

TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO E SALINA ATIVADA POR PLASMA: EFEITO SINÉRGICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

Emily de Abreu Bueno¹, Felipe Santos de Almeida², Anlê Maria Rodrigues Cavalcanti da Silva¹, Juliana Ferreira-Strixino¹, Anelise Cristina Osório Cesar Doria², Juliana Guerra Pinto¹

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde (Photobios) Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, emilydeabreubueno24@gmail.com, anlemrcsilva@gmail.com, juferreira@univap.br, ju Guerra@univap.br

²Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, ferder017@gmail.com, ane.doria@gmail.com

Resumo

A leishmaniose cutânea é uma doença que causa lesões na pele e os tratamentos disponíveis causam toxicidade sistêmica. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia associada a um fotossensibilizador, como o Azul de Metileno (AM), luz em comprimento de onda adequado e oxigênio, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos celulares. A solução salina ativada por plasma (PAS) é proveniente de um plasma frio, transmitindo partículas energéticas à salina e ganhando propriedades antimicrobianas. O objetivo foi avaliar a eficácia da TFD com AM associado à PAS em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*. Os macrófagos infectados foram submetidos a TFD e PAS, divididos em 6 grupos experimentais (escuro e irradiado) com AM nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, realizando testes de viabilidade celular com Azul de Tripán e internalização do AM por microscopia confocal de fluorescência. O grupo com AM 25 µg/mL e PAS sob irradiação eliminou todas as células infectadas, as demais apresentaram efeitos parciais. A TFD com AM e PAS potencializa a atividade leishmanicida, sendo uma estratégia inovadora para o tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Terapia fotodinâmica. Azul de metileno. Solução salina ativada por plasma.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde - Biomedicina

Introdução

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida por insetos hematófagos pertencentes ao grupo flebotomíneos, através da picada das fêmeas que infectam os mamíferos. Existem três principais formas da doença que são a leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (Assouab *et al.*, 2024). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose cutânea é a forma mais incidente na população, principalmente nas Américas, no Oriente Médio e na Ásia Central, com uma estimativa de 600.000 a 1 milhão de novos casos por ano.

A leishmaniose cutânea afeta principalmente a pele, iniciando com uma picada que pode evoluir para úlcera, sendo capaz de causar cicatrizes e desfiguração (Cabral *et al.*, 2023). Em casos mais graves, a doença pode atingir a mucosa nasal ou oral, evoluindo para a leishmaniose mucocutânea (Farina *et al.*, 2021). Além dos sintomas físicos, a doença compromete a saúde mental das pessoas, surgindo problemas de autoestima e depressão, diminuindo a qualidade de vida (Bailey *et al.*, 2019). O tratamento da doença está relacionado ao uso de medicamentos como antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio), anfotericina B lipossomal, pentamidina e miltefosina (Fujii *et al.*, 2021). No entanto, essas medicações causam diversos efeitos colaterais, como náuseas, diarreia, vômitos, problemas cardíacos, renais e pancreáticos. Além disso, os medicamentos são caros e a maioria injetáveis, sendo invasivas e aumentando os riscos de infecções, exceto a miltefosina que é administrada por via oral (Cabral *et al.*, 2024).

Diante das dificuldades enfrentadas no tratamento, é necessária uma busca por novas terapias, com menos toxicidade e mais acessíveis. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa que está

relacionado ao uso de um fotossensibilizador, que, ao ser ativado por uma fonte de luz (LED ou laser) em um comprimento de onda específico, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que destroem as células infectadas pela *Leishmania* (Navasconi *et al.*, 2017). O azul de metileno (AM) é um corante que pode ser utilizado na TFD, sendo ativado pela luz vermelha e que possui propriedades antifúngicas e antibacterianas, um baixo custo e fácil aquisição (Sbeghen *et al.*, 2015).

A combinação de terapias pode potencializar os efeitos contra o parasita. A solução salina ativada por plasma (PAS) pode ser uma ferramenta de auxílio no tratamento da leishmaniose cutânea, proveniente de um plasma frio, que ao manter contato com a salina produz espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e cloro (RCS), por meio da interação com partículas energéticas como elétrons livres, íons e luz UV, fazendo com que a solução salina ganhe propriedades antimicrobianas (Chen *et al.*, 2023). Dessa forma, o presente estudo possui o objetivo de avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica com azul de metileno, associada à solução salina ativada por plasma, no tratamento de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* e investigar a internalização do azul de metileno em condições com e sem a solução salina ativada por plasma.

Metodologia

Cultivo celular

Os macrófagos de linhagem RAW foram descongelados em banho-maria com água destilada por aproximadamente 2 minutos. As células foram cultivadas em garrafa de cultura estéril, com 5 ml de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de Penicilina/Estreptocina. A garrafa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As manutenções foram realizadas com trocas frequentes do meio e monitoramento em microscópio invertido. Para cultivo e repique de *Leishmania amazonensis*, a cepa foi mantida em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de SFB, 2,5 mg/mL de hemina, 2% de urina estéril e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Foram realizados repiques a 10% para manter os parasitas na fase logarítmica de crescimento.

Infecção dos macrófagos

Os macrófagos e parasitas foram contados em câmaras de Neubauer. Nos macrófagos, foi trocado o meio para um novo de DMEM e foram desprendidos da garrafa de cultura com *cell scraper*. Foram colocados 20 µL da suspensão celular na câmara de Neubauer e contados 135 x 10⁴ células/mL nos quatro quadrantes. Aos parasitas, ocorreu uma diluição de 10 µL da cultura de parasitas com 990 µL de formaldeído a 4 %. Foram adicionados 20 µL da diluição na câmara de Neubauer e contados 50 x10⁶ parasitas/mL. A infecção dos macrófagos ocorreu na proporção 10:1 parasitos por célula. Foram adicionados 50 µL de DMEM e 74 µL de macrófagos em duas placas de 96 poços. Em uma placa de 24 poços, foram colocados 400 µL de DMEM e 74 µL de macrófagos. As placas foram incubadas por 12 horas em estufa a 37°C. Após esse período, foram adicionados 20 µL de parasitas aos macrófagos nas placas e o período de internalização foi de 24 horas em estufa a 37°C.

Preparo da salina ativada por plasma (PAS)

A solução salina ativada por plasma (PAS), foi produzida a partir da água de osmose reversa (OR) obtida pelo sistema purificador do modelo OS 10 LXE (Gehaka). A ativação da salina 0,9% foi realizada com sistema tipo *gliding arc*, em potência de 18,4 W e frequência de 60 Hz. Foram utilizados gases Argônio (pureza 99,95%) e ar comprimido seco (compressor Schulz MSV6-30), com vazão total de 10 L/min rotâmetros separados (6 L/min de argônio + 4 L/min de ar comprimido). O plasma foi gerado por um transformador de alta voltagem (7,5 kV, 60 Hz) conectado aos eletrodos, protegido por resistência de (1 kΩ), com controle de tensão via transformador VARIAC. A distância usada entre a saída do plasma e a superfície da salina foi de 2 mm com um tempo de ativação de 30 minutos.

Terapia fotodinâmica associada à PAS

O fotossensibilizador AM foi preparado diluindo-se 1 g em 3 mL de PBS, obtendo-se solução estoque de 333 µg/mL. A partir desta, foram preparadas soluções de trabalho de 25 µg/mL e 50 µg/mL em salina ou PAS (20 mL cada). Foram utilizadas duas placas de 96 poços, divididas em 6 grupos (4 poços/grupo): Controle (macrófagos infectados sem tratamento), PAS, AM 25, AM 50, AM 25+PAS e AM 50+PAS. Uma placa foi mantida no escuro e a outra irradiada. Após a internalização dos parasitas, o meio DMEM foi substituído por 100 µL das soluções correspondentes (ou salina nos controles), seguido de incubação a 37 °C por 1 h. Em seguida, os poços foram lavados com 100 µL de salina. A placa destinada à irradiação foi submetida ao equipamento Biopdi/IRRAD-LED (54 LEDs, 660 nm, 10

J/cm²) por 4 min 20 s. Após a irradiação, adicionou-se 200 µL de DMEM, e as placas foram incubadas a 37 °C por 20 h. O teste de viabilidade foi realizado substituindo o DMEM por Azul de Tripán 0,4% em PBS 1× por 5 min. Após a remoção do corante e lavagem com PBS, foram obtidas três imagens de campos aleatórios por poço em microscópio invertido. As células viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas) foram contadas manualmente, calculando-se a média e a porcentagem de viabilidade por grupo.

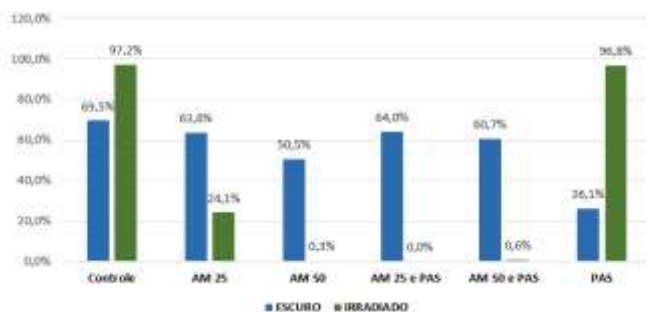
Internalização do azul de metileno

Na placa de 24 poços, foram alocadas lamínulas estéreis no fundo dos poços, e procedeu-se o processo de infecção dos macrófagos, como descrito anteriormente. Após a infecção, nos grupos AM 50 (AM na concentração de 50 µg/mL); AM 25 (AM na concentração de 25 µg/mL); AM 50 + PAS (AM na concentração de 50 µg/mL e PAS) e AM 25 + PAS (AM na concentração de 25 µg/mL e PAS) as soluções foram adicionadas aos poços, e incubadas em estufa a 37° C por uma hora. Após esse período a solução foi retirada e as células fixadas com paraformaldeído a 4%, por 15 minutos. As lamínulas presentes nos poços dos grupos foram retiradas e colocadas em lâmina através de ProLong com DAPI. As lâminas foram destinadas a análise por microscopia fluorescência confocal Zeiss LMS 700.

Resultados

Na análise de viabilidade por Azul de Tripán, a contagem das células vivas (coradas) e células mortas (não coradas), mostraram que o grupo AM 25 e PAS irradiado foi o único que não apresentou células viáveis, indicando que a concentração de AM 25 potencializou os efeitos das terapias combinadas, de acordo com a Figura 1. O grupo AM 50 e PAS irradiado apresentou poucas células viáveis, mas com efeito menor que o grupo anterior. Nos grupos escuros, o AM 50 e PAS apresentou menor viabilidade celular que o AM 25 e PAS. Na TFD, o AM 50 teve efeitos mais potentes, tanto no escuro quanto irradiado, em relação ao AM 25. Os grupos tratados apenas com PAS apresentaram maior citotoxicidade no escuro e maior viabilidade na forma irradiada. Nos controles, a redução de células vivas foi maior no escuro, devido a alta quantidade de parasitas, enquanto a irradiação ocasionou um efeito protetor nas células.

Figura 1- Gráfico de viabilidade dos macrófagos infectados em grupos experimentais mantidos no escuro e irradiados.



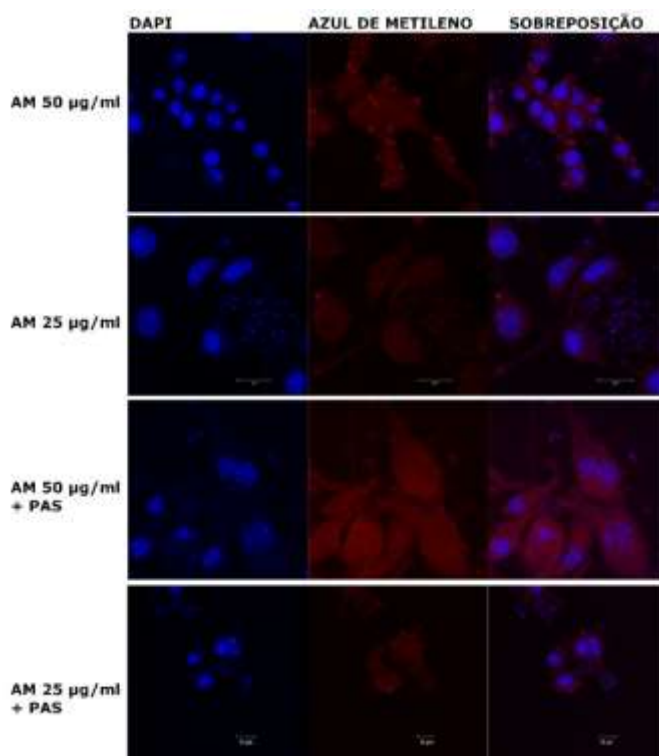
Fonte: O autor (2025)

A microscopia de fluorescência confocal possui a finalidade de analisar os núcleos celulares a internalização do AM em células e parasitas. Foi utilizado o meio de contagem ProLong, que fixa as lamínulas nas lâminas, prevenindo a perda de fluorescência por fotodegradação. Esse meio contém o corante DAPI, que se liga ao DNA e emite fluorescência azul nos núcleos, enquanto o AM emite fluorescência vermelha. Nos grupos escuros, foi possível observar os núcleos (DAPI), o AM e a sobreposição de duas fluorescências, conforme evidenciado na Figura 2.

Nos grupos escuros tratados apenas com AM (25 µg/mL e 50 µg/mL) foi possível observar a presença de fluorescência vermelha difusa no citoplasma dos macrófagos e no interior dos parasitas, indicando que o AM foi internalizado. A intensidade do sinal foi mais pronunciada no grupo AM 50, sugerindo maior acúmulo intracelular proporcional à concentração utilizada.

Nos grupos AM 25 + PAS escuro e AM 50 + PAS escuro, observou-se sobreposição das fluorescências azul e vermelha, indicando a presença do AM tanto no núcleo parasitário quanto disperso no citoplasma das células hospedeiras. Nesses grupos, a fluorescência vermelha mostrou-se mais homogênea, sugerindo que a presença da PAS pode ter favorecido uma distribuição uniforme do AM nas células.

Figura 2- Imagens da microscopia confocal com fluorescência em grupos experimentais permanecidos no escuro. Núcleos celulares (fluorescência azul); azul de metileno (fluorescência vermelha); Sobreposição das duas fluorescências.



Fonte: O autor (2025)

Discussão

Diante dos resultados obtidos, foi observado com o teste de viabilidade de Azul de Tripán uma diminuição na porcentagem de macrófagos infectados nos grupos experimentais. O grupo submetido a TFD com AM na concentração de 25 µg/mL combinado a PAS foi o mais eficaz, enfatizando que a combinação de terapias potencializa os efeitos contra as células infectadas pela *Leishmania amazonensis*. Além disso, observa-se que, nos grupos mantidos no escuro, inclusive no controle, houve aproximadamente 30% de morte celular. Esse efeito pode ser atribuído à destruição dos macrófagos causada pela intensa proliferação dos parasitas, comprometendo a viabilidade celular independentemente de tratamento. Por outro lado, tanto a exposição ao LED vermelho quanto a aplicação isolada da solução salina ativada por plasma demonstraram capacidade de controlar parcialmente o crescimento dos parasitas, reduzindo a taxa de infecção. O destaque, entretanto, foi o grupo tratado com AM 25 µg/mL associado à PAS, no qual se verificou a eliminação completa das células infectadas. Esse resultado mostra um efeito sinérgico entre a TFD e a PAS, ampliando o potencial terapêutico da combinação para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Os efeitos da TFD e do AM estão relacionados aos seus mecanismos de ação. Segundo Aureliano (2015), a TFD associada a um fotossensibilizador (FS) induz morte celular pela ativação luminosa em comprimento de onda específico. O FS excitado pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) por transferência de energia (tipo II) ou de elétrons (tipo I), produzindo oxigênio singlete, radicais superóxido e hidroxila, que promovem citotoxicidade em células hospedeiras e parasitas. Pinto (2017) demonstrou

por microscopia de fluorescência confocal com DAPI que o AM internaliza em cepas de *Leishmania major* e *L. braziliensis* em 1 hora, achado também observado neste estudo. Camargo (2021) avaliou diferentes concentrações de AM (50–500 μM) em promastigotas e macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sob irradiação semelhante à deste estudo, mostrando maior eficácia nas concentrações elevadas, especialmente em 300 s a 50 mW/cm^2 . Em *L. amazonensis*, as amastigotas responderam de forma semelhante, enquanto em *L. braziliensis* as formas amastigotas foram mais afetadas na concentração de 50 μM . De forma compatível, neste estudo a maior concentração de AM também foi mais eficaz em *L. amazonensis*. Aureliano (2018) relatou que 50 μM irradiados por LED (645 ± 10 nm, 100 mW, 300 s) foram mais eficientes em promastigotas de *L. amazonensis*, induzindo alterações ultraestruturais (encolhimento, vacuolização) e morte por apoptose. O autor destacou ainda baixa citotoxicidade do AM no escuro, reforçando que parâmetros de irradiação, concentração e cepa influenciam os resultados. A PAS, conforme Liu et al. (2016), é obtida pela exposição da solução salina a plasma frio, gerando ROS, RNS e espécies reativas de cloro (RCS), como H_2O_2 , radicais hidroxila, NO e HOCl. Em *Staphylococcus aureus*, a PAS foi mais eficaz que água deionizada ativada, devido ao HOCl proveniente de íons cloreto, o que pode explicar a redução de macrófagos infectados observada aqui, embora faltem estudos sobre PAS em parasitas. No grupo tratado apenas com PAS irradiada, observou-se mínima infecção. Ishihara et al. (2017) destacaram que luz, calor, oxigênio, compostos orgânicos e íons metálicos podem degradar HOCl, reduzindo seu efeito antibacteriano. Outra hipótese é a interação da luz vermelha com os macrófagos: Golovynska et al. (2022) mostraram que 650 nm e 808 nm modulam fagocitose, produção de citocinas e atividade mitocondrial, aumentando a resistência às infecções. Isso pode explicar também o maior percentual de macrófagos viáveis no grupo controle irradiado. No presente estudo, a associação de TFD com AM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e PAS apresentou maior efeito antileishmaniasis em comparação aos tratamentos isolados. Os achados reforçam que a TFD com AM promove morte celular via ROS e alterações ultraestruturais, enquanto a PAS no escuro contribui com ROS de efeito antimicrobiano. Contudo, não há relatos prévios da combinação TFD+AM+PAS, sendo necessários estudos adicionais em diferentes cepas de *Leishmania*.

Conclusão

A terapia fotodinâmica com azul de metileno, especialmente na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, associada à solução salina ativada por plasma, foi eficaz no controle de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*. Além disso, a microscopia confocal confirmou a internalização do fotossensibilizador em condições tanto com quanto sem a PAS, evidenciando um efeito potencializado da combinação terapêutica.

Referências

ASSOUAB, Aicha et al. Cutaneous leishmaniasis and iron metabolism: current insights and challenges. **Frontiers in immunology**, v. 15, p. 1488590, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11649654/>. Acesso em: 18 abr. 2025.

AURELIANO, D. P. **Photodynamic effect mediated by methylene blue on the inactivation of Leishmania (L.) amazonensis**. An in vitro study, Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Materiais). Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), 2015.

AURELIANO, D. P. et al. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 23, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29751117/>. Acesso em: 19 ago. 2025.

BAILEY, Freddie et al. Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007092, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6405174/>. Acesso em: 15. jul. 2025

CABRAL, Fernanda V. et al. New insights in photodynamic inactivation of *Leishmania amazonensis*: A focus on lipidomics and resistance. **PloS one**, v. 18, n. 9, p. e0289492, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10503701/>. Acesso em: 17 de mar .2025.

CABRAL, Fernanda V. et al. Photodynamic therapy offers a novel approach to managing miltefosine-resistant cutaneous leishmaniasis. **Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 177, n. 116881, p. 116881, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38917757/>. Acesso em: 17 de mar. 2025.

CAMARGO, L. H. M. C. **Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade celular de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis***. Dissertação (Mestrado em Medicina). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021.

CHEN, Fanfan et al. Toxicity study of rats treated by plasma-activated solution. **Heliyon**, v. 9, n. 12, p. e23116, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10746464/>. Acesso em: 23 ago. 2025.

FARINA, Juan Ma et al. Leishmaniasis y corazón. **Archivos de cardiologia de Mexico**, v. 92, n. 1, p. 85–93, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8771027/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

GOLOVYNSKA, Iuliia et al. Macrophages modulated by red/NIR light: Phagocytosis, cytokines, mitochondrial activity, Ca²⁺ influx, membrane depolarization and viability. **Photochemistry and photobiology**, v. 98, n. 2, p. 484–497, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34569637/>. Acesso em: 23 ago. 2025.

ISHIHARA, Masayuki et al. Stability of weakly acidic hypochlorous acid solution with microbicidal activity. **Biocontrol science**, v. 22, n. 4, p. 223–227, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29279579/>. Acesso em: 23 ago.2025.

LIU, Zhi Chao et al. Chemical kinetics and reactive species in normal saline activated by a surface air discharge: Chemical kinetics and reactive species in normal saline. Plasma processes and polymers, v. 14, n. 4–5, p. 1600113, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ppap.201600113>. Acesso em: 23 ago.2025.

NAVASCONI, Taisa Rocha et al. Photodynamic Therapy With Bengal Rose and Derivatives Against *Leishmania amazonensis*. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 8, n. 1, p. 46–50, Inverno 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5420365/>. Acesso em: 17 de mar. 2025.

PINTO, Juliana Guerra et al. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 18, p. 325–330, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100016302587>. Acesso em: 19 ago. 2025

SBEGHEN, Mônica Raquel et al. Topical and intradermal efficacy of photodynamic therapy with methylene blue and light-emitting diode in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 6, n. 3, p. 106–111, Verão 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26464777/>. Acesso em:18 abr. 2025.

VITAL-FUJII, D. G.; BAPTISTA, M. S. Progress in the photodynamic therapy treatment of Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 12, p. e11570, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmr/a/KVjSKCYJKqXNtwR8qRGH8bx/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Leishmaniasis**.2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 16 de mar. 2025.