

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE *Leishmania braziliensis* APÓS APLICAÇÃO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO.

Nallanda Agueda Reis Francisco, Luciana Maria Cortez Marcolino, Juliana Guerra Pinto e Juliana Ferreira-Strixino.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, naagueda@outlook.com, jgbiomd@gmail.com, lumaria.cortez@hotmail.com, juferreira@univap.br.

Resumo

A Leishmaniose cutânea, é uma doença grave que causa lesões na pele e cartilagem, e a leishmaniose tegumentar americana. A doença é transmitida por insetos hematófagos e causada por várias espécies de *Leishmania*. O tratamento tradicional com estibogluconato de sódio tornou-se ineficaz e tóxico, levando à busca por alternativas. Uma abordagem alternativa é a Terapia Fotodinâmica Antiparasitária (TFD) que combina um fotossensibilizador com luz visível para criar espécies reativas de oxigênio tóxicas para os parasitas. O estudo avalia os efeitos da TFD com azul de metileno em *Leishmania braziliensis*. A morfometria dos parasitas é analisada após o tratamento, observando-se alterações significativas na largura e no comprimento do corpo e no comprimento do flagelo em grupos tratados com TFD. Comparativamente, grupos controle e irradiados não mostram alterações. Pelo presente estudo conclui-se que a TFD, nos parâmetros definidos, foi capaz de danificar a morfologia da *L. braziliensis*, alterando a morfometria do comprimento, a largura dos protozoários.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, azul de metileno, *Leishmania braziliensis*.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A Leishmaniose cutânea (LC) se caracteriza por uma doença não contagiosa, comum e causadora de lesões graves na epiderme da pessoa infectada. Essas lesões serem múltiplas ou isoladas, provocando úlceras na face, braços e pernas, tendo como consequência, lesões destrutivas de boca e nariz, outra forma de manifestação dessa enfermidade é a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que também é uma doença não contagiosa, que agride principalmente a cartilagem e a pele, sendo apenas local ou espalhada por todo o corpo. (OPAS; OMS, 2018; WHO/PAHO, 2019).

A leishmaniose é uma doença zoonótica antiga transmitida por fêmeas de insetos hematófagos e causada por 21 espécies de *Leishmania*, pertencente à família *Trypanosomatidae* (TRAHAMANE, E. J. O; 2017). Os hemoparasitas apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo biológico: promastigota, encontrada no vetor, e amastigota, encontrada no hospedeiro vertebrado. Os controles das leishmanioses são realizados por meio do combate ao inseto vetor, detecção dos reservatórios, que são animais como gambás, ratos e caninos e o tratamento dos casos em humanos. (FREITAS et al., 2010).

No início das tentativas de tratamento dos casos, foram feitos apenas o uso de recursos terapêuticos orais, tópica ou sistêmica de drogas a base de antimônio. Por algumas décadas o fármaco utilizado para a cura dos doentes era o estibogluconato de sódio, sendo considerado padrão ouro para tratamento de leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis*, o que não demorou muito para ser proibido no prognóstico das lesões e relatado como sendo bastante tóxico a seres humanos, caro e ineficiente para as variadas espécies de *Leishmania* (NAKAYAMA et al., 2007).

Devido a esses relatos e pela necessidade de melhorar cada vez mais o tratamento da doença, iniciaram os estudos alternativos, destacando a Terapia Fotodinâmica Antiparasitária, uma técnica que combina a utilização de um fotossensibilizador não tóxico a uma luz visível não ionizante, com comprimento de onda capaz de excitar o fotossensibilizador a um estado de tripleto reativo. Esta reação irá gerar oxigênio atômico e superóxido, que são espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicos para

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

os parasitas (EROs) (TRAHAMANE, E. J. O; 2017). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a morfometria dos promastigotas de *Leishmania braziliensis* após a aplicação da TFD com azul de metileno (AM).

Metodologia

A metodologia do presente estudo foi dividida e realizada em seis etapas, conforme a descrição abaixo:

Cultivo das Leishmanias

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* cepa (M2904), foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina, à 28°C.

Curva de crescimento

Para determinar o melhor dia para realização do experimento foi realizada a curva de crescimento, para tanto, diariamente foi retirada uma alíquota de 10 µL da cultura e transferida para 990 µL de paraformol a 4%. A solução era homogeneizada e um alíquota era transferida para câmara de Neubauer para contagem dos parasitos.

Teste Azul de metileno mais TFD

Foram selecionadas as concentrações de 500, e 62,5µg/mL de Azul de metileno, de acordo com resultados obtidos em um estudo anterior. (PINTO et al., 2017a). Para a realização dos testes os parasitas foram incubados por 1h na estufa à 26°C com o AM nessas concentrações. Após esse período as amostras foram centrifugadas e retirado o AM e ressuspensas em PBS. Para irradiação foi utilizado o equipamento LED Biotable 660 nm (Biopdi – Brasil), 36,8mW/cm², com doses de 10J/cm². Os grupos foram divididos em: grupo controle escuro (sem AM e não irradiado), o grupo AM escuro (com o AM e não irradiado), grupo LED (sem o AM e irradiado) e o grupo TFD (com o AM e irradiado com 10J/cm²). Após 24h de TFD as amostras foram coradas e as análise morfológicas foram realizadas em microscopia óptica.

Coloração Giemsa

Realizou-se os esfregaços de cada amostra em lâminas limpas com álcool 70%, após terem secado completamente, cobri-las totalmente com o corante May-Grunwald por um minuto, acrescentar o mesmo volume de água por cima e aguardar mais um minuto, retirar o corante em água corrente com a parte corada ao contrário da corrente de água e acrescentar o corante Giemsa, deixar sob a lâmina por 20 minutos, lavar em água corrente e aguardar secar completamente para a análise.

Análise morfológica

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (Leica DM2500) por meio de uma câmera acoplada (câmera Leica DFC425), utilizando-se o software Leica Application Suite (LAS V3.7.0), para a visualização das imagens. As medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ e considerados os seguintes parâmetros: comprimento do corpo, comprimento do flagelo e largura do corpo.

Análise estatística

As diferenças das médias entre os tratamentos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA). Valores de P<0,001- considerados indicativos de significância.

Resultados

Através da curva de crescimento foi possível observar que o melhor dia para a realização de experimentos fica entre o oitavo e nono dia de cultivo, conforme demonstrado na figura 1.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 – Resultado da curva de crescimento da *L. braziliensis* após onze dias de cultivo.



Fonte: Autor.

Para a verificação da morfometria dos parasitas tratados, foram realizadas as mensurações de 220 células de cada um dos grupos submetidos ao tratamento e dos grupos controles escuro e irradiado, sendo calculado individualmente o comprimento do corpo, largura do corpo e comprimento do flagelo. As alterações morfométricas podem ser visualizadas na tabela 1, onde verificamos que no parâmetro largura do corpo todos os grupos apresentaram diferença estatística comparados ao grupo controle, exceto o grupo tratado apenas com o FS na concentração de 500 µg/mL.

Tabela 1. Análise morfométrica de *L. braziliensis*. Os símbolos presentes na tabela indicam as diferenças estatísticas significantes para $p < 0,0001$ (Ordinary one-way ANOVA).

Grupos/Parâmetros	Largura do corpo (µm)	Comprimento do corpo (µm)	Comprimento do flagelo (µm)
Controle	8.791±1,4 β	4.697±1,9 Ω	6.567±3,0 α
FS 62,5 µg/mL	7.84±0,8 β	3.374±2,0 Ω	6.054±3,8
FS 500 µg/mL	8.079±1,0 β	3.674±1,7	6.136±4,3
Irradiado	8.091±1,5	4.082±2,3	7.096±4,7
TFD 62,5 µg/mL	7.790±1,0 β	3.310±1,8 Ω	3.458±2,6 α
TFD 500 µg/mL	8.037±1,0 β	3.622±1,8 Ω	5.268±2,1

Fonte: Autor.

No parâmetro comprimento do corpo foi possível observar diferença estatística somente nos grupos FS 62,5 µg/mL, TFD 62,5 µg/mL e TFD 500 µg/mL quando comparados ao grupo controle.

Já o comprimento flagelar verificou-se que somente o grupo TFD 62,5 µg/mL apresentou alterações significativas em relação ao grupo controle.

Discussão

Neste trabalho foi possível observar que o tratamento com a TFD integrada ao azul de metileno alterou morfometricamente os parasitas tratados, seja em sua estrutura corporal (tamanho e largura), como também no comprimento do seu flagelo, que foram mensurados, sendo os grupos que mais houveram alterações os de concentrações FS 62,5 µg/mL, TFD 62,5 µg/mL e TFD 500 µg/mL, respectivamente, Pinto e colaboradores (2017), puderam observar igualmente a ação da TDF em suas

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

análises morfológicas dos parasitas tratados, tendo sido notório o tamanho dos danos em sua morfologia ao observar os protozoários arredondados e hiperpigmentados, concentrações menores não obtiveram danos morfológicos notáveis.

Além disso no presente estudo tanto o grupo controle quanto o grupo irradiado não apresentaram alterações morfológicas, isso também foi verificado tanto no trabalho de Pinto, et al (2017), quanto no estudo de Souza (2020), no qual os grupos não tratados e os grupos que apenas foram expostos a luz, não demonstraram alterações em sua morfologia. Na análise de Souza, 2020, feita através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que a estrutura morfológica dos parasitos foi mantida, no entanto nos grupos submetidos a TFD houve diminuição no corpo dos parasitas e no seu comprimento do flagelo.

De acordo com Silva e colaboradores (2009), um dos principais benefícios da TFD é sua seletividade, permitindo a destruição de células alvos enquanto minimiza o impacto sobre tecidos saudáveis. Aureliano (2015), pode observar em seus estudos que as células submetidas a TFD apresentaram danos, enquanto as células submetidas apenas a luz e ao FS não tiveram alterações. Esses dados corroboram com o presente estudo, pois demonstrou que a TFD tem o potencial de alterações morfológicas.

Conclusão

Através desse estudo foi possível verificar, pelo método aplicado, que a terapia fotodinâmica com azul de metileno, foi capaz de causar danos morfológicos em *Leishmania braziliensis*, promovendo alterações morfométricas na largura do corpo, seguido do comprimento dos protozoários.

Referências

AURELIANO, D. P; **Efeito fotodinâmico mediado por azul de metileno na inativação de Leishmania (L.) amazonensis**: estudo in vitro. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Acesso em: 09 ago. 2023.

FREITAS, J. C.C; PINHEIRO, D. C.S.N; Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-Ceará. 2010. Acesso em 26 de jul. 2023.

SILVA, E.; SANTOS, E.; JÚNIOR, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 3, p. 211-7, 2009.

TRAHAMANE, E. J.O; EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIPARASITÁRIA EM *Leishmania braziliensis* E NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS, Universidade Federal da Bahia, 2015, Salvador – Bahia. Acesso em 26 de jul. 2023.

OPAS; OMS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, n. 5, 2017. Acesso em 26 de jul. 2023.

PINTO, J. G. et al. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, n. April, p. 325–330, 2017. Acesso em 27 de jul. 2023.

NAKAYAMA, H. et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovan*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 186-188, 2007.

SOUZA, T. H. S; Avaliação in vitro do efeito fotodinâmico associado à zincoporfirina para o tratamento da Leishmaniose cutânea. Universidade Federal de Pernambuco. 2020. Acesso em 12 de ago. 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Agradecimentos

Agradeço sinceramente a todos os indivíduos que contribuíram para a elaboração deste artigo, especialmente pós-doutoranda Dra. Luciana Maria Cortez Marcolino, Professora Dra. Juliana Ferreira Strixino e Professora Dra. Juliana Guerra Pinto, cuja orientação e conhecimento foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Reconheço as instituições que proporcionaram recursos e infraestrutura para a realização deste estudo, CNPq e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.