

Padronização da técnica MTT para a avaliação de viabilidade celular e sua utilização para estudo do potencial anti-*Leishmania* do azul de metileno em associação com a anfotericina B no combate a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Gabriel Iamassaki Staquicini de Paula (PIC/Uem), Bianca Celin Possari, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose, Jorge Juarez Vieira Teixeira, Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré (Orientadora). E-mail: acfhrmilare2@uem.br. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Ciências da Saúde, Farmácia.

Palavras-chave: Citotoxicidade. *Leishmania*. Azul de metileno.

RESUMO

As leishmanioses estão entre as enfermidades infecciosas mais negligenciadas no mundo. No Brasil, dentre as espécies que causam leishmanioses destacam-se *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Os tratamentos convencionais apresentam alta toxicidade e requerem longos períodos de administração, sendo assim, a necessidade de novas estratégias terapêuticas cresceu. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado alternativa promissora, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e levando à morte seletiva dos parasitos. O azul de metileno (AM) caracteriza-se como fotossensibilizador eficaz, contribuindo para resultados expressivos no tratamento da leishmaniose cutânea. O avanço das pesquisas nessa área depende da análise da viabilidade celular do parasito. O ensaio com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) destaca-se por ser de menor custo, mantendo eficiência comparável a métodos como o XTT. Após experimentação com anfotericina, droga de referência nos estudos com leishmanioses, verificou-se que o comprimento de onda ideal para leitura da técnica MTT foi de 530 nm, utilizando concentração de 5 mg/mL. A associação do AM à TFD demonstrou impacto positivo, em concentrações a partir de 10 µg/mL em diluições seriadas (1:2), reduzindo significativamente o número de parasitos viáveis e diminuindo a concentração inibitória média (IC50) sob exposição à luz, no comprimento de 660 nm, por 30 minutos e incubação por 24 horas. Porém, ainda são necessários novos ensaios para avaliar a associação entre AM e Anfotericina B, com aplicação da TFD, assim como possível ação citotóxica em macrófagos J774A.1.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas e endêmicas que afetam populações vulneráveis, especialmente em países em desenvolvimento. No Brasil, destacam-se

as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo; geralmente as manifestações clínicas concentram-se em formas cutâneas e mucosas (WHO, 2024).

O tratamento convencional utiliza como fármaco de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes, como o Glucantime[®], que apresenta administração intravenosa. A anfotericina B atua geralmente como uma segunda opção de tratamento. Entretanto, esses tratamentos exibem alta toxicidade, efeitos adversos e a longa duração favorecem o abandono terapêutico (BRASIL, 2017). Como alternativa, a terapia fotodinâmica (TFD) têm se mostrado promissora. Essa técnica utiliza um fotossensibilizador que, sob radiação luminosa específica e na presença de oxigênio, gera espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por citotoxicidade seletiva (OYAMA et al., 2020).

O azul de metileno (AM), tradicionalmente empregado como corante e agente antimalárico, também apresenta ação como fotossensibilizador, com aplicações no combate a protozoários (LU et al., 2018). Estudos ainda são necessários para verificar se sua associação à TFD, e ainda a um fármaco de referência, como anfotericina, reduz a carga parasitária, objetivos do nosso estudo.

Vale ressaltar que para avaliação da eficácia de novas substâncias com ação anti-*Leishmania*, ensaios de viabilidade celular são necessários. Dessa forma, buscamos padronizar o método 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), visto que essa técnica mede a atividade metabólica mitocondrial por meio da redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan pela enzima succinil desidrogenase, posteriormente quantificados por espectrofotometria, sendo uma técnica prática e de baixo custo (GHASEMI et al., 2021).

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos compostos

Foram utilizados MTT (SIGMA[®]), Anfotericina B (INLAB[®]), fornecidos pelo Laboratório de Imunologia Clínica, e AM (Siynt[®]), fornecido pelo Nupesf.

Cultivo de parasitos e plaqueamento

As culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis* (PH8) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/00/BA788) foram expandidas em garrafas de 20 mL e posteriormente em 50 mL em meio RPMI 1640 (Gibco[®], EUA, 2110284), pH 6,8; suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e antibióticos (0,063 mg/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. a 25°C. Para os experimentos, após contagem em câmara de Neubauer, o inóculo de parasitos foi ajustado para uma concentração de 4×10^6 promastigotas/100 µL. A anfotericina B foi utilizada em diluições seriadas a partir de 5 µg/mL, enquanto a

droga-teste, AM, foi avaliada desde 10 µg/mL em diluições seriadas (1:2). Para a TFD com AM, uma das placas foi exposta a uma fonte de luz de 660 nm, por 30 minutos, e, em seguida, incubada na estufa B.O.D a 25°C por 24 horas para a realização da TFD. A outra placa não foi exposta à luz, servindo como controle e permitindo avaliar se a droga teste possui atividade fotossensibilizadora.

Ensaio de viabilidade (MTT)

Após o período de incubação de 24h, adicionou-se solução de MTT (5 mg/mL; 20 µL/poço) e as placas foram mantidas por 4 horas a 37°C na estufa BOD com 5% de CO₂, até a formação de cristais de formazan. Logo após, foi realizada a centrifugação das placas a 2500 RPM/min por 10 minutos. Em seguida, foram retirados 100 µL de todos os poços e adicionado DMSO (100 µL/poço) para a solubilização. A placa foi incubada novamente por 15 minutos, disposta em um agitador de placas por 5 minutos e após isso realizou-se a leitura espectrofotométrica em leitora de ELISA *Versa Max microplate reader* (Molecular Devices, CA, EUA), para a quantificação da viabilidade celular, no comprimento de onda de 530 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leitura de viabilidade celular usando a técnica MTT no comprimento de onda 530 nm apresentou curvas de crescimentos semelhantes à linha de tendência logarítmica, característica do modelo de multiplicação de *Leishmania*. Esse ajuste é evidenciado pelo valor de R (coeficiente de correlação) que indica o quão bem os dados experimentais se ajustam à linha de tendência esperada, ou seja, quanto mais próximo de 1, melhor a conformidade (**Figura 1**).

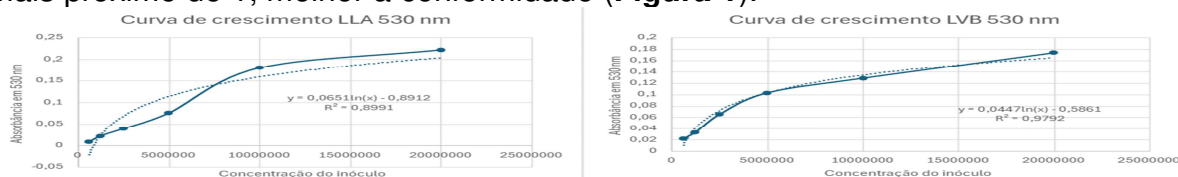


Figura 1- Curva de crescimento para LLa e LVb, em 530 nm. A linha sólida representa os dados experimentais, enquanto a linha tracejada é a tendência logarítmica. A curva mostra um crescimento logarítmico típico das culturas de *Leishmania*, com um aumento inicial rápido da absorbância, que depois tende a se estabilizar à medida que a população se aproxima da fase estacionária.

De mesma forma, os resultados encontrados para a inibição do parasito, proporcionados pela anfotericina B demonstraram um valor de 0,0511 µg/mL para o valor de IC₅₀, muito próximo ao valor prévio usando a técnica XTT, sendo este de 0,0512 µg/mL (**Figura 2**). A análise da atividade do azul de metileno, com e sem aplicação da TFD, demonstrou um valor de IC₅₀ de 2,674 µg/mL, com luz, e 7,218

$\mu\text{g/mL}$ sem luz, comprovando sua ação como fotossensibilizador (**Figura 2**).

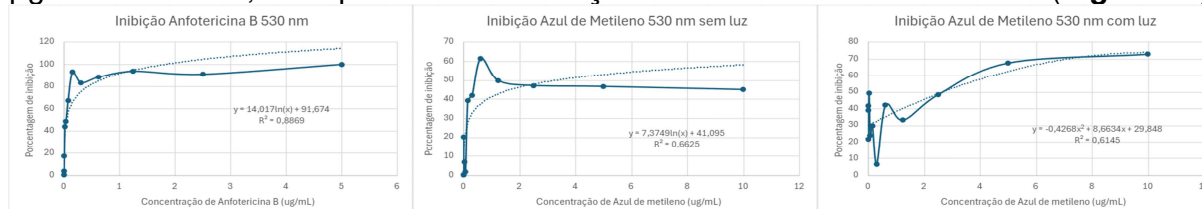


Figura 2- Curva de inibição da Anfotericina B, em 530 nm, avaliada desde 5 $\mu\text{g/mL}$ em diluições seriadas (1:2) e inibição do Azul de metileno, com e sem luz, em 530 nm, avaliada desde 10 $\mu\text{g/mL}$ em diluições seriadas (1:2). A linha sólida representa os dados experimentais, enquanto a linha tracejada é a tendência logarítmica.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a técnica de viabilidade celular MTT possui eficácia semelhante ao XTT, porém ainda há a necessidade de mais ensaios para melhor avaliar a associação entre o azul de metileno e Anfotericina B, com aplicação da TFD, assim como sua possível ação citotóxica em macrófagos J774A.1.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq/CAPES, ao Laboratório de Imunologia Clínica, assim como a todos seus integrantes e professores, ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, amigos e família por todo o suporte e ajuda durante o projeto.

REFERÊNCIAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis: fact sheet*. Geneva: **World Health Organization**, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 24 maio 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana*. 2. ed. atual. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf. Acesso em: 24 maio 2025.

OYAMA, J.; FERNANDES, H.; RAMOS-MILARÉ, Á. C.; LOPES, L. N. D. S. S.; NESI-REIS, V.; et al. Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 30, p. 101682, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101682>. Acesso em: 24 maio 2025.

LU, G.; NAGBANSHI, M.; GOLDAU, N.; et al. , O. Eficácia e segurança do azul de metileno no tratamento da malária: uma revisão sistemática. *BMC Medicine*, v. 16, p. 59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1045-7>. Acesso em: 25 maio 2025.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>. Acesso em: 30 agosto 2025.