaniose, cujo tratamento utilizava TFD, Evangelou *et al.* (2011) lograram resultados positivos, entretanto, recomendaram estudos com quantidades maiores de pacientes para que se pudesse confirmar a proposição do esquema terapêutico.

O teste que avalia a presença ou ausência de parasitas por meio da confecção de lâminas de extensão apresentou pouca sensibilidade no processo de fixação e identificação dos parasitas. Apesar disto, os resultados das lâminas corroboram com os resultados dos outros testes, onde o grupo N-metil glucamina 20 mg + TFD foi o que mais se aproximou dos resultados do grupo controle negativo, seguido dos grupos N-metil glucamina 10 mg + TFD e N-metil glucamina 20 mg.

No teste que avalia a viabilidade celular entre os diferentes esquemas terapêuticos deste estudo foi possível verificar que o único grupo que se aproximou do grupo controle negativo foi o grupo N-metil glucamina 20 mg + TFD. Um ponto muito importante neste grupo foi que após 60 dias do término do tratamento não ocorreu crescimento da quantidade de parasitas no camundongo. Outro resultado muito importante ocorreu no grupo N-metil glucamina 10 mg + TFD. Os resultados deste grupo, apesar de não terem se aproximado do controle negativo, superou os resultados apresentados no grupo considerado padrão ouro N-metil glucamina 20 mg. Além disso, o grupo N-metil glucamina 20 mg demonstrou aumento da quantidade de parasitas após 60 do término do tratamento. Isso pode ter ocorrido devido à resistência que o parasita da LC tem desenvolvido. Esses resultados foram ao encontro do que foi sugerido por Escobar *et al.*, (2006), ocasião em que, ao avaliarem a atividade fotodinâmica da ftalocianina alumínio e zinco em promastigotas de Leishmania,

indicaram a perspectiva promissora desta associação para o tratamento contra a Leishmaniose.

Quando Peñaranda (2010) realizou estudos utilizando a TFD associada à ftalocianina de cloro-alumínio, segundo o método, para tratamento de lesão cutânea em hamsters resultante da inoculação de *L. amazonensis*. Os resultados deste estudo mostraram que todos os animais foram curados da lesão clínica após 12 semanas de tratamento, entretanto, não houve redução completa das formas amastigotas no local das lesões.

Em um estudo com materiais e método semelhantes desempenhado por Dutta *et al.* (2005), houve resultados que mostraram que a *L. amazonensis* fotossensibilizada por ftalocianina foram altamente suscetíveis à citólise, em situação de radiação por luz, indicando a ocorrência de geração de espécies reativas de oxigênio, possivelmente, em função da baixa eficácia dos mecanismos antioxidantes do parasita, demonstrando, também, que a associação de TFD com ftalocianina e n-metil glucamina, além da cura clínica, pode eliminar uma maior quantidade de parasitas. Tal constatação vai ao encontro, por exemplo, ao relato de Perussi (2007), quando a utilização de ftalocianina em quimioterapia fotodinâmica mostrou-se eficaz, por possuir características necessárias para promover eficientemente a redução da viabilidade celular maior do que um FS padrão (RIBEIRO, 2014).

A perda de peso nos animais pode ser um alerta de intoxicação. Por este motivo, os animais foram pesados em diferentes momentos do estudo para que assim fosse feita a avaliação de intoxicação dos esquemas terapêuticos que os animais de cada grupo foram submetidos.

A baixa toxicidade foi outro fator muito importante apresentado neste trabalho. Em relação aos efeitos adversos, as alterações bioquímicas não corresponderam às alterações morfológicas. Parece que as mudanças foram aleatórias, mais uma consequência do estresse cativeiro do que das próprias terapias e, portanto, que os esquemas terapêuticos eram seguros. No entanto, devido ao pequeno número de animais avaliados, não foi possível realizar análises estatísticas para confirmar isso, sugerindo um estudo com grupos maiores. Embora um número maior de animais seja desejável para evitar vieses no estudo de efeitos adversos, o número total atendeu aos padrões do Comitê de Ética Animal. Além disso, durante o experimento não houve perda de animais. No momento do teste, todos os animais estavam vivos. Os testes

foram divididos em três etapas. Assim, achamos importante avaliar a eficácia do tratamento a longo prazo (principal objetivo do estudo), por isso não fomos capazes de sacrificar todos os animais de uma só vez para a avaliação dos critérios de eficácia e efeitos adversos.

Tratando-se dos parâmetros bioquímicos do fígado, os esquemas terapêuticos, em geral, não apresentaram toxicidade. Tratando-se do rim, foi observado que tanto os grupos tratados com N-Metil. glucamina 20 mg + TFD, quanto os grupos que receberam N-Metil. glucamina 10 mg + TFD, assim como os que foram tratados somente com TFD, manifestaram níveis de ureia e creatinina semelhantes. Por outro lado, o grupo que usou a maior dose de N-Metil. glucamina apresentou menores níveis de ureia e creatinina quando comparados aos citados anteriormente.

Sobre a análise histopatológica do rim e do fígado, os animais do grupo controle, tanto o saudável quanto o infectado sem tratamento, apresentaram alterações histológicas. Tais alterações não foram, necessariamente, resultado do uso do medicamento, visto que os animais que não receberam tratamento apresentaram o mesmo tipo de alteração do que os animais que receberam a medicação. Por outro lado, como afirmaram Ortega *et al.* (2017), o uso de formulações lipossomais têm ampliado a efetividade de agentes antileishmaniais.

Os vários esquemas terapêuticos de uma forma geral não evidenciaram toxicidade. Entretanto, não se pode afirmar que as drogas não são tóxicas, pois isso depende da dose administrada e do tempo de tratamento. Além disso, o número de animais em cada grupo foi muito pequeno – pela limitação de não podermos eliminar todos os animais para dar continuidade ao estudo – e não permitiu que houvesse uma confirmação mais evidente com análise estatística inferencial sobre as interações das drogas.

Sobre os vieses deste estudo, a quantidade de animais deste experimento poderia ser maior, assim resultaria maior expressão do ponto de vista estatístico. A quantidade de sangue a ser retirada dos animais é muito pequena em muitos casos insuficiente para a realização dos exames necessários para a realização da análise de toxicidade. Entretanto, tal cenário foi decorrente do que foi estabelecido pelo Comitê de Ética, impossibilitando o aumento da quantidade de animais por grupo. Da mesma forma, uma análise tóxica com uma quantidade maior de amostras seria o ideal para confirmar se houve ou não lesão causada pelo esquema terapêutico

utilizado. A análise bioquímica e hematológica ficou prejudicada pela pequena quantidade de sangue coletado. Uma possibilidade de melhorar este cenário, seria a realização dos exames em apenas um momento. Assim, a quantidade de animais utilizada para coletar o material seria maior, melhorando os resultados da toxicidade.

Diante das análises realizadas é lícito dizer, apesar do pequeno número de animais utilizados, que, baseado em parâmetros bioquímicos do sangue e em parâmetros histopatológicos, não se verificou diferença de toxicidade entre as diversas alternativas de tratamento propostas. Mais especificamente, sugere-se que uso da associação N-Metil 10mg ou 20mg + TFD com ftalocianina não apresentou menor toxicidade que o uso do N-Metil 10mg ou 20mg isoladamente.

A associação de TFD com AICIPC e N-metil glucamina mostrou-se eficaz no tratamento de LC experimental causada por *L. amazonensis*. O esquema terapêutico N-metil glucamina 20mg + TFD apresentou maior eficácia do que o esquema padrão para LC (20mgSbV / Kg / dia) e todos os outros esquemas terapêuticos testados. O tratamento com N-metil glucamina 10mg + TFD com AICIPC teve resultados semelhantes ao grupo N-metil glucamina 20mg, indicando que a combinação tem a possibilidade de reduzir a dose de antimônio, diminuindo os efeitos adversos do fármaco. O esquema terapêutico testado com a associação de N-metil glucamina + TFD com AICIPC não teve alterações significativas na função renal, função hepática e lesões histopatológicas, mas a análise de uma amostra maior de exames seria desejável. Sugere-se testar a eficácia do SbV + TFD com AICIPC em outras espécies de *Leishmania*, para testar a solução tópica por via intralesional, a fim de permitir uma entrega maior e mais adequada da substância.

Consoante aos estudos de Silva-Lopes (2010), o teste de MTT é válido porque os seus resultados apontam a mitocôndria como alvo de utilização de fármacos eficazes. Nesse sentido, conforme os achados de Ferreira et al. (2004), foi possível que se avaliasse a interação da ftalocianina com as enzimas mitocondriais, o que reforça o teste e viabilidade por MTT.

O grupo tratado com grupo N-Metil. 20 mg + TFD foi o grupo que mais se aproximou do controle negativo. Da mesma forma, os resultados são promissores relacionados a associação do miltefosina com a terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Ainda, os resultados semelhantes entre os grupos tratados com N-metil glucamina 10 mg + TFD e N-metil glucamina 20 mg poderiam indicar que a utilização da TFD com AICIPC pode potencializar os resultados do tratamento padrão ouro, que utiliza apenas a droga sistêmica isolada. Resultados parecidos a estes foram encontrados por Beck (2016) que fez o tratamento in vitro de sangue de cão infectado com *Leishmania infantum chagasi* utilizando AICIPC e após o tratamento inoculou o sangue em hamster para verificar se estes desenvolviam a doença. Este estudo demonstrou que ocorreu significativa redução parasitária. Entretanto, o parasita não foi eliminado do organismo hamster (BECK, 2016).

O tempo de exposição utilizado na TFD é fator fundamental para os resultados positivos, e deve ser determinado pelos protocolos pré-estabelecidos (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). Assim, os resultados dos grupos N-metil glucamina mg + TFD e apenas TFD poderiam ter sido melhorados caso o tempo de exposição a ao tratamento da TFD fosse maior. O local da infecção e o número de sessões também são variáveis fundamentais para o êxito do tratamento utilizando a TFD. Neste sentido, a utilização da TFD com uma maior quantidade de sessões e um tempo de exposição maior poderia melhorar os resultados destes dois grupos (CABRAL, 2017). Por outro lado, os resultados aqui obtidos ainda podem ser limitados, visto que não avaliam a toxicidade in vivo, e, assim, a associação ainda não pode ser recomendada para a rotina clínica (BASTOS *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste experimento foram muito promissores, indicaram que a associação da TFD com a AICIPC e o tratamento de primeira escolha com N-metil glucamina 20 mg pode trazer resultados terapêuticos superiores quando associados. A associação da TFD com ftalocianina cloro alumínio e N-metil glucamina 20 mg apresentou resultados superiores que o tratamento utilizando apenas N-metil glucamina 20 mg.

Outro resultado interessante foi o observado no grupo tratado com AICIPC e N-metil glucamina 10 mg. Os resultados deste grupo foram muito próximos dos resultados obtidos no grupo N-metil glucamina 20 mg, indicando que a associação tem grande potencial e a possibilidade de redução das doses do antimônio, alcançando um dos objetivos deste estudo.

Sugere-se, ainda, a realização de trabalhos futuros que testem esquemas terapêuticos utilizando a AICIPC com outras drogas já consagradas no tratamento da LC pode demonstrar resultados promissores. Outro ponto importante é testar o tratamento utilizando a AICIPC em outras espécies de leishmaniose. Seria interessante ainda testar a ação da AICIPC por meio da aplicação injetável, visto que esta via de administração permite que a entrega da substância no foco da lesão seja maior aumentando assim a ação.

Por fim, os objetivos deste estudo foram alcançados e os testes realizados demonstraram que um caminho muito importante para o tratamento da LC pode ser alcançado quando associamos a TFD com AICIPC e o tratamento convencional considerado de primeira escolha que utiliza o antimoniato de grupo N-metil glucamina. Conclui-se, portanto, que a utilização sistêmica do antimoniato de N-metil-glucamina associado à TFD tópica com AICIPC para o tratamento da leishmaniose causada por *Leishmania (L) amazonensis* foi eficaz nos parâmetros deste estudo.

7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR-TORRENTERA F. *et al.* Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 70, p.5075-80, 2002.
- AGUILAR-TORRENTERA F. *et al.* Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg.* ;66, 273-279 2002.
- AKILOV, O. E. *et al.* Photodynamic therapy against intracellular pathogens: problems and potentials. *Med. Laser Appl.*, v.21, p.251-260, 2006.
- AKILOV, O. E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K. *et al.* Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci*, v.6 2007, p.1067-75.
- ALISSON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.1, n.1, p.27-42, 2004.
- ALMEIDA, Joao Paulo Mattos *et al.* In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 6, n.5, p. 815–835, jul. 2011.
- ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; GOSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v.43, n.2, 2010, p.194-197.
- AURELIANO, D. P.; RIBEIRO, M. S.; LINDOSO, J. A. L. *et al.* Treatment and Control of Leishmaniasis Using Photodynamic Therapy. In: CLABORN D. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment.* London/UK: IntechOpen, p. 393-412, 2014.
- BARBOSA, V. T.; SILVA, M. A. G.; SOUSA, M. G.; GERING, A. P.; SANTOS, H. D.; LAUS, J. L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1465-1470, 2012.
- BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* v.7, n.3. São Paulo, 2004.
- BASTOS, M. M. *et al.* O uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea, *Revista Virtual de Química*, v.4, n.3, p.257-267, 2012
- BASTOS, J. L. N. *et al.* Análise da ação da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) com ftalocianina cloro-alumínio (FC-C1A1) sobre os

microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) e *Staphylococcus aureus* (Gram+). *Brazilian Journal of Biomedical Engineering*. 2013.

BECK, C. *Efeito da luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio na inativação de Leishmania infantum chagais em sangue canino*. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2016.

BERGSTRAND, N. et al. Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. *Biophys. Chem.* v.104, p.361-379, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral*. Brasília. 1.ed. 2003.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2nd ed. Brasília, Brazil: Editora do Ministério da Saúde; 2007

BRITO, M. E. F.; SILVA, C. J.; CRISTIANE, M. S.; SALAZAR, P. R. COUTINHO, J. S.; REIS, L. C.; PEREIRA, V. R. A.; BRANDAO-FILHO, S. P.; MEDEIROS, A. C. R. Clinical epidemiological profile of American tegumentary *Leishmaniasis* at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. v.24, n.10, Rio de Janeiro, 2008.

BORBOREMA, S. E. T. et al. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (Leishmania) major-infected macrophages. *Int J Antimicrob Ag.* v. 38, p. 341– 347, 2011.

CABRAL, Fernanda Viana. *Estudo da terapia fotodinâmica no tratamento de Leishmaniose cutânea em modelo murino*. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017.

CARNEIRO, A. L. *Uso de terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro alumínio no tratamento tópico da leishmaniose cutânea*. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília: Departamento de Ciências Médicas, 2013.

CARDOSO, F. O.; DE SOUZA, C. F. S; MENDES, V. G. et al. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. *J Infect Dis*, v.201, 2010, p.1933-40.

CARVALHO, R. F. De. *Estudo in vivo da ação de nanocápsulas de PLGA contendo anfotericina B, DMSA e nanopartículas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Departamento de Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CARVALHO, R.F.; RIBEIRO, I. F.; MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol.* v.135, 2013, p.217-22.

CHANG, K. P. *et al.* Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* v.85, n.3, 2003, p.375-390.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. *et al.* Randomized controlled clinical Trial to Assess efficacy and safety of Miltefosina in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmaniasis (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.84, n.2, p.255, 2011.

CHURCH, D. M. *et al.* Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*, 7, 2009.

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. As nanopartículas em terapia fotodinâmica: um paradigma emergente. *Adv Drug Deliv Rev.* v.60, p.1627-1637, 2008.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C. R.; SILVA, A. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E. S.; SILVA, C. M. P.; SILVA, A. R. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão: aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v.25, n.2, 1992, p.115-123.

COSTA FILHO, A. V.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.4, 2008, p.424-427.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v. 15, p. 248-256, 1997.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in *Leishmaniasis*. *Clin Microbiol Review*, v.19, 2006, p.111-126.

ÇAMUR, M.; AHSEN, V.; DURMUS, M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 219 n. 2-3, p. 217-227, 2011.

CUCÉ, L. C.; JÚNIOR, W. B.; DIAS, M. C. Alterações renais por hipersensibilidade ao uso de antimonial pentavalente (Glucantime®) na leishmaniose tegumentar americana; relato de um caso Nephrotoxicity to Glucantime® in the treatment of *Leishmaniasis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 32, n. 4, p. 249-251, 1990.

DAI, Tianhong; HUANG, Ying-Ying; HAMBLIN, Michel R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* v.6, p.170-188, 2009.

DEPS, P. D.; VIANA, M. C.; FALQUETO, A.; DIETZE, R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.33, n.6, 2000, p.535-543.

DESJEUX P. The increase in risk factors for *Leishmaniasis* worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v.95, n.3, p.239-243, 2001.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Disease*. v.27, 2004, p.305-318.

DISCH, J.; CALIGIORNE, R. B.; MACIEL, F.; OLIVEIRA, M.C.; ORSINI, M.; NETO, E.D.; RABELLO, A. *Diag. Microbiol. and Inf. Dis*. n.56, p.395-400, 2006.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. v.3, n.5, p.380-387, 2003.

DORLO, T.P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of *Leishmaniasis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. v.67, n.11, 2012, p.2576-2597.

DOMINGOS, I. H. *Teste rápido TR-DPP® no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina*. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa de pós-graduação em Ciência Animal. Campo Grande, 2012.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KOBERLIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy. *Journal National Cancer Institute*, v.90, n.12, p.889-905, 1998.

DUTTA, S. *et al*. Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4474–4484, 2005.

ESCOBAR, Patrícia; HERNÁNDEZ, Cesar M. Rueda; MARTÍNEZ, Fernando; PÁEZ, Edgar. Actividad fotodinámica de ftalocianina de aluminio (iii) y zinc (ii) en promastigotes de *Leishmania*. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. v.26, 2006.

EVANGELOU, G. *et al*. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodermatol. photoimmunol. photomed.*, v.27, p.254-256, 2011.

FERREIRA, S. D. R. M. *et al*. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS4. *Lasers med. sci.*, v.18, p.207-212, 2004

FIELD, Andy. *Descobrimos a Estatística usando o SPSS – 2ª edição*. Artmed, 2009.

FREZARD, F. C. *et al.* Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. n.14, 2009, p.2317-2336.

FRÉZARD, F. J. G. A caminho da leishmaniose visceral canina. In: _____. Lipossomas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Brasília: IBICT, Canal Ciência, 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*. v.36, n.1, 2003.

GRIMALDI, J. G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the new world. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.41, 1989, p.687-725.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines- current status, problems and future prospects. *Vaccine*, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

GURSOY, H. *et al.* Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest.* v.17, n.4, p.1113-1125, 2003.

HERNÁNDEZ, I. *et al.* In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World *Leishmania* species. *J Photoch photobio B*. v. 117, p. 157-163, 2012.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*. v.1, n.3, p. 297-315, 2006.

ISSA, Maria Cláudia Almeida; MANELA-AZULAY, Mônica. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol*. v.85, n.4, p.501-511, 2010.

JIRMANUS, L.; GLEBY, M. J.; GUIMARÃES, L. H.; LAGO, E.; ROSA, M. E.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E. M. Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in an Area of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Transmission Over a 20-Year Period. *Am J Trop Med Hyg.* v.86, n.3, 2012, p.426-433.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.. Las leishmaniasis y la *Leishmaniasis* del Nuevo Mundo, con particular referencia al Brasil. *Bulletin of Sanitary Panamerican*, v.76, 1974, p.93-119.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C.; MARLE, J. VAN. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* v.49, n.5, p.2026-2034, 2005.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v.16, p.307-321, 1998.

LEVERAN, A. *Leishmanioses Kala-Azar, Bouton d'Orient, Leishmaniose Americaine*. Paris: Manson et Cie, 1917.

LEVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma dovani*). Parasite d'une fièvre de l'Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-961.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B. M.; LIEEDALE, G. F.; LEOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*. v.27, 1980, p.37-58, 1980.

LIEW, F.Y. *et al.* Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997.

LONGO, J. P. F.. *Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre o câncer bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro*. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Medicina, Departamento de Pós Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LOPERA SEPÚLVEDA, ALEX ARBEY. *Diseño de un dispositivo médico que sirva como terapia alternativa para el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea*. Tese (doutorado). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, 2017.

LOPERA SEPÚLVEDA, A. A.; MONTOYA, A.; VÉLEZ, I. D.; ROBLEDO, S. M.; GARCIA, C.P. Synthesis of calcium phosphate nanostructures by combustion in solution as a potential encapsulant system of drugs with photodynamic properties for the treatment of cutaneous *Leishmaniasis*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v.21, p.138-146, 2018.

LORÍA, Cervera E. N. Implementación de técnicas moleculares para el análisis de citocinas Th1 (Interleucina-12, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa) de *Peromyscus yucatanicus*. *Mérida*: Universidad Autónoma de Yucatán; 2011.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*. v.23, n.2, 2000, p.237-243.

MACHADO, P. R. *et al.* Miltefosina in the Treatment of Cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial (Miltefosina for *L. braziliensis* CL). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v.4, n.12, 2010.

MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LLÂNOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Revista Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v.28, 1986, p.421-430.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; GOMES, M. L. S.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*. v.24, n.12, Rio de Janeiro, 2008, p.2941-2947.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz. j. vet. res. anim. sci*; v.50, n.5, 2013, p.341-352.

MARSDEN, P.D.; JONES, T.C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of *Leishmaniasis*. Coordinating ed, E. Chang and R.S. Bary.; *Elsevier Science Publisher*, Amsterdam. 1985.

MATRAGOLO, F. da S. V. Análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania V. braziliensis* e de *Leishmania L. infantum* sensíveis e resistentes aos antimoniais. Tese (doutorado). 82f. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, 2013.

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*. 2004.

MEYERHOFF, A. U.S. food and drug administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 28, n. 1, p. 42-48, discussion 49-51, 1999.

MINODIER, P. PAROLA, P. Cutaneous *Leishmaniasis* treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v.5, n.3, p.150-158.

MILLS, C.D. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. v.164, p.6166–6173, 2000.

MOHEBALI, M. *et al.* A comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta Tropica*, v.103, p.33-40, 2007

MONTANARI, J. *et al.* Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. *J Control Release*. v. 1, n. 3, p. 368-376, 2010.

MOSTAFA, D.; TARAKJI, B. Photodynamic Therapy in Treatment of Oral Lichen Planus. *J Clin Med Res*. v.7, n.6. p.393-399, 2015.

MOTA, E. F.; LIMA, M. da G. S.; MELO, D. F. de. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. *Ciência Animal*. v.16, n.2, p.79-88, 2006.

MURRAY, H. W.; DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral *Leishmaniasis*. *Infect Immun*. 68, p.288-93, 2000.

NAME, R. Q.; BORGES, K. T.; NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, J. H. D.; TAUIL, P. L.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes

com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.80, n.3, Rio de Janeiro, 2005, p.249-254.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas américas. *Revista Percurso*. v.1, n.1, p.85-103, 2009.

NETTO, E. M. et al. Long-term followup of patients with Leishmania (Viannia) braziliensis infection and treated with Glucantime®. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.84, p.367-370, 1990.

O'RIORDAN, Katie; AKILOV, Oleg E.; HASAN, Tayyaba. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v.2, n.4, p.247-262 2005.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVALA, Z. G.; LIMA, E. C.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *Journal Nanoscience Nanotechnology*, v.6, n.8, p.2432-2437, 2006.

OLIVEIRA, F. S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; PACHEGO, S. J. B.; COSTA, F. A. C.; SCHUBACH, A. O.; PACHECO, R. S. American tegumentary Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasites & Vectors*, 2013.

OLIVEIRA, K.T. et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química*, v.7, n.1, p.310-335, 2015.

ORTEGA, Vanessa; GIORGIO, Selma; PAULA, Eneida de. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of Leishmaniasis: a review. *Journal of Liposome Research*. v.27, n.3, 2017.

OTA, H. et al., Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to Leishmania major at the early phase of infection. *J Vet Med Sci*. n.70, v.6, 2008, p.589-593.

PACHECO, S.J. B.; MARTINS, A C. da C.; PIMENTEL, M. I. F.; SOUZA, C. T. V. de. Social stigmatization of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Eletron Comun Inf Inov Saúde*. v.11, n.3, 2017.

PARIS, C. et al. Miltefosina induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. n.48, 2004, p.852-859.

PELLOSI, Diogo Silva; JESUS, Priscila da Coseta Carvalho de; TEDESCO, Antonio Claudio. Spotlight on the delivery of photosensitizers: different approaches for photodynamic-based therapies. *Expert Opinion on Drug Delivery*. v.14, n.12, 2017.

PEÑARANDA, I. P. H.. *Actividad fototóxica in vitro e in vivo de ftalocianina de aluminio clorada contra Leishmania amazonensis*. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Básicas Biomédicas, Departamento de Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2010.

PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to Miltefosina: Implication for clinical use. *Drug Resist Updat.* n.9, 2006, p.26-39.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos, *Química Nova*, v.30, n.4, p.1-7, 2007.

PONTES, A.C.O.; CAETANO, M.N.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes. *S.T.P. Pharma Sci.*, Paris, v.9, p.419-427, 1999.

PRIMO, F. L. *et al.* Laser simulation on fibroblastos WI-26 based on photodynamic processes. *Wound Repair and Regeneration.* v.16, 2008.

PY-DANIEL, Karen Rapp. Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina. Tese (doutorado). Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. 166fl. Brasília, 2017.

RAMOS, C. S. *et al.* Leishmania amazonensis META2 protein confers protection against heat shock and oxidative stress. *Exp Parasitol.* n.127, v.1, 2011, p.228-237.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova*, v.26, n.4, 2003, p.550-555.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous *Leishmaniasis*. *Lancet Infectious Diseases.* v.7, n.9, 2007, p.581-596.

RESENDE, F. C. B. *et al.* Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.* v.27, n.3, 2004, p.116-124.

RIBEIRO, J. B. P. Avaliação *in vivo* da eficácia do tratamento com miltefosine sistêmico associado à terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal (AICIFt) contra o parasita *Leishmania (L.) Amazonensis*. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Brasília, 79 fl.

RIBEIRO, J. B. P.; MIRANDA-VILELA, A. L.; GRAZIANI, D.; GOMES, M. R. de A.; SANTAREM, A. A. A.; GARCIA, R. D.; FILHO, J. de S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; MOREIRA, J. R.; LIMA, A. V.; SAMPAIO, R. N. R. Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* caused

by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015, p.1-9.

ROCHA, J. G. da. Efeitos do laser de baixa potência na leishmaniose experimental: avaliação sobre a lesão cutânea (in vivo) e efeitos sobre leishmânia (in vitro). Dissertação (mestrado). 100f. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2014.

ROCHA, José Matos; BARBOSA, Ana Clara André; SANTANA, Elisabeth Priscila Costa; CALHEIROS, Cláudia Maria Lins. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. v.6, n.4, 2015, p.49-54.

ROSAS L. *et al.* Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol*. 17 :p.1347-1357, 2005.

RUSSEL, Elizabeth S. *Origins and History of Mouse Inbred Strains: Contributions of Clarence Cook Little*.
<<http://www.informatics.jax.org/morsebook/chapters/russell.shtml>>. Acesso em:29 de jul 2017.

SARAVIA, N.G. *et al.* Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection-reactivation or reinfection? *The Lancet*, v.336, p.398-402, 1990.

SAMPAIO, R. N. *et al.* The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/Kg/day, 12/12hr, for 30 days in the mucocutaneous form of *Leishmaniasis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. n.30, 1997, p.457-463.

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, Í. C.; COSTA FILHO, A. V. The use of azythromycin and N-methyl glucamine for the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in C57BL6 mice. *An Bras Dermatol*. v.84, 2009, p.125-8.

SANTAREM, A. A. A.; GREGGIANIN, G. F.; DEBASTIANI, R. G; RIBEIRO, J. B. P.; POLLI, D. A.; SAMPAIO, R. N. R. Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* in C57Bl/6 mice. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. v.47, n.1, 2014.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. R.; NASCIMENTO, S. B.; BERNADINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Leishmaniasis* treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*. v.103, n.1, 2008, p.1-10.

SARAVIA, N.G.L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A.F.; HOLGUÍN, C., NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World *Leishmaniasis*. *Journal of Infectious Diseases*. v.159, 1989, p.725-735.

SBEGHEN, M. R.; VOLTARELLI, E. M.; CAMPOIS, T. G. *et al.* Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *J Lasers Med Sci*. v.6, 2015, p.106-11.

SEIFERT, K. *et al.* Effects of Miltefosina and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother*. n.45, 2001, p.1505-1510.

SERENO, D. P. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. N.45, 2001, p.2064-2069.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. v.4, n.11, 1999, p.507-517.

SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; RICCI-JÚNIOR, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *Rev. Bras. Farm.* v.90, n.3, 2009, p.211-217.

SILVA, V. C. *Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica*. Dissertação de mestrado. 52p. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2013.

SILVA, L. C. *et al.* Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.41, 2004, p.201-206.

SILVA, E. P. de O. Estudos da interação de derivados de ftalocianinas de zinco com albumina bovina e a sua potencialidade na terapia fotodinâmica em macrófagos infectado com *Leishmania* spp. Dissertação (mestrado). 74p. Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, São José dos Campos, 2013.

SILVA-LOPES, R. E. Proteases de leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quim.Nova*, v.33, n.7, p.1541-1548, 2010.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*. v.25, n.5, 2002, p.801-807.

SNELL, George D.; LITTLE, Clarence Cook. *1888 a 1971. National Academy Sciences. Washington (1888 – 1971)*. 1975. Disponível em: <<http://www.nasonline.org/publications/biographical-memoirs/memoir-pdfs/little-clarence-c.pdf>>. Acesso em: 29 jul 2017.

SUNDAR, D. *et al.* Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, n. 3, p. 193-196, 2001.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral *Leishmaniasis*. *Trop Med Int Health*. n.6, 2001. P.849-854.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. n.14, v.1, 2012, p.53-63.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S.K. Injectable paromomycin for visceral *Leishmaniasis* in India. *N Engl J Med*, v.356, 2007, p.2571-2581.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. *Current Organic Chemistry*. v.7, p.187-196, 2003.

THAKUR, C. P.; NARAYAN, S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 98, n. 2, p. 129-138, 2004.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in *Leishmaniasis* treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. v.15, 2011, p.e525-e532.

TOREZAN, L.; FESTA NETO, C.; NIWA, A. B. M. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Bras Dermatol*. v.84, n.5, 2009, p.445-459.

TUON, F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous *Leishmaniasis*-a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*, n.47, 2008, p.109-124.

URDAPILLETA, A. A. A. *Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis e Leishmania (V.) braziliensis*. [Dissertação Mestrado]. Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2006, p.87.

VAN DER SNOEK, E.; ROBINSON, D.; VAN HELLEMOND, J. *et al.* A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. JEADV, v.22, 2008, p.918-22.

VASCONCELLOS, C.; KAUFFMAN, M. R.; SOTTO, M. N. Persistence of *Leishmania* antigen in C57Bl/6j inbred mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Ass. Med. Brasil*. v.45, n.3, 1999, p.225-228.

VÉLEZ, I. *et al.* Efficacy of Miltefosina for the treatment of American cutaneous *Leishmaniasis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.83, v.2, 2010.

WATERSTON, R. H. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 2002, p.520–562.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral *Leishmaniasis* in Brazil. Introduction. *Cadernos de Saúde Pública* v.24, n.12, Rio de Janeiro, 2008, p.2937-2940.

WHO. *Leishmaniasis Fact sheet* N°375. World Health Organization. 2014

WHO. *Weekly epidemiological record*. n.22 v.91, 2016, p.285-296.

APÊNDICES

Apêndice I - Comissão de ética no uso de animais – Declaração



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 01 de agosto de 2012

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Avaliação in vivo da efetividade quanto à resposta ao tratamento contra o parasita *Leishmania (L.) amazonenses*, por meio da utilização das drogas sistêmicas miltefosine e antimoniate de n-metilglucamina associadas à terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio”, UnBDoc 83795/2012, sob responsabilidade da Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte Prédio FM/FS CEP: 70.910-900

Apêndice II: Teste de normalidade dos dados das medidas das patas

Tests of Normality^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t,u,v}

		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Sig.
Antes de infectar	Controle Negativo	,260	2	.
	Controle Positivo	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Laser	,260	2	.
02 dias após a infecção	Controle Positivo	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Laser	,260	2	.
	Ftalocianina	,260	2	.
	TFD	,260	2	.
	N-Metil. 10 mg + TFD	,260	2	.
30 dias após a infecção	Controle Negativo	,260	2	.
	N-Metil. 10 mg	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Laser	,260	2	.
	Ftalocianina	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg + TFD	,260	2	.
Após 10 dias de tratamento	Controle Positivo	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Ftalocianina	,260	2	.
	TFD	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg + TFD	,260	2	.
Após 20 dias de tratamento	Controle Negativo	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Laser	,260	2	.
	Ftalocianina	,260	2	.
60 dias após o termino do tratamento	Controle Positivo	,260	2	.
	N-Metil. 10 mg	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg	,260	2	.
	Laser	,260	2	.
	Ftalocianina	,260	2	.
	TFD	,260	2	.
	N-Metil. 10 mg + TFD	,260	2	.
	N-Metil. 20 mg + TFD	,260	2	.

Fonte: Dados da pesquisa.

Apêndice III: Estatística descritiva dos dados das medidas do paquímetro

Descriptive Statistics

Grupo		N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
		Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Controle Negativo	Antes de infectar	6	1,9	2,1	2,000	,0258	,0632
	02 dias após a infecção	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	30 dias após a infecção	6	2,0	2,2	2,083	,0401	,0983
	Após 10 dias de tratamento	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	Após 20 dias de tratamento	4	2,0	2,2	2,075	,0479	,0957
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,0	2,0	2,000	,0000	,0000
	Valid N (listwise)	2					
Controle Positivo	Antes de infectar	6	1,9	2,1	2,017	,0307	,0753
	02 dias após a infecção	6	2,3	2,7	2,433	,0615	,1506
	30 dias após a infecção	6	2,2	2,7	2,400	,0730	,1789
	Após 10 dias de tratamento	6	2,3	2,6	2,433	,0494	,1211
	Após 20 dias de tratamento	4	2,3	2,6	2,425	,0750	,1500
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,5	2,6	2,550	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
N-Metil. 10 mg	Antes de infectar	6	1,8	2,2	2,000	,0516	,1265
	02 dias após a infecção	6	2,1	2,6	2,350	,0719	,1761
	30 dias após a infecção	6	2,3	2,6	2,433	,0422	,1033
	Após 10 dias de tratamento	6	2,3	2,4	2,333	,0211	,0516
	Após 20 dias de tratamento	4	2,2	2,4	2,300	,0408	,0816
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,4	2,5	2,450	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
N-Metil. 20 mg	Antes de infectar	6	1,9	2,1	2,000	,0258	,0632
	02 dias após a infecção	6	2,2	2,6	2,373	,0636	,1558
	30 dias após a infecção	6	2,2	2,6	2,417	,0703	,1722
	Após 10 dias de tratamento	6	2,2	2,3	2,283	,0167	,0408
	Após 20 dias de tratamento	4	2,1	2,3	2,200	,0408	,0816
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,2	2,3	2,250	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
Laser	Antes de infectar	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	02 dias após a infecção	6	2,3	2,4	2,350	,0224	,0548
	30 dias após a infecção	6	2,3	2,5	2,400	,0365	,0894
	Após 10 dias de tratamento	6	2,3	2,6	2,433	,0422	,1033
	Após 20 dias de tratamento	4	2,3	2,5	2,425	,0479	,0957
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,5	2,6	2,550	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
Ftalocianina	Antes de infectar	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	02 dias após a infecção	6	2,1	2,6	2,350	,0764	,1871
	30 dias após a infecção	6	2,2	2,6	2,417	,0543	,1329

	Após 10 dias de tratamento	6	2,4	2,6	2,483	,0307	,0753
	Após 20 dias de tratamento	4	2,4	2,6	2,500	,0408	,0816
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,5	2,6	2,550	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
TFD	Antes de infectar	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	02 dias após a infecção	6	2,1	2,6	2,367	,0667	,1633
	30 dias após a infecção	6	2,2	2,6	2,417	,0543	,1329
	Após 10 dias de tratamento	6	2,3	2,4	2,333	,0211	,0516
	Após 20 dias de tratamento	4	2,3	2,3	2,300	,0000	,0000
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,3	2,4	2,350	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
N-Metil. 10 mg + TFD	Antes de infectar	6	2,0	2,1	2,033	,0211	,0516
	02 dias após a infecção	6	2,2	2,6	2,350	,0619	,1517
	30 dias após a infecção	6	2,3	2,6	2,400	,0516	,1265
	Após 10 dias de tratamento	6	2,1	2,3	2,233	,0333	,0816
	Após 20 dias de tratamento	4	2,1	2,3	2,175	,0479	,0957
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,2	2,3	2,250	,0500	,0707
	Valid N (listwise)	2					
N-Metil. 20 mg + TFD	Antes de infectar	6	2,0	2,1	2,017	,0167	,0408
	02 dias após a infecção	6	2,2	2,5	2,333	,0422	,1033
	30 dias após a infecção	6	2,3	2,5	2,383	,0307	,0753
	Após 10 dias de tratamento	6	2,0	2,3	2,117	,0477	,1169
	Após 20 dias de tratamento	4	2,1	2,2	2,125	,0250	,0500
	60 dias após o termino do tratamento	2	2,0	2,2	2,100	,1000	,1414
	Valid N (listwise)	2					

Apêndice IV: Análise do teste de normalidade viabilidade celular

Teste de Normalidade				
	Grupo	Shapiro-Wilk		
		Estatística	Graus de Liberdade	p-valor
Diluição Farmol	N-Metil. 20 mg	,947	30	,140
	N-Metil. 10 mg	,912	30	,016
	N-Metil. 20 mg + TFD	,897	30	,007
	N-Metil. 10 mg + TFD	,934	30	,063
	TFD	,898	30	,008
	Ftalocianina	,860	30	,001
	Laser	,878	30	,002
	Controle Negativo	,751	30	,000
	Controle Positivo	,947	30	,141

Apêndice V: Análise descritiva da viabilidade celular

Comparação aos Pares						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferença Média	Erro Padrão	p-valor	Intervalo de 95% de Confiança para a Diferença	
					Limite Inferior	Limite Superior
N-Metil. 20 mg	N-Metil. 10 mg	-,047	,034	1,000	-,202	,108
	N-Metil. 20 mg + TFD	,087	,034	1,000	-,068	,242
	N-Metil. 10 mg + TFD	,062	,034	1,000	-,093	,217
	TFD	-,022	,034	1,000	-,177	,133
	Ftalocianina	-,113	,034	,320	-,268	,042
	Laser	-,122	,034	,218	-,277	,033
	Controle Negativo	,212	,034	,006	,057	,367
	Controle Positivo	-,063	,034	1,000	-,218	,092
N-Metil. 10 mg	N-Metil. 20 mg	,047	,034	1,000	-,108	,202
	N-Metil. 20 mg + TFD	,133	,034	,128	-,022	,288
	N-Metil. 10 mg + TFD	,108	,034	,405	-,047	,263
	TFD	,025	,034	1,000	-,130	,180
	Ftalocianina	-,067	,034	1,000	-,222	,088
	Laser	-,075	,034	1,000	-,230	,080
	Controle Negativo	,258	,034	,001	,103	,413
	Controle Positivo	-,017	,034	1,000	-,172	,138
N-Metil. 20 mg + TFD	N-Metil. 20 mg	-,087	,034	1,000	-,242	,068
	N-Metil. 10 mg	-,133	,034	,128	-,288	,022
	N-Metil. 10 mg + TFD	-,025	,034	1,000	-,180	,130
	TFD	-,108	,034	,405	-,263	,047
	Ftalocianina	-,200	,034	,009	-,355	-,045
	Laser	-,208	,034	,006	-,363	-,053
	Controle Negativo	,125	,034	,187	-,030	,280
	Controle Positivo	-,150	,034	,062	-,305	,005
N-Metil. 10 mg + TFD	N-Metil. 20 mg	-,062	,034	1,000	-,217	,093
	N-Metil. 10 mg	-,108	,034	,405	-,263	,047
	N-Metil. 20 mg + TFD	,025	,034	1,000	-,130	,180
	TFD	-,083	,034	1,000	-,238	,072
	Ftalocianina	-,175	,034	,022	-,330	-,020
	Laser	-,183	,034	,016	-,338	-,028
	Controle Negativo	,150	,034	,062	-,005	,305
	Controle Positivo	-,125	,034	,187	-,280	,030
TFD	N-Metil. 20 mg	,022	,034	1,000	-,133	,177
	N-Metil. 10 mg	-,025	,034	1,000	-,180	,130
	N-Metil. 20 mg + TFD	,108	,034	,405	-,047	,263
	N-Metil. 10 mg + TFD	,083	,034	1,000	-,072	,238
	Ftalocianina	-,092	,034	,896	-,247	,063
	Laser	-,100	,034	,601	-,255	,055
	Controle Negativo	,233	,034	,003	,078	,388
	Controle Positivo	-,042	,034	1,000	-,197	,113
Ftalocianina	N-Metil. 20 mg	-,113	,034	,320	-,042	,268
	N-Metil. 10 mg	,067	,034	1,000	-,088	,222
	N-Metil. 20 mg + TFD	,200	,034	,009	,045	,355
	N-Metil. 10 mg + TFD	,175	,034	,022	,020	,330
	TFD	,092	,034	,896	-,063	,247
	Laser	-,008	,034	1,000	-,163	,147
	Controle Negativo	,325	,034	,000	,170	,480
	Controle Positivo	,050	,034	1,000	-,105	,205
Laser	N-Metil. 20 mg	,122	,034	,218	-,033	,277
	N-Metil. 10 mg	,075	,034	1,000	-,080	,230
	N-Metil. 20 mg + TFD	,208	,034	,006	,053	,363
	N-Metil. 10 mg + TFD	,183	,034	,016	,028	,338
	TFD	,100	,034	,601	-,055	,255
	Ftalocianina	,008	,034	1,000	-,147	,163
	Controle Negativo	,333	,034	,000	,178	,488
	Controle Positivo	,058	,034	1,000	-,097	,213
Controle Negativo	N-Metil. 20 mg	-,212	,034	,006	-,367	-,057
	N-Metil. 10 mg	-,258	,034	,001	-,413	-,103
	N-Metil. 20 mg + TFD	-,125	,034	,187	-,280	,030
	N-Metil. 10 mg + TFD	-,150	,034	,062	-,305	,005
	TFD	-,233	,034	,003	-,388	-,078
	Ftalocianina	-,325	,034	,000	-,480	-,170
	Laser	-,333	,034	,000	-,488	-,178
	Controle Positivo	-,275	,034	,001	-,430	-,120
Controle Positivo	N-Metil. 20 mg	,063	,034	1,000	-,092	,218
	N-Metil. 10 mg	,017	,034	1,000	-,138	,172
	N-Metil. 20 mg + TFD	,150	,034	,062	-,005	,305
	N-Metil. 10 mg + TFD	,125	,034	,187	-,030	,280
	TFD	,042	,034	1,000	-,113	,197
	Ftalocianina	-,050	,034	1,000	-,205	,105
	Laser	-,058	,034	1,000	-,213	,097
	Controle Negativo	,275	,034	,001	,120	,430

Apêndice VI: Análise do teste de normalidade viabilidade celular

	Testes de Normalidade					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estatística	Graus de Liberdade	p-valor	Estatística	Graus de Liberdade	p-valor
Antes de infectar	,142	18	,200*	,934	18	,232
02 dias após a infecção	,145	18	,200*	,942	18	,310
30 dias após a infecção	,142	18	,200*	,951	18	,444
Após 10 dias de tratamento	,200	18	,056	,927	18	,172
Após 20 dias de tratamento	,128	18	,200*	,904	18	,067
60 dias após o término do tratamento	,157	18	,200*	,894	18	,045

Apêndice VII: Relatório estatístico

Descriptive Statistics^a

Grupo	Statistic	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	
		Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Controle positivo	Apos 10 dias de tratamento	8	2109,26702986114000	3164,84725351247240	2889,0000000000000000	122,010562545211460	345,097984608417700
	Após 20 dias de tratamento	8	2601,21427109625500	4134,63401323418900	3600,0000000000000000	178,738070806892840	505,547607695020900
	60 dias após o término do tratamento	8	2650,8204516474030000	3933,6636090658544000	3544,0000000000000000	146,074289123700450	413,160481585491770
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 10 mg	Apos 10 dias de tratamento	8	1018,78281704603830	2802,04278623994470	2279,0000000000000000	211,506939930725300	598,231965972126500
	Após 20 dias de tratamento	8	1213,30661896243300	2576,12021466905200	2009,0000000000000000	192,669235554759130	544,950891947193800
	60 dias após o término do tratamento	8	2316,2097863542380000	3591,7403170227440000	3167,0000000000000000	148,086760899082070	418,852611342767260
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 20 mg	Apos 10 dias de tratamento	8	623,31177958954160	2615,19032892887340	1767,0000000000000000	261,618892802779560	739,969972749447500
	Após 20 dias de tratamento	8	543,45266882925400	1905,14892362135170	1299,000000000000200	180,125275023775830	509,471213729615000
	60 dias após o término do tratamento	8	564,3984810050583000	2104,9654323581950000	1433,000000000000500	195,644923936322020	553,367409680398400
	Valid N (listwise)	8					
Laser	Apos 10 dias de tratamento	8	1649,77624413651800	3602,69585377689100	2800,0000000000000000	237,624013554620660	672,102205428945500
	Após 20 dias de tratamento	8	1887,87763538652350	3336,09094667217870	2858,999999999999500	160,203735827931580	453,124591901394750
	60 dias após o término do tratamento	8	2166,2335176520630000	4426,0603998298600000	3549,0000000000000000	283,260594629463870	801,181949221710600
	Valid N (listwise)	8					

Ftalocianina	Apos 10 dias de tratamento	8	1857,67768766895440	3803,58910376377660	2867,000000000000500	230,058555770113140	650,703859420122200
	Após 20 dias de tratamento	8	2081,76260028800700	3345,63176301172600	2967,000000000000000	141,035655846293050	398,909074552023900
	60 dias após o término do tratamento	8	2140,7626817278530000	4037,4153331241500000	3278,000000000000000	232,289445538233140	657,013768552591500
	Valid N (listwise)	8					
TFD	Apos 10 dias de tratamento	8	1083,18086404686350	3005,66853795460070	2432,999999999999500	219,345222278291800	620,401976375402900
	Após 20 dias de tratamento	8	1174,87709375679800	2498,32281922993200	2095,000000000000000	152,198405640848400	430,482098857699160
	60 dias após o término do tratamento	8	1319,2029739776950000	3144,8703841387855000	2589,000000000000000	213,229449130105200	603,103957714277500
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 10 mg + TFD	Apos 10 dias de tratamento	8	284,07001693958200	3386,67871259175700	1784,000000000000500	331,363839590052240	937,238472056549200
	Após 20 dias de tratamento	8	247,53230769230790	2123,36307692307670	1257,000000000000000	235,924701812051900	667,295826002864300
	60 dias após o término do tratamento	8	193,2864201227726500	1958,6357239107651000	978,000000000000000	190,927696494620500	540,025075630692800
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 20 mg + TFD	Apos 10 dias de tratamento	8	71,24032825322391	2916,89566236811200	843,999999999999800	398,305765722822600	1126,578831713232800
	Após 20 dias de tratamento	8	60,81123792800724	687,63476733977150	332,999999999999940	82,396448836356500	233,052350871512400
	60 dias após o término do tratamento	8	,0000000000000000	152,4390243902438700	44,999999999999986	22,303074377993077	63,082620535947385
	Valid N (listwise)	8					

a. No statistics are computed for one or more split files because there are no valid cases.

Tests of Normality

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	,308	8	,024	,767	8	,013
	N-metil glucamina 10 mg	,260	8	,120	,824	8	,051
	N-metil glucamina 20 mg	,210	8	,200*	,909	8	,349
	Laser	,154	8	,200*	,946	8	,671
	Ftalocianina	,116	8	,200*	,982	8	,974
	TFD	,211	8	,200*	,829	8	,058
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,178	8	,200*	,978	8	,952
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,325	8	,013	,718	8	,004
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	,178	8	,200*	,909	8	,346
	N-metil glucamina 10 mg	,259	8	,122	,864	8	,131
	N-metil glucamina 20 mg	,209	8	,200*	,907	8	,333
	Laser	,194	8	,200*	,866	8	,136
	Ftalocianina	,240	8	,197	,817	8	,044
	TFD	,336	8	,008	,806	8	,033
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,240	8	,195	,923	8	,453
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,213	8	,200*	,902	8	,300
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	,207	8	,200*	,843	8	,081
	N-metil glucamina 10 mg	,174	8	,200*	,892	8	,244
	N-metil glucamina 20 mg	,140	8	,200*	,946	8	,675
	Laser	,174	8	,200*	,932	8	,537
	Ftalocianina	,166	8	,200*	,939	8	,606
	TFD	,213	8	,200*	,862	8	,125
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,196	8	,200*	,960	8	,809
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,330	8	,010	,705	8	,003

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Nonparametric Tests

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of Apos 10 dias de tratamento are the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Median Test	,008	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of Apos 10 dias de tratamento is the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.
3	The medians of Após 20 dias de tratamento are the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Median Test	,000	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of Após 20 dias de tratamento is the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.
5	The medians of 60 dias após o término do tratamento are the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Median Test	,000	Reject the null hypothesis.
6	The distribution of 60 dias após o término do tratamento is the same across categories of Grupo .	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Chi-Square	26,760	52,768	50,735
Df	7	7	7
Asymp. Sig.	,000	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	11,63	93,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	5,38	43,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	10,88	87,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	6,13	49,00
	Total	16		

Test Statistics ^a			
	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	7,000	,000	13,000
Wilcoxon W	43,000	36,000	49,000
Z	-2,626	-3,361	-1,995
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	,001	,046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007 ^b	,000 ^b	,050 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,00	96,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	5,00	40,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		

60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	4,000	,000	,000
Wilcoxon W	40,000	36,000	36,000
Z	-2,941	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	8,50	68,00
	Laser	8	8,50	68,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	11,63	93,00
	Laser	8	5,38	43,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	8,13	65,00
	Laser	8	8,88	71,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	32,000	7,000	29,000
Wilcoxon W	68,000	43,000	65,000
Z	,000	-2,626	-,315
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,009	,753
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b	,007 ^b	,798 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	8,63	69,00
	Ftalocianina	8	8,38	67,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	11,50	92,00
	Ftalocianina	8	5,50	44,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	9,50	76,00
	Ftalocianina	8	7,50	60,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	31,000	8,000	24,000
Wilcoxon W	67,000	44,000	60,000
Z	-,105	-2,521	-,840
Asymp. Sig. (2-tailed)	,916	,012	,401
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,959 ^b	,010 ^b	,442 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	10,75	86,00
	TFD	8	6,25	50,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,00	96,00
	TFD	8	5,00	40,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	14,000	,000	4,000
Wilcoxon W	50,000	36,000	40,000
Z	-1,890	-3,361	-2,943
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059	,001	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 ^b	,000 ^b	,002 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	11,38	91,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,63	45,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	9,000	,000	,000
Wilcoxon W	45,000	36,000	36,000
Z	-2,415	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,13	97,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,88	39,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	3,000	,000	,000
Wilcoxon W	39,000	36,000	36,000
Z	-3,048	-3,361	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,63	85,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	6,38	51,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	11,13	89,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	5,88	47,00
	Total	16		
	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	15,000	11,000	,000
Wilcoxon W	51,000	47,000	36,000
Z	-1,785	-2,205	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,074	,027	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,083 ^b	,028 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	6,88	55,00
	Laser	8	10,13	81,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	5,13	41,00
	Laser	8	11,88	95,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	7,25	58,00
	Laser	8	9,75	78,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	19,000	5,000	22,000
Wilcoxon W	55,000	41,000	58,000
Z	-1,365	-2,836	-1,050
Asymp. Sig. (2-tailed)	,172	,005	,294
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,195 ^b	,003 ^b	,328 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	6,50	52,00
	Ftalocianina	8	10,50	84,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	5,00	40,00
	Ftalocianina	8	12,00	96,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	8,00	64,00
	Ftalocianina	8	9,00	72,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	16,000	4,000	28,000
Wilcoxon W	52,000	40,000	64,000
Z	-1,680	-2,941	-,420
Asymp. Sig. (2-tailed)	,093	,003	,674
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,105 ^b	,002 ^b	,721 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	7,50	60,00
	TFD	8	9,50	76,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	8,88	71,00
	TFD	8	8,13	65,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	11,13	89,00
	TFD	8	5,88	47,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	24,000	29,000	11,000
Wilcoxon W	60,000	65,000	47,000
Z	-,840	-,315	-2,207
Asymp. Sig. (2-tailed)	,401	,753	,027
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,442 ^b	,798 ^b	,028 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,25	82,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	6,75	54,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,88	87,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	6,13	49,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	18,000	13,000	,000
Wilcoxon W	54,000	49,000	36,000
Z	-1,470	-1,995	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,141	,046	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,161 ^b	,050 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	11,13	89,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	5,88	47,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	11,000	,000	,000
Wilcoxon W	47,000	36,000	36,000
Z	-2,207	-3,361	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,028 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,75	46,00
	Laser	8	11,25	90,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,63	37,00
	Laser	8	12,38	99,00
	Total	16		
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00

60 dias após o término do tratamento	Laser	8	12,50	100,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	10,000	1,000	,000
Wilcoxon W	46,000	37,000	36,000
Z	-2,310	-3,256	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,021 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,50	44,00
	Ftalocianina	8	11,50	92,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	8,000	,000	,000
Wilcoxon W	44,000	36,000	36,000
Z	-2,521	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,010 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	6,25	50,00
	TFD	8	10,75	86,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,50	44,00
	TFD	8	11,50	92,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,13	41,00
	TFD	8	11,88	95,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	14,000	8,000	5,000
Wilcoxon W	50,000	44,000	41,000
Z	-1,890	-2,521	-2,838
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059	,012	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 ^b	,010 ^b	,003 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	8,38	67,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	8,63	69,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	8,88	71,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	8,13	65,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	10,25	82,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	6,75	54,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	31,000	29,000	18,000
Wilcoxon W	67,000	65,000	54,000
Z	-,105	-,315	-1,470
Asymp. Sig. (2-tailed)	,916	,753	,141
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,959 ^b	,798 ^b	,161 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	10,75	86,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	6,25	50,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	14,000	1,000	,000
Wilcoxon W	50,000	37,000	36,000
Z	-1,892	-3,256	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	8,38	67,00
	Ftalocianina	8	8,63	69,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	7,50	60,00
	Ftalocianina	8	9,50	76,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	9,75	78,00
	Ftalocianina	8	7,25	58,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	31,000	24,000	22,000
Wilcoxon W	67,000	60,000	58,000
Z	-,105	-,840	-1,050
Asymp. Sig. (2-tailed)	,916	,401	,294
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,959 ^b	,442 ^b	,328 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	9,75	78,00
	TFD	8	7,25	58,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	11,75	94,00
	TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	11,25	90,00
	TFD	8	5,75	46,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	22,000	6,000	10,000
Wilcoxon W	58,000	42,000	46,000
Z	-1,050	-2,731	-2,312
Asymp. Sig. (2-tailed)	,294	,006	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,328 ^b	,005 ^b	,021 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	11,00	88,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	6,00	48,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	12,000	1,000	,000
Wilcoxon W	48,000	37,000	36,000
Z	-2,100	-3,256	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,036	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,038 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	11,75	94,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	6,000	,000	,000
Wilcoxon W	42,000	36,000	36,000
Z	-2,733	-3,361	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,005 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	9,88	79,00
	TFD	8	7,13	57,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	11,75	94,00
	TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		
	Ftalocianina	8	10,88	87,00

60 dias após o término do tratamento	TFD	8	6,13	49,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	21,000	6,000	13,000
Wilcoxon W	57,000	42,000	49,000
Z	-1,155	-2,731	-1,997
Asymp. Sig. (2-tailed)	,248	,006	,046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,279 ^b	,005 ^b	,050 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	11,25	90,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,75	46,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	10,000	1,000	,000
Wilcoxon W	46,000	37,000	36,000
Z	-2,310	-3,256	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021	,001	,001

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,021 ^b	,000 ^b	,000 ^b
--------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	11,75	94,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	6,000	,000	,000
Wilcoxon W	42,000	36,000	36,000
Z	-2,733	-3,361	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,005 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	TFD	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	6,50	52,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	TFD	8	11,88	95,00

	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,13	41,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	TFD	8	12,25	98,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,75	38,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	16,000	5,000	2,000
Wilcoxon W	52,000	41,000	38,000
Z	-1,680	-2,836	-3,153
Asymp. Sig. (2-tailed)	,093	,005	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,105 ^b	,003 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	TFD	8	11,38	91,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	5,63	45,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	TFD	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	TFD	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	9,000	,000	,000
Wilcoxon W	45,000	36,000	36,000
Z	-2,417	-3,361	-3,366
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	10,75	86,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	6,25	50,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	11,63	93,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	5,38	43,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	14,000	7,000	,000
Wilcoxon W	50,000	43,000	36,000
Z	-1,892	-2,626	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059	,009	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 ^b	,007 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Friedman Test

Test Statistics ^a		
Controle positivo	N	8
	Chi-Square	12,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,002
N-metil glucamina 10 mg	N	8
	Chi-Square	14,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,001
N-metil glucamina 20 mg	N	8
	Chi-Square	7,750
	df	2
	Asymp. Sig.	,021
Laser	N	8
	Chi-Square	13,000
	df	2
	Asymp. Sig.	,002
Ftalocianina	N	8
	Chi-Square	7,750
	df	2
	Asymp. Sig.	,021
TFD	N	8
	Chi-Square	12,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,002
N-metil glucamina 10 mg + TFD	N	8
	Chi-Square	9,000
	df	2
	Asymp. Sig.	,011
N-metil glucamina 20 mg + TFD	N	8
	Chi-Square	12,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,002

a. Friedman Test

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Test Statistics ^a		
Grupo		Após 20 dias de tratamento - Apos 10 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento - Apos 10 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento - Após 20 dias de tratamento
Controle positivo	Z	-2,521 ^b	-2,521 ^b	-,420 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,012	,674
N-metil glucamina 10 mg	Z	-2,100 ^c	-2,521 ^b	-2,521 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,036	,012	,012
N-metil glucamina 20 mg	Z	-2,380 ^c	-2,380 ^c	-1,400 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,017	,017	,161
Laser	Z	-,700 ^b	-2,521 ^b	-2,521 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,484	,012	,012
Ftalocianina	Z	-,560 ^b	-2,521 ^b	-1,960 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,575	,012	,050
TFD	Z	-2,380 ^c	-2,380 ^b	-2,521 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,017	,017	,012
N-metil glucamina 10 mg + TFD	Z	-2,100 ^c	-2,521 ^c	-1,820 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,036	,012	,069
N-metil glucamina 20 mg + TFD	Z	-,980 ^c	-2,521 ^c	-2,521 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,327	,012	,012

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

Descriptive Statistics

Grupo	Statistic	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
		Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Controle positivo	Apos 10 dias de tratamento	8	60,795415785524 2560	91,220410669213 4400	83,269663687836 810	3,5167111490147 25	9,9467612037705 90
	Após 20 dias de tratamento	8	72,255951974895 9600	114,85094481206 08200	99,999999999999 990	4,9649464113025 77	14,042989102639 464
	60 dias após o término do tratamento	8	62,023330377242 6600	92,039020397025 7100	82,921754553516 600	3,4178149969793 77	9,6670406448207 87
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 10 mg	Apos 10 dias de tratamento	8	21,398435259902 5160	58,853889321263 2460	47,867939212714 546	4,4424753592238 83	12,565217807045 405
	Após 20 dias de tratamento	8	23,030220342451 7400	48,898287741319 3200	38,133569820588 036	3,6571258070217 65	10,343913831189 662
	60 dias após o término do tratamento	8	87,302044342067 3800	135,37904652215 05000	119,36983258607 2160	5,5816519913915 75	15,787295893345 519
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 20 mg	Apos 10 dias de tratamento	8	9,7652889853766 400	40,971613484618 8640	27,683201572932 454	4,0987258317751 86	11,592947319490 825
	Após 20 dias de tratamento	8	14,516679173204 1740	50,890238078995 8600	34,698819837642 404	4,8114968947311 65	13,608968327689 691
	60 dias após o término do tratamento	8	10,793467977458 7630	40,255028587882 0300	27,404467113652 256	3,7414828220278 67	10,582511500595 540
	Valid N (listwise)	8					

Laser	Apos 10 dias de tratamento	8	44,763036087330 5200	97,751198132142 7200	75,971818293532 140	6,4474029928398 07	18,236009509117 878
	Após 20 dias de tratamento	8	65,379630261272 9200	115,53311958523 77100	99,010846578893 490	5,5480613883962 66	15,692287320697 007
	60 dias após o término do tratamento	8	47,221422401382 0850	96,483073505820 4100	77,364156143309 610	6,1747582057369 87	17,464853597855 612
	Valid N (listwise)	8					
Ftalocianina	Apos 10 dias de tratamento	8	51,054765903412 1200	104,53446934010 56900	78,794085118584 360	6,3227252966895 28	17,883367731475 566
	Após 20 dias de tratamento	8	69,800122791459 1900	112,17681970120 74200	99,481547172385 550	4,7288322379714 63	13,375157370252 715
	60 dias após o término do tratamento	8	51,367693636625 4040	96,877956480605 4900	78,655752540002 470	5,5737953465252 12	15,765073945895 999
	Valid N (listwise)	8					
TFD	Apos 10 dias de tratamento	8	22,414287469790 6900	62,196370786056 6100	50,346127063449 806	4,5389159192698 40	12,837992903005 105
	Após 20 dias de tratamento	8	35,172931305000 3500	74,793642131113 9800	62,719148645883 070	4,5564460272337 83	12,887575535870 050
	60 dias após o término do tratamento	8	25,371231129941 1800	60,482908971247 5960	49,792275101805 770	4,1008804136317 89	11,599041397256 526
	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 10 mg + TFD	Apos 10 dias de tratamento	8	4,6204890836849 190	55,085405316839 4000	29,017326834063 823	5,3897381358603 36	15,244481538746 340
	Após 20 dias de tratamento	8	1,7463674193328 345	14,980558018964 4550	8,8682720512995 42	1,6644744942649 15	4,7078448080270 82
	60 dias após o término do tratamento	8	5,4296409032947 990	55,020361153387 3560	27,473160297807 578	5,3633816064293 09	15,169934015989 453

	Valid N (listwise)	8					
N-metil glucamina 20 mg + TFD	Apos 10 dias de tratamento	6	,58984967025764 97	5,7346495719493 715	2,0753969879435 82	,77591223008546 8	1,9005890488943 74
	Após 20 dias de tratamento	6	,70946176410396 59	6,1122859676649 140	3,1016213020442 51	1,0104705112600 33	2,4751371527163 25
	60 dias após o término do tratamento	6	,00000000000000 00	4,8702233556826 120	1,5521094703357 88	,71043463654476 3	1,7402023551342 92
	Valid N (listwise)	6					

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Grupo		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	,308	8	,024	,767	8	,013
	N-metil glucamina 10 mg	,260	8	,120	,824	8	,051
	N-metil glucamina 20 mg	,210	8	,200*	,909	8	,349
	Laser	,154	8	,200*	,946	8	,671
	Ftalocianina	,116	8	,200*	,982	8	,974
	TFD	,211	8	,200*	,829	8	,058
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,178	8	,200*	,978	8	,952
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,329	6	,042	,774	6	,034
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	,178	8	,200*	,909	8	,346
	N-metil glucamina 10 mg	,259	8	,122	,864	8	,131
	N-metil glucamina 20 mg	,209	8	,200*	,907	8	,333

	Laser	,194	8	,200*	,866	8	,136
	Ftalocianina	,240	8	,197	,817	8	,044
	TFD	,336	8	,008	,806	8	,033
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,240	8	,195	,923	8	,453
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,279	6	,159	,826	6	,098
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	,207	8	,200*	,843	8	,081
	N-metil glucamina 10 mg	,174	8	,200*	,892	8	,244
	N-metil glucamina 20 mg	,140	8	,200*	,946	8	,675
	Laser	,174	8	,200*	,932	8	,537
	Ftalocianina	,166	8	,200*	,939	8	,606
	TFD	,213	8	,200*	,862	8	,125
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	,196	8	,200*	,960	8	,809
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	,350	6	,021	,804	6	,064

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Comparações entre os grupos em cada tempo

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Chi-Square	49,222	54,264	53,036
df	7	7	7
Asymp. Sig.	,000	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Mann-Whitney Test

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	4,88	39,00
	N-metil glucamina 10 mg	8	12,13	97,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	3,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	39,000
Z	-3,361	-3,361	-3,046
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,002

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,001 ^b
--------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000
Z	-3,361	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	9,13	73,00
	Laser	8	7,88	63,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	8,38	67,00
	Laser	8	8,63	69,00
	Total	16		
	Controle positivo	8	9,00	72,00

60 dias após o término do tratamento	Laser	8	8,00	64,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	27,000	31,000	28,000
Wilcoxon W	63,000	67,000	64,000
Z	-,525	-,105	-,420
Asymp. Sig. (2-tailed)	,600	,916	,674
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,645 ^b	,959 ^b	,721 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	9,38	75,00
	Ftalocianina	8	7,63	61,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	8,50	68,00
	Ftalocianina	8	8,50	68,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	8,88	71,00
	Ftalocianina	8	8,13	65,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	25,000	32,000	29,000
Wilcoxon W	61,000	68,000	65,000
Z	-,735	,000	-,315
Asymp. Sig. (2-tailed)	,462	1,000	,753
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,505 ^b	1,000 ^b	,798 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,38	99,00
	TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,38	99,00
	TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	1,000	1,000	,000
Wilcoxon W	37,000	37,000	36,000
Z	-3,256	-3,256	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
	Controle positivo	8	12,50	100,00

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000
Z	-3,361	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Controle positivo	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	Controle positivo	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	Controle positivo	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000

Z	-3,102	-3,098	-3,102
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	11,56	92,50
	N-metil glucamina 20 mg	8	5,44	43,50
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	8,63	69,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	8,38	67,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	7,500	31,000	,000
Wilcoxon W	43,500	67,000	36,000
Z	-2,575	-,105	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,010	,916	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007 ^b	,959 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	5,25	42,00
	Laser	8	11,75	94,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	4,50	36,00
	Laser	8	12,50	100,00
	Total	16		

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,13	97,00
	Laser	8	4,88	39,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	6,000	,000	3,000
Wilcoxon W	42,000	36,000	39,000
Z	-2,731	-3,361	-3,046
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,001	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,005 ^b	,000 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	5,13	41,00
	Ftalocianina	8	11,88	95,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,13	97,00
	Ftalocianina	8	4,88	39,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	5,000	,000	3,000
Wilcoxon W	41,000	36,000	39,000
Z	-2,836	-3,361	-3,046
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005	,001	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,003 ^b	,000 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	7,63	61,00
	TFD	8	9,38	75,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	5,13	41,00
	TFD	8	11,88	95,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	25,000	5,000	,000
Wilcoxon W	61,000	41,000	36,000
Z	-,735	-2,836	-3,363
Asymp. Sig. (2-tailed)	,462	,005	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,505 ^b	,003 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	11,13	89,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,88	47,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
	N-metil glucamina 10 mg	8	12,50	100,00

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	11,000	,000	,000
Wilcoxon W	47,000	36,000	36,000
Z	-2,205	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,028 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000
Z	-3,102	-3,098	-3,102

Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Laser	8	12,50	100,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Laser	8	12,50	100,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Laser	8	12,50	100,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000
Z	-3,361	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,50	36,00
	Ftalocianina	8	12,50	100,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000
Z	-3,361	-3,361	-3,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,25	42,00
	TFD	8	11,75	94,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	4,88	39,00
	TFD	8	12,13	97,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	5,13	41,00
	TFD	8	11,88	95,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	6,000	3,000	5,000
Wilcoxon W	42,000	39,000	41,000
Z	-2,731	-3,046	-2,838
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,002	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,005 ^b	,001 ^b	,003 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	8,38	67,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	8,63	69,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	8,88	71,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	8,13	65,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	31,000	1,000	29,000
Wilcoxon W	67,000	37,000	65,000
Z	-,105	-3,256	-,315
Asymp. Sig. (2-tailed)	,916	,001	,753
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,959 ^b	,000 ^b	,798 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 20 mg	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000
Z	-3,102	-3,098	-3,102
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	8,38	67,00
	Ftalocianina	8	8,63	69,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	8,50	68,00
	Ftalocianina	8	8,50	68,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	8,25	66,00
	Ftalocianina	8	8,75	70,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	31,000	32,000	30,000
Wilcoxon W	67,000	68,000	66,000
Z	-,105	,000	-,210
Asymp. Sig. (2-tailed)	,916	1,000	,834

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,959 ^b	1,000 ^b	,878 ^b
--------------------------------	-------------------	--------------------	-------------------

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	11,63	93,00
	TFD	8	5,38	43,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	11,75	94,00
	TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	11,75	94,00
	TFD	8	5,25	42,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	7,000	6,000	6,000
Wilcoxon W	43,000	42,000	42,000
Z	-2,626	-2,731	-2,733
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	,006	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007 ^b	,005 ^b	,005 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		

60 dias após o término do tratamento	Laser	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	1,000	,000	1,000
Wilcoxon W	37,000	36,000	37,000
Z	-3,256	-3,361	-3,256
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Laser	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	Laser	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	Laser	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000

Z	-3,102	-3,098	-3,102
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	11,88	95,00
	TFD	8	5,13	41,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	12,13	97,00
	TFD	8	4,88	39,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Ftalocianina	8	12,00	96,00
	TFD	8	5,00	40,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	5,000	3,000	4,000
Wilcoxon W	41,000	39,000	40,000
Z	-2,836	-3,046	-2,943
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005	,002	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,003 ^b	,001 ^b	,002 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	12,50	100,00

	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	Ftalocianina	8	12,38	99,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,63	37,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	1,000	,000	1,000
Wilcoxon W	37,000	36,000	37,000
Z	-3,256	-3,361	-3,256
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	Ftalocianina	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	Ftalocianina	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	Ftalocianina	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000
Z	-3,102	-3,098	-3,102
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	TFD	8	11,38	91,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,63	45,00
	Total	16		
Após 20 dias de tratamento	TFD	8	12,50	100,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	4,50	36,00
	Total	16		
60 dias após o término do tratamento	TFD	8	11,38	91,00
	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	5,63	45,00
	Total	16		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	9,000	,000	9,000
Wilcoxon W	45,000	36,000	45,000
Z	-2,415	-3,361	-2,417
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016	,001	,016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015 ^b	,000 ^b	,015 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	TFD	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	TFD	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		
60 dias após o término do tratamento	TFD	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000
Z	-3,102	-3,098	-3,105
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Apos 10 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	10,38	83,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,67	22,00
	Total	14		
Após 20 dias de tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	9,75	78,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	4,50	27,00
	Total	14		

60 dias após o término do tratamento	N-metil glucamina 10 mg + TFD	8	10,50	84,00
	N-metil glucamina 20 mg + TFD	6	3,50	21,00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Apos 10 dias de tratamento	Após 20 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento
Mann-Whitney U	1,000	6,000	,000
Wilcoxon W	22,000	27,000	21,000
Z	-2,973	-2,324	-3,102
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,020	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,020 ^b	,001 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Comparações entre os tempos

Friedman Test

Test Statistics^a

Controle positivo	N	8
	Chi-Square	13,067
	df	2
	Asymp. Sig.	,001
N-metil glucamina 10 mg	N	8
	Chi-Square	14,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,001
N-metil glucamina 20 mg	N	8
	Chi-Square	6,750
	df	2
	Asymp. Sig.	,034
Laser	N	8
	Chi-Square	13,000
	df	2
	Asymp. Sig.	,002

Ftalocianina	N	8
	Chi-Square	12,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,002
TFD	N	8
	Chi-Square	12,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,002
N-metil glucamina 10 mg + TFD	N	8
	Chi-Square	14,250
	df	2
	Asymp. Sig.	,001
N-metil glucamina 20 mg + TFD	N	6
	Chi-Square	6,333
	df	2
	Asymp. Sig.	,042

a. Friedman Test

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Test Statistics ^a		
Grupo		Após 20 dias de tratamento - Apos 10 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento - Apos 10 dias de tratamento	60 dias após o término do tratamento - Após 20 dias de tratamento
Controle positivo	Z	-2,521 ^b	-,210 ^b	-2,521 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,833	,012
N-metil glucamina 10 mg	Z	-2,380 ^c	-2,521 ^b	-2,521 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,017	,012	,012
N-metil glucamina 20 mg	Z	-1,960 ^b	-,140 ^c	-2,100 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,050	,889	,036
Laser	Z	-2,521 ^b	-1,680 ^b	-2,521 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,093	,012
Ftalocianina	Z	-2,521 ^b	-,420 ^b	-2,521 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,674	,012
TFD	Z	-2,521 ^b	-,140 ^c	-2,521 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,889	,012
	Z	-2,521 ^c	-2,100 ^c	-2,521 ^b

N-metil glucamina 10 mg + TFD	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,036	,012
N-metil glucamina 20 mg + TFD	Z	-,943 ^b	-2,201 ^c	-1,572 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,345	,028	,116

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.