AVALIAÇÃO LEUCOCITÁRIA E CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Pseudomonas aeruginosa* SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA

Maria Eduarda de Brito Visoto, Eloíse Gwyneth Lopes Oliveira, Mariany Fernandes da Silva Gravito de Carvalho, Isabelle Ferreira, Isabelle Ribeiro Brambilla, Juliana Ferreira-Strixino, Juliana Guerra Pinto.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Laboratório Photobios – Fotobiologia aplicada à Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, madudavisoto@gmail.com, eloisegwyneth@gmail.com, maycarvalho.y@gmail.com, iferreira.vet@gmail.com, isabelle.isa27@gmail.com, jufestrixino@gmail.com, juguerra@gmail.com.

Resumo

A resistência microbiana é um problema de saúde pública associado ao uso inadequado de antibióticos, destacando-se *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa de relevância clínica capaz de formar biofilmes. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como alternativa terapêutica que combina luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Este estudo avaliou o perfil leucocitário e a evolução de lesões cutâneas em camundongos infectados por *P. aeruginosa* submetidos à TFD com curcumina, associada ou não a antibiótico. A contagem diferencial de 100 leucócitos demonstrou maior proporção relativa de linfócitos e menor proporção relativa de neutrófilos segmentados nos grupos tratados em comparação com o controle. Na análise das lesões, observaram-se diferenças entre os grupos ao longo do tratamento, com redução final em todos, sobretudo no grupo LED. Devido ao caráter preliminar e ao reduzido número de animais, as diferenças no perfil leucocitário e sua possível relação com os efeitos imunomoduladores da TFD requerem estudos com amostras maiores.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. *Pseudomonas aeruginosa*. Modulação Imunológica.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde, Biomedicina.

Introdução

A resistência microbiana caracteriza-se pela incapacidade dos tratamentos convencionais de neutralizar micro-organismos. Atualmente, ela constitui um dos maiores desafios para a saúde pública no mundo. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2020), isso se deve ao uso indiscriminado de antibióticos, o que favorece infecções prolongadas, patologias agravadas e a limitação de opções de tratamento eficazes. Entre os micro-organismos mais comuns na área clínica, destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa,* uma bactéria Gram-negativa multirresistente e oportunista, frequentemente encontrada em infecções microbianas, especialmente em pessoas imunocomprometidas (Basseti *et al.*, 2018). Essa bactéria apresenta vários mecanismos de resistência, incluindo efluxo de fármacos, produção de β-lactamases e formação de biofilmes, o que leva as terapias antimicrobianas convencionais a perderem eficácia (Arias; Murray, 2009).

Com isso, a busca por terapias alternativas para o controle das infecções por *P. aeruginosa* torna-se indispensável. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido amplamente investigada como estratégia complementar ao tratamento de infecções bacterianas. Ela se baseia na ativação de um fotossensibilizador (FS) por luz de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio capazes de danificar células e causar efeito bactericida ou bacteriostático (Songca; Adjei, 2022). Além disso, entre os FS, destaca-se a curcumina, um composto extraído da cúrcuma (*Curcuma longa*), utilizada na medicina asiática e africana há mais de 4 mil anos, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (Angel *et al*., 2019). Em relação à TFD, a curcumina apresenta alto potencial como FS devido à sua absorbância na luz azul, gerando oxigênio reativo e, assim, ganhando destaque em estudos com bactérias Gram-negativas (Dias *et al*., 2020). Diante disso, estudos *in vivo* são essenciais para avaliar a redução da carga microbiana e a resposta do organismo nessa situação.

A análise hematológica, com foco na contagem diferencial de leucócitos, permite compreender alterações imunológicas, como neutrofilia, linfocitopenia ou monocitose, que podem estar relacionadas ao grau de infecção pelo patógeno. Dessa forma, a avaliação de parâmetros microbiológicos e hematológicos pode contribuir para uma compreensão mais abrangente dos efeitos da TFD no modelo experimental. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil leucocitário de camundongos infectados experimentalmente por *Pseudomonas aeruginosa* e submetidos à TFD associada à curcumina, com ou sem antibioticoterapia, a fim de identificar possíveis alterações na distribuição relativa das populações leucocitárias entre os grupos experimentais.

Metodologia

Amostra

Os esfregaços analisados foram obtidos de animais previamente incluídos em estudo aprovado pela CEUA com o protocolo nº A08/CEUA2024. As amostras utilizadas foram preparadas a partir do sangue coletado por punção cardíaca de camundongos machos da linhagem BALB/c, infectados experimentalmente com a cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente do banco de estoque do Laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde (PhotoBioS), e submetidos aos diferentes tratamentos propostos no estudo original. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: Controle; LED; TFD + ATB + Cur 1,5% e TFD + Cur 1,5%. Devido à perda de animais ao longo da execução experimental, o presente estudo foi conduzido em caráter preliminar, com um número reduzido de animais para análise. Para cada grupo experimental, foram utilizados dois animais, com exceção do grupo LED, constituído por um animal. Os animais foram inicialmente sedados e, em seguida, submetidos à tricotomia da região dorsal torácica, delimitando-se uma área de 3 mm de largura por 5 mm de altura. Posteriormente, foi realizada a infecção superficial da área preparada por meio da aplicação de 10 µL de solução de *Pseudomonas aeruginosa*, ajustada à concentração de 0,5 na escala de McFarland. Dessa forma, o protocolo foi organizado em cinco sessões de tratamento, nas quais o antibiótico escolhido para uso em conjunto com o FS foi amicacina.

Todas as lâminas foram devidamente identificadas, fixadas e armazenadas sob condições adequadas de conservação no PhotoBioS, pertencente ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba.

Preparação e Coloração das Lâminas

O esfregaço sanguíneo foi feito utilizando uma lâmina extensora sobre as lâminas ponta-foscas, onde foi depositada uma gota de sangue do animal próxima à extremidade da lâmina e com o auxílio de uma lâmina extensora, foi feito o espalhamento do sangue, formando uma região mais fina ao longo da lâmina, também chamada de “franja” ou “cauda”. A coloração dos esfregaços sanguíneos foi realizada pelo método Panótico Rápido, conforme as instruções do fabricante.

Leitura das Lâminas

A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40x, utilizando a região de “franja” das lâminas, onde as células se encontram melhor distribuídas. Foram analisadas sete lâminas sanguíneas, distribuídas entre os grupos experimentais. Em cada esfregaço foram contadas 100 células leucocitárias, classificadas por tipo celular e registradas digitalmente no software WBC Counter, que arquiva as informações de contagem para posterior análise. Os resultados foram organizados em planilhas do Microsoft Excel, com a identificação dos grupos experimentais e as respectivas porcentagens leucocitárias, a fim de permitir a comparação entre os tratamentos.

Mensuração da lesão

A evolução das lesões cutâneas foi acompanhada por meio de mensurações realizadas com um paquímetro. A área experimental foi mensurada inicialmente, antes da infecção, e posteriormente, após a inoculação de *Pseudomonas aeruginosa*. Durante o período experimental, as lesões foram monitoradas imediatamente antes de cada sessão de tratamento, com registro de suas dimensões em milímetros. Os valores obtidos em cada momento foram registrados individualmente para cada animal e, posteriormente, organizados de acordo com os respectivos grupos experimentais, permitindo o acompanhamento da evolução do tamanho das lesões ao longo das sessões de tratamento.

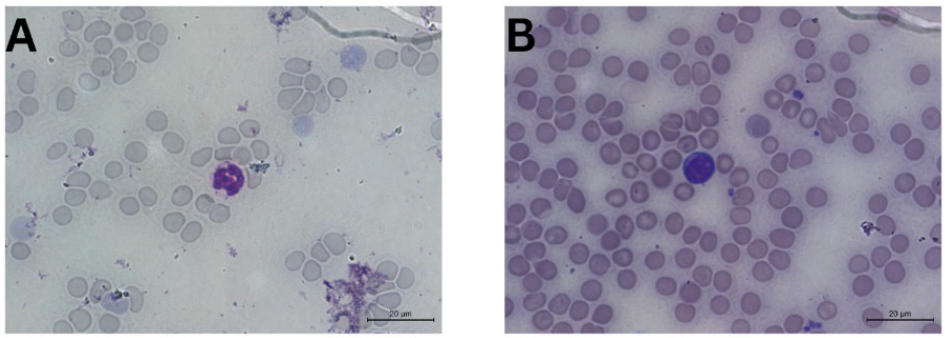
Resultados

A análise diferencial dos leucócitos demonstrou variação no perfil leucocitário entre os grupos experimentais. No grupo controle, os linfócitos corresponderam a 54,67% das células contabilizadas,

enquanto os neutrófilos segmentados representaram 41,33%. Nos grupos submetidos aos diferentes tratamentos, observou-se maior proporção de linfócitos e menor proporção de neutrófilos segmentados em comparação ao controle. O grupo TFD+ATB+Cur 1,5% apresentou a maior proporção de linfócitos (80,5%) e a menor proporção de neutrófilos segmentados (10%). Nos demais grupos tratados, os linfócitos representaram entre 76% e 80,5% das células contabilizadas.

Além das diferenças na distribuição leucocitária, foram identificados linfócitos atípicos em todos os grupos experimentais. Essas células foram destacadas no grupo LED (11%). A Figura 1 apresenta exemplos das características morfológicas observadas em esfregaços sanguíneos.

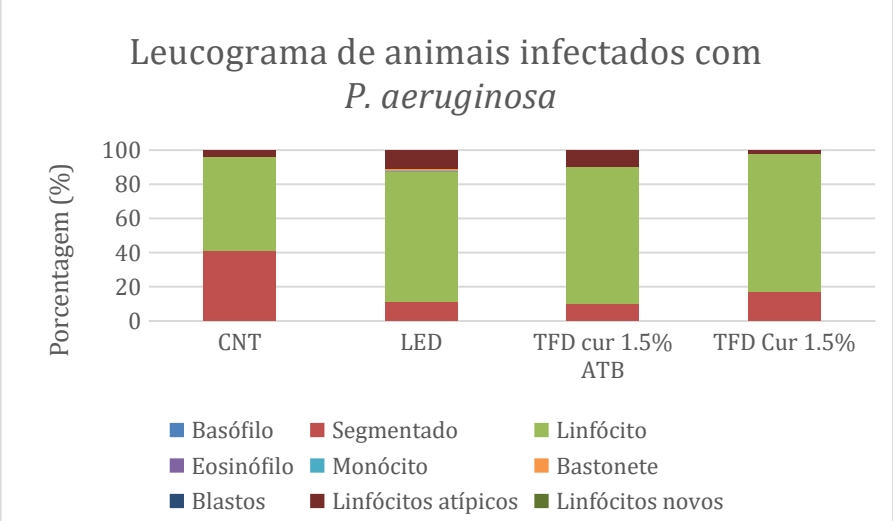
Figura 1 – Imagens das células principais encontradas nos grupos experimentais, neutrófilo segmentado e linfócito, respectivamente. A – Neutrófilo Segmentado; B – Linfócito.



Fonte: Autores (2026).

O gráfico 1 apresenta a comparação das médias da contagem diferencial de 100 leucócitos no esfregaço sanguíneo dos grupos experimentais do estudo. De modo geral, os linfócitos constituíram a população leucocitária predominante nos grupos experimentais.

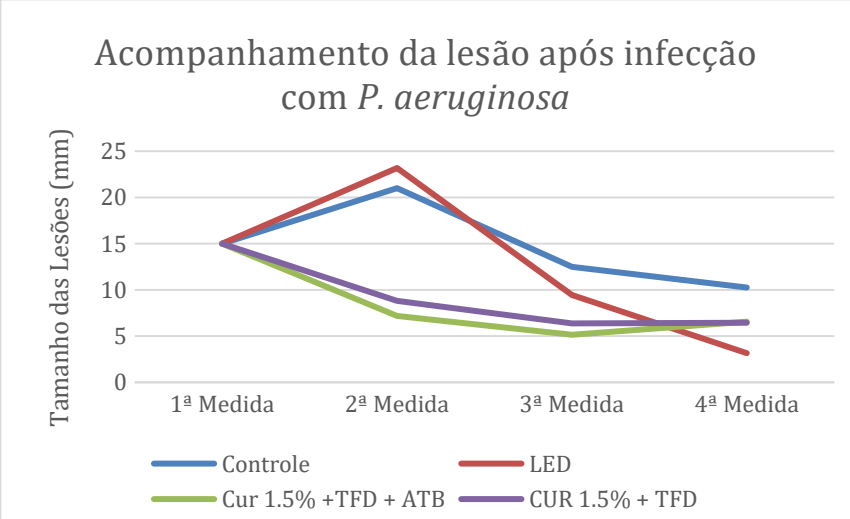
Gráfico 1 – Resultados da Contagem Diferencial de Leucócitos.



Fonte Autores (2026).

O gráfico 2 representa a relação entre as medidas das lesões, em milímetros, após a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* ao longo das sessões de tratamento. Pode-se perceber que nas duas primeiras medidas, os grupos tratados com a curcumina já apresentam valores reduzidos, enquanto os grupos controle e LED apresentam um aumento na lesão. A partir da terceira medida, as medidas de todos os grupos experimentais decaem sobretudo o grupo LED, apresentando uma lesão final inferior a 5 mm.

Gráfico 2 – Relação das medidas das lesões após infecção com *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte Autores (2026).

Apesar do padrão leucocitário observado, os resultados devem ser interpretados considerando as limitações do estudo. O reduzido número de animais por grupo, incluindo grupos com apenas um animal, limita a realização de inferências estatísticas e a generalização dos achados. Além disso, a análise baseou-se na contagem diferencial relativa de leucócitos, não permitindo determinar se a maior proporção de linfócitos corresponde a um aumento absoluto dessa população celular. Estudos futuros com amostras maiores, contagem leucocitária absoluta e avaliação de marcadores imunológicos são necessários para investigar o possível efeito imunomodulador da TFD.

Discussão

O presente estudo avaliou o perfil leucocitário de camundongos infectados por *P. aeruginosa* após o tratamento com TFD. Os neutrófilos desempenham papel fundamental na resposta imune inata às infecções bacterianas e, no presente estudo, foram observados em maior proporção relativa no grupo controle (Abbas *et al*., 2021). Em contrapartida, os grupos submetidos a diferentes tratamentos apresentaram maior proporção relativa de linfócitos, especialmente o grupo TFD + ATB + Cur 1,5%. Considerando a participação dos linfócitos na resposta imune adaptativa, tanto humoral quanto celular (Abbas *et al*., 2021), esse perfil leucocitário pode indicar diferenças na resposta imunológica entre os grupos experimentais. Entretanto, por se tratar de uma contagem diferencial relativa e de um estudo com reduzido número de animais, esses achados não permitem afirmar que tenha ocorrido aumento absoluto de linfócitos ou ativação da resposta imune adaptativa.

A geração de ERO pode estimular mecanismos de morte celular imunogênica, além de promover danos celulares por meio da oxidação de proteínas, lipídios e outros componentes celulares (Aebisher *et al*., 2024). Esse processo pode favorecer a liberação de sinais inflamatórios e a ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, contribuindo, consequentemente, para a ativação de linfócitos (Li *et al*., 2024). Garg (2022) também corrobora essa relação ao descrever que mecanismos associados à morte celular imunogênica podem favorecer a ativação de células apresentadoras de antígenos e de linfócitos. Além do dano microbiano, as EROs geradas durante o tratamento podem estar relacionadas à modulação da resposta imunológica, uma vez que os processos de morte celular imunogênica atuam na ativação do sistema imune. Essas moléculas também podem participar de cascatas de resposta ao dano e favorecer a exposição de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) na superfície celular, contribuindo para a sinalização e o recrutamento de componentes da resposta imune (Singh *et al*., 2024). Nesse contexto, Cai *et al*. (2026) também descreveram a capacidade da TFD de estimular componentes das respostas imunes inatas e adaptativas em estudos com células cancerígenas. Além disso, Santos *et al*. (2016) estabeleceram valores de referência para neutrófilos segmentados e linfócitos em camundongos BALB/c de 11–29% e 65–87%, respectivamente. No presente estudo, as proporções relativas de

linfócitos mostraram-se semelhantes aos valores de referência, enquanto a proporção de neutrófilos segmentados observada no grupo controle apresentou-se acima do intervalo descrito pelos autores.

Ademais, *P. aeruginosa* é um importante agente de infecções clínicas, podendo estar associada a infecções cutâneas de diferentes graus de gravidade e, em determinadas condições, a complicações sistêmicas (Hartmann, 2026). No presente estudo, observou-se redução das medidas das lesões ao longo do acompanhamento, inclusive nos grupos submetidos à TFD. Embora esses achados sejam descritivos, a evolução observada pode ser discutida à luz de estudos que investigaram a participação da TFD no processo de reparo tecidual. Tao Yang *et al*. (2020) demonstraram que a TFD associada ao ácido 5-aminolevulínico (ALA) pode atuar em diferentes etapas do reparo tecidual, além de apresentar efeitos sobre colônias de *P. aeruginosa*. De forma semelhante, Zengjun Yang (2021) relatou que a TFD com ALA pode favorecer o reparo tecidual por meio de mecanismos relacionados à proliferação celular e à geração de EROs na região da lesão.

A possível participação da resposta imunológica nesse processo também deve ser considerada. Freire *et al*. (2018) descreveram a relação entre os linfócitos e os processos de cicatrização e reparo tecidual. Entre essas células, os linfócitos T reguladores (Treg) participam da regulação da resposta inflamatória e da produção de TGF-β (fator de crescimento transformador beta), mediador envolvido na atividade dos fibroblastos e na deposição de componentes da matriz extracelular durante o reparo tecidual. No presente estudo, observou-se, de forma descritiva, que grupos com maior proporção relativa de linfócitos também apresentaram menores medidas das lesões em determinados momentos do acompanhamento. Entretanto, considerando o tamanho amostral reduzido e a ausência de análise inferencial, não é possível estabelecer uma associação entre o perfil leucocitário observado e a evolução das lesões.

Dessa forma, as diferenças observadas no perfil leucocitário e na evolução das lesões sugerem possíveis efeitos associados aos tratamentos empregados. Entretanto, os resultados devem ser interpretados como preliminares e não permitem atribuir diretamente à TFD efeitos imunomoduladores, antimicrobianos ou de aceleração da cicatrização. Estudos com maior tamanho amostral e avaliações específicas desses desfechos serão necessários para investigar a possível relação entre a TFD, a resposta imunológica e o reparo tecidual.

Conclusão

A análise diferencial dos leucócitos demonstrou alterações no perfil leucocitário dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, caracterizadas principalmente por maior proporção relativa de linfócitos e menor proporção de neutrófilos segmentados em comparação ao grupo controle. O padrão observado sugere possível influência da TFD sobre o perfil da resposta imunológica durante a infecção por *P. aeruginosa* e no reparo tecidual pós lesão. Entretanto, considerando o reduzido número de animais e o caráter descritivo da análise, estudos com maior tamanho amostral, contagem absoluta de leucócitos e avaliação de marcadores imunológicos são necessários para confirmar o potencial imunomodulador da terapia.

Referências

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and molecular immunology**. 10. ed. Filadélfia, PA, USA: Elsevier - Health Sciences Division, 2021.

AEBISHER, David; WOŹNICKI, Paweł; BARTUSIK-AEBISHER, Dorota. Photodynamic therapy and adaptive immunity induced by reactive oxygen species: Recent reports. **Cancers**, v. 16, n. 5, p. 967, 2024.

AGEL, Michael R. *et al.* Curcumin loaded nanoparticles as efficient photoactive formulations against gram-positive and gram-negative bacteria. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 178, p. 460–468, 2019.

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 439–443, 2009.

BASSETTI, Matteo *et al.* How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. **Drugs in Context**, v. 7, p. 212527, 2018.

CAI, Xiaowen *et al.* A mini-review: photodynamic therapy-induced immune activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 17, p. 1746961, 2026.

DIAS, Lucas D. *et al.* Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, n. 100384, p. 100384, 2020.

GARG, Abhishek D. Immunology of cell death in cancer and infection. **Genes and Immunity**, v. 23, n. 8, p. 241–243, 2022.

HARTMANN, D.; IBACETA AYALA, J.; MORGADO-CARRASCO, D. Cutaneous infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Clinical presentation, diagnosis and treatment. **Actas dermo-sifiliograficas**, v. 117, n. 3, p. 104590, 2026.

LI, Chuang *et al.* **Immunogenic cell death triggered by pathogen ligands via host germ line-encoded receptors**. 2024. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/2402.04422>.

MELO, Márcio. **Laboratório de Hematologia: teorias, técnicas e atlas. 2**. *[S.l.: S.n.]*.

Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>.

SANTOS, Ed. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, p. 138–145, 2016.

SINGH, Tanya *et al.* Immunogenicity of cancer cells: An overview. **Cellular Signalling**, v. 113, n. 110952, p. 110952, 2024.

SONGCA, Sandile Phinda; ADJEI, Yaw. Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3209, 2022.

YANG, Tao *et al.* Effects of ALA-PDT on the healing of mouse skin wounds infected with Pseudomonas aeruginosa and its related mechanisms. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 585132, 2020.

YANG, Zengjun *et al.* Photodynamic therapy accelerates skin wound healing through promoting re-epithelialization. **Burns & Trauma**, v. 9, p. tkab008, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2022/10251-0.