

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

## **ESTUDO DOS ASPECTOS DAS LESÕES VISCERAIS E SUAS RESPOSTAS À INATIVAÇÃO DA *L. CHAGASI* SOB EFEITO DA INCIDÊNCIA DA LUZ VISÍVEL ASSOCIADA À FTALOCIANINA NO SANGUE DE CÃES<sup>1</sup>**

**Felipe Oliveski Bombardiéri<sup>2</sup>, Mateus Henrique Dambroz<sup>3</sup>, Artur Schoenmeier Wocichoski<sup>4</sup>, Paulo Afonso Hübner Bonfada<sup>5</sup>, Talita Gomes Da Silva Batista<sup>6</sup>, Cristiane Beck<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa realizado no curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>2</sup> Bolsista PIBIC UNIJUI, aluno do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>3</sup> Bolsista PIBITI UNIJUI, aluno do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>4</sup> Aluno do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>5</sup> Aluno do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>6</sup> Residente do laboratório de zoonoses da UNESP-FMVZ-BOTUCATU

<sup>7</sup> Professora, mestre em Medicina Veterinária da UNIJUI

### **Introdução**

As leishmanioses são antroponozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam um complexo de doenças de grande importância clínica e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007).

Em estudos realizados por Souza et al. (2001), onde hamsters receberam sangue infectado com *Leishmania infantum chagasi*, os animais desenvolveram sinais típicos da doença, incluindo ascite, caquexia e morte. Também foi observado que esses animais apresentaram alta carga parasitária no baço e no fígado, 90 dias pós-transfusão. O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é considerado um modelo experimental com uma procura em elevação por parte dos pesquisadores.

As alterações hepatoesplênicas e lesões renais são importantes indicativos da carga parasitária destes animais, o que justifica a importância do diagnóstico através da histopatologia e citopatologia, tendo em vista que, nesses exames é possível encontrar as formas amastigotas do parasita e a extensão das lesões renais.

A Terapia Fotodinâmica (TDF) consiste em uma modalidade terapêutica que envolve a ativação de substâncias fotossensíveis, fonte de luz e a geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres para promover a destruição de células alvo (ÇAMUR et al., 2011). A técnica de inativação ocorre devido a absorção da luz por um corante, na presença de oxigênio, desencadeando processos fotofísicos e biológicos que resultam na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) capazes de agredir constituintes celulares e ocasionar a morte celular por apoptose ou necrose (GARDNER et al., 2010 e DUTTA et al., 2011).

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

Na fototoxicidade da reação fotodinâmica estão implicados múltiplos fatores, tais como: classe do fotossensibilizador, dose, via de administração, absorção, especificidade do corante e distribuição nas células alvo, tipo de fonte de luz e intervalo entre administração do fotossensibilizador e a exposição à fonte de luz (WIEDMANN et al., 2004).

Como fotossensibilizadores, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos demonstram seu potencial para a TFD (ZHU et al., 2006). A ftalocianina por ser um corante sintético semelhante às porfirinas, sua lipofilicidade contribui para sua localização nas membranas plasmáticas, nos microssomos e nas mitocôndrias, e, conseqüentemente, para a ação fotodinâmica (ROSENTHAL, 1991). O metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora (ANHOLT e MOAN, 1992), apresenta alta absorção na faixa de espectro luminoso vermelho (670-780 nm) (ÇAMUR et al., 2011).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a presença do parasita, as lesões por ele causadas em órgãos de hamsters experimentalmente inoculados com *Leishmania infantum chagasi*, e avaliar a eficácia do método de inativação utilizado, a partir das alterações apresentadas, comparando-as entre os diferentes grupos.

#### Material e Métodos

O sangue de cão parasitado por *Leishmania infantum chagasi* foi doado pelo Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, do Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária - FMVA da UNESP, Campus de Araçatuba. Após a coleta foi conservado em uma bolsa contendo anticoagulante CPDA, e encaminhado para a terapia fotodinâmica que foi realizada em parceria com o “Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, e Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina” da Universidade de São Paulo - FFCLRP, Campus da USP de Ribeirão Preto – SP.

Para irradiação com luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio, foi utilizado um sistema atuando no comprimento de onda na faixa do visível (de 630 a 650 nm). O dispositivo usado neste estudo foi um sistema BTH Quantum Tech. Este sistema de luz é contínuo, com uma potência total na fibra óptica ao redor 0,3 W, contendo 6 mL de sangue com *Leishmania infantum chagasi* o qual foi adicionado um volume fixo de emulsão de ftalocianina de cloro-alumínio em placas de cultivo celular, que permitiu obter uma faixa de concentração que varia de 5 a 10  $\mu$ M. Este material foi submetido a uma radiação unilateral de luz visível com comprimento na faixa descrita acima numa faixa de luz de 10 J/cm<sup>2</sup>, agitado constantemente por um intervalo de tempo proporcional a dose utilizada de modo que a irradiação seja uniforme em toda a amostra, com duração de 24 minutos.

Após o tratamento pela luz o sangue foi inoculado nos animais por via intraperitoneal. No total foram inoculados 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*), com sangue de cão, separados em 6 grupos conforme o quadro a seguir.

Quadro 1: Relação dos grupos de hamsters e seus tratamentos.

Grupo	Tratamento
1	Inoculação de sangue da bolsa coletada de canino hígido (grupo controle saúde)

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

- 2 Inoculação de sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi* sem tratamento (grupo controle doença)
- 3 Inoculação de sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi* com tratamento de ftalocianina associada à luz visível
- 4 Inoculação de sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi* com a ftalocianina
- 5 Inoculação de sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi* com o tratamento da luz visível
- 6 Inoculação de sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi* com o veículo da ftalocianina

Após a inoculação os animais permaneceram isolados no laboratório de zoologia da UNIJUI durante seis meses, acondicionados em caixas específicas para hamsters, contendo maravilha, sendo esta trocada duas vezes por semana. Os animais receberam ração e água à vontade sendo observados diariamente quanto à mudança de comportamento e também sendo monitorada diariamente a temperatura ambiente.

Os hamsters inoculados com *Leishmania infantum chagasi* foram acompanhados clinicamente, sendo que, os que não morreram naturalmente foram submetidos à eutanásia depois de decorridos seis meses de estudo. O procedimento de eutanásia foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário da UNIJUI a partir de indução anestésica com isoflurano por via inalatória seguido de aplicação por via intra-peritonial de cloridrato de cetamina associado à xilasina na dose de 20 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente.

Após o procedimento de eutanásia, foram coletados fragmentos de fígado e baço, além dos dois rins inteiros para avaliação histopatológica, tendo sido acondicionados em recipientes plásticos contendo formol a 10% para fixação dos tecidos para envio ao Laboratório de Histopatologia Veterinária da UNIJUI, afim de realizar os procedimentos de rotina da avaliação histopatológica.

#### Resultados e Discussão

No presente trabalho foi inoculado sangue de cão proveniente de bolsa infectada por *Leishmania infantum chagasi*, e sangue tratado com luz visível associada à ftalocianina em animal de experimentação, *Mesocricetus auratus*, conforme protocolo descrito por Freitas et al. (2006).

Após eutanásia, procedeu-se a coleta das amostras de fígado baço e os dois rins inteiros para avaliação histopatológica

Até o presente momento apenas foram observadas as alterações macroscópicas dos órgãos no momento da coleta, onde visualmente, os rins não apresentaram alterações, enquanto em alguns grupos, baço e fígado demonstraram alterações. O grupo 2 apresentou 33,33% de hepatomegalia e esplenomegalia, o grupo 3 apresentou 33,33% de esplenomegalia e 16,66% de hepatomegalia, o grupo 4 apresentou 50% de hepatomegalia e esplenomegalia, o grupo 6 apresentou 46,66% de esplenomegalia e 17% de hepatomegalia. Os grupos 1 e 5 não apresentaram alterações macroscópicas em nenhum dos animais. Segundo Luviziotto (2006), hepatomegalia e esplenomegalia são sinais clínicos comumente observados em cães infectados com *Leishmania chagasi*.

Tendo em vista a presença de alterações importantes associadas a órgãos sem alterações macroscopicamente visíveis, faz-se necessária a análise microscópica das amostras coletadas para confirmação do diagnóstico e averiguação da eficácia dos tratamentos testados.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

A TFD consiste em modalidade terapêutica que envolve a ativação de substâncias fotossensíveis, fonte de luz e a geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres para promover a destruição de células alvo (ÇAMUR et al., 2011). A técnica de inativação ocorre devido a absorção da luz pelo corante, na presença de oxigênio, desencadeando processos fotofísicos e biológicos que resultam na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) capazes de agredir constituintes celulares e ocasionar a morte celular por apoptose ou necrose (GARDNER et al., 2010 e DUTTA et al., 2011).

As ftalocianinas são produtos altamente conjugados, de intensa pigmentação, utilizadas como corante, destacando-se com altas estabilidades térmica e química, a não toxicidade, a atividade redox bem definida e caráter elétrico (semicondutividade) como características importantes destas moléculas (LEZNOFF e LEVER, 1989). Atualmente as ftalocianinas têm sido utilizadas em TFD, como produto fotossensibilizador (LEZNOFF e LEVER, 1989 e FERREIRA et al., 2004).

Como fotossensibilizadores de segunda geração, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos demonstram seu potencial para a TFD (ZHU et al., 2006). O metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora (ANHOLT e MOAN, 1992), apresenta alta absorção na faixa de espectro luminoso vermelho (670-780 nm) (ÇAMUR et al., 2011).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado uma opção clínica promissora para o tratamento de tumores e muitas outras doenças (MACHADO et al., 2008). Recentemente a TFD também vêm sendo utilizada para inativar células bacterianas por meio do uso de fotossensibilizadores alvos (ROVALDI et al., 2000).

#### Conclusão

Diante os resultados obtidos até o momento, percebe-se a presença de alterações hepatoesplênicas importantes e a ausência de alterações macroscópicas renais. A partir disto, faz-se necessária a realização das avaliações histopatológicas para confirmação da presença do parasita e eficácia dos tratamentos.