

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

## **ESTUDO DOS EFEITOS DA LUZ VISÍVEL ASSOCIADA À FTALOCIANINA NA INATIVAÇÃO DA LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI NO SANGUE DE CÃES<sup>1</sup>**

**Mateus Henrique Dambroz<sup>2</sup>, Felipe Oliveski Bombardiéri<sup>3</sup>, Paulo Afonso Hübner Bonfada<sup>4</sup>,  
Artur Schoenmeier Woecichoshi<sup>5</sup>, Cristiane Beck<sup>6</sup>, Samea Fernandes Joaquim<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa Institucional no Departamento de Estudos Agrários, Pertencente do grupo de pesquisa em Saúde Animal

<sup>2</sup> Bolsista PIBITI/UNIJUI graduando em Medicina Veterinária pela UNIJUI, mateusdambroz@gmail.com

<sup>3</sup> Bolsista PIBIC/UNIJUI graduando em Medicina Veterinária pela UNIJUI, felipe.oliveski@gmail.com

<sup>4</sup> Graduando do curso de Medicina Veterinária

<sup>5</sup> Graduando do curso de Medicina Veterinária

<sup>6</sup> Professora Mestre em Medicina Veterinária da UNIJUI, cristiane.beck@unijui.edu.br

<sup>7</sup> Residente do Laboratório de Biologia Molecular e Imunodiagnóstico da UNESP Botucatu-SP

### Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV), primariamente, era uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (Brasil, 2010).

Daniel e Silva (2009) observaram alterações histopatológicas no baço de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e ratificam esses animais como um bom modelo experimental para o estudo da leishmaniose visceral, já que desenvolvem os sinais e sintomas da doença.

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes utilizando técnicas sorodiagnostics constitui um instrumento essencial no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) (FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003), sendo que os animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999; FERRER, 2002). A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por dois anos (FERRER, 2002). As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são a Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2003). Segundo Assis et al. (2008), a técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser de grande valia no diagnóstico da leishmaniose, confirmando casos positivos e inconclusivos.

A aplicação deste método atualmente tem provado que pode resolver os problemas de diagnósticos que resultam da baixa sensibilidade do exame microscópico os falsos positivos ou negativos dos

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

exames sorológicos, geralmente atribuído a anticorpos persistentes ou imunossupressão (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

A Terapia Fotodinâmica (TDF) é 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 por meio da 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 promover a morte celular por apoptose ou necrose (GARDNER et al., 2010 e DUTTA et al., 2011).

A fototoxicidade da reação fotodinâmica da 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).

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

A justificativa do trabalho se dá pelo fato da leishmaniose ser uma zoonose com distribuição mundial e ter como principal reservatório o cão, ela tem como principais sinais clínicos ascite e caquexia levando o animal a morte, pois não há tratamento para essa doença em cães, logo, os animais positivos para essa enfermidade devem ser obrigatoriamente submetidos a eutanásia. Esse trabalho busca uma forma capaz de eliminar ou reduzir a parasitemia, colaborando para que pesquisas posteriores possam desenvolver uma terapia para tratar a leishmaniose, não havendo necessidade de realizar a eutanásia.

## Metodologia

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, foi encaminhada para a terapia fotodinâmica sendo 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.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

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 nos permitiu obter uma faixa de concentração que varia de 5 a 10  $\mu\text{M}$ . Este material foi submetido a uma radiação unilateral de luz visível com comprimento na faixa de 630 a 650 nm numa faixa de dose de luz de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 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, 3 mL de 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 1.

Grupo	Tratamento
1	Inoculação de sangue da bolsa coletada de canino hígido (grupo controle saúde)
2	Inoculação de sangue positivo para <i>Leishmania infantum chagasi</i> sem tratamento (grupo controle doença)
3	Inoculação de sangue positivo para <i>Leishmania infantum chagasi</i> com tratamento de ftalocianina associada à luz visível
4	Inoculação de sangue positivo para <i>Leishmania infantum chagasi</i> com a ftalocianina
5	Inoculação de sangue positivo para <i>Leishmania infantum chagasi</i> com o tratamento da luz visível
6	Inoculação de sangue positivo para <i>Leishmania infantum chagasi</i> com o veículo da ftalocianina

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

Após a inoculação os animais permaneceram isolados no laboratório de zoologia da UNIJUI durante seis meses, acondicionados em caixas específicas para hamsters, contendo maravalha, 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 foi monitorada diariamente a temperatura ambiente.

Os hamsters inoculados com *Leishmania infantum chagasi* foram acompanhados clinicamente, sendo que, os que não morreram naturalmente foram eutanasiados 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-

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

peritonial de cloridrato de cetamina associado à xilazina na dose de 20 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente. Após os hamsters entrarem em plano anestésico, foi coletado sangue por punção intracardíaca com seringa estéril de 5 mL e agulha 25x7mm, após transferidas para tubos de microcentrifuga sem anticoagulante e centrifugadas para RIFI.

As amostras de fígado, baço e medula óssea foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Imunodiagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, Campus Botucatu – SP para a realização das análises (RIFI e PCR), então após receber os resultados das amostras, será feita a análise e compilação de dados.

## Resultados e discussão

A técnica de inativação utilizando luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio seguiu o protocolo preconizado por Rodrigues et al., (2012) modificada.

No presente projeto 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). O restante foram grupos controles.

A eutanásia foi realizada mediante a administração de anestesia inalatória à base de isoflurano e anestesia dissociativa com cloridrato de xilazina (200mg/mL) associado com cloridrato de quetamina (100g/mL) por via intraperitoneal (SOUZA et al., 2001). Após os hamsters entrarem em plano anestésico foi feita a coleta de sangue, e coletadas amostras de fígado, baço e medula óssea (osso esterno) para análise de PCR. A amostra do osso esterno foi macerada para expor a medula óssea. As amostras foram congeladas até o envio, sendo feito em caixas de isopor resfriados com gelo seco para preservar o DNA.

Para a realização da técnica de PCR serão utilizados fragmentos do baço, fígado e medula óssea, conforme descrita por Ikonopolus et al. (2003). Para a técnica de RIFI, o soro dos hamsters foi encaminhado, para a realização dos testes para *Leishmania infantum chagasi*, conforme descrita por Camargo (1966).

Não foi observada nenhuma manifestação clínica nos hamsters infectados até os 180 dias eles apresentaram boa condição corporal até o momento da eutanásia. Nunes et al. (1995) observaram lesões no local do inóculo caracterizado por edema, eritema e ulcerações. Daniel e Silva (2009) relatam perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e ascite também no decorrer de quatro meses em hamsters dourados infectados experimentalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. No momento os resultados das amostras dos hamsters submetidos a eutanásia, estão sendo aguardadas, pois foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Imunodiagnóstico e no Laboratório de

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, Campus Botucatu - SP.

### Conclusão

Até o momento os resultados obtidos não demonstraram alterações clínicas, porém ainda é necessário aguardar os resultados do PCR e RIFI para a confirmação da presença do parasita, podendo assim afirmar ou não que houve eficácia dos tratamentos.

### Referências bibliográficas:

ANHOLT, H.; MOAN, J. Fractionated treatment of CaD2 tumors in mice sensitized with aluminumphthalocyanine tetrasulfonate. *Journal Cancer Letters*. 1992;61:263-7.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; BUZETTI, W.A.S.; NEVES, M.F.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S. Diagnóstico por RIFI e PCR de Leishmaniose visceral em cães sintomáticos e oligossintomáticos. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.2, supl.1, ago, p. 61, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, p.120, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, p.277, 2010

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, v.8, p.227-234, 1966.

ÇAMUR, MERYEM, AHSEN, VEFA, DURMUS, MAHMUT . 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.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

DANIEL, K.B; SILVA, J.M. Análise das Alterações Histopatológicas do Baço de Hamsters Experimentalmente Infectados com *Leishmania (Leishmania) Chagasi*. Disponível em :< <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=470>>. Acesso em 05/06/2015.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

DUTTA S, ONGARORA BG, LI H, VICENTE MDA G, KOLLI BK, CHANG KP. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. Plos One. V. 6, n. 6, p. e20786, 2011.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Proceedings of second international canine leishmaniasis forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: Intervet International bv, p. 21-24, 2002.

GARDNER D. M, TAYLOR V. M, CEDEÑO DL, PADHEE S, ROBLEDO SM, JONES MA, LASH T.D, VÉLEZ I.D. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. Photochemistry Photobiology, v.86, n.3, p.645-52, 2010.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary Parasitology, v.113, p.99-103, 2003.

LEZNOFF, C. C., LEVER, A.B.P. Phthalocyanines: Properties and Applications. Vol. 2 e 3. New York. 1989.

NAKASEKO H, KOBAYASHI M, AKITA Y, TAMADA Y, MATSUMOTO Y. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. British Journal of Dermatology. 2003;148:122-7.

NUNES et al. Estudo Epidemiológico Sobre Leishmaniose Tegumentar (It) no Município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - Estudos na População Humana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28(3):185-193, jul-set, 1995.

RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. L. In Vitro Photodynamic Inactivation of Cryptococcus neoformans Melanized Cells with Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion. Photochemistry and Photobiology, v.88, p.440 - 447, 2012.

ROSENTHAL I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. Photochem Photobiol. 1991;53:859-70.

SOUZA, E.P.; et al. Occurrence of Leishmania donovani parasitemia in plasma infected hamsters. Acta Tropica, v.80, p. 69-75, 2001.

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

**Evento:** V Seminário de Inovação e Tecnologia

WIEDMANN M.W; CACA K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2004;5:1-12.

ZHU, Y., HUANG, J., JIANG, X., SUN, J. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. *Inorganic Chemistry Communications*, v.9, n.5, p.473-477, 2006.