

ANÁLISE HEMATOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* E TRATADOS COM TERAPIA FOTODINÂMICA

Nallanda Agueda Reis Francisco, Maria Clara Barbosa Silva de Azevedo, Isabelle Ferreira, Luciana Maria Cortez Marcolino, Juliana Guerra Pinto e Juliana Ferreira-Strixino.

Laboratório de Fotobiologia Aplicada à Saúde (PhotoBioS), 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, mariaclarabsa@gmail.com, iferreira@gmail.com, jgbiomd@gmail.com, lumaria.cortez@hotmail.com, juferreira@univap.br.

Resumo

A leishmaniose tegumentar causa lesões cutâneas e os tratamentos disponíveis podem ser tóxicos para o paciente. A terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma alternativa de tratamento, utilizando a curcumina, um composto natural, que após a interação com a luz pode produzir espécies reativas de oxigênio e levar a danos celulares. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações nas células de defesa (leucócitos) em camundongos infectados com *Leishmania* submetidos à terapia fotodinâmica. Para isso, os animais foram infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com LED azul em combinação com a curcumina. Após esse processo os animais foram eutanasiados e o sangue total coletado, para realização de esfregaços. Após coloração com May-Grunwald e Giemsa os leucócitos foram contabilizados. Após a leitura e análise dos dados foi possível observar a maior presença de linfócitos na corrente sanguínea dos animais, seguido de uma segunda dominância de monócitos.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Leucocitometria, *Leishmania braziliensis*.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A Leishmaniose cutânea (LC) se caracteriza por uma doença não contagiosa, podendo causar lesões graves na epiderme do indivíduo infectado. Essas lesões podem ser 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).

A leishmaniose é uma doença zoonótica antiga, transmitida por fêmeas de insetos hematófagos causada por 21 espécies de *Leishmania*, pertencente à família *Trypanosomatidae* (Trahamane, E. J. O; 2015). Os parasitas 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, como gambás, ratos e caninos e o tratamento dos casos em humanos. (Freitas, et al., 2010).

Os tratamentos convencionais utilizam recursos terapêuticos orais, tópicos ou sistêmicos de drogas à base de antimônio. Por algumas décadas o fármaco utilizado para tratamento era o estibogluconato de sódio, considerado padrão ouro para tratamento de leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis*, no entanto foi proibido no tratamento das lesões e relatado como tóxico a seres humanos, com custo elevado e ineficiente para as variadas espécies de *Leishmania* (Wyrepkowski, 2020), outra droga utilizada para o tratamento de leishmaniose cutânea, é a miltefosina, que obtém resultado satisfatório no controle da doença, porém esse medicamento causa riscos teratogênicos, podem selecionar parasitas resistentes e ser tóxico para seres humanos (Campos, J. F. F; 2008). A necessidade de tornar o tratamento mais eficiente, iniciaram estudos alternativos, destacando a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma técnica que combina a utilização de um fotossensibilizador (FS), não tóxico, como a curcumina a uma luz visível não ionizante, em comprimento de onda capaz de excitar o fotossensibilizador gerando espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicos para os parasitas (ERO)

(Trahamane, E. J. O; 2017). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente a ação da TFD na resposta imunológica avaliando os leucócitos no sangue de camundongos Balb/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com TFD com associação da Curcumina como fotossensibilizador.

Metodologia

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, (CEUA-Univap), sob o protocolo nº A9-CEA-2022. Foram utilizados no total 12 camundongos machos da linhagem Balb/c, que ficaram instalados no biotério de passagem do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), da Univap.

Os parasitas utilizados na infecção foram mantidos em cultura no meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina e mantidos em estufa de crescimento à 28°C até o momento ideal para infecção, determinado por curva de crescimento.

Os animais foram infectados com a idade de sete a oito semanas com cepa de *Leishmania braziliensis* (M2904) e observados durante o período de quatro semanas, monitorando o edema e eritema no membro pélvico esquerdo onde foi realizada a infecção. Os animais foram divididos em dois grupos de tratamento usando a curcumina como o fotossensibilizador na concentração de 0,2 µmol/L, são eles: tratamento TFD subcutâneo (TFD Subc), onde o fotossensibilizador foi injetado por via subcutânea no membro dos animais e tratamento TFD tópico, no qual a curcumina foi misturada em um creme base, e aplicada na região de infecção, após 15 minutos, as lesões foram irradiadas. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1- Delineamento dos grupos experimentais.

Grupos experimentais

Controle	Animal não infectado
FS	Animal infectado não tratado
LED	Animal infectado e tratado com luz
Subcutâneo	Animal infectado tratado de maneira subcutânea e aplicado a luz
Tópico	Animal infectado tratado de maneira tópica e aplicado a luz

Fonte: o autor (2024).

O tratamento foi realizado semanalmente durante um período de quatro semanas, aplicando o fotossensibilizador durante 15 minutos e em seguida irradiando os membros com LED em 450 nm, 39 mW/cm², 10 J/cm². Após as sessões de TFD os camundongos foram eutanasiados com overdose do composto anestésico de xilazina (30mg/kg) e cetamina (300mg/kg) e o sangue foi coletado por meio de punção cardíaca para realização do esfregaço sanguíneo, posteriormente as lâminas foram coradas com a técnica de May-Grunwald e Giemsa para visualização dos leucócitos e contagem diferencial, em microscópio óptico (Leica DM2500) na com aumento de 100x.

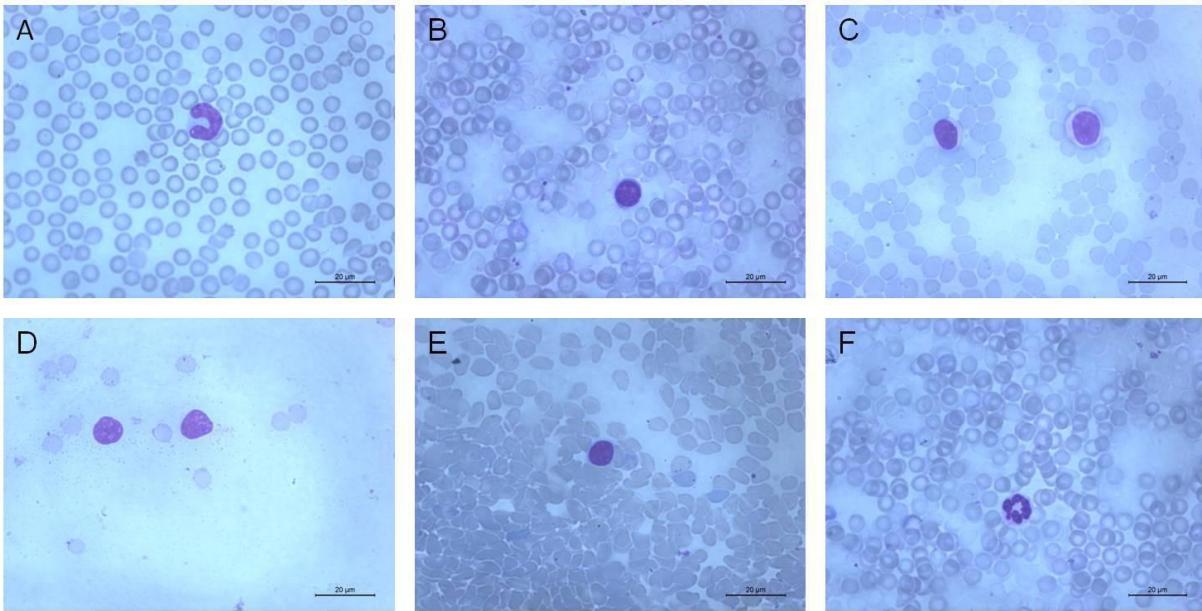
Resultados

Foi possível observar a diferença entre a contagem de leucócitos dos animais do grupo controle, LED (irradiado) e do grupo FS (não irradiado) e a diferença entre os métodos de tratamento TFD subcutâneo e tópico.

Foram contabilizados os seguintes tipos celulares: Basófilo, Segmentado, Linfócito, Eosinófilo, Monócito e Bastonete (Figura 1). Na Figura 2 observa-se que a maior presença de monócitos e linfócitos, células do sistema de defesa, ocorreu nos grupos que foram submetidos à irradiação, o gráfico também apresenta a comparação entre os grupos TFD observando-se que a presença de basófilos, linfócitos e bastonetes foi significativamente maior no grupo tópico comparado ao grupo subcutâneo, principalmente a presença dos linfócitos, sendo ele uma das principais células imunológicas no organismo, evidenciando a presença da infecção e a tentativa de combate. Já os tipos celulares segmentados, eosinófilos e monócitos tiveram maior presença no tratamento subcutâneo, enquanto os basófilos, eosinófilos e bastonetes mesmo estando presentes em ambos os grupos, não tiveram um destaque elevado, indicando que o tratamento ativou majoritariamente os glóbulos brancos de origem linfoide.

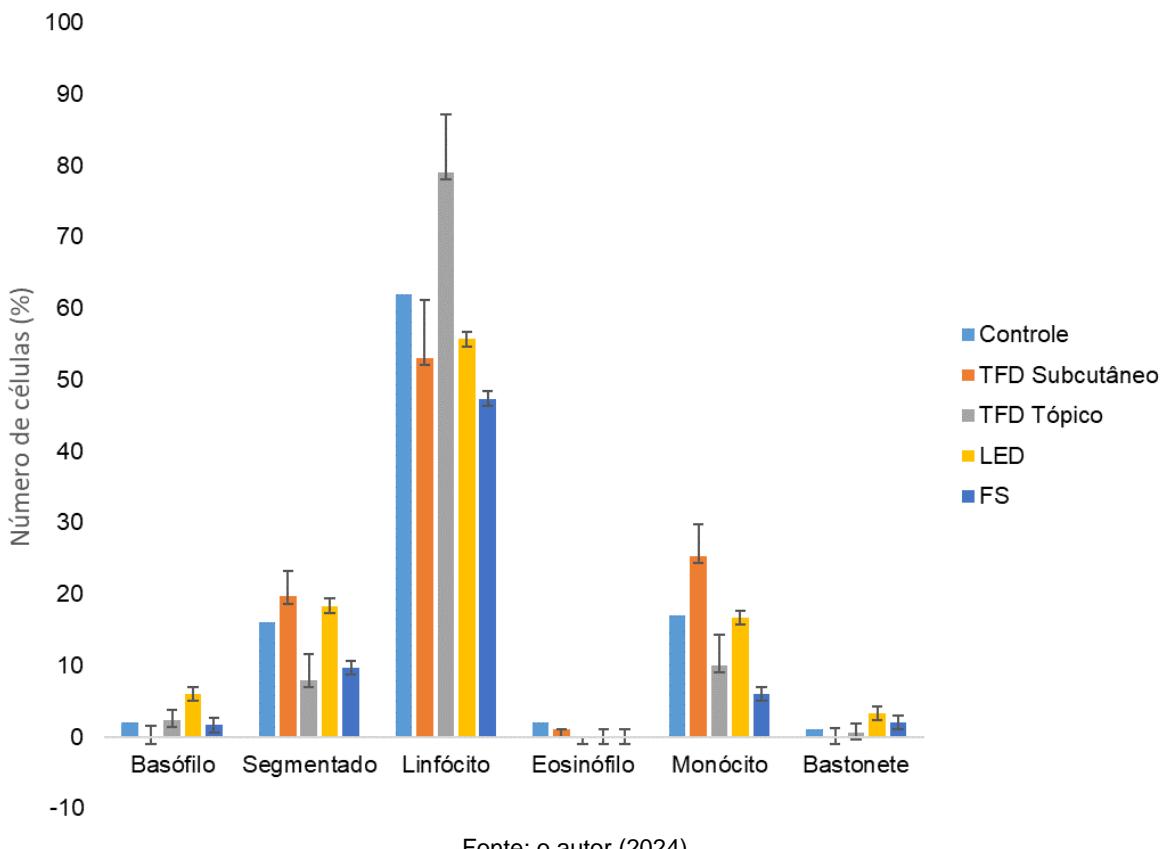
Ao comparar os leucócitos, foi possível observar que não houve diferença estatística dos tipos celulares nos diferentes grupos.

Figura 1- Micrografias dos diferentes tipos de leucócitos contabilizados nos grupos analisados. As células representadas abaixo são respectivamente: A- Bastonete; B- Basófilo; C- Monócitos; D- Eosinófilo; E- Linfócito; F- Segmentado.



Fonte: o autor (2024).

Figura 2- Análise leucocitária de camundongos Balb/c. Gráfico comparativo das células leucocitárias nos diferentes grupos.



Fonte: o autor (2024).

Discussão

A avaliação hematológica é uma ferramenta essencial para determinação do perfil fisiológico das linhagens e/ou populações de animais, além de permitir a criação de valores de referência que reflitam a condição em cada laboratório. No entanto, estabelecer um intervalo de valores de referência para roedores é difícil, pois muitas variáveis devem ser consideradas, como: sexo, idade, variação genética, dieta e condições ambientais em que estes animais são submetidos, de acordo com De Sousa (2017).

Durante um processo de infecção por protozoários, como a Leishmania, é notório o aumento na porcentagem de células monocitárias nesses casos e de acordo com o trabalho de Diniz (2020), e em seu trabalho Pinto, (2017) observou que uma vez que os neutrófilos são ativados passam a mandar sinais quimiotáticos, ajudando a recrutar monócitos e macrófagos e outras células do sistema de defesa, ativando o processo da fagocitose das células infectadas que se apresentam em apoptose.

No presente estudo foi possível observar a maior presença de monócitos, isso foi verificado também nos trabalhos de Ahmadi-hamedan (2020), que realizou um estudo de caso sobre infecção de leishmaniose cutânea em um Shih tzu-terrier, onde o número de monócitos na corrente sanguínea foi maior do que o considerado normal para o animal, concluindo que a infecção pode ser responsável por causar monocitose.

É importante a busca por tratamento que seja mais eficaz e seletivo. Segundo 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), observou em seus estudos que as células submetidas à TFD apresentaram comportamento diferente, enquanto as células submetidas apenas à luz, mesmo obtendo resultados maiores que o grupo FS ainda precisam de um

componente fotossensível para ativar seu sistema imunológico significativamente enquanto os grupos sem estímulo da luz não expressaram alterações, como foi notado nos resultados do presente trabalho.

Sugere-se que o tratamento com a TFD associado a curcumina, foi eficaz, pois o sistema imunológico dos animais reagiu de maneira mais efetiva sobre a infecção parasitária, sendo possível observar o aumento expressivo de monócitos em ambos os grupos de tratamento e também no grupo LED. Pinto, (2017) observou que após o uso da TFD, aumento no número de linfócitos nos quatro grupos de animais, o que também é notado neste trabalho, porém este resultado está dentro dos padrões de normalidade estabelecidos para camundongos Balb/c, já que no trabalho de Santos, et al. (2016) onde o objetivo era a padronização de valores de referência hematológicos e bioquímicos de roedores, foi observado que diferente do sistema humano, os roedores têm 70% de presença linfática no sangue, enquanto os humanos apresentam maior número de neutrófilos segmentados. Porém Pinto (2017) e Santos et al. (2016) descrevem uma baixa presença de monócitos no material analisado, sendo o padrão uma média abaixo de 3,1% na corrente sanguínea e o valor encontrado constitui-se em 25,3% de monócitos no grupo TFD subcutâneo, um aumento expressivo, resultado encontrado também por Diniz (2020), onde o valor dos monócitos em pacientes infectados com LC foi de 26,53% na corrente sanguínea, já a baixa de células como eosinófilos, basófilos e bastonetes são esperadas nesse caso mesmo com a infecção adquirida no sistema (Pinto, 2017).

Esses dados corroboram com o presente estudo, pois demonstrou que a TFD tem o potencial de causar alterações hematológicas, ativando o sistema imune dos animais infectados e auxiliando no controle da infecção através das células brancas, principalmente através dos monócitos, visto que quando comparamos os valores referentes as células dos grupos tratados com TFD e o grupo controle, podemos verificar a diferença na presença de monócitos, já no grupo apenas irradiado houve aumento de todos os tipos celulares em comparação ao grupo que foi infectado e que permaneceu sem o tratamento, sugerindo que a luz é capaz de estimular o sistema imunológico, mas apresenta maior eficiência na presença de curcumina.

Conclusão

A terapia fotodinâmica associada a curcumina, mostrou-se eficaz no tratamento dos camundongos infectados com a *Leishmania braziliensis*, uma vez que ajudou na ativação do sistema imunológico primário, possibilitando a contagem dos leucócitos e causando alteração hematológica nos animais, ajudando no tratamento da infecção.

Referências

- AHMADI-HAMEDANI, Mahmooud et al. **As manifestações hematológicas e bioquímicas da leishmaniose cutânea em um cão Shih Tzu-terrier com infecção grave: relato de caso.** Iranian Journal of Parasitology , v. 15, n. 3, p. 457, 2020. Acesso em 24 de ago. 2024.
- AURELIANO, D. P; **Efeito fotodinâmico mediado por azul de metileno na inativação de Leishmania (L.) amazonensis: estudo in vitro.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015. Acesso em 09 de ago. 2024.
- CAMPOS, Jacksandra Farias de França. **Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensis, Leishmania (Viannia) braziliensis e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.** 2008. Acesso em 22 de ago. 2024.
- DE SOUSA BARBOSA, Brenna et al. **Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. Acta Scientiae Veterinariae,** v. 45, p. 1-5, 2017. Acesso em 25 de ago. 2024.
- DINIZ, Suelen Queiroz et al. **Mecanismos efetores de monócitos na malária humana causada pelo Plasmodium vivax.** 2020. Acesso em 23 de ago. 2024.

FREITAS, J. C.C; PINHEIRO, D. C.S.N **Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a Leishmania spp.** In: Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-Ceará. 2010. Acesso em 26 de jul. 2024.

SANTOS, Ed Wilson et al. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c.** Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia , v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016. Acesso em 26 de ago. 2024.

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. Acesso em: 12 de ago. 2024.

OPAS; OMS. **Leishmanioses.** Informe Epidemiológico das Américas, Nº5, 2017. Acesso em 26 de jul. 2024.

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. 2024.

PINTO, Sandra Milena Leal. **Desenvolvimento de uma nanoformulação com alumínio-cloro-ftalocianina e paromomicina para tratamento da leishmaniose.** 2017. Acesso em 23 de ago. 2024

WYREPKOWSKI, Claudia Dantas Comandolli et al. **Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura.** Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 12, n. 8, p. e3352-e3352, 2020. Acesso em 25 de ago. 2024.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq 406282/2021-8 e CNPq 115735/2022-4, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001, ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba e a FAPESP/CEPOF-2013/07226-1.