



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (CCA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga
Cep: 64048-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 3215-5753**

PAULLINE PAIVA MENDES DE SOUZA LEAL

**AVALIAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DO MÉTODO DE ACELERAÇÃO
CICATRICIAL (MAC)[®] NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR:
ABORDAGENS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS**

TERESINA - PI

2026

PAULLINE PAIVA MENDES DE SOUZA LEAL

**AVALIAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DO MÉTODO DE ACELERAÇÃO
CICATRICIAL (MAC)[®] NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR:
ABORDAGENS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para defesa do Doutorado.

Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim
Carvalho

TERESINA – PI

2026

PAULLINE PAIVA MENDES DE SOUZA LEAL

**AVALIAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DO MÉTODO DE ACELERAÇÃO
CICATRICIAL (MAC)[®] NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR:
ABORDAGENS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para defesa do Doutorado.

Linha de pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica em medicina veterinária

Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves
Departamento de Morfofisiologia Veterinária – DMV/ UFPI
(Membro Interno - Orientador)

Prof^ª. Dra Luanna Soares de Melo Evangelista
Departamento de Parasitologia e Microbiologia – DPM/UFPI
(Membro Interno)

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho
Departamento de Farmacologia
(Membro Interno)

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
Departamento de Ciências Farmacêuticas – DCF/UFPB
(Membro Externo)

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Sousa
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA/UFRPE
(Membro Externo)

REITORA

Prof.^a Dr.^a. Nadir do Nascimento Nogueira

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

PRÓ-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Carlos Sait Pereira de Andrade

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Prof. Dr. Willams Costa Neves

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

Prof.^ª. Dra Lilian Silva Catenacci

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior

Dedicatória

Dedico esse Doutorado aos meus Pais, que nunca mediram esforços e sempre me incentivaram a realizar meus sonhos. Ao Meu Marido, pelo apoio incondicional em todas as fases desta jornada e por ser o alicerce da nossa família. Aos meus filhos pela compreensão e paciência diante das minhas ausências. A todos que fazem parte do Bioleish e Instituto Celulare.

Agradecimientos

No meu coração há apenas gratidão. Hoje, ao concluir este grande sonho, que foi meu, mas também dos meus familiares, reconheço que fui abraçada e acolhida por muitas pessoas ao longo dessa caminhada. Cada uma delas foi especial e, com certeza, escolhida por Deus, que me guiou com amor e carinho em todas as etapas. Eu vejo o amor dele em cada detalhe, pois foi assim que este projeto foi concebido, escrito, realizado e concluído: com muito amor. Agradeço, primeiramente ao Senhor meu Deus, por realizar mais uma de suas obras por meio de mim e de todas essas pessoas especiais que colocaste no meu caminho.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela oportunidade de formação acadêmica e pelo suporte institucional que tornou possível a realização deste doutorado. Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Aplicada a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), minha sincera gratidão pelo acolhimento, pela estrutura oferecida e pela contribuição científica ao longo de toda a trajetória, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, de forma especial, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pelo apoio financeiro por meio da bolsa de fomento, que foi essencial para minha dedicação à pesquisa e para a concretização desta tese.

Aos meus familiares, em especial meus pais, Mauro Ferraz e Isolda Paiva, minha eterna gratidão por sempre me apoiarem, acreditarem em mim, e serem meus maiores incentivadores. Ao meu marido Laurence Leal, meu porto seguro, que me inspira diariamente e é o alicerce da nossa família. Aos meus filhos Kalel Paiva e Arthur Paiva, pela paciência, amor e compreensão diante das minhas ausências vocês são minha maior motivação e razão para continuar. À minha irmã Bruna Paiva e ao meu sobrinho Eduardo Paiva, obrigada pelo carinho e apoio constante. Aos meus sogros Adão e Oneide, por todo suporte e incentivo, minha sincera gratidão.

Como eu disse, Deus nos apresenta as pessoas certas, aquelas que, como anjos, surgem em nossas vidas para nos direcionar. Assim aconteceu com a Professora Dra Maria do Socorro Pires e Cruz, que me levou até um amigo de infância aquele que viria a ser meu orientador. Gratidão, professora Socorro, por esse encontro abençoado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Michel Muálem de Mores Alves, expresso minha mais profunda gratidão. Sua dedicação e compromisso ultrapassam os limites da orientação acadêmica você foi e é um verdadeiro exemplo de ética, humildade e amor pela ciência. Obrigada por me permitir desenvolver um projeto do qual tanto me orgulho, que representa muito mais do que a conquista de um título de Doutora: representa uma trajetória de esforço, superação, amadurecimento e evolução pessoal e científica. Sou imensamente grata também a você e à sua linda família, que me acolheram com tanto carinho e que, com gestos de amizade

e generosidade, tornaram-se parte da minha história. Levarei comigo não apenas o aprendizado técnico, mas também o exemplo de ser humano e de profissional que tive o privilégio de conhecer e admirar.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, minha sincera gratidão pela colaboração no projeto, pela dedicação, carinho e paciência. Obrigada por me acolher de braços abertos, por acreditar em mim e por me conduzir com sabedoria, paciência e generosidade ao longo dessa caminhada mesmo quando dizia, em tom de brincadeira, que eu era “a aluna que mais dá trabalho”.

Ao Professor Dr. Marcus Vinicius de Mello Pinto, e à Professora Aline Ronis, minha gratidão por compartilharem seu vasto conhecimento, por me incentivarem a crescer, por acreditarem na minha capacidade mesmo quando eu duvidava de mim e por não desistirem diante dos desafios. Obrigada pela parceria, apoio e valiosas contribuições à nossa pesquisa.

À Professora Lilian Silva Catenacci, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, e a todos os professores do programa, meu reconhecimento por cada ensinamento e incentivo durante minha formação.

Deixo também um agradecimento muito especial e cheio de carinho a todos os colaboradores do BioLeish, que participaram desta pesquisa e tornaram possível a concretização deste trabalho. Aos amigos que ganhei ao longo desta jornada: Pastora Pereira Lima Neta, Victória Hannah Araújo de Almeida Passos, Francisco das chagas de Souza Cunha e tantos outros que estiveram comigo, minha gratidão sincera pela amizade, apoio e companheirismo.

Por fim, deixo aqui meu mais profundo agradecimento a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Afinal, ninguém conquista nada sozinho.

Muito obrigada a cada um de vocês!

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com manifestações clínicas variadas, onde o tratamento convencional enfrenta limitações como elevada toxicidade, custo alto, necessidade de administração parenteral prolongada e baixa continuidade por parte do paciente. Diante da necessidade de terapias mais seguras, acessíveis e de aplicação simplificada, o Método de Aceleração Cicatricial (MAC[®]) surge como uma abordagem de terapia fotodinâmica não invasiva, que combina um agente fotossensibilizador (FS) com irradiação por Luz Emitida por Diodo (LED) para promover estimulação tecidual. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade antileishmania, a citotoxicidade e parâmetros de ativação de macrófagos do MAC[®] e seus efeitos terapêuticos no tratamento da Leishmaniose Tegumentar (LT) em camundongos BALB/c. A metodologia do presente trabalho compreendeu abordagens *in vitro* e *in vivo* para avaliação da atividade biológica e da segurança do tratamento proposto. *In vitro*, foram realizados ensaios de atividade contra formas promastigotas, testes de citotoxicidade em macrófagos peritoneais e em eritrócitos de carneiro, bem como a avaliação contra amastigotas internalizadas em macrófagos. Adicionalmente, investigou-se a ativação de macrófagos por meio da análise da atividade lisossomal, da capacidade fagocítica e da produção de óxido nítrico. Também foram conduzidos ensaios de toxicidade aguda, pigmentação e dosagem de nitrito utilizando larvas de *Zophobas morio*. *In vivo*, a metodologia incluiu a avaliação clínica das lesões, a determinação da carga parasitária, a quantificação de nitrito e citocinas, além de análises laboratoriais e histopatológicas, visando à caracterização da eficácia terapêutica e dos possíveis efeitos sistêmicos do tratamento. Os resultados *in vitro* demonstraram que os tratamentos inibiram formas promastigotas do parasito dependente da concentração e do tempo de exposição a luz. O MAC[®] apresentou alta eficácia contra amastigotas internalizadas em macrófagos, com uma concentração inibitória média (CI₅₀) de 10,92 segundos, além de índice de seletividade contra o parasito (>25) e capacidade de ativar a fagocitose em macrófagos, sem toxicidade observada para eritrócitos de carneiro. Em relação à segurança, o MAC[®] reduziu a viabilidade em apenas 20% das larvas de *Zophobas morio*. Nos ensaios *in vivo*, os camundongos BALB/c tratados com MAC[®] apresentaram uma redução significativa das lesões ulcerativas e da carga parasitária em 83%. Já na quantificação das citocinas, observou-se elevação dos níveis de IL-10 nos grupos azul de metileno (AM), LED, MAC[®] e MAC[®] + Anfotericina B (Anf B), sugerindo modulação imunológica anti-inflamatória. Em relação a quantificação de enzimas séricas, foi observado que apenas o grupo tratado com Anfotericina B 3%, exibiu sinais de nefrotoxicidade. Conclui-se, portanto, que o

MAC[®] atua nas diferentes formas evolutivas do parasito, além de ativar macrófagos, configurando-se como uma abordagem terapêutica promissora para a Leishmaniose Tegumentar, por sua acessibilidade econômica e praticidade de aplicação, quando comparado ao tratamento medicamentoso. Sua aplicação é restrita a profissionais habilitados sendo capaz de acelerar a cicatrização, reduzir a carga parasitária e apresentar menor toxicidade em comparação ao tratamento convencional.

Palavras - Chaves: Doenças negligenciadas, terapia fotodinâmica, azul de metileno, Leishmanioses, reparo tecidual

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, with diverse clinical manifestations. Conventional treatment faces limitations such as high toxicity, high cost, the need for prolonged parenteral administration, in addition the low patient adherence. Having regard to the need for safer, more accessible, and simpler therapies, the Scar Acceleration Method (MAC[®]) emerges as a non-invasive photodynamic therapy approach that combines a photosensitizing agent (PA) with Light Emitting Diode (LED) irradiation to promote tissue stimulation. The objective of this research was to evaluate the antileishmanial activity, cytotoxicity, and macrophage activation parameters of MAC[®] and its therapeutic effects in the treatment of cutaneous leishmaniasis (CL) in BALB/c mice. The methodology of this work consisted of *in vitro* and *in vivo* approaches to evaluate the biological activity and safety of the proposed treatment. *In vitro* assays were performed to assess activity against promastigote forms, cytotoxicity tests in peritoneal macrophages and sheep erythrocytes, as well as evaluation against amastigotes internalized in macrophages. Additionally, macrophage activation was investigated through analysis of lysosomal activity, phagocytic capacity, and nitric oxide production. Acute toxicity, pigmentation, and nitrite dosage assays were also conducted using *Zophobas morio* larvae model. *In vivo*, the methodology included clinical evaluation of lesions, determination of parasite load, quantification of nitrite and cytokines, as well as laboratory and histopathological analyses, aiming at characterizing the therapeutic efficacy and possible systemic effects of the treatment. The *in vitro* results showed that the treatments inhibited promastigote forms of the parasite depending on the concentration and time of exposure to light. MAC[®] demonstrated high efficacy against amastigotes internalized in macrophages, with a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of 10.92 seconds, in addition to a selectivity index against the parasite (>25) and the ability to activate phagocytosis in macrophages, without observed toxicity to sheep erythrocytes. Regarding safety, MAC[®] reduced the viability of *Zophobas morio* larvae by only 20%. In *in vivo* assays, BALB/c mice treated with MAC[®] showed a significant reduction in ulcerative lesions and parasite load by 83%. In cytokine quantification, elevated IL-10 levels were observed in the methylene blue (MB), LED, MAC[®], and MAC[®] + Amphotericin B (Amp B) groups, suggesting anti-inflammatory immune modulation. Regarding the quantification of serum enzymes, it was observed that only the group treated with Amp B 3% presented signs of nephrotoxicity. It is concluded, therefore, that MAC[®] acts on the different evolutionary forms of the parasite, in addition to activating macrophages, thus configuring itself as a promising therapeutic approach

for cutaneous leishmaniasis, due to its economic accessibility and ease of application when compared to drug treatment. Its application is restricted to qualified professionals and is able of accelerating healing, reducing the parasitic load, and presenting lower toxicity compared to conventional treatment.

Keywords: Neglected diseases, photodynamic therapy, methylene blue, leishmaniasis, tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1.	Mapa de Notificação de Leishmaniose Tegumentar no Brasil no primeiro semestre de 2024.	25
Figura 2.	Mapa de Notificação de Leishmaniose Tegumentar no Piauí no primeiro semestre de 2024.	26
Figura 3.	Observação microscópica das formas evolutivas da <i>Leishmania amazonensis</i> .	27
Figura 4.	Ciclo Biológico da Leishmaniose	28
Figura 5	Estrutura química dos medicamentos para Leishmanioses.	29
Figura 6.	Diferentes comprimentos de ondas do LED	31
Figura 7.	Formula da estrutura do Azul de Metileno.	32

CAPÍTULO 1

Figura 8.	Demonstração do equipamento de fototerapia	44
Figura 9.	Forma de aplicação da substância e exposição de luz no <i>Zophobas morio</i>	51
Figura 10.	Atividade antileishmania contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	53
Figura 11.	Efeitos citotóxicos dos tratamentos do AM, LED e MAC [®] em macrófagos peritoneais murinos.	54
Figura 12.	Representação gráfica da atividade hemolítica dos tratamentos: AM, LED e MAC [®] .	55
Figura 13.	Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> .	57
Figura 14.	A atividade do AM, LED e MAC [®] , sobre amastigotas internalizadas em macrófagos.	58
Figura 15.	Atividade lisossomal e capacidade fagocítica de macrófagos submetidos aos tratamentos: AM, LED e MAC [®] .	59
Figura 16.	Quantificação de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos	60
Figura 17.	Curva de sobrevivência das larvas <i>Zophobas morio</i> no período de 48 h após aplicação.	61
Figura 18.	Avaliação da pigmentação das larvas <i>Zophobas morio</i> no período de 48 h após aplicação.	62

Figura 19.	Avaliação do Nitrito pelo método de Griess na larva <i>Zophobas morio</i> .	63
-------------------	---	----

CAPÍTULO 2

Figura 20.	Forma de contenção e exposição de luz no camundongo BALB/c	82
Figura 21.	Avaliação do tamanho da lesão dos camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com Anf b, AM, LED, MAC [®] e MAC [®] +Anf B.	86
Figura 22.	Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com Anf b, AM, LED, MAC [®] e MAC [®] +Anf B.	85
Figura 23.	Fotomicrografias de lesões cutâneas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados por 41 pós-infecção.	89
Figura 24.	Fotomicrografias de lesões cutâneas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados por 41 pós-infecção.	90
Figura 25.	Ativação da síntese de óxido nítrico pela concentração de nitrito, retirado do esplenócito dos camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> após tratados com Anf b, AM, LED, MAC [®] e MAC [®] +Anf B.	91
Figura 26.	Perfil imunomodulador para Anf B, AM, LED, MAC [®] e associação em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> .	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Metodologia aplicada para os seguintes testes: promastigota, amastigota internalizada, atividade lisossomal, capacidade fagocítica e produção e óxido nítrico. 46
- Tabela 2.** Tempo de exposição à luz para os testes de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro. E avaliação de toxicidade aguda, pigmentação, e produção e nitrito em larvas de *Zophobas morio*. 46
- Tabela 3.** Valores da concentração inibitória (CI50) para o teste de amastigotas com *L. amazonensis*, citotoxicidade (CC50) para células de macrófagos de murino e índice de seletividade (IS) para tratamento de 48 h realizados com azul de metileno, LED e associação entre eles através do MAC[®]. 59

CAPÍTULO 2

- Tabela 4.** Representação esquemática dos grupos experimentais e protocolos de tratamentos. 82
- Tabela 5.** Achados histopatológicos observados na epiderme de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados após 41 dias pós-infecção. 88
- Tabela 6.** Avaliação da toxicidade do tratamento dos camundongos infectados por *L. amazonensis*. 94

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina-aminotransferase
AM	Azul de Metileno
Anf B	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CC₅₀	Concentração citotóxica média
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CH₅₀	Concentração hemolítica média
CI₅₀	Concentração inibitória média
cm²	Centímetro quadrado
CRE	Creatinina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL₅₀	Dose Letal 50
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
HT	Hematócrito
IC₅₀	Concentração Inibitória
IL- 4	Interleucina - 4
IL- 5	Interleucina -5
IL- 6	Interleucina - 6
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina -12
IFN-γ	Interferon gama
J	Joule
LED	Diodo emissor de luz
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano de Escherichia coli
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MAC[®]	Método de Aceleração Cicatricial
MF	Miltetosina
ml	Mililitro
MS.	Ministério da Saúde
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
mw	Miliwatt
µg	Micrograma
NaCl	Solução Salina
NaNO₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais

nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Pan-Americana de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
Resazurina	Azul Alamar
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SESAPI	Secretaria de Saúde do Piauí
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia fotodinâmica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
W	Watts
ZnSO₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Leishmaniose.....	25
2.1.1. Epidemiologia	25
2.1.2. Etiologia.....	27
2.1.3. Ciclo biológico.....	27
2.1.4. Tratamento Convencional.....	28
2.2. Diodo emissor de luz - LED	30
2.3. Azul de metileno (AM).....	32
2.4. A Terapia fotodinâmica (TFD).....	32
2.5. MAC® (Método de Aceleração Cicatricial).....	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

Capítulo 1: Terapia Fotodinâmica com o Método de Aceleração Cicatricial (MAC®): Seletividade *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*

1. INTRODUÇÃO	42
2. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO	43
2.1. Local de execução.....	43
2.2. Substâncias utilizadas	43
2.3. Equipamento de fototerapia	444
2.4. Parasitos e células	45
2.5. Tempo de exposição de Luz e concentração/dose do Azul de Metileno	45
2.6. Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas.....	47
2.7. Avaliação de citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos e índice de Seletividade (IS).....	47
2.8. Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro	47
2.9. Atividade antileishmania sobre formas amastigotas internalizadas em macrófagos.....	48
2.10. Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos.....	49

2.10.1. Preparo de soluções.....	49
2.10.2. Concentrações e tempo de exposição utilizados para os testes de ativação de macrófagos.	49
2.10.3. Determinação da capacidade fagocítica	49
2.10.4. Avaliação da atividade lisossomal	500
2.10.5. Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico	50
2.11. Avaliação da toxicidade aguda em larvas de <i>Zophobas morio</i>	511
2.11.1. Avaliação da Pigmentação da <i>Zophobas morio</i>	522
2.11.2. Ensaio de Nitrito por método de Griess em homogenato de <i>Zophobas morio</i>	52
3.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.RESULTADOS.....	53
4.1. Ensaio de atividade antileishmania	53
4.2. Citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos	54
4.3. Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro	54
4.4. Atividade sobre amastigotas internalizadas e determinação do Índice de Seletividade (IS).....	55
4.5. Ativação de macrófagos.....	58
4.5.1. Atividade Lisossomal e determinação da Capacidade fagocítica	59
4.5.2. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)	59
4.6. Avaliação da toxicidade aguda em larvas de <i>Zophobas morio</i>	60
4.6.1. Avaliação da pigmentação.....	61
4.6.2. Avaliação do ensaio de Nitrito pelo método de Griess em larvas <i>Zophobas morio</i>	61
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

Capítulo 2: A nova terapia fotodinâmica contra a Leishmaniose Tegumentar em camundongos BALB/C infectados por *Leishmania amazonensis*

1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. Local de execução e aquisição de substâncias	79
2.2. Equipamento de fototerapia	77
2.3. Parasito e animais utilizados	77
2.4. Infecção dos camundongos por <i>L. amazonensis</i>	77

2.5. Tratamento.....	78
2.6. Avaliação Clínica	79
2.7. Avaliação da carga parasitária	80
2.8. Histopatológico	80
2.9. Quantificação de Nitrito e Citocinas.	84
2.10. Análises laboratoriais	84
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
4. RESULTADOS.....	85
4.1. Avaliação clínica.....	85
4.2. Carga parasitária	86
4.3. Histopatológico	87
4.4. Quantificação de nitrito.....	84
4.5. Quantificação de citocinas	892
4.6 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do tratamento com Anf B, AM, LED, MAC® e associação do MAC® + Anf. B em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por <i>L. amazonensis</i>	92
5. DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÃO.....	99
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	104

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Organização Mundial da Saúde (2023), as Leishmanioses são zoonoses parasitárias consideradas entre as vinte doenças mais negligenciadas e são consideradas endêmicas em populações de países emergentes, estando presente atualmente em cerca de 99 países, onde as estimativas são de 700.000 a 1 milhão de novos casos anualmente, resultando em cerca de 20.000 mortes anuais. No Brasil, entre os anos de 2011 e 2020, foram confirmados 33.000 casos de leishmanioses, com uma média de 3,3 mil casos por ano (Castro, 2023). As manifestações clínicas são: Tegumentar cutânea (LC), mucosa (LM), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). Os principais sinais clínicos da Leishmaniose Tegumentar (LT) estão relacionados às alterações cutâneas, lesões inflamatórias nas mucosas do nariz e da boca, podendo causar deformidades no paciente (Salud, 2023).

Em se tratando da LT, é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, e transmitida ao homem durante o repasto sanguíneo da fêmea do inseto flebotomíneo (Ordem Diptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae) (Bichiou et al., 2021). O vetor *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral, é endêmico no estado do Piauí, observado pelo alto número de pacientes acometidos e em tratamento (Alvar et al., 2012). Quanto ao endemismo do *Nyssomyia whitmani* no Piauí, não há evidências robustas sobre a presença ampla no estado, porém Sousa et al., (2023) demonstraram, em uma modelagem de nicho ecológico para o vetor no estado, alta adequação ambiental para *Ny. whitmani* no centro-norte e extremo norte, regiões coincidentes com áreas de maior incidência de leishmaniose cutânea. O sudeste do estado é, em grande parte, inadequado, sugerindo baixa ocorrência do vetor também demonstrado pela ausência de notificação da doença na região.

Um estudo epidemiológico realizado por dados secundários extraídos do DATASUS mostrou que no período de 2015 a 2017 foram notificados 190 casos de Leishmaniose Tegumentar no Piauí (Lemos et al., 2018). Já em dados mais recentes, apenas no primeiro semestre de 2024, foram notificados com LT no Piauí 56 casos e 4979 casos no Brasil (Brasil, 2024).

Devido à falta de uma vacina eficaz e medidas de controle limitadas, o tratamento quimioterápico ainda é a principal forma de combater a LT. Atualmente, para o tratamento, é utilizado como primeira escolha o Antimonial Pentavalente, porém outras medicações têm sido utilizadas, dentre elas as quais destacamos: Pentamidina, Anfotericina B, Miltefosina e Paromomicina. Contudo, esses fármacos são limitados, apresentam muitos efeitos adversos, longo período de tratamento o que pode levar a baixa adesão e continuidade do tratamento pelos pacientes, além de serem onerosos e o parasito pode apresentar resistência (Bamorovat et al., 2023; Didwania et al., 2017). Isso pode gerar

agravamento do estado de saúde destes pacientes, devido à evolução natural da doença, gerando ainda mais custos para o Sistema Único de Saúde (SUS).

A cicatrização é um processo fisiológico complexo, que ocorre por etapas de forma sequencial e interdependentes. Quando há presença de microrganismos, como bactérias, fungos ou outro patógenos, esse processo tende a ser retardado devido à resposta inflamatória prolongada e ao comprometimento da regeneração tecidual. Assim, a cicatrização pode ocorrer de forma ordenada, dentro de um tempo considerado normal, ou torna-se crônica, quando não segue o curso fisiológico esperado. De modo geral, o processo da cicatrização é dividido em três fases bem definidas, a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Gao et al., 2024). Entretanto a cicatrização de feridas na leishmaniose tegumentar, em particular, apresenta um processo distinto em comparação com a cicatrização normal, devido às alterações patológicas induzidas pelo parasito *Leishmania*, sendo assim a fase inflamatória é exacerbada e prolongada (Zucolotto et al., 2023).

Portanto, existe a necessidade urgente de investigar novas alternativas terapêuticas no tratamento da doença apresentada, dentre elas, a terapia fotodinâmica (TFD) por Luz Emitida por Diodo (LED) (Hoon Sim et al., 2023). Sendo o LED amplamente utilizado nos processos de cicatrização, pois contribui em todas as fases de reparo tecidual. Além disso, tem potencial efeito na inativação de microrganismos patogênicos existentes nas feridas. Porém não existe uma padronização em relação a dosimetria e o tempo de tratamento ideais da terapia fotodinâmica (Filho et al., 2017; Minagawa et al., 2023). Essa terapia fotodinâmica é a combinação de um agente fotossensibilizador e comprimento de ondas específicas do LED (Hoon Sim et al., 2023).

O MAC[®] (Método de Aceleração Cicatricial), tem como o princípio, a terapia fotodinâmica, porem utiliza-se a dobra do tempo em diferentes comprimentos de ondas estimulando o tecido específico escolhido. Além do mais, essa metodologia é baseada na proposta de identificar, observar, avaliar e interpretar, para que seja possível realizar a terapêutica adequada no reparo tecidual por intermédio do LED associado a foto fármacos específicos conforme cada caso. É um método inovador e moderno, e vem mostrando resultados positivos no tratamento da candidíase vaginal, em lesão muscular grau 2 em atleta profissional, no processo de cicatrização e imunomodulação durante a infecção viral por SARS-CoV-2, e na contratura capsular após implante mamário (Moreira et al., 2020; Pinto et al., 2021a, 2020, 2021b, 2024).

Nesse contexto, acredita-se que a metodologia MAC[®] possa apresentar atividade sobre o parasito, como também capacidade de atuar em sinergismo com a resposta imune do hospedeiro. Este estudo assume um caráter pioneiro ao configurar-se como o primeiro trabalho a empregar o MAC[®] com finalidade de tratar lesões leishmaniótica. Desta forma, o MAC[®] pode fornecer uma possível alternativa de tratamento para a LT.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antileishmania, citotóxica e a capacidade de ativação de macrófagos utilizando-se o MAC[®]. Ademais, investigar seu efeito tóxico em modelo alternativo *in vivo* utilizando larvas de *Zophobas morio* bem como a eficácia desse método no processo de cicatrização da úlcera cutânea resultante da infecção experimental de camundongos BALB/c com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

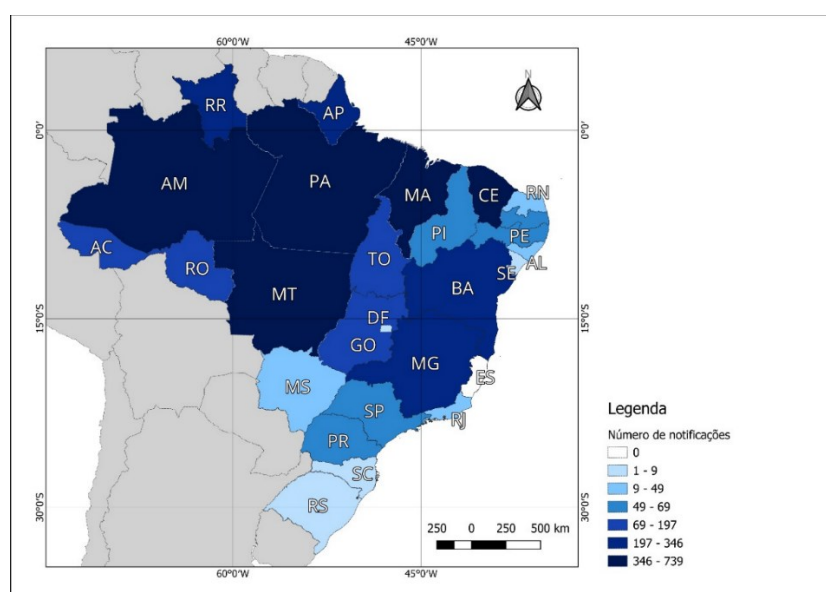
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses

2.1.1. Epidemiologia

Atualmente, as Leishmanioses acometem mais de 12 milhões de pessoas, sendo endêmica em cerca de 99 países, dos quais 89 apresentam prevalência para LT, 80 para LV e 71 desses países endêmicos para as duas formas: LT e LV. Dentre os 99 países que são notificados, 85% dos casos de LT estão nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru. Estima-se que a LT, em ambas suas formas de manifestação (LC e LM), apresenta anualmente cerca de 272.00 novos casos (OPAS, 2022). Já no Brasil, só no primeiro semestre de 2024 (Figura 1), foram notificados 4.979 casos de Leishmaniose Tegumentar (Brasil, 2024).

Figura 1 — Mapa de Notificação de Leishmaniose Tegumentar no Brasil no primeiro semestre de 2024.

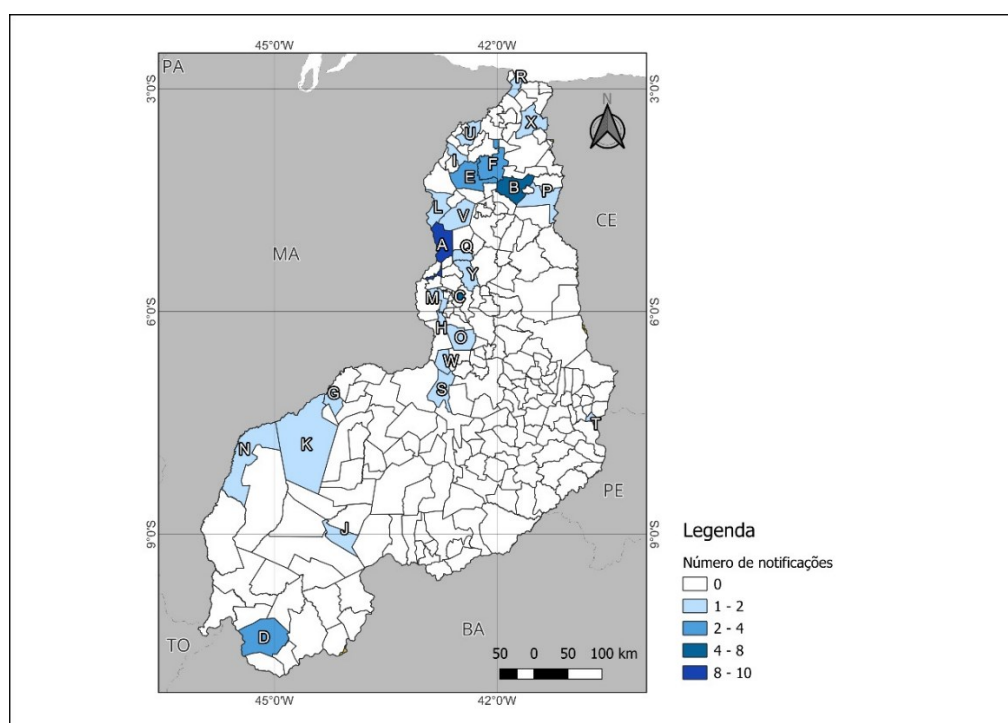


Arquivo pessoal: Dados do Painel de Epidemiologia de Leishmaniose Tegumentar do Ministério da Saúde, 2024.1.

No Estado do Piauí, segundo (Lemos et al., 2018) foram notificados 690 casos de LV e 190 casos de LT entre 2015 a 2017. Dados mais recentes da Secretaria de Saúde do Piauí (SESAPI, 2024), no ano de 2023 ainda foi registrado 222 casos de LV e 131 casos LT. No entanto no primeiro semestre de 2024 (Figura 2), no portal do Ministério da Saúde foram notificados com LT no Piauí 56 casos (Brasil, 2024).

Esses indicadores levantam a hipótese de uma subnotificação de casos, especialmente ao considerar a posição estratégica do Piauí, situado entre estados com alta endemia como Maranhão, Ceará, Sergipe e Bahia, o Piauí historicamente apresenta uma carga elevada de leishmanioses. A redução abrupta nos registros parciais de 2024 pode não refletir uma queda real na incidência, mas sim em subnotificação.

Figura 2 — Mapa de Notificação de Leishmaniose Tegumentar no Piauí no primeiro semestre de 2024.



Arquivo pessoal: Dados do Painel de Epidemiologia de Leishmaniose Tegumentar do Ministério da Saúde, primeiro semestre de 2024. Os municípios que obtiveram notificação foram identificadas da seguinte forma: A: Teresina, B: Piripiri, C: Barro Duro, D: Corrente, E: Barras, F: Batalha, G: Antônio Almeida, H: Angical do Piauí, I: Campo Largo do Piauí, J: Santa Luz, K: Uruçuí, L: União, M: São Pedro do Piauí, N: Ribeiro Gonçalves, O: Regeneração, P: Pedro II, Q: Pau D'Arco do Piauí, R: Parnaíba, S: Nazaré do Piauí, T: Marcolândia, U: Luzilândia, V: José de Freitas, W: Francisco Ayres, X: Cocal, Y: Beneditinos.

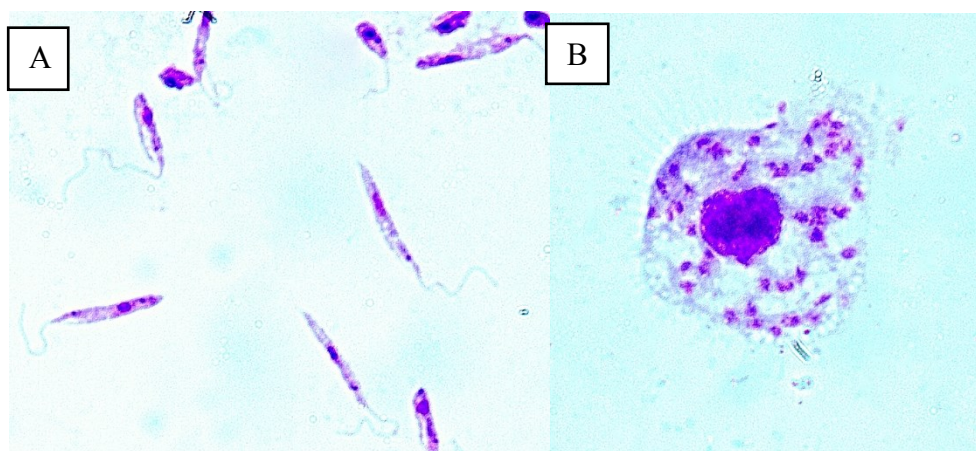
Alguns fatores contribuem para o aumento da epidemiologia da leishmaniose, como as condições socioeconômicas, a urbanização, mudanças climáticas e desmatamento, que influenciam a

distribuição de vetores e reservatórios do parasito (Chakravarty; Sundar, 2019; Cosma et al., 2024; Pradhan et al., 2022).

2.1.2. Etiologia

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários da família Trypanosomatidae pertencentes ao gênero *Leishmania*. As principais espécies que afetam humanos, no Brasil, incluem *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* como agentes etiológicos da Leishmaniose tegumentar e *Leishmania infantum* da Leishmaniose visceral (Freitas-Mesquita; Meyer-Fernandes, 2021). São parasitos dimórficos, apresenta duas formas morfológicas principais: amastigota e promastigotas (Figura 3). As amastigotas são obrigatoriamente intracelulares, pois são encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados. Ela possui uma forma arredondada com flagelo internalizado e medem cerca de 4 a 5 μm . Enquanto que as formas promastigotas estão presentes no trato digestivo dos flebotomíneos, apresentam se de forma alongadas, com flagelos livres, são moveis e medem cerca de 15 a 20 μm (Dagger et al., 2018; Sunter; Moreira-Leite; Gull, 2018).

Figura 3 — Observação microscópica das formas evolutivas da *Leishmania amazonensis*.



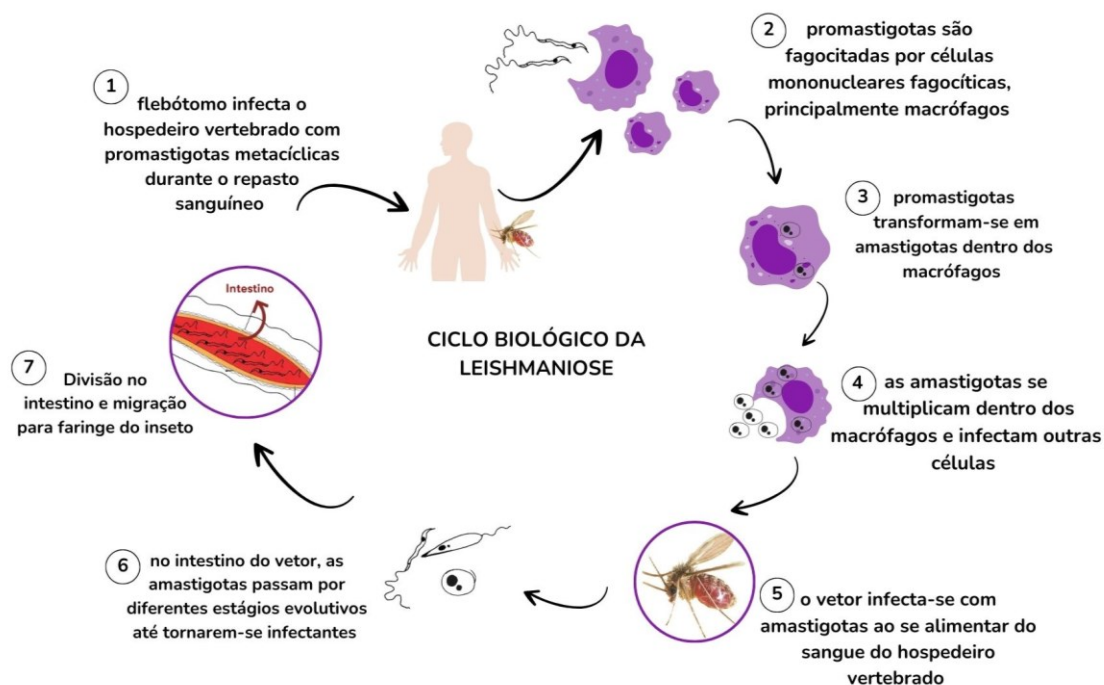
Fonte: A) Formas promastigotas, coradas com panótico rápido®. B) Formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos, ambos cultivados em meio de cultura. Aumento 1000x. Arquivo pessoal.

2.1.3. Ciclo biológico

O ciclo inicia-se quando um flebotomíneo fêmea infectado, ao exercer o repasto sanguíneo, regurgita formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro. Estas são rapidamente fagocitadas por diversas células, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Após a fagocitose, os parasitos se diferenciam em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo, onde se replicam, até o rompimento da célula, com liberação de novas amastigotas capazes de infectar outras células (Figura

4). O ciclo se completa quando a fêmea do flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado ingere macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* (Wei et al., 2024).

Figura 4 — Ciclo Biológico da Leishmaniose



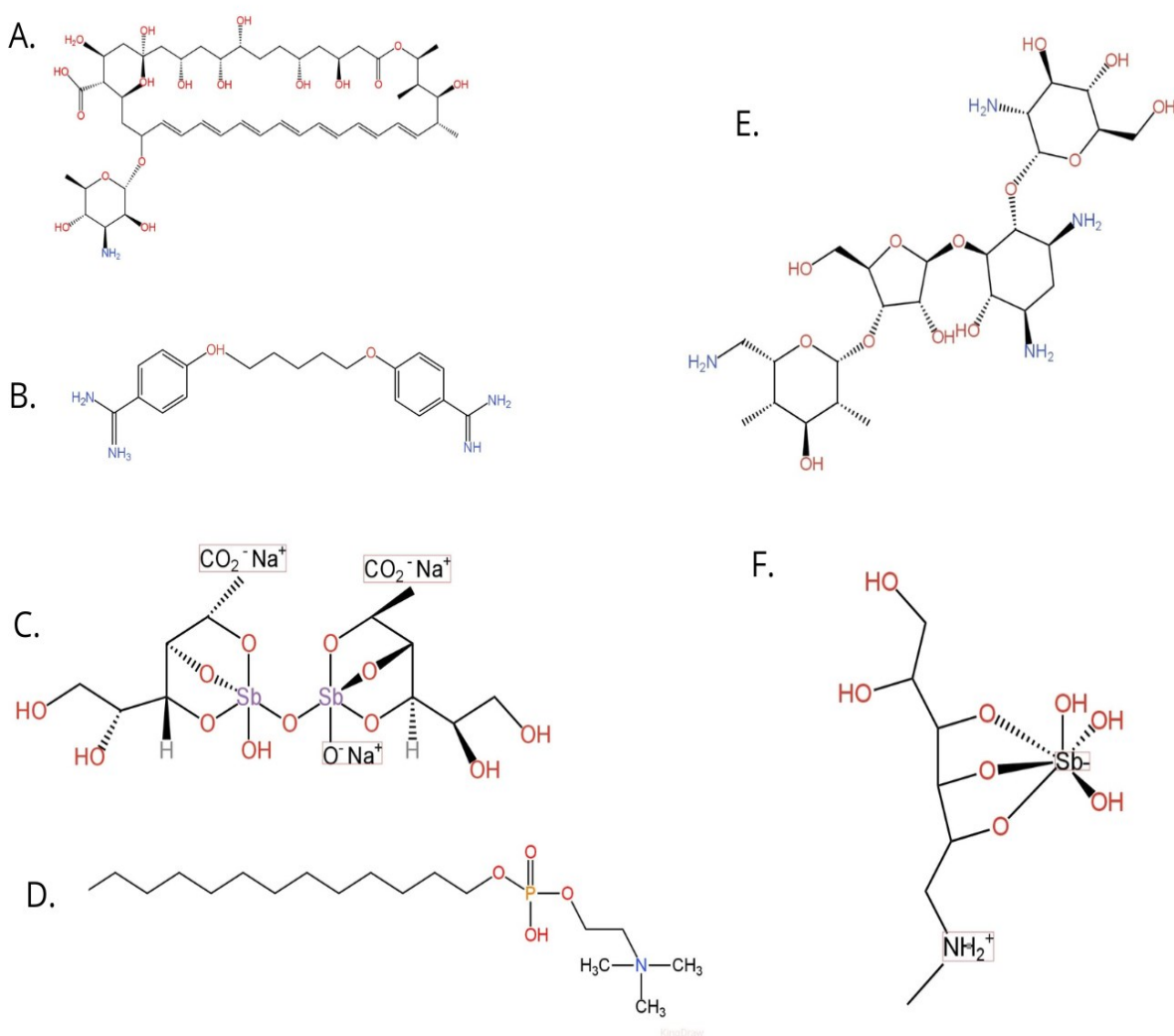
Fonte: 1) Flebotomíneos regurgitam formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneos: 2) As promastigotas ao penetrarem na pele são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. 3) Promastigotas transformam-se em amastigotas. 4) Os amastigotas se multiplicam por divisão binária simples e prosseguem para infectar outras células. 5) A infecção torna-se sintomática e como resultado ocorre o aparecimento de lesões cutâneas ou forma visceral. 6) Os flebotomíneos se infectam pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo. 7) No inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, e se desenvolvem no intestino, multiplicam-se e migram para o intestino anterior. Adaptado de Mokni, (2019).

2.1.4. Tratamento convencional

A complexidade da terapia da leishmaniose tegumentar, resulta da diversidade das espécies de *Leishmania* e sua ampla gama de manifestações clínicas. Atualmente, os antimoniais pentavalentes (Figura 5) permanecem como fármacos de primeira escolha, incluindo o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]). Em situação de falha terapêutica ou intolerância aos fármacos de primeira linha, as opções de tratamento de segunda linha para a leishmaniose, incluem a Anfotericina B, Pentamidina e Miltefosina (Uzun et al., 2018). Como já relatado anteriormente esses fármacos são limitados, apresentam muitos efeitos adversos e longo

período de tratamento o que pode levar a baixa adesão ou a descontinuidade do tratamento pelos pacientes (Bamorovat et al., 2023), além de serem onerosos e o parasito já apresentar resistência aos medicamentos. Além disso, a administração desses medicamentos apresenta desafios consideráveis, pois a maioria dos tratamentos exigem administração parenteral de longa duração além de contraindicações específicas, como para pacientes grávidas, restringindo ainda mais o escopo de aplicação dessas terapias (Pradhan et al., 2022).

Figura 5 — Estrutura química dos fármacos para Leishmanioses.



Fonte: A. Anfotericina, B. Pentamidina, C. Estibogluconato de sódio, D. Miltefosina
E. Paromomicina, F. Antimoniato de Meglumina. Arquivo Pessoal.

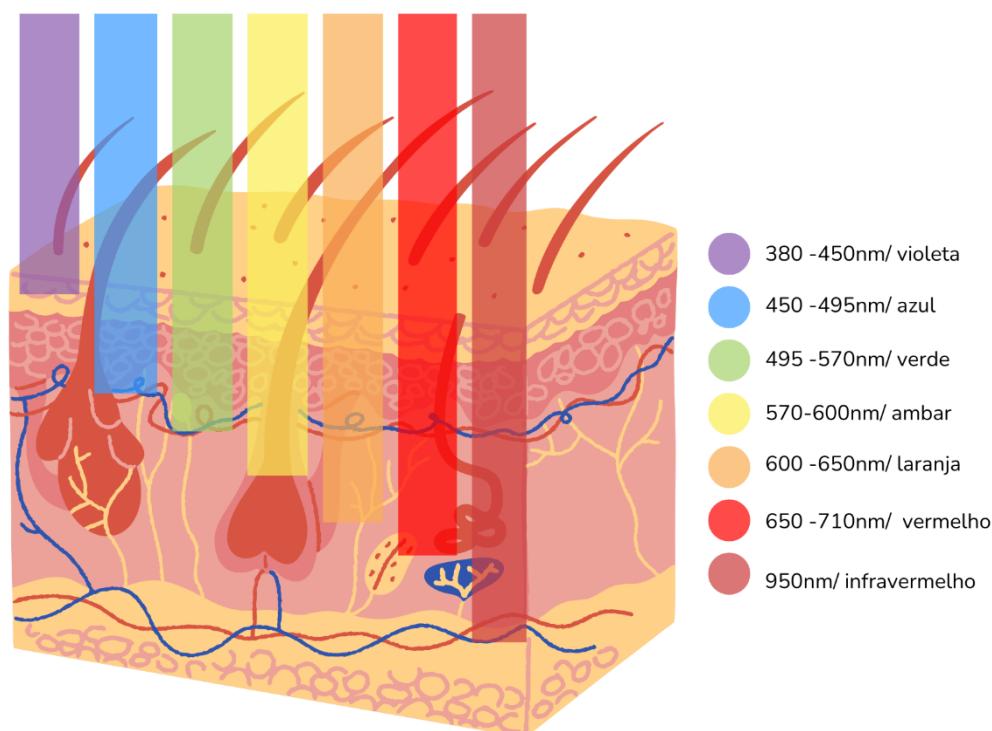
2.2. Diodo emissor de luz - LED

Diversas tecnologias têm sido utilizadas como recursos terapêuticos para cicatrização de lesões. A terapia de fotobiomodulação com LED é um recurso amplamente utilizado quando apresenta alterações cutâneas mostrando resultados benéficos principalmente por sua ação anti-inflamatória como proliferativa (Baracho et al., 2023). Os primeiros relatos históricos de LEDs foram escritos por Henry Round e Oleg Losev em 1907 e 1927, respectivamente; porém só em 2001 ganhou atenção de outros autores (Heiskanen; Hamblin, 2018). O LED é um diodo semicondutor, monocromático de baixa potência, não invasivo, indolor e livre de efeitos adversos. Sua constituição é baseada em uma estrutura emissora de luz formada por material semicondutores como por exemplo, hélio-neon, rubi, argônio, criptônio, arsenieto de gálio, e arsenieto de gálio-alumínio e, por sua vez, é rodeado por uma cavidade refletora sendo esta a responsável pela reflexão direcionada da Luz (Sena; Meira, 2024).

O LED é usado em diversas áreas como na dermatologia, odontologia, fonoaudiologia, fisioterapia, veterinária e outros. Clinicamente apresenta excelentes resultados em tratamentos como: neuropatias, cardiopatias, analgesia muscular, além de reduzir a inflamação e auxiliar na cicatrização (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2022). Inúmeros estudos demonstram o uso do LED para reparação tecidual, isso acontece pela diversidade de comprimento de onda, assim como doses de aplicação e densidade de energia variada que proporcionam uma bioestimulação para o tecido, realizando neovascularização, melhorando a microcirculação, estimulando a produção de tecido de granulação e síntese de colágeno, todavia os efeitos da fototerapia LED ainda são pouco compreendidos (Baracho et al., 2023; Blascovich; Nogueira; Jesus Costa, 2022; Freitas et al., 2022).

No entanto vale ressaltar que para cada tipo de tratamento é adotado um comprimento de ondas específico (Figura 6), dentro de um espectro eletromagnético que pode variar dentre feixe de 405 a 940 nm, sendo assim cada comprimento vai estimular uma reação no organismo.

Figura 6 — Diferentes comprimentos de ondas do LED.



Fonte: Arquivo Pessoal

Como visto na figura 6, o espectro da luz infravermelho penetra o tecido de forma mais eficaz do que a luz no espectro visível, isto é, a penetração no tecido diminui quanto menor for o seu comprimento de ondas. Porém cada comprimento de onda estimula e atinge uma célula alvo (Pinto et al., 2024). Dentre os espectros da Ledterapia, a luz a vermelha, azul e âmbar são capazes de atingir a derme e epiderme, o que as torna promissoras para tratamento da LT.

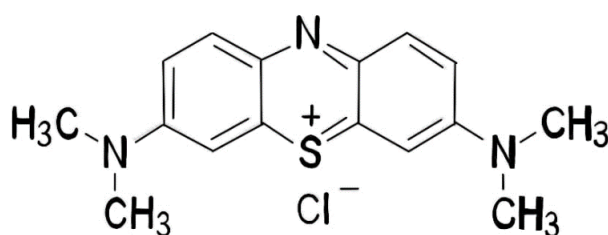
O LED vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, atua na inibição de mediadores da cascata inflamatória e na estimulação de fibroblastos, o que potencializa a síntese de colágeno e elastina. Quanto ao LED azul (400 - 460 nm), embora seus mecanismos sobre o crescimento bacteriano ainda demandem maior esclarecimento, suas propriedades bactericidas e antimicrobianas são amplamente reconhecidas na literatura. Por fim, o LED âmbar (590 nm) é empregado para estimular a produção de colágeno e otimizar as circulações sanguínea e linfática (Kim et al., 2013).

2.3. Azul de metileno (AM)

O azul de metileno é um derivado da fenotiazina, é uma molécula catiônica que possui diversas aplicações na medicina e na biologia (Figura 7). Quimicamente, é um corante conhecido por sua coloração azul intensa, apresenta característica hidrofílica, porém quando sofre um processo de metilação apresenta hidrofobicidade. Além de seu uso como corante, o azul de metileno possui propriedades terapêuticas e é utilizado em diferentes contextos, antisséptico, antimicrobiano e corante para diagnóstico. Estudos recentes têm investigado o potencial do azul de metileno como agente terapêutico antileishmania, devido às suas propriedades antiparasitárias (Oliveira et al., 2019).

Pesquisas indicam que o azul de metileno pode inibir a multiplicação do parasito, sendo explorado como uma alternativa ou complemento ao tratamento convencional, além de ser um fotossensibilizador de baixo custo. No entanto, ainda são necessários estudos complementares, para entender a eficácia, a segurança e melhor forma de administração do azul de metileno no contexto da leishmaniose (Cabral et al., 2023; Pereira et al., 2020)

Figura 7 — Fórmula da estrutura do Azul de Metileno.



Fonte: Arquivo pessoal

2.4. A Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD se baseia em um processo fotoquímico que combina a ativação de uma substância fotossensibilizador (FS), por uma fonte de luz não ionizante (LED/Laser) e oxigênio molecular para destruir seletivamente e localmente um tecido ou célula alvo por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que induzem morte celular. A sua aplicabilidade varia conforme a condição tratada e o fotossensibilizador utilizado. O uso do FS pode ser administrado de forma sistêmica ou tópica (Pinto et al., 2017).

Inúmeros FS, têm sido estudado dentre eles o Azul de Metileno, para realizar a terapia fotodinâmica, por ser conhecido como corante histológico por sua função antimicrobiana, grande

eficiência fotodinâmica, baixo custo, fácil obtenção e preparação (Liu et al., 2022; Ozlem-Caliskan et al., 2022).

O principal mecanismo de ação da TFD envolve a absorção da luz vermelha e infravermelha pela Citocromo C Oxidase (CCO), uma enzima crucial das mitocôndrias. Essa absorção de luz faz com que o óxido nítrico, que normalmente inibe a CCO, se dissipe, liberando a enzima de forma mais efetiva. Consequentemente, isso aumenta a produção de ATP (adenosina trifosfato), a principal fonte de energia da célula. Esse aumento de energia e a liberação do óxido nítrico ativam diversas vias de sinalização de células e fatores de transcrição, que promovem efeito benéficos e duradouros, como a redução da inflamação e melhora da cicatrização (Hambin et al., 2024).

2.5. MAC[®] (Método de Aceleração Cicatricial)

O Método de aceleração cicatricial (MAC[®]) foi desenvolvido pelo fisioterapeuta Dr. Marcus Vinícius de Melo Pinto durante seu pós-doutorado em Nova York - EUA. Implantado no Rio de Janeiro em 2010, o método possui patente registrada sob o INPI N° 930663055 e a marca com INPI N° 932400485, focando na sinergia entre diferentes terapias de LED/Laser bem como a utilização de fotofármaco e fotosensibilizadores para otimizar processos de reparação tecidual e analgesia.

O MAC[®], consiste no uso de agentes biotivos e tecnologias avançadas que atuam sinergicamente para estimular a reparação tecidual. Para realizar esse método é necessário o intermédio de fototerapia (LED/Laser) associando a marcadores celulares, substância fotossensibilizadoras, fotofármacos e fotobiomodulação, com ênfase na imunofotobiomodulação, para processos de administração: Monodoses e Doses. Dessa forma, a aplicação deve considerar o tipo de tecido, extensão e profundidade do dano tecidual, bem como a presença e o tipo de microrganismos colonizadores. As Monodoses contêm subdoses terapêuticas, nas quais o tempo de exposição é progressivamente dobrado ao longo do tratamento, fracionando-se a aplicação em diferentes comprimentos de onda (Pinto et al., 2024).

Esse ajuste temporal pode ser ampliado ou reduzido conforme a presença de comorbidades crônicas ou agudas, as características da lesão, os objetivos terapêuticos e a avaliação clínica. A dosimetria, por sua vez, é adaptada individualmente, sendo aumentada ou reduzida de acordo com a necessidade clínica de cada caso (Pinto et al., 2021a).

É um método inovador e moderno, e vem mostrando resultados positivos no tratamento da candidíase vaginal, em lesão muscular grau 2 em atleta profissional, no processo de cicatrização, queimaduras e imunomodulação durante a infecção viral por SARS-CoV-2, e na contratura capsular após implante mamário (Moreira et al., 2020b; Pinto et al., 2020, 2021a).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a atividade antileishmania, a citotoxicidade e parâmetros de ativação de macrófagos do método de aceleração cicatricial (M.A.C[®]) e seu efeito terapêutico no tratamento da LT em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antileishmania do M.A.C[®] sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Determinar *in vitro* a citotoxicidade do M.A.C[®] sobre macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro e índice de seletividade (IS).
- Avaliar *in vitro* a atividade antileishmania do M.A.C[®] sobre formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos e índice de sobrevivência;
- Investigar *in vitro* a capacidade do M.A.C[®] em ativar macrófagos;
- Determinar a toxicidade e dose letal de 50% (DL₅₀) em larvas de *Zophobas morio*;
- Determinar a eficácia do método M.A.C[®] no tratamento da úlcera leishmaniótica induzidas por *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c e em associação com Anfotericina B;
- Quantificar o índice de retração das feridas cutâneas, através de avaliação clínica;
- Avaliar a carga parasitária através da recuperação de parasitos da lesão leishmaniótica;
- Avaliar alteração e/ou reparo tecidual através da análise histopatológica;
- Quantificar citocinas e nitrito pela análise de esplenócitos

REFERÊNCIAS

- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- BAMOROVAT, Mehdi *et al.* Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: A case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, p. 21–27, 1 abr. 2023.
- BARACHO, Valéria da Silva *et al.* Fototerapia com LED no reparo tecidual de feridas crônicas em pessoas com diabetes: revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 44, p. e20220274, 28 jul. 2023.
- BICHIOU, Haifa *et al.* Transcription Factors Interplay Orchestrates the Immune-Metabolic Response of Leishmania Infected Macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 660415, 7 abr. 2021.
- BLASCOVICH, Hellyangela Bertalha; NOGUEIRA, Adriana Gomes; JESUS COSTA, Ana Cristina P. de. PARÂMETROS E PROTOCOLOS DA LASERTERAPIA UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS DIABÉTICAS. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 96, n. 38, 2022.
- BRASIL. **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. Disponível em: <[http://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=\(\)&show-top-menu=false](http://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=()&show-top-menu=false)>. Acesso em: 23 fev. 2025.
- CABRAL, Fernanda V. *et al.* Photodynamic therapy mediated by a red LED and methylene blue inactivates resistant *Leishmania amazonensis*. **JOSA A, Vol. 40, Issue 5, pp. 996-1005**, v. 40, n. 5, p. 996–1005, 1 maio 2023.
- CASTRO, Regina. **Aumento do número de casos de leishmaniose em cães acende alerta para a doença em humanos | Agência Fiocruz de Notícias**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/aumento-do-numero-de-casos-de-leishmaniose-em-caes-acende-alerta-para-doenca-em-humanos>>. Acesso em: 24 nov. 2025.
- CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.
- COSMA, Claudia *et al.* Leishmaniasis in Humans and Animals: A One Health Approach for Surveillance, Prevention and Control in a Changing World. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 11, p. 258, 1 nov. 2024.
- DAGGER, Francehuli *et al.* *Leishmania mexicana* differentiation involves a selective plasma membrane autophagic-like process. **Cell stress & chaperones**, v. 23, n. 4, p. 783–789, 1 jul. 2018.
- DIDWANIA, Nicky *et al.* Alternative to chemotherapy-the Unmet demand against leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, 21 dez. 2017.

FILHO, N. Reis *et al.* Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 603–612, 1 jun. 2017.

FREITAS, Ana Beatriz Silva *et al.* Efeitos da laserterapia em pacientes com pé diabético. **Clinical & Biomedical Research**, 2022.

FREITAS-MESQUITA, Anita Leocadio; MEYER-FERNANDES, José Roberto. Stage-Specific Class I Nucleases of *Leishmania* Play Important Roles in Parasite Infection and Survival. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 769933, 15 out. 2021.

GAO, Mingnan *et al.* Regulation of inflammation during wound healing: the function of mesenchymal stem cells and strategies for therapeutic enhancement. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1345779, 15 fev. 2024.

HEISKANEN, Vladimir; HAMBLIN, Michael R. **Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes? Photochemical and Photobiological Sciences** Royal Society of Chemistry, , 2018.

HOON SIM, Jee *et al.* **OLED catheters for inner-body phototherapy: A case of type 2 diabetes mellitus improved via duodenal photobiomodulation.** [*S.l.: S.n.*]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

KIM, O. *et al.* In Vitro Bactericidal Effects of 625, 525, and 425 nm Wavelength (Red, Green, and Blue) Light-Emitting Diode Irradiation. <https://home.liebertpub.com/pho>, v. 31, n. 11, p. 554–562, 1 nov. 2013.

LEMOES, Matheus Henrique da Silva *et al.* EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DO PIAUÍ EPIDEMIOLOGY OF THE LEISHMANIOSES IN THE STATE OF PIAUÍ. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 25, n. 2, p. 53–57, 2018.

LIU, Kan *et al.* Antimicrobial effect of methylene blue in microbiologic culture to diagnose periprosthetic joint infection: an in vitro study. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2022.

MINAGAWA, Emika *et al.* Photodynamic reactions using high-intensity red LED promotes gingival wound healing by ROS induction. **Scientific Reports 2023 13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 10 out. 2023.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, 1 mar. 2019.

MOREIRA, Carolina Macedo Alves *et al.* Use of the Scar Acceleration Method/Método de Aceleração Cicatricial—MAC®—in the Treatment of Capsular Contracture: Case Report. **Open Journal of Therapy and Rehabilitation**, v. 8, n. 4, p. 131–142, 27 ago. 2020.

OLIVEIRA, Fabiana Cristina Sales *et al.* AZUL DE METILENO PARA FINS TERAPÊUTICOS METHYLENE BLUE FOR THERAPEUTIC PURPOSES. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 27, n. 2, p. 66–70, ago. 2019.

OPAS. **LEISHMANIOSES: Informe epidemiológico das Américas.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEVT220021_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 3 fev. 2025.

OZLEM-CALISKAN, Sercin *et al.* Evaluation of photodynamic therapy against *Leishmania tropica* promastigotes using different photosensitizers. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 38, n. 4, p. 354–364, 1 jul. 2022.

PEREIRA, Luiz Miguel *et al.* Inhibitory action of phenothiazinium dyes against *Neospora caninum*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

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, 1 jun. 2017.

PINTO, Marcus V. M. *et al.* ANALYSIS OF THE M.A.C® HEALING ACCELERATION METHODOLOGY IN A MUSCLE INJURY. v. 11, n. 11, p. 51670–51675, 2021a.

PINTO, Marcus Vinícius de Mello *et al.* Use of the Scar Acceleration Method - Mac® in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: A Proposal for Treatment in Public Health in Sus, Brazil. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 11, p. 758–765, 11 nov. 2020.

PINTO, Marcus Vinicius de Mello *et al.* A Study of Laser Effectiveness in Injured Tissues Regeneration. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 9, n. 3, p. 55–63, 10 mar. 2021b.

PINTO, Marcus Vinicius de Mello *et al.* Analysis of the Cicatricial Acceleration Method (MAC®) in Skin Repair in Wistar Rattus norvegicus with Induced Chemical Burns. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 12, n. 9, p. 204–214, 2 set. 2024.

PRADHAN, S. *et al.* Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 1 mar. 2022.

SALUD, Organización Panamericana de la. Síntesis de evidencia y recomendaciones: directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e43, 2023.

SECRETARIA DE SAÚDE DO PIAUÍ. **Sesapi realiza capacitação para vigilância e o controle das leishmanioses no estado – pi.gov.** Disponível em: <<https://www.pi.gov.br/sesapi-realiza-capacitacao-para-vigilancia-e-o-controle-das-leishmanioses-no-estado/>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

SENA, Natã Ferreira Gama de; MEIRA, Carlos Eduardo. Photobiomodulation in the stability of dental implants. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 7, p. e13913746238–e13913746238, 29 jul. 2024.

SOUSA, Raimundo Leoberto Torres *et al.* Association between the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* and leishmaniasis incidence in Piauí State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 6, p. e0011388, 1 jun. 2023.

SUNTER, Jack Daniel; MOREIRA-LEITE, Flavia; GULL, Keith. Dependency relationships between IFT-dependent flagellum elongation and cell morphogenesis in *Leishmania*. **Open biology**, v. 8, n. 11, 1 nov. 2018.

UZUN, Soner *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. **International journal of dermatology**, v. 57, n. 8, p. 973–982, 1 ago. 2018.

WANG, Songyun *et al.* Light Emitting Diode Therapy Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Mitigating Neuroinflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, n. 1, p. 9343160, 1 jan. 2020.

WEI, Ling *et al.* Using machine learning to dissect host kinases required for *Leishmania* internalization and development. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 16 maio 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

ZHANG, Wen Wen *et al.* Light-emitting diode phototherapy: pain relief and underlying mechanisms. **Lasers in Medical Science** 2022 37:5, v. 37, n. 5, p. 2343–2352, 11 abr. 2022.

ZUCOLOTTO, Thiago Elias *et al.* Cicatrização de feridas: uma revisão sob o escopo cirúrgico. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 31210–31220, 12 dez. 2023.

Terapia Fotodinâmica com o Método de Aceleração Cicatricial (MAC[®]): Seletividade *in vitro* contra formas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Paulline Paiva Mendes de Souza Leal^{1,2}; Marcus V. de M. Pinto³, Francisco das C. de S. Cunha^{1,2}, Bianca S. dos Anjos¹, Maria R. M. de Castro¹, Ana C. B. dos S. Soares¹, Lucas C. V. Monteiro¹, Vinicius S. Silva¹, Fernando A. de A. Carvalho¹; Michel Mualem de M. Alves^{1,2}

- 1- BioLeish- Pesquisa Avançada em Leishmania e Modelos Alternativos - Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais. Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
- 2- Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional. Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
- 3- Instituto Celulare, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Criador da Metodologia de Aceleração Cicatricial MAC[®]

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, com manifestações clínicas cutâneas; mucosas, mucocutâneas e visceral. Os tratamentos convencionais apresentam limitações, efeitos adversos e baixa continuidade por parte do paciente, o que exige novas abordagens terapêuticas, como a terapia fotodinâmica. O Método de Aceleração Cicatricial (MAC[®]) é uma terapia baseada em LED/Laser associado a um biomarcador e, quando necessário, a um fotofármaco para potencializar o tratamento de lesões cutâneas. Nesse sentido, este estudo avaliou a atividade do Azul de Metileno (AM) associado ao método MAC[®] sobre *Leishmania amazonensis* e utilizou-se de abordagens *in vitro* e *in vivo* para avaliar a segurança do tratamento proposto. Foram realizados ensaios contra promastigotas e amastigotas e avaliação da citotoxicidade em macrófagos e em eritrócitos. Adicionalmente, investigou-se a atividade lisossomal; capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico. Também se realizou ensaios de toxicidade aguda; pigmentação e dosagem de nitrito em larvas de *Zophobas morio*. Os grupos experimentais incluíram: controle; AM; LED; MAC[®]; Anfotericina B (Anf B) e MAC[®] + Anf B. Os resultados evidenciaram que todos os tratamentos inibiram formas evolutivas do parasito. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) contra amastigotas foram de 5,99 µM (AM); 110,25s (LED); 10,92s (MAC[®]) e 0,20 µg/mL (Anfotericina B) e os valores de concentração citotóxica média (CC₅₀) para macrófagos foram 155,61 µM; 6.040,77s; 605s e 8,75 µg/mL, respectivamente. Não se observou toxicidade para eritrócitos em nenhum dos tratamentos e os índices de seletividade (IS) foram elevados (>25). Além disso, observou-se que os tratamentos foram capazes de ativar a fagocitose. Observou-se baixa toxicidade em larvas de *Zophobas morio*. Apenas o MAC[®] apresentou, no maior intervalo de tempo e maior dose do AM, uma redução de 20% na viabilidade das larvas. Assim, conclui-se que o MAC[®] apresentou os melhores resultados, podendo ser uma abordagem promissora para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.

Palavras - Chave: Doenças negligenciadas, terapia fotodinâmica, curva espaço-tempo, azul de metileno, Leishmanioses.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, with cutaneous, mucosa, mucocutaneous and visceral clinical manifestations. Conventional treatments have limitations, adverse effects, and low patient adherence, requiring new therapeutic approaches, such as photodynamic therapy. The Scar Acceleration Method (MAC[®]), a non-invasive and easy-to-apply method, is a photodynamic therapy based on LED/Laser associated with a biomarker and, when necessary, a photopharmaceutical to enhance the treatment of cutaneous lesions. In light of this, was evaluated the activity of the photopharmaceutical Methylene Blue (MB) associated with LED and the MAC[®] method on *L. amazonensis*; this work included *in vitro* and *in vivo* approaches to evaluate the biological activity and safety of the proposed treatment. *In vitro*, the activity against promastigote forms, cytotoxicity tests in peritoneal macrophages and sheep erythrocytes was evaluated, as well as assessment against amastigotes internalized in macrophages. Additionally, macrophage activation was investigated through analysis of lysosomal activity, phagocytic capacity, and nitric oxide production. Acute toxicity, pigmentation, and nitrite dosage assays were also conducted using *Zophobas morio* larvae model. In both stages, the experimental groups included: control, AM, LED, MAC[®], Amphotericin B (Amp B), and MAC[®] + Amphotericin B. The results showed that all treatments inhibited promastigote forms of the parasite in a dose and time-dependent manner. The mean inhibitory concentration (IC₅₀) values against amastigotes internalized in macrophages were 5.99 μ M (AM); The mean cytotoxic concentration (CC₅₀) values for murine macrophages were 110.25s (LED); 10.92s (MAC[®]) and 0.20 μ g/ml (Amp B), and the mean cytotoxic concentration (CC₅₀) values for murine macrophages were 155.61 μ M; 6040.77s; 605s and 8.75 μ g/ml, respectively. No toxicity to sheep erythrocytes was observed in any of the treatments used. The selectivity indices (SI) found were high (>54). Furthermore, it was observed that the treatments used were able to activate phagocytosis in macrophages. In the *in vivo* toxicity assay on *Zophobas morio* larvae, only MAC[®], at the longest time interval used, reduced larval viability by 20%. Thus, it can be concluded that MAC[®] was able to act on the different evolutionary forms of the parasite, in addition to activating macrophages, and may be a promising approach for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Neglected diseases; photodynamic therapy; space–time curve; methylene blue; leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses pertencem ao grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos. Amplamente distribuída, a Leishmaniose está presente em 99 países com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas (OPAS, 2022). Suas manifestações clínicas podem ser: tegumentar, cutânea, mucosa, mucocutânea e visceral, sendo a forma cutânea a que pode apresentar lesões ulceradas no local da infecção, podendo causar deformidades nos pacientes (Pereira et al., 2020).

Os tratamentos convencionais para as leishmanioses baseiam-se em quatro fármacos: os antimoniais pentavalentes (Glucantine[®] e Pentostam[®]), a pentamidina (Pentam-300[®]), a anfotericina B[®] e a miltefosina (Milteforan[®]). Além destes, outros fármacos são utilizados, como a Paromomicina. Contudo, esses fármacos estão associados a diversos efeitos adversos, além de apresentarem alto custo, disponibilidade limitada e, em sua maioria, requererem administração parenteral em ambiente hospitalar, fatores que comprometem a adesão e a continuidade do tratamento pelos pacientes (Bamorovat et al., 2023). Diante desses desafios, torna-se evidente a necessidade de investigar e desenvolver novas alternativas terapêuticas.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa promissora, visto que podem ser utilizadas como tratamento local, não invasiva (não necessitando de ambiente hospitalar) e ainda ser efetiva contra diferentes patógenos por ter um mecanismo de indução de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem atuar também em sinergismo com a resposta imune do hospedeiro na ativação celular (Vital-Fujii; Baptista, 2021).

A TFD é a junção de três elementos, luz (LED/Laser), fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular para promover a formação de EROs. O Método de Aceleração Cicatricial (MAC[®]), consiste em uma terapia fotodinâmica avançada que envolve luzes (lasers e LEDs) com comprimento de onda que varia de 405 nm a 960 nm, promovendo a ativação de substâncias fotossensíveis (fotofármacos) e a fotobiomodulação do processo biológico celular. A dosimetria de emissão da luz, neste caso, deve ser ajustada pelo tempo de exposição e comprimento de onda desejado, sendo assim o método pode ser aplicado de duas formas: monodoses e doses. As monodoses consistem em subdosas terapêuticas, sendo fracionadas em diferentes comprimentos de ondas e dobras do tempo sendo determinada em segundos. Esse tempo de duplicação pode ser ajustado individualmente de acordo com a sua comorbidade, aumentando ou diminuindo o tempo de exposição do LED de acordo com as necessidades terapêuticas. Já na modalidade de dose, o tempo de exposição e o comprimento de onda são mantidos constantes durante toda a aplicação. Dessa forma o MAC[®] oferece flexibilidade

e precisão no controle dos parâmetros fototerápicos, potencializando os efeitos biológicos desejados e promovendo a otimização dos processos de cicatrização, além de promover a eliminação de microrganismos (Pinto et al., 2024).

Recentemente tem sido observada a eficácia do tratamento MAC[®] em diversos tipos de doenças como: vulvovaginite por *Candida albicans* (Pinto et al., 2020) ; cicatrização de úlceras nos membros inferiores (Pinheiro et al., 2024); em feridas infeccionadas (Su et al., 2020) e em pós-operatório de cirurgia estética (Moreira et al., 2020). Foi relatado ainda que espécies reativas de oxigênio (EROs) resultantes deste protocolo são citotóxicos para a célula alvo, levando à morte do microrganismo por causarem desordens na parede celular (Moura; Brandão; Barcessat, 2018) e que pode aumentar a produção de adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias, sendo este fato importante para o processo de cicatrização (Pinto et al., 2024) .

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antileishmania, citotóxica e parâmetros de ativação de macrófagos *in vitro* do MAC[®], bem como determinar a toxicidade aguda *in vivo* em larvas de *Zophobas morio*.

2. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

2.1. Local de execução

Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Laboratório de Pesquisa Avançada em *Leishmania* e Modelos Alternativos – BioLeish, no Núcleo de Pesquisas de Plantas Medicinais – NPPM do CCS/UFPI e no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias (DMV/CCA/UFPI).

2.2. Substâncias utilizadas

Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%), adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, soro fetal bovino (SFB), meio RPMI, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio Bromo, Azul Alamar (Resazurina[®]), azul de Trypan, o lipopolisacárideo bacteriano (LPS) e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina advindos da Sigma Chemical (Merck – Rio de Janeiro, Brasil). O antibiótico, Anfotericina B (Anf B 90%), panótico rápido[®] foram adquiridos da Cristália (São Paulo, SP). Azul de metileno (AM) foi adquirido da Valdequímica Produtos Químicos LTDA (São Paulo, SP), e foram realizadas diluições seriadas obtendo três faixas de concentração: 15,00; 7,50 e 3,75 µM.

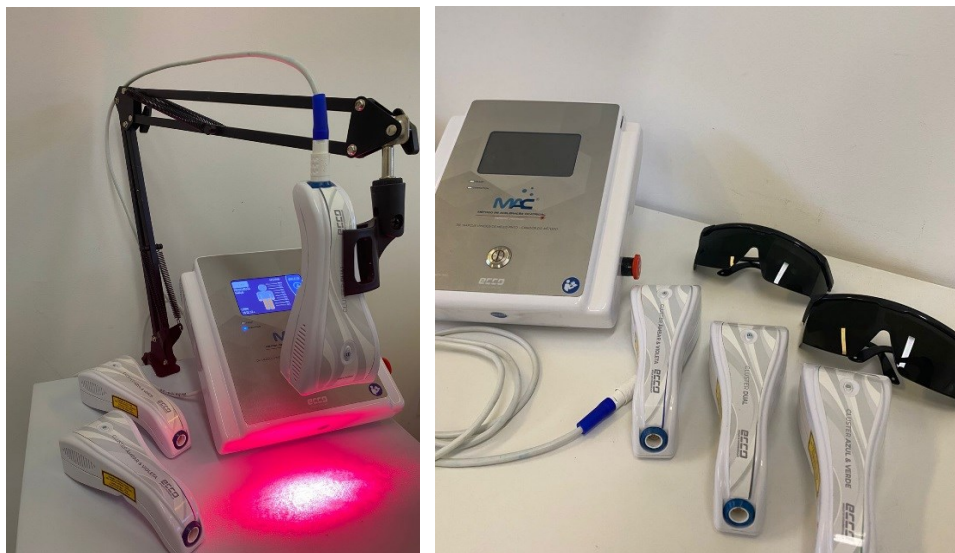
2.3. Equipamento de fototerapia

O LED utilizado na pesquisa foi um equipamento patenteado do MAC[®], fabricado pela empresa Ecco Fibras[®] (Campinas, São Paulo, Brasil). Este aparelho utiliza LEDs semicondutores sólidos, ligados entre si e que fornecem uma luz de alta potência e confiabilidade, garantindo uma distribuição de irradiação uniforme e constante. A irradiância do equipamento varia entre 150 a 400 mW/cm².

O aparelho é composto por três clusters emissores de luz, cada cluster fornecendo o dobro ou o triplo da irradiância mencionada. Sendo assim distribuídas da seguinte forma: Cluster Dual LED vermelho e infravermelho (660 e 880nm), cluster azul e verde (460 e 520nm) e por último o cluster âmbar e violeta (590 e 405nm) respectivos (Figura 8). Este equipamento permite tanto a configuração manual, onde permite personalizar parâmetros como o comprimento de onda e o tempo de exposição da luz, quanto a utilização de protocolos pré-definidos. Esses protocolos otimizam o tratamento ao sugerir o fotossensibilizador, comprimento de onda e tempo de exposição mais adequados para cada patologia, incorporando também quando necessário a aplicação de doses fracionadas com variações de comprimento de onda e tempo de exposição.

O AM está presente em diversos protocolos do MAC[®] por ser um fotossensibilizador de baixo custo e possuir propriedades terapêuticas como, antisséptico e antimicrobiano.

Figura 8 — Demonstração do equipamento de fototerapia.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.4. Parasitos e células

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), foram obtidas no Laboratório de Pesquisa Avançada em Leishmania e Modelos Alternativos - BioLeish, da Universidade Federal do Piauí, cultivadas em meio Schneider's (Sigma, EUA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e (Sigma, EUA e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg) a 26 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.).

Para avaliação da citotoxicidade, capacidade fagocítica, atividade lisossomal e síntese de óxido nítrico foram coletados macrófagos murinos das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c fêmeas (4 a 5 semanas de idade), após elicitação prévia (72 h) pela aplicação de 2 mL de tioglicolato (Kasvi, Espanha) a 3% via intraperitoneal desses animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e mantidos no Biotério setorial do NPPM/UFPI. Para avaliar a citotoxicidade sobre os eritrócitos de carneiro, foi coletado o sangue de carneiro (9 meses de idade) do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI) localizado em Teresina, PI, Brasil. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal nº 789/2023.

Os invertebrados (*Zophobas morio*) utilizados nos experimentos foram provenientes do Laboratório de Ciências Fisiológicas do Departamento de Morfologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias/UFPI, onde foram mantidas em caixas organizadoras de plástico com dimensões de 60 x 40 x 80cm com alimentação constituída de farelo de trigo e pedaços de batata para fonte de hidratação, em sala fechada com temperatura ambiente de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para o experimento foram selecionadas as larvas adultas pesando 450 mg, com cor clara e uniforme sem sinal de melanização (Rumbos; Athanassiou, 2021).

2.5. Tempo de Exposição de Luz e concentração/dose do Azul de Metileno

Tabela 1 — Metodologia aplicada para os seguintes testes: promastigota, amastigota internalizada, atividade lisossomal, capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico.

LED/Tempo de tratamento (segundos)			
GRUPOS	Vermelho (λ 660 n)	Azul (λ 460 n)	Âmbar (λ 590 n)
LED 1	56	26	13
LED 2	110	55	25
LED 3	220	110	55

MAC/Tempo de tratamento (segundos)				AM (μM)
MAC 1	14	7	4	3,75
MAC 2	28	14	8	7,5
MAC 3	56	29	15	15

*AM: grupo isolado de azul de metileno e associado ao grupo MAC®.

Tabela 2 — Tempo de exposição à luz para os testes de citotoxicidade em macrófago peritoneal murino e em eritrócito de carneiro. E avaliação da toxicidade aguda, pigmentação e produção de nitrito em larvas de *Zophobas morio*.

LED/Tempo de tratamento (segundos)				
Grupo	Vermelho (λ 660 n)	Azul (λ 460 n)	Âmbar (λ 590 n)	AM* (μM)
LED 1/ MAC 1	225	112	56	3,75
LED 2/ MAC 2	450	225	112	7,5
LED 3/ MAC 3	900	450	225	15

*AM: grupo isolado de azul de metileno e associado ao grupo MAC®.

2.6 Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento foram semeadas em placas de cultivo celular de 96 poços (1×10^6 por poço) contendo as concentrações de 3,75; 7,5 e 15 μM de AM. Para o tratamento de LED e MAC[®], as promastigotas foram expostas a três comprimentos de onda específicos: luz vermelha (660 nm), azul (460 nm) e âmbar (590 nm). A escolha desses comprimentos de onda se baseia em estudos anteriores que indicam seus potenciais propriedades antimicrobianas e efeitos sobre a viabilidade celular (Hamblin; Hasan, 2004; Pimenta et al., 2025).

Para os tratamentos seguiu-se o tempo de exposição da luz e concentração do AM, já descrito na tabela 1. A Anfotericina B (Anf B) foi utilizada na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ como controle positivo. As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D) na temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após esse período foram acrescentados 20 μL resazurina (1 mM) na placa e incubada novamente por 4 h. Posteriormente, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de microplacas (Biotek Elx800; Vermont, EUA) a 550 nm, para a avaliação da inibição do crescimento (Alves et al., 2017).

2.7 Avaliação de citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos e índice de Seletividade (IS)

Em placa de 96 poços foram adicionados 2×10^5 macrófagos por poço e, em seguida, foi incubada a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas para adesão das células à placa. Após esse período, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, para retirada das células que não aderiram e então foram adicionados 100 μL de meio RPMI 1640 Sigma Chemical (Merck – Rio de Janeiro, Brasil), (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina).

Para a condução dos tratamentos, as placas foram organizadas em grupos experimentais contendo concentrações de AM de 100, 200 e 300 μM e tempos de exposição à luz conforme descrito na tabela 2.

Após os tratamentos as placas foram incubadas por 48 horas, ao término desse período, foi adicionado 10% de MTT na concentração de 5 mg/mL em cada poço e incubado novamente por 4 horas em estufa 37°C com 5% de CO_2 . Por fim, o sobrenadante foi descartado e, então, foi adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para lise total das células. As placas foram agitadas por cerca de 30 minutos no agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizado a leitura a 550 nm em leitora de placa (Alves et al., 2017). O índice de seletividade de cada tratamento foi calculado dividindo a concentração citotóxica

média (CC₅₀) observada para macrófagos pela concentração inibitória média (CI₅₀), calculada para as formas amastigotas do parasito.

2.8 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro, coletado com anticoagulante (EDTA). Após a coleta, foi realizado o hematócrito e ajustado para 5% de hemácias, onde foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços e os grupos foram tratados como citado na tabela 2. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH₅₀) considerando o controle positivo como 100 % de hemólise (Sæbø et al., 2023).

2.9 Atividade antileishmania sobre formas amastigotas internalizadas em macrófagos.

Os macrófagos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células/poço em 500 µL de RPMI suplementado, contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 h para a adesão dos macrófagos. Os macrófagos aderidos foram então incubados com um novo meio contendo formas promastigotas na fase estacionária de crescimento, numa razão de 10 promastigotas para cada macrófago e incubados novamente a 5% de CO₂ e 37 °C, *overnight*. Passado esse período, o meio foi aspirado para remover parasitos não internalizados e um novo meio de cultura foi acrescentado.

Seguindo a metodologia da tabela 1, as placas foram distribuídas em grupos específicos, variando-se a concentração de AM e o tempo de exposição de luz. Também foram incluídos grupos controles, sendo um controle positivo tratado com Anf. B na concentração de 0,2 µg/mL e controle negativo que consistiu apenas de macrófago infectados sem tratamento.

Finalizado os tratamentos, as placas foram levadas para estufa CO₂ por 48 h e após, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando o panóptico rápido®. Para cada tratamento, contou-se os números de macrófagos infectados (% de infecção) e a carga parasitária (índice de amastigotas sobreviventes) percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica (Bezerra et al., 2020).

2.10 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos

2.10.1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi obtida pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de extração utilizada consiste de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio 1% p/v em água destilada (Grando et al., 2009).

2.10.2 Concentrações e tempo de exposição utilizados para os testes de ativação de macrófagos.

Os tratamentos foram organizados em quatro grupos principais: AM, LED, MAC[®] e controle. Para os grupos AM e MAC[®] os macrófagos foram submetidos a diferentes concentrações do FS (3,75; 7,50; e 15,00 μ M). Para o grupo LED, as células foram expostas à luz em três protocolos distintos: LED 1 (95 segundos, sendo: 56 s para a luz de vermelha, 26 s para a luz azul, 13 s para a luz âmbar), LED 2 (190 segundos correspondendo a: 110 s para a luz vermelha, 55 s para a luz azul, 25 s para a luz âmbar) e LED 3 (380 segundos da seguinte forma: 220 s para a luz vermelha, 110 s para a luz azul, 55 s para a luz âmbar). Para o grupo MAC[®] combinou-se diferentes concentrações de AM e tempos de exposição de luz: MAC[®] 1 (3,75 μ M de AM com exposição de luz total de 25 s: 14 s para a luz vermelha, 7 s para a luz azul, 4 s para a luz âmbar), MAC[®] 2 (7,5 μ M de AM com exposição de luz total de 50 s, sendo: 28 s para a luz vermelha, 14 s para a luz azul, 8 s para a luz âmbar) e MAC[®] 3 (15 μ M de AM com exposição de luz total de 100 s, sendo: 56 s para a luz vermelha, 29 s para a luz azul e 15 s para a luz âmbar).

2.10.3 Determinação da capacidade fagocítica

Após o plaqueamento e a incubação dos macrófagos peritoneais (2×10^5 /poço) a 37 °C com 5% de CO₂ por 4 horas, os tratamentos específicos de cada grupo foram aplicados e posteriormente incubados em estufa a 37 °C a 5% de CO₂, por 48 h onde foram acrescentados 10 μ L de solução de zimosan corado e incubado por 30 min a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de fixador de Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, as placas foram lavadas com salina 0,9% a fim de remover as partículas de zimosan não fagocitadas pelos macrófagos. Após a lavagem, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 μ L de solução de extração e, após solubilização em

agitador de Kline, a placa foram lidas no leitor de placas (Biotek Elx800, Vermont, EUA) a 550 nm (Nunes et al., 2021).

2.10.4 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados a 37° C e 5% de CO₂ por 4 horas conforme citado no item anterior. Após esse tempo, o sobrenadante foi removido para retirar as células não aderentes e, em seguida foram realizados os tratamentos correspondentes a cada grupo. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 2% de DMSO e incubou-se novamente nas mesmas condições por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionado 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline as placas foram avaliadas no leitor de placas (Biotek Elx800, Vermont, EUA) a 550 nm (Nunes et al., 2021).

2.10.5 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço e incubados a 37° C e 5% de CO₂ por 4 horas na presença ou na ausência de forma promastigotas *L. amazonensis* na concentração de 1×10^6 por poço. Posterior a isso, as placas foram tratadas como citadas no protocolo 2.10.2 e o LPS (lipopolisacáride de *Escherichia coli*) foi utilizado como controle para aumento da indução de óxido nítrico).

Transcorrido o tratamento, as placas foram incubadas novamente por 24 horas, após esse período, os sobrenadantes foram transferidos do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® a concentrações variadas de 1,1; 2,3; 4,6; 9,3; 18,7; 37,5; 75; 150; 300; 600 µM diluídos em meio RPMI 1640. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão e das placas tratadas, com o mesmo volume do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em H₃PO₄ 10 % (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1 % naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procedeu a leitura das absorbâncias na leitora de placa (Biotek Elx800, Vermont, EUA) a 550 nm (Carvalho et al., 2023).

2.11 Avaliação da toxicidade aguda em larvas de *Zophobas morio*

Para avaliação da toxicidade aguda, foram aplicados 10 μ L do AM nas doses de 3,70; 7,50 e 15,00 μ M/Kg no terceiro esternito, logo após o último par de patas das larvas na porção ventral com auxílio de seringa tipo Hamilton, sendo aplicado no grupo tratado com AM de forma isolada e no grupo tratado com MAC[®]. Para os tratamentos LED e MAC[®] ambos utilizaram o mesmo tempo de exposição de luz, sendo distribuídas da seguinte forma: no tratamento LED 1 e MAC[®] 1 a exposição total à luz de 393 segundos com a seguinte distribuição: 225 segundos para a luz vermelha, 112 segundos para a luz azul e 56 segundos para a luz âmbar. Para o tratamento LED 2 e MAC[®] 2 com exposição total à luz aumentada para 787 segundos, redistribuindo-se o tempo em 450 segundos para a luz vermelha, 225 segundos para a luz azul e 112 segundos para a luz âmbar. E por fim, o tratamento LED 3 e o MAC[®] 3 com maior tempo de exposição, totalizando 1575 segundos, com a seguinte distribuição: 900 segundos para a luz vermelha, 450 segundos para a luz azul e 225 segundos para a luz âmbar.

No controle negativo foram aplicados 10 μ L de solução salina e no controle positivo 10 μ L de DMSO (figura 9).

A taxa de sobrevivência foi avaliada por 24 e 48 h, por meio de verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de melanização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave. Após esse período, os exemplares de cada grupo foram armazenados em tubo Falcon de 50 mL e congelados a - 40 °C para posterior análise da pigmentação (melanização) e nitrito (Campelo et al., 2024).

Figura 9 — Forma de Aplicação da substância e exposição de luz no *Zophobas morio*.



Legenda: Imagem demonstrativa de administração transdérmica do inoculo no primeiro esternito após o último par de patas em larva de *Zophobas morio*. Método de contenção da larva (A), local da inoculação (B), aplicação da luz (C).

2.11.1 Avaliação da Pigmentação da *Zophobas morio*

Para o ensaio de quantificação do teor de pigmentação as larvas foram congeladas a -20°C por 1 h. Posteriormente, cada larva foi então macerada em um almofariz com 2 mL de PBS com pH 7,4. O homogenato foi transferido para um microtubo de 2 mL e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C (Alves et al., 2025).

Após, foi retirado 100 μL do sobrenadante e adicionado em duplicata em uma placa de 96 poços. Em seguida, foi realizado a leitura em espectrofotômetro (Biotek Elx800, Vermont, EUA) a 550 nm,

2.11.2 Ensaio de Nitrito por método de Griess em homogenato de *Zophobas morio*

A concentração de nitrito foi determinada pelo método de Griess como descrito por Green et al. Utilizou-se o sobrenadante do homogenato de *Z. morio* que foram desproteinizadas pela adição de solução de sulfato de zinco de acordo com protocolo de Romitelli et al., (2007). Num microtubo foram adicionados 180 μL de solução de sulfato de zinco (ZnSO_4) a 0,15 M, 3 μL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10 M, e 300 μL da amostra. Incubou-se em gelo por 15 minutos e posteriormente foi centrifugado a 14.600 rpm por 10 minutos, onde obteve o sobrenadante desproteinizado. Em seguida, foram adicionados numa microplaca 100 μL do sobrenadante desproteinizado em duplicata e adicionado 100 μL do reagente de Griess em cada poço. Após 10 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Biotek Elx800, Vermont, EUA) a 550 nm. A obtenção dos resultados foi através da comparação entre a curva de calibração e os valores de absorbância obtidos para a amostra. A curva de calibração foi realizada pela leitura espectrofotométrica a 550 nm, em diluições seriadas (1,1; 2,3; 4,6; 9,3; 18,7; 37,5; 75; 150; 300; 600 μM) com solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 10 mM. Utilizou-se para o branco 100 μL de água destilada e 100 μL de reagente de Griess (Vargas-Maya et al., 2021).

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata, a concentração inibitória médias (CI_{50}), concentração citotóxica média (CC_{50}) com limite de confiança de 95%, foram calculadas utilizando regressão de probitos. O índice de seletividade foi calculado dividindo a CC_{50} pela CI_{50} . Já nos testes *in vivo* as análises de sobrevivência foram determinadas por meio de teste de Log-rank e as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. Por fim, foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

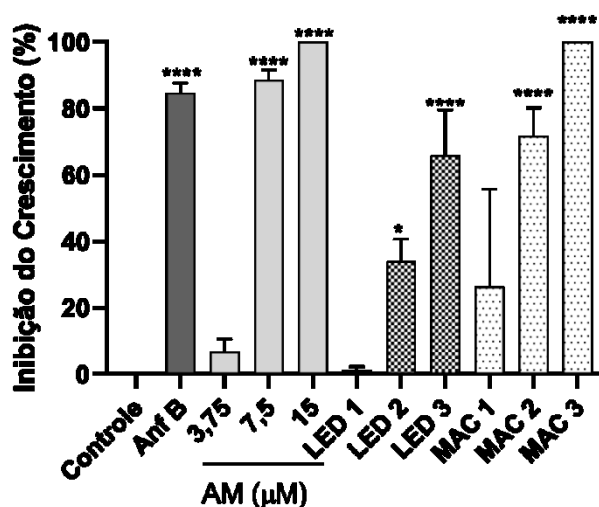
4 RESULTADOS

4.1. Ensaio de atividade antileishmania

Todos os tratamentos AM, LED e MAC[®] promoveram inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, dependente da concentração e do tempo de exposição. Observou-se 100% de inibição do crescimento dos parasitos, na concentração de 15 μ M para o AM, assim como para o MAC[®] 3 sendo este o maior tempo de exposição de luz e concentração do AM (Figura 10).

Os valores de CI₅₀ do AM, LED, MAC[®] e da Anf B foram de 5,99 μ M, 260,81s, 33,77s e 0,20 μ g/mL respectivamente. Os resultados demonstraram que o MAC[®] é 7 vezes mais eficaz contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, do que a terapia fotodinâmica convencional utilizando apenas o LED.

Figura 10 — Atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

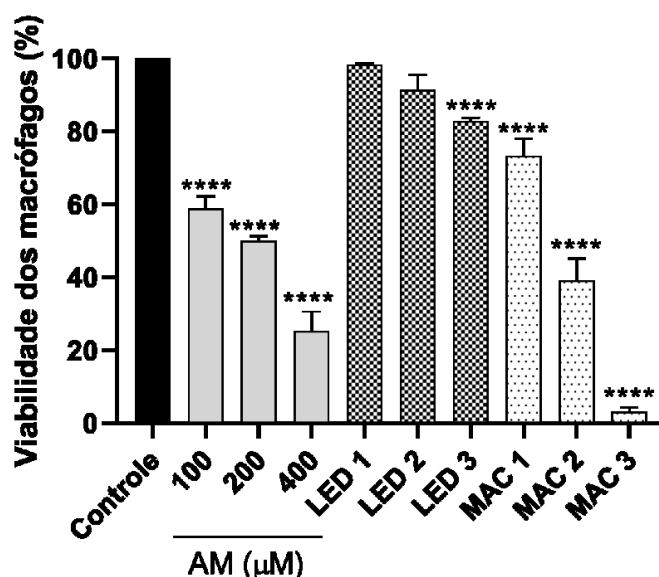


Legenda: Os parasitos foram expostos a diferentes concentrações de AM e tempos de exposição de luz (LED 1: 56 s de vermelho; 26 s de azul; 13 s de âmbar, LED 2: 100 s de vermelho; 55 s de azul; 25 s de âmbar, LED 3: 220 s de vermelho; 110 s de azul; 55 s de âmbar), e o MAC[®] (MAC[®] 1: AM 3,75 μ M + 14 s de vermelho; 7 s de azul, e 4 s de âmbar, MAC[®] 2: AM 7,5 μ M + 28 s de vermelho; 14 s de azul, e 8 s de âmbar, MAC[®] 3: AM 15 μ M + 56 s de vermelho; 29 s de azul, e 15 s de âmbar) e Anf B (2 μ g / mL) por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina[®]. Os dados estão representados com valores médios de ensaios realizados em triplicata. * representa diferença significativas entre os grupos tratados e o controle, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

4.2. Citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos

Na avaliação da citotoxicidade sobre os macrófagos, foi possível observar que o tratamento LED reduziu a viabilidade celular no maior tempo de exposição (LED 3) (Figura 11), apresentando o valor de CC_{50} de 6.040,77, enquanto o MAC[®] (CC_{50} 605,23s) reduziu a viabilidade dessas células de forma significativa demonstrando que a associação luz e fotossensibilizador apresenta citotoxicidade dependente da concentração do AM (CC_{50} 155,61 μ M) e tempo de exposição do LED.

Figura 11 — Efeitos citotóxicos dos tratamentos do AM, LED e MAC[®] em macrófagos peritoneais murinos.

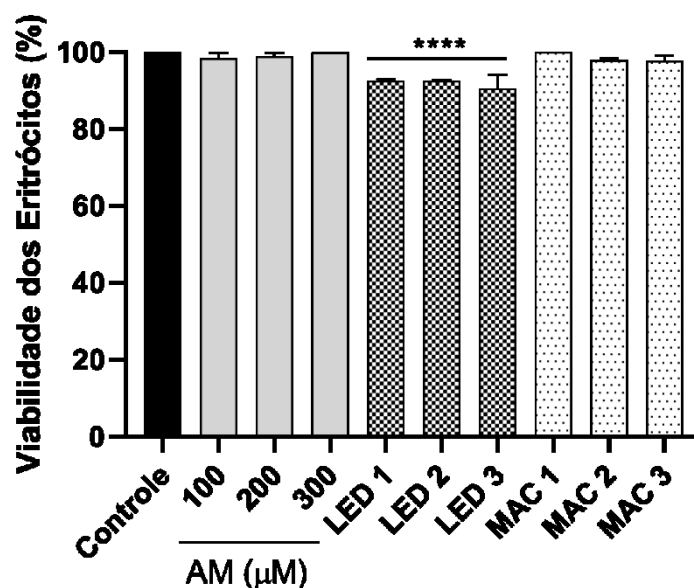


Legenda: Macrófagos foram incubados por 48 h na presença de diferentes concentrações AM (100, 200 e 300 μ M) e tempos de exposição do LED e MAC[®] (LED 1 / MAC[®] 1: 225 s de vermelho, 112 s do azul e 56 s do âmbar; LED 2 / MAC[®] 2: 450 s vermelho, 225 s do azul e 112 s do âmbar e LED 3 / MAC[®] 3: 900 s do vermelho, 450 s do azul e 225 s do âmbar). No grupo tratado com MAC[®] foram adicionadas as concentrações do AM de forma respectivas 100, 200 e 300 μ M. A viabilidade dos macrófagos foi mensurada pelo sal tetrasólico (MTT). Os dados são representados como valores médios realizados em triplicata. * denota diferença significativas entre os grupos tratados e o controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.3. Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Não houve redução da viabilidade de forma significativa nos eritrócitos tratados com AM e MAC[®]. No entanto, as células eritrocitárias tratadas com LED, apresentaram baixa toxicidade (figura 12) não sendo possível determinar os valores de concentração hemolítica 50 (CH_{50}) nas concentrações de AM e tempos de exposição ao LED e MAC[®] testadas.

Figura 12 — Representação gráfica da atividade hemolítica dos tratamentos: AM, LED e MAC[®].



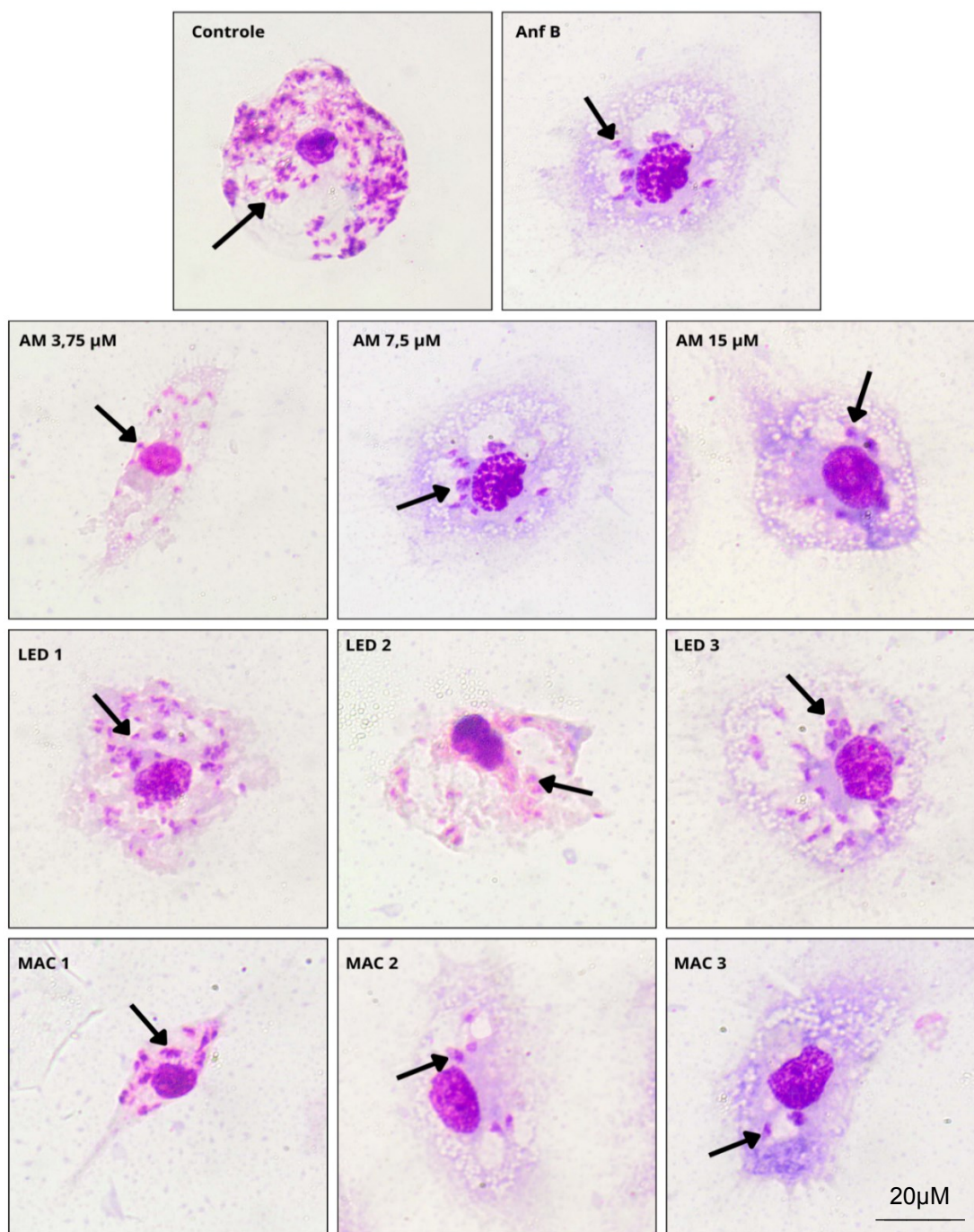
Legenda: A atividade foi avaliada através da incubação de eritrócitos de carneiro a 5%, coletado com anticoagulante (EDTA) e diferentes concentrações do AM além de diferentes tempos de exposição ao LED e MAC[®] (LED 1 / MAC[®] 1: 225 s de vermelho, 112 s do azul e 56 s do âmbar; LED 2 / MAC[®] 2: 450 s do vermelho, 225 s do azul e 112 s do âmbar e LED 3 / MAC[®] 3: 900 s do vermelho, 450 s do azul e 225 s do âmbar). No grupo tratado com MAC[®] foram adicionadas as concentrações do AM (100, 200 e 300 μ M) de forma respectivas. Posterior, foram incubados a 37° C por 1 hora. A absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro a 550 nm. Os dados são representados como valores médios realizados em triplicata. * denota diferença significativas entre os grupos tratados e o controle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.4. Atividade sobre amastigotas internalizadas e determinação do Índice de Seletividade (IS)

Para esse ensaio foi realizado infecção de macrófagos *in vitro* por *L. amazonensis* (figura 13) com a finalidade de se investigar o índice de sobrevivência; a concentração inibitória média (CI₅₀); concentração citotóxica média (CC₅₀); além de se determinar o índice de seletividade (IS). Os resultados mostraram que o grupo controle negativo apresentou 100% de macrófagos infectados. Por outro lado, o tratamento com Anfotericina B, na concentração de 0,2 μ g/mL, reduziu a taxa de infecção em aproximadamente 28% (figura 14 A).

O AM, isoladamente, reduziu a infecção em 35% e 59% nas concentrações de 7,50 μ M e 15,00 μ M, respectivamente. A exposição à luz no tratamento LED 3 (220 s vermelho; 110 s azul e 55 s âmbar), promoveu uma redução de 22%. Para o tratamento MAC[®] 2 (7,50 μ M de AM e 28 s luz vermelha; 14 s azul e 8 s âmbar) e MAC[®] 3 (15,00 μ M de AM associado a 56 s vermelho; 29 s azul e 15 s âmbar), observou-se uma redução de 58% e 80%, respectivamente. Tendo o tratamento MAC[®] 3 apresentado desempenho superior ao dos componentes isolados e à Anfotericina.

Figura 13 — Macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

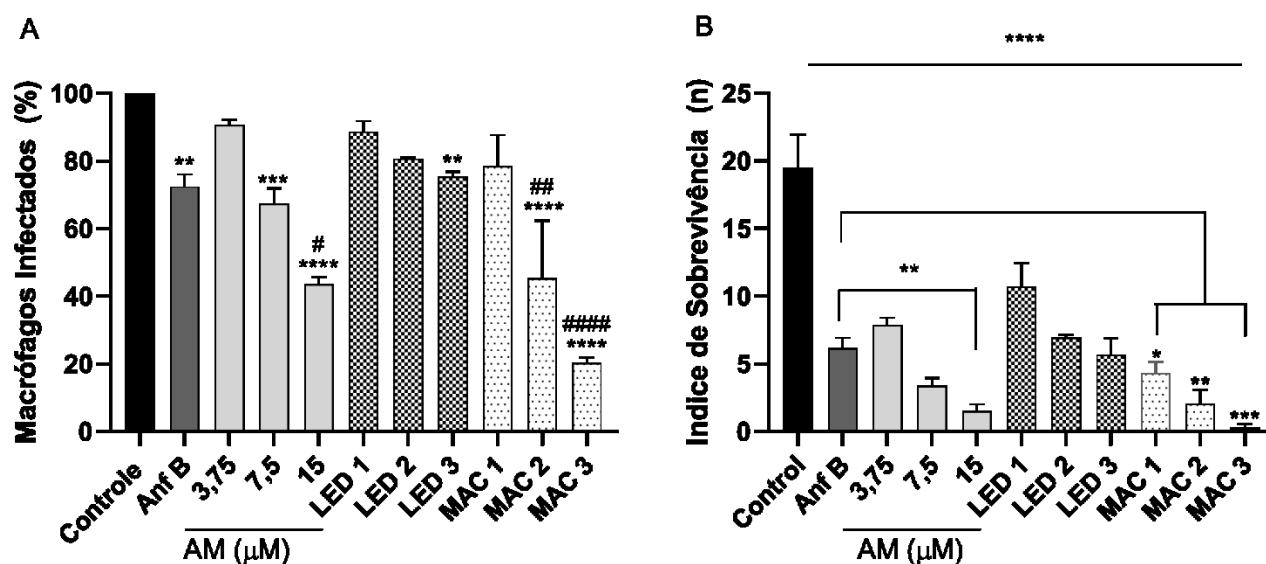


Legenda: A Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 µg/mL, o AM de 3,75; 7,50 e 15,00 µM (concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ x CI_{50} ; 1 x CI_{50} e 2 x CI_{50}). (LED 1: 56 s de vermelho; 26 s de azul; 13 s de âmbar, LED 2: 100 s de vermelho; 55 s de azul; 25 s de âmbar, LED 3: 220 s de vermelho; 110 s de azul; 55 s de âmbar), e o MAC[®] (MAC[®] 1: AM 3,75 µM + 14 s de vermelho; 7 s de azul, e 4 s de âmbar, MAC[®] 2: AM 7,5 µM + 28 s de vermelho; 14 s de azul, e 8 s de âmbar, MAC[®] 3: AM 15 µM + 56 s de vermelho; 29 s de azul, e 15 s de âmbar). As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Coloração por Panóptico Rápido[®]. Aumento 1000x.

Paralelamente, foi avaliado o índice de sobrevivência das amastigotas internalizadas nos macrófagos (Figura 14B). O grupo controle apresentou uma média de 19 amastigotas por macrófago infectado, enquanto o tratamento com Anf. B resultou em média de 6 amastigotas por células. Nos grupos tratados com LED e MAC[®] esse número foi reduzido para 6 e 1 amastigota por macrófago, respectivamente. As CI₅₀ obtidas para amastigotas internalizadas foram de 2,76 μ M para AM; 110,25 s para o LED; 10,92 s para o MAC[®] e 0,20 μ g/mL para Anf. B.

Com base nesses valores, os índices de seletividades observados para AM, LED, MAC[®] e Anf. B foi de 56,29; 54,79; 55,41 e 43,75 respectivamente (tabela 3).

Figura 14 — A atividade do AM, LED e MAC[®], sobre amastigotas internalizadas em macrófagos.



Legenda: Os resultados foram determinados pela contagem de 100 células por lamínulas e expressos como porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas por macrófagos. A Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 μ g/ML, diferentes concentrações de AM e tempos de exposição de luz foram utilizadas, (LED 1: 56 s de vermelho; 26 s de azul; 13 s de âmbar, LED 2: 100 s de vermelho; 55 s de azul; 25 s de âmbar, LED 3: 220 s de vermelho; 110 s de azul; 55 s de âmbar), e o MAC[®] (MAC[®] 1: AM 3,75 μ M + 14 s de vermelho; 7 s de azul, e 4 s de âmbar, MAC[®] 2: AM 7,5 μ M + 28 s de vermelho; 14 s de azul, e 8 s de âmbar, MAC[®] 3: AM 15 μ M + 56 s de vermelho; 29 s de azul, e 15 s de âmbar). Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ SEM. Em (A) macrófago infectados e (B) índice de sobrevivência. * denota diferença significativas entre os grupos tratados e o controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. e # demonstra diferença estatística entre os grupos tratados e Anf. B # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

Tabela 3 — Valores da concentração inibitória (CI₅₀) para o teste de amastigotas com *L. amazonensis*, citotoxicidade (CC₅₀) para células de macrófagos de murino e índice de seletividade (IS) para tratamento de 48 h realizados com azul de metileno, LED e associação entre eles através do MAC[®].

Tratamento	CI ₅₀	CC ₅₀	IS
AM	5,99 ± 0,427 (μM)	155,61 ± 0,065 (μM)	25,97
LED	110,256 ± 0,127 (s)	6040,77 ± 0,053 (s)	54,79
MAC	10,922 ± 0,137 (s)	605,23 ± 0,325 (s)	55,41
Anf B	0,20 ± 0,17 μg/ml	8,75 ± 0,25 μg/ml	43,75

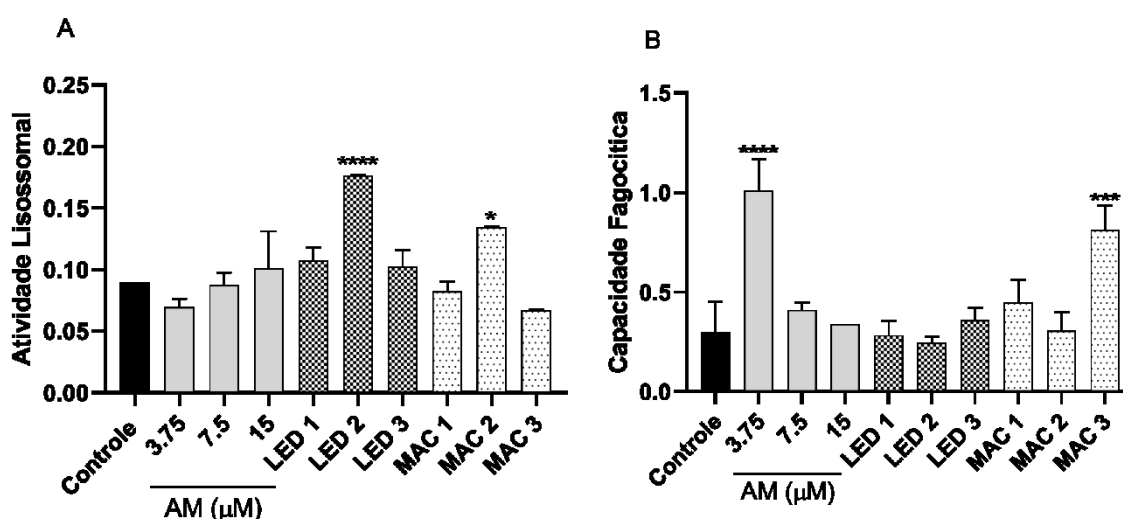
Legenda: CI₅₀: concentração do tratamento que inibe 50% da mortalidade das amastigotas internalizadas, CC₅₀: concentração citotóxica média sobre macrófagos, IS: índice de seletividade calculado por CC₅₀ / CI₅₀, AM: azul de metileno, LED: Diodo De Emissor De Luz, MAC[®]: método de aceleração cicatricial, Anf B: Anfotericina B, μM: micromolar, s: segundos, μg/ml micrograma por mililitro.

4.5. Ativação de macrófagos

4.5.1. Atividade Lisossomal e determinação da Capacidade fagocítica

O tratamento LED 2, assim como o tratamento MAC[®] 2 foram capazes de aumentar a atividade lisossomal dos macrófagos (Figura 15A). Já na avaliação da capacidade fagocítica observamos uma indução significativa na menor concentração do AM (3,75μM), assim como para o tratamento MAC[®] 3 (Figura 15B).

Figura 15 — Atividade lisossomal e capacidade fagocítica de macrófagos submetidos aos tratamentos: AM, LED e MAC[®].

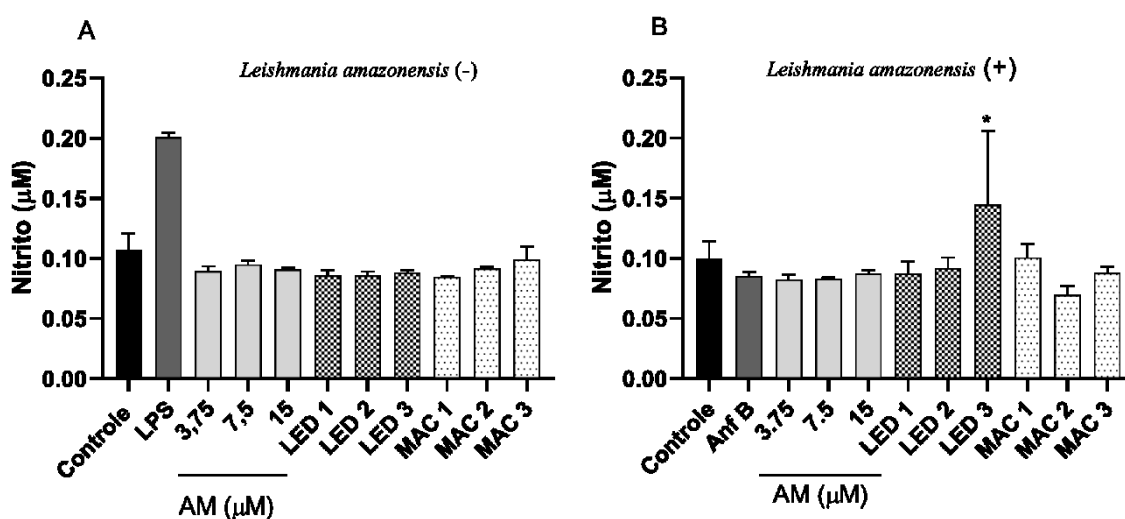


Legenda: Os dados são representados como valores médios realizados em triplicata. foram realizadas diferentes concentrações de AM e tempos de exposição de luz (LED 1: 56 s de vermelho; 26 s de azul; 13 s de âmbar, LED 2: 100 s de vermelho; 55 s de azul; 25 s de âmbar, LED 3: 220 s de vermelho; 110 s de azul; 55 s de âmbar), e o MAC[®] (MAC[®] 1: AM 3,75 μM + 14 s de vermelho; 7 s de azul, e 4 s de âmbar, MAC[®] 2: AM 7,5 μM + 28 s de vermelho; 14 s de azul, e 8 s de âmbar, MAC[®] 3: AM 15 μM + 56 s de vermelho; 29 s de azul, e 15 s de âmbar) * denota diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

4.5.2. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

Não houve aumento significativo da síntese de óxido nítrico em macrófagos tratados com AM e expostos ao LED e ao MAC[®] (Figura 16A). O lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli* (LPS) foi utilizado como controle positivo, demonstrando alta capacidade na indução da síntese desse metabólito por essas células. No entanto ao realizar os mesmos tratamentos na presença do parasito (Figura 16B), foi observado uma indução da síntese de NO para o tratamento LED 3.

Figura 16 — Quantificação de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos

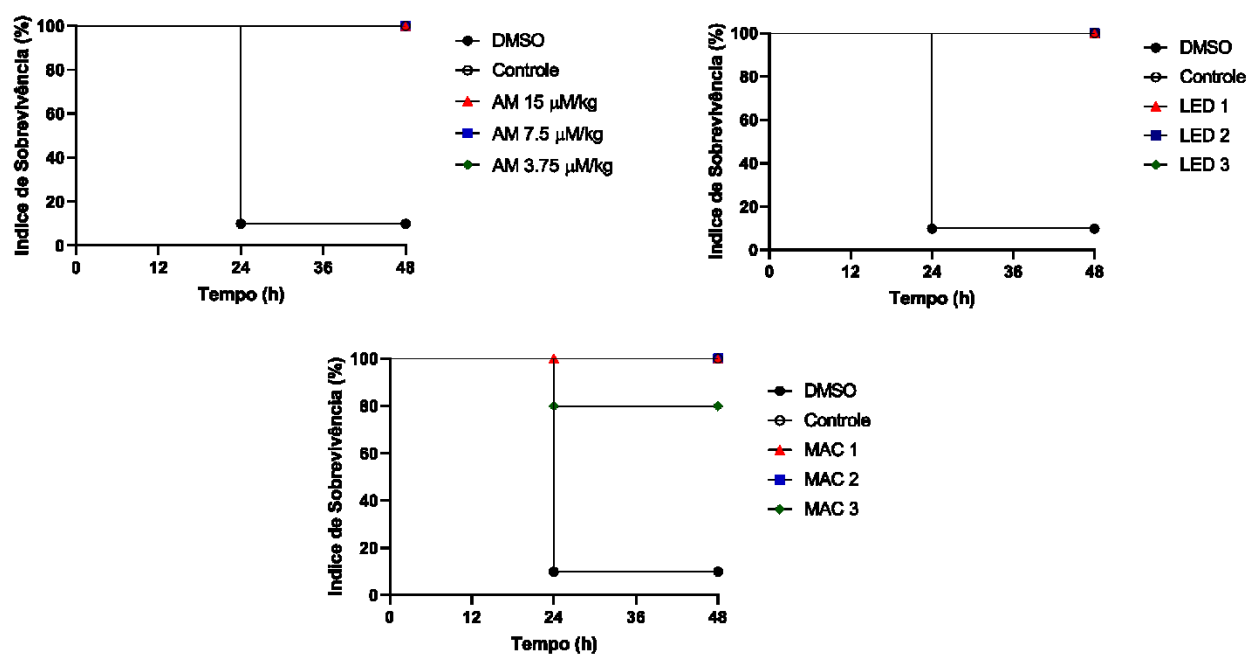


Legenda: Controle positivo: LPS – lipopolissacarídeo bacteriano (2 µg/mL). Os resultados apresentam a média ± E.P.M. em três experimentos realizados em triplicata células sem o estímulo por leishmania. A: quantificação de NO de macrófagos peritoneais murinos tratados com AM, LED (LED 1: 56 s de vermelho; 26 s de azul; 13 s de âmbar, LED 2: 100 s de vermelho; 55 s de azul; 25 s de âmbar, LED 3: 220 s de vermelho; 110 s de azul; 55 s de âmbar), e o MAC[®] (MAC[®] 1: AM 3,75 µM + 14 s de vermelho; 7 s de azul, e 4 s de âmbar, MAC[®] 2: AM 7,5 µM + 28 s de vermelho; 14 s de azul, e 8 s de âmbar, MAC[®] 3: AM 15 µM + 56 s de vermelho; 29 s de azul, e 15 s de âmbar) por 24 h, não infectado por leishmania e B: Quantificação de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e tratados com AM, LED e MAC[®] por 48 h * denota diferença significativas entre os grupos tratados e o controle* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

4.6. Avaliação da toxicidade aguda em larvas de *Zophobas morio*

Não foi observado letalidade nas larvas submetidas às doses de AM e nem ao tempo de exposição ao LED. No entanto, foi observado 20% de letalidade nas larvas submetidas ao tratamento MAC[®] 3, representado por 15,00 $\mu\text{M/kg}$ de AM mais 900 s de exposição à luz vermelha; 450 s para a luz azul e 225 s para a luz âmbar. As larvas que receberam administração de DMSO (grupo controle positivo) apresentaram 90% de letalidade (Figura 17).

Figura 17 — Curva de sobrevida das larvas *Zophobas morio* no período de 48 h após aplicação.

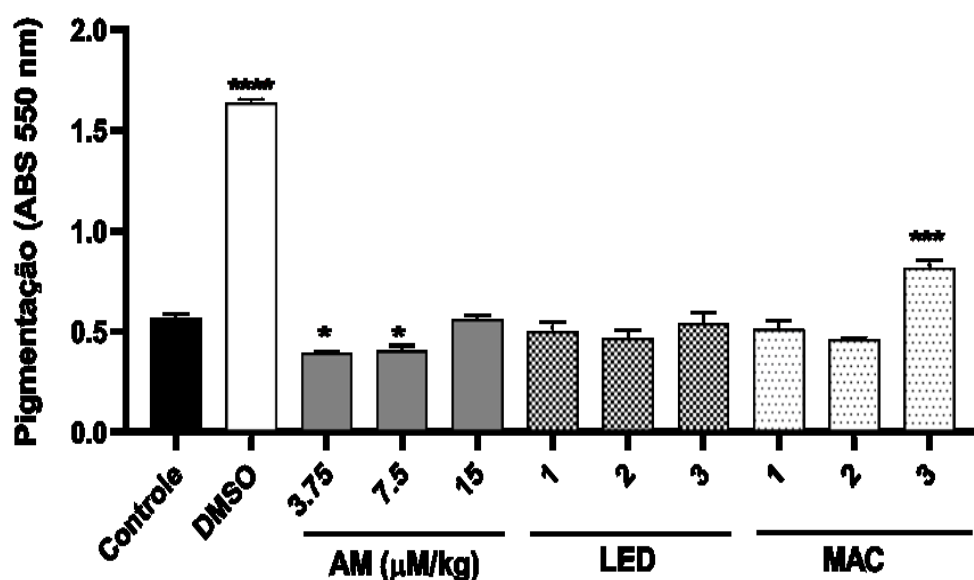


Legenda: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de larvas *Zophobas morio* após 48 h submetidos aos tratamentos. Foram realizados diferentes concentrações do azul de metileno além de diferentes tempos de aplicação do LED e MAC[®] (LED 1 / MAC[®] 1: 225 s de vermelho, 112 s do azul e 56 s do âmbar; LED 2 / MAC[®] 2: 450 s de vermelho, 225 s do azul e 112 s do âmbar e LED 3 / MAC[®] 3: 900 s do vermelho, 450 s do azul e 225 s do âmbar) No grupo tratado com MAC[®] foram adicionadas as doses do AM de forma respectivas. O grupo controle negativo foi injetado solução salina, enquanto o grupo positivo foi injetado DMSO.

4.6.1. Avaliação da pigmentação

Além da mortalidade, a melanização foi observada após o período de 48 h, onde todas as larvas apresentaram melanização dependente da concentração. Observando a figura 18, percebe-se que nos grupos submetidos ao tratamento LED, assim como para os grupos 1 e 2 do tratamento MAC[®], bem como o tratamento AM na dose de 15,00 $\mu\text{M/kg}$, houve pigmentação equivalente ao observado para o grupo controle. Porém, já no tratamento MAC[®] 3 houve aumento significativo da pigmentação, demonstrando toxicidade em relação ao grupo controle.

Figura 18 — Avaliação da pigmentação das larvas *Zophobas morio* no período de 48 h após aplicação.

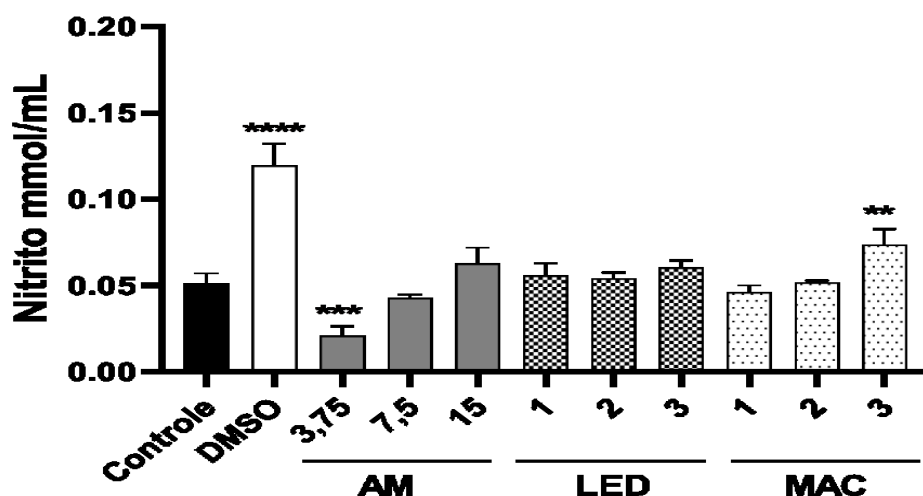


Legenda: Avaliação da pigmentação em larvas *Zophobas morio*. Foram realizados diferentes concentrações do azul de metileno além de diferentes tempos de aplicação do LED e MAC[®] (LED 1 / MAC[®] 1: 225 s de vermelho, 112 s do azul e 56 s do âmbar; LED 2 / MAC[®] 2: 450 s de vermelho, 225 s do azul e 112 s do âmbar e LED 3 / MAC[®] 3: 900 s do vermelho, 450 s do azul e 225 s do âmbar). No grupo tratado com MAC[®] foram adicionadas as doses do AM de forma respectivas. O grupo controle negativo foi injetado solução salina, enquanto o grupo positivo foi injetado DMSO. A pigmentação foi avaliada no homogenato obtido da maceração da larva em absorbância de 550 nm. Significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.6.2. Avaliação do ensaio de Nitrito pelo método de Griess em larvas *Zophobas morio*.

Em relação a quantificação de nitrito, observou-se que houve aumento da produção desse metabólito nas larvas submetidas ao tratamento com AM na dose de 3,75 μM e no tratamento MAC[®] 3, não sendo observado aumento nas larvas dos tratamentos utilizando LED quando comparadas ao grupo controle (figura 19).

Figura 19 — Avaliação do Nitrito pelo método de Griess na larva *Zophobss morio*.



Legenda: Quantificação do Nitrito. O homogeneizado foi misturado em partes iguais com o reagente de Griess. Foram realizados diferentes concentrações do azul de metileno além de diferentes tempos de aplicação do LED e MAC[®] (LED 1 / MAC[®] 1: 225 s de vermelho, 112 s do azul e 56 s do âmbar; LED 2 / MAC[®] 2: 450 s de vermelho, 225 s do azul e 112 s do âmbar e LED 3 / MAC[®] 3: 900 s do vermelho, 450 s do azul e 225 s do âmbar). No grupo tratado com MAC[®] foram adicionadas as doses do AM de forma respectivas. O grupo controle negativo foi injetado solução salina, enquanto o grupo positivo foi injetado DMSO. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão na média (E.P.M). * denota diferença significativas entre os grupos tratados e o controle* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

A busca por novos tratamentos para as leishmanioses tem impulsionado a investigação de diversas abordagens terapêuticas, entre novas medicações e o reposicionamento de fármacos. Nesse cenário, a terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma nova estratégia de tratamento. Em estudos recentes essa terapia tem se mostrado eficaz no tratamento de infecções causadas por diversos patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e *Serratia rubidae* (Hamblin; Hasan, 2004; Pimenta et al., 2025).

Contudo, sua abordagem terapêutica no tratamento das leishmanioses ainda permanece pouco explorada. A principal vantagem da terapia fotodinâmica é sua fácil aplicação, baixo custo, não necessitar de ambiente hospitalar e de administração parenteral, o que pode promover maior adesão dos pacientes ao tratamento.

A TFD emprega fotossensibilizantes (FS), compostos inovadores que utilizam a luz como potencializador para controlar a atividade biológica das moléculas (Velema et al., 2014). Essa abordagem vem evoluindo como uma metodologia promissora para o controle de processos biológicos (Fuchter, 2020). Trabalhos *in vitro* também têm relatado a eficácia desse protocolo sobre protozoários do gênero *Leishmania* (Maciel et al., 2021) e no tratamento da leishmaniose, onde

obteve-se cura da lesão com redução da carga parasitária em modelos animais (Akilov et al., 2007; Cabral et al., 2024; Sbeghen et al., 2015) e em humanos (Enk et al., 2003), com raros efeitos adversos.

O uso do método de aceleração cicatricial (MAC[®]) surge como uma abordagem inovadora que visa reduzir a carga microbiana e promover a regeneração. Essa metodologia envolve a TFD na curva espaço tempo. Essa curva foi desenvolvida dentro de uma equação matemática que melhora acessibilidade medicamentosa e do FS, garantindo que atinja o objetivo (Pinto et al., 2021).

Diante disso o AM foi escolhido devido sua baixa toxicidade, capacidade de gerar EROs, propriedades antiprotzoárias, pelo baixo custo e por apresentar seu pico de absorção no comprimento de onda 664 nm (Ozlem-Caliskan et al., 2022). A utilização de diferentes comprimentos de onda de forma combinada se justifica pela necessidade de alta absorção de energia luminosa pelo FS, agindo em diversas profundidades e diferentes tecido, aproveitando as propriedades específicas de cada componente. O LED vermelho (660 nm) possui uma alta penetração do tecido, alcançando os parasitos em profundidade (Cabral et al., 2023), o LED azul (460 nm), é altamente absorvido pelo AM (Pimenta et al., 2025), o que maximiza a produção de EROs, possui uma baixa penetração no tecido, o que é ideal para atingir parasitos na camada superficial da pele, por sua vez, o LED âmbar (590 nm) possui ação anti-inflamatória, além de estimular a produção de colágeno e elastina, melhorar a oxigenação da pele e consequentemente a cicatrização do tecido (Hong et al., 2022).

O método se baseia em uma curva espaço-tempo, um modelo matemático que orienta a intervenção de acordo com a progressão da patologia, considerando se a lesão se encontra em uma fase aguda ou crônica. Nesses casos, a "dobra do tempo" é aplicada de forma crescente para estimular uma reorganização gradual. Em lesões agudas, o objetivo é controlar o processo inflamatório e prevenir danos adicionais. A "dobra do tempo" é aplicada de forma decrescente para induzir uma rápida regressão dos sintomas e direcionar o tecido para uma fase de reparo mais organizada e eficiente. A avaliação clínica, incluindo a gravidade da lesão, a densidade tecidual e a possível colonização microbiana, é crucial para determinar a dosimetria ideal, garantindo maior eficácia e precisão na reabilitação e, consequentemente, melhorando a qualidade de vida do paciente (Pinheiro et al., 2024). Sendo assim, neste estudo, demonstrou-se que o MAC[®] apresentou atividade intrínseca contra *L. amazonensis*.

Todos os tratamentos apresentaram inibição do crescimento de formas promastigotas dependente da concentração e da exposição do tempo do LED, porém o MAC[®] demonstrou um alto potencial de inibição apresentando a CI₅₀ (33,77) sete vezes menor, quando comparado ao LED (260,81). De modo similar ao presente estudo, Cabral et al., (2023) também avaliaram, em seu estudo a influência da TFD *in vitro*, utilizando o LED vermelho e 1-9- dimetil- azul de metileno, contra

promastigotas de duas cepas de *Leishmania amazonensis*, sendo uma cepa selvagem e a outra resistente a miltefosina e ambas obtiveram eficácia na inativação das cepas.

Embora os valores da CI_{50} possam ser bastante variáveis, a capacidade de atuar de forma seletiva contra o parasito, minimizando a citotoxicidade para o hospedeiro é comparável entre eles. Isso, sugere que, ambos os tratamentos obtiveram IS significativos. Um aspecto notável, no entanto, é que o grupo tratado com MAC[®] alcançou o seu elevado IS com um tempo de exposição de luz significativamente menor em comparação com o grupo LED, além de apresentar o IS maior que o da Anfotericina B. Este resultado não apenas reforça o perfil de segurança e seletividade do MAC[®], mas também demonstra uma eficiência terapêutica superior, indicando que a sua aplicação pode ser mais rápida e potencialmente mais conveniente clinicamente. Portanto, o MAC[®] se destaca por combinar alta seletividade com uma cinética de ação favorável.

No que se refere ao alto índice de seletividade, indica que o tratamento tem capacidade de destruir o patógeno, gerando um mínimo de dano possível para as células saudáveis (Das Neves et al., 2024; Martins et al., 2016). Esses resultados demonstram a importância para determinar o potencial dos tratamentos, porém são necessários avaliar todos os testes *in vitro*, para confirmar o melhor tratamento, enquanto sua eficácia e segurança. Sendo assim este trabalho mostra que todos os três tratamentos avaliados possuem um excelente IS, indicaram maior seletividade em atingir o parasito do que a célula do hospedeiro.

Diferentes ensaios citotóxicos podem ser realizados para determinar a segurança de uma terapia às células de animais e humanos visando futuros tratamentos *in vivo*. Ensaios realizados com eritrócitos permitem avaliar o potencial dos tratamentos em causar lesões na membrana plasmática das células. Quando o tratamento compromete a estrutura celular dos eritrócitos causando hemólise, pode desencadear uma série de efeitos adversos incluindo inflamação local e sistêmica, oclusão vascular, ativação de células endoteliais e danos renais devido à liberação de hemoglobina livre (Liu et al., 2025). Pelos resultados obtidos neste estudo, os tratamentos MAC[®] não apresentaram toxicidade para os eritrócitos em nenhuma das diferentes doses estudadas.

Após a realização da atividade antileishmania contra promastigotas e citotoxicidade, prosseguiu-se com a investigação da atividade antileishmania de formas amastigotas internalizadas em macrófagos, que é o modelo *in vitro* que mais representa a infecção no hospedeiro vertebrado, além disso, os macrófagos são células do sistema imune, que desempenham um papel importante na defesa do organismo contra doenças e infecções (Chen et al., 2023). No presente estudo, foi possível observar que os grupos expostos à fototerapia com LED e MAC[®] demonstraram redução significativa no número de macrófagos infectados, sendo capazes de reduzir 20% e 80% respectivamente.

Adicionalmente, ao analisar o índice de sobrevivência das amastigotas internalizadas, observou-se uma redução significativa nos grupos submetidos a esses tratamentos. No grupo controle, foi possível observar uma média de 19 amastigotas por macrófago, frequentemente aglomerados ao redor do vacúolo parasitóforo. Em contraste, os tratamentos com LED e MAC[®] reduziram o número de amastigotas sobreviventes para 6 e 1 por macrófago, respectivamente. Essa eficácia foi dependente da concentração, sendo demonstrado maior atividade nos tratamentos MAC[®] 1, 2 e 3 e nas concentrações de 15,00 μM do AM, quando comparados a Anf. B. Segundo (Cabral et al., 2024) em seus estudos de inativação de cepas *L. amazonensis* e resistentes a mitelfosina utilizando a TFD, a associação entre o LED vermelho e o AM já se demonstravam uma terapia eficaz ao combate da resistência de fármaco. Descobertas semelhantes foram relatadas por (Pimenta et al., 2025), que mostraram que apenas a fototerapia de LED azul em diferentes espécies de leishmania demonstraram uma inibição no crescimento do parasito durante e após o tratamento, apresentando resultados semelhantes à Anf. B, além de reduzir a taxa de infecção dos macrófagos.

Na avaliação dos parâmetros de ativação de macrófagos, investigou-se a capacidade dos tratamentos AM, LED e MAC[®] na indução da capacidade fagocítica, atividade lisossomal e síntese de óxido nítrico isso porque os macrófagos são essenciais na defesa contra patógeno e células tumorais, participando da fagocitose, citotoxicidade, secreção de citocinas e apresentação de antígenos. Macrófagos ativados demonstram uma série de características, como maior adesão e espriamento, síntese de DNA estimulada, secreção alterada de citocinas, aumento de enzimas lisossomais e maior atividade microbicida via NO e EROs (Chen et al., 2023).

Essas células são as primeiras células de defesa do nosso organismo, e são elas as primeiras células do sistema fagocítico mononuclear que utilizam estratégias para combater corpos estranhos, inflamações e patógenos. A ativação dessas células, que inclui o aumento da capacidade fagocítica e a atividade lisossomal é crucial. A fagocitose é o processo pelo qual o macrófago engloba o patógeno formando um fagossomo. Esse por sua vez, funde-se com o lisossomo, criando um fagolisossomo onde neste compartimento os patógenos são degradados por enzimas e ERO's (Alves et al., 2021; Bogdan; Rölinghoff, 1998). Nos resultados dos ensaios de atividade lisossomal o tratamento LED 2 (110 s vermelho; 55 s azul e 25 s âmbar) assim como o tratamento MAC[®] 2 (7,50 μM de AM seguido por 28 s vermelho; 14 s azul e 8 s âmbar) induziram aumento do volume lisossomal. Porém, ao avaliar a capacidade fagocítica observou-se aumento na menor concentração do AM (3,75 μM) assim como no tratamento MAC[®] 3 (15,00 μM de AM mais 56 s vermelho; 29 s azul e 15 s âmbar).

Uma outra via de defesa dos macrófagos é a produção de NO. Dentro da célula, o NO reage como ânion superóxido (O_2^{-2}), formando o peroxinitrito, um potente agente microbiano. O parasito sobrevive dentro do macrófago mediante a habilidade de inibir a expressão ou atividade do oxido

nítrico sintase induzível (iNOS) por meio da inibição da produção de citocinas envolvidas na regulação da iNOS, inibição da síntese de NO por glicosilinositol, fosfolípidos da superfície de amastigotas ou estímulos a produção do fator de transformação de crescimento TGF- β (Alves et al., 2021; Dey; Panga; Raghunathan, 2016; Palmieri et al., 2020).

Neste estudo, a produção de NO foi avaliada, de maneira indireta através da quantificação de nitritos. Nos resultados dos ensaios com macrófagos, submetidos aos tratamentos com LED, AM e MAC[®], não foi possível observar um aumento significativo no NO em nenhum dos tratamentos realizados, produzindo níveis inferiores ao grupo controle. Além disso, nenhuma das amostras foi capaz de elevar significativamente a produção desse metabolito, já que, quando comparadas ao lipopolissacarídeo (LPS), um estimulador da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, foi observado um aumento substancial na síntese de NO. No entanto, quando avaliado em macrófagos infectados por *L. amazonensis* observou-se aumento da síntese de NO no grupo tratado com LED 3. Uma hipótese a ser considerada é a dependência de oxigênio na TFD, portanto, quando se utiliza alta exposição de luz, assim como no tratamento MAC[®] com a associação do AM, provavelmente pode ter causado o esgotamento do oxigênio intracelular, dificultando a ação das EROs. Outra hipótese é que o AM, em certas doses possa, além da geração do ânion superóxido, atuar predominantemente por meio da inibição direta da NO sintase e de outras enzimas contendo ferro e, conseqüentemente, a produção de NO (Mayer; Brunner; Schmidt, 1993).

A utilização de modelos animais para avaliação de toxicidade é comum, no entanto, a busca por métodos alternativos tem ganhado destaque por serem mais econômicas e não exigirem aprovação de comitê de ética. Insetos, como o *Zophobas morio*, surgem como uma opção viável. Eles possuem um ciclo de vida curto, alta taxa de reprodução e baixo custo de manutenção e à dispensa de aprovação ética, além de não necessitarem de aprovação por comitês de ética, o que contribui para maior agilidade nas pesquisas. Essa abordagem permite uma determinação eficiente e preliminar da toxicidade de novas substâncias e tratamentos (Rumbos; Athanassiou, 2021).

Um dos fatores importantes no estudo de toxicidade aguda é a avaliação da letalidade que a busca de possíveis novos tratamentos pode ocasionar nos modelos experimentais (Alves et al., 2025; Brai et al., 2023).

A análise dos resultados deste estudo demonstra que apenas o grupo experimental submetido ao tratamento MAC[®] 3 foi observada uma taxa de mortalidade de 20% nas primeiras 24 horas, a qual se manteve estável até as 48 horas seguintes. Este tratamento corresponde à aplicação da maior dose de azul de metileno (15 μ M/kg) combinada com o maior tempo de exposição de luz. A toxicidade observada é estatisticamente significativa quando comparada aos grupos controle, indicando que o efeito tóxico foi induzido exclusivamente pela combinação mais intensa do MAC[®].

Outros testes avaliados com *Z. morio* foi o de pigmentação e dos níveis de nitrito, que são empregados como indicadores de estresse oxidativo. Este é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (EROs) nos tecidos, superando a capacidade antioxidante do organismo. Nesse contexto, concentrações elevadas de nitrito em amostras biológicas são indicativas de um aumento na formação de NO. O excesso de NO, por sua vez, resulta na produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o peroxinitrito (ONOO⁻), uma substância altamente citotóxica. Essa cascata de eventos oxidativos culmina no estresse oxidativo, que está intrinsecamente ligado aos processos de pigmentação observados (Bryan; Grisham, 2007; Pérez-Torres et al., 2020).

Em relação à pigmentação, apenas o tratamento MAC[®] 3, induziu um aumento significativo. Embora não tenha superado o nível de produção ocasionado pelo DMSO. Quanto à produção de nitrito, tanto o MAC[®] 3 quanto o AM 3,75 µM/kg, demonstraram resultados significativos na produção de nitrito quando comparado ao grupo controle. Contudo, as concentrações observadas no nitrito em todos os tratamentos foram consideravelmente inferiores ao grupo tratado com DMSO que apresentou valores elevados.

Ao final, observou-se que todos os tratamentos propostos: AM, LED e MAC[®] demonstraram eficácia significativa contra a *Leishmania amazonensis*, tanto nas formas promastigota quanto na amastigota, corroborando os achados de Cabral et al., (2024) sobre a sensibilidade do parasito à TFD. O AM é um FS amplamente utilizado pois, após ativação pela luz, promove a geração de EROS, levando a danos oxidativos irreversíveis e consequentemente morte celular (Mayer; Brunner; Schmidt, 1993; Oliveira et al., 2019). A aplicação do LED isolado também apresentou efeito antileishmania, embora de forma menos expressiva quando comparada ao tratamento o MAC[®]. O MAC[®], por sua vez, apresentou um excelente desempenho, atingindo resultados significativos com menor tempo de exposição. Essa eficácia pode estar relacionada à maior estabilidade química do composto, à sua capacidade de penetração e seletividade no tecido características que favorecem sua ação terapêutica.

Embora a TFD com AM já tenha sido explorada contra protozoários do gênero *Leishmania* (Cabral et al., 2023; Ozlem-Caliskan et al., 2022), o presente trabalho se destaca como primeiro a descrever e avaliar a eficácia do MAC[®] contra a *Leishmania amazonensis*, onde ressalta o caráter inovador da técnica, proporcionando abertura para novas investigações.

6. CONCLUSÃO

Todos os tratamentos avaliados no presente estudo demonstraram atividade antileishmania, contra diferentes formas evolutivas do parasito, como também promoveram capacidade de ativar macrófagos. Dentre os tratamentos testados, o MAC[®] destacou-se por promover esses efeitos com menor tempo de exposição à luz.

Esses resultados apontam que a terapia fotodinâmica com utilização do MAC[®] é uma abordagem promissora para um possível desenvolvimento de uma alternativa terapêutica eficaz contra a Leishmaniose Tegumentar, apresentando diversas vantagens sobre os tratamentos convencionais, sendo menos invasiva que a terapia convencional, não necessitando de ambiente hospitalar nem de administração parenteral, o que pode favorecer adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- AKILOV, Oleg E. *et al.* Parasitocidal effect of δ -aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 8, p. 651–660, 1 ago. 2007.
- ALVES, Michel Muálem de Moraes *et al.* Methods of macrophages activation and their modulation for the prospection of new antileishmania drugs: a review. **Bioscience Journal**, v. 37, p. e37077–e37077, 29 dez. 2021.
- ALVES, Michel Muálem de Moraes *et al.* Yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) larvae as an alternative model for antileishmanial drug evaluation. **Veterinary Parasitology**, v. 337, p. 110468, 1 jul. 2025.
- ALVES, Michel Muálem de Moraes *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 9, p. 893–903, 1 set. 2017.
- BAMOROVAT, Mehdi *et al.* Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: A case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, p. 21–27, 1 abr. 2023.
- BEZERRA, Érika Alves *et al.* Garcinielliptone FC: Selective anti-amastigote and immunomodulatory effects on macrophages infected by *Leishmania amazonensis*. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104750, 1 mar. 2020.
- BOGDAN, Christian; RÖLLINGHOFF, Martin. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134, 1 jan. 1998.
- BRAI, Annalaura *et al.* *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **International Journal of Molecular Sciences** 2023, Vol. 24, Page 2296, v. 24, n. 3, p. 2296, 24 jan. 2023.
- BRYAN, Nathan S.; GRISHAM, Matthew B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 1 set. 2007.
- CABRAL, Fernanda V. *et al.* Photodynamic therapy mediated by a red LED and methylene blue inactivates resistant *Leishmania amazonensis*. **JOSA A, Vol. 40, Issue 5, pp. 996-1005**, v. 40, n. 5, p. 996–1005, 1 maio 2023.
- CABRAL, Fernanda V. *et al.* Photodynamic therapy offers a novel approach to managing miltefosine-resistant cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 116881, 1 ago. 2024.
- CAMPELO, Jamilly Erica Sousa *et al.* Evaluation of the acute toxicity of ellagic acid and gallic acid incorporated in Poloxamer407® gel, in *Zophobas morio* larvae. **Toxicology in Vitro**, v. 95, 1 mar. 2024.