

Título em Português:	Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudo in vivo em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>
Título em Inglês:	Effect of the antimicrobial photodynamic therapy against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> at an in vivo study in <i>Galleria mellonella</i>
Autor:	Ana Júlia Barbosa Tomé
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Cristina Kurachi
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Radiologia e Fotobiologia
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas

Toxicidade do azul de metileno e Photodithazine para Terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Galleria mellonella*

Ana Júlia Barbosa Tomé

Livia Mara Alves Figueiredo Godoi

Cristina Kurachi

Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

Objetivos

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno que se destaca como agente de infecções no ambiente hospitalar. Uma bactéria gram negativa, versátil, com grande capacidade adaptativa a ambientes hostis, inclusive na presença de antibióticos (1).

Com a dificuldade crescente em eliminar microrganismos com drogas convencionais, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), com seu mecanismo de ação inespecífico e local, é uma alternativa promissora (2).

Esse projeto analisou o potencial do azul de metileno (AM) e do Photodithazine (PDZ) como fotossensibilizadores para a TFDa. Uma vez que sua segurança nas larvas foi confirmada, novos experimentos serão realizados para investigar seu potencial como fotossensibilizador em infecções causadas por *P. aeruginosa*.

Métodos e Procedimentos

As larvas de *G. mellonella* foram criadas e mantidas no Laboratório de Biofotônica Ambiental (IFSC), em estufa a 28 °C, com ração à base de mel e cera alveolada.

Foram selecionadas 10 larvas por grupo, com 240 a 300 mg, livres de manchas que pudessem indicar processo infeccioso. Os fotossensibilizadores (AM ou PDZ) foram

inoculados na *proleg* esquerda das larvas, nas concentrações de 5, 10, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µM. Diariamente, por 5 dias, as larvas foram monitoradas quanto a sua movimentação, formação de casulo, melanização e sobrevivência. Durante todo o experimento, as larvas foram mantidas sem alimentação.

Os ensaios de sobrevivência foram analisados pelo método Kaplan-Meier com teste Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados do índice de saúde larval passaram por teste de normalidade, dados paramétricos foram avaliados por ANOVA e Tukey e não paramétricos por Kruskal-Wallis e Dunn. As análises foram feitas no *GraphPad Prism* 8.0, com significância de 5%.

Resultados

Na análise de sobrevida, nenhuma das concentrações dos fotossensibilizadores testadas, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \geq 0,05$).

Para o AM, as concentrações de 5 e 10 µM não apresentaram toxicidade larval. Mas, a partir de 12,5 µM houve 10% de mortalidade das larvas em 72 h (Figura 1). Na análise da soma total dos atributos larvais, as concentrações de 5 e 10 µM apresentaram maior pontuação,

indicando boa saúde larval (Figura 2). Com base nestes resultados, as concentrações de 5 e 10 μM de AM foram consideradas ideais para a realização da TFDa.

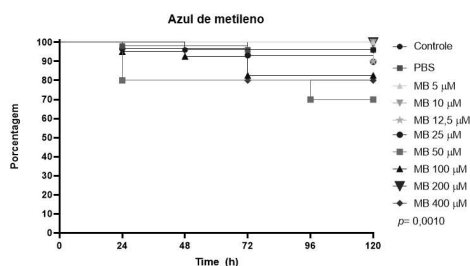


Figura 1: Análise da sobrevivência larval com diferentes concentrações de AM.

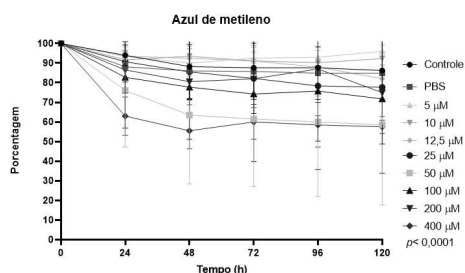


Figura 2: Pontuação total do índice de saúde larval com diferentes concentrações de AM.

Para o PDZ, a menor concentração testada de 5 μM foi tóxica, com 20% de mortalidade larval após 48 h (Figura 3). Esse resultado corresponde ao encontrado na análise da soma dos atributos, na qual a mínima concentração testada apresentou queda da pontuação da saúde larval (Figura 4). Assim, para o PDZ, não houve concentração não tóxica.

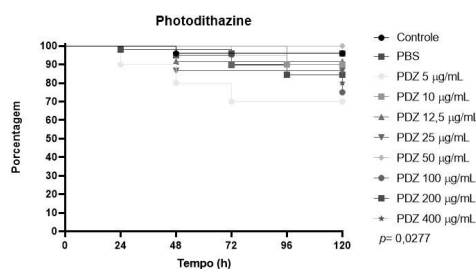


Figura 3: Análise da sobrevivência larval com diferentes concentrações de PDZ.

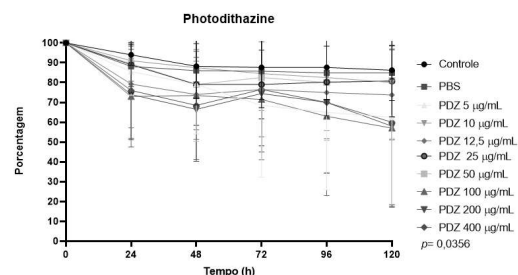


Figura 4: Pontuação total do índice de saúde larval com diferentes concentrações de PDZ.

Conclusão

O azul de metileno mostrou-se promissor para aplicação em TFDa, já que foi possível encontrar concentrações sem toxicidade em *G. mellonella*. Porém, serão necessários mais testes com o PDZ para encontrar uma concentração larval segura a ser utilizada na TFDa. Assim que determinadas concentrações seguras, experimentos considerando os efeitos destes fotossensibilizadores em larvas infectadas por *P. aeruginosa* serão realizados. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] URGANCI, N. N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Pathogenicity. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 726–738, 30 abr. 2022.
- [2] MARASINI, S.; LEANSE, L. G.; DAI, T. Can microorganisms develop resistance against light based anti-infective agents? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 175, p. 113822, 1 ago. 2021.

Toxicity of methylene blue and Photodithazine in *Galleria mellonella*: an in vivo study

Ana Júlia Barbosa Tomé

Livia Mara Alves Figueiredo Godoi

Cristina Kurachi

University of São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

Objectives

Pseudomonas aeruginosa is a pathogen that stands out as an agent of infection in hospitals. It's a versatile gram-negative bacterium that can adapt really well to harsh environments, even when antibiotics are present (1).

With the increasing difficulty in eliminating microorganisms with conventional drugs, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), with its nonspecific and local mechanism of action, appears to be a promising alternative (2).

This study analyzed the toxicity of methylene blue (MB) and Photodithazine (PDZ) in the *Galleria mellonella* model. Once their safety is confirmed, subsequent experiments will assess them as photosensitizers in aPDT against *Pseudomonas aeruginosa* infections in *G. mellonella*.

Materials and Methods

G. mellonella larvae were raised and maintained at the Environmental Biophotonics Laboratory (IFSC) in an incubator at 28°C, and fed a nutritious diet based on honey and beeswax.

Ten larvae per group were selected, weighing 240 to 300 mg, free of spots that could indicate

infection. Concentrations of 5, 10, 12.5, 25, 50, 100, 200, and 400 µM of the photosensitizers (AM or PDZ) were inoculated into the left larval proleg. The larvae were monitored for 5 days, and movement, cocoon formation, melanization, and survival attributes were evaluated. Throughout the experiment, the larvae were kept without being fed.

Survival tests were analyzed using the Kaplan-Meier method with the Log-rank test (Mantel-Cox). The results of the larval health index were subjected to normality testing, parametric data were evaluated by ANOVA/Tukey, and nonparametric data by Kruskal-Wallis/Dunn. The analyses were performed in GraphPad Prism 8.0, with a significance level of 5%.

Results

In survival analysis, photosensitizers in the absence of light, at the concentrations tested, showed no statistically significant difference compared to the control ($p \geq 0.05$).

For AM, concentrations of 5 and 10 µM did not show larval toxicity. However, at concentrations above 12.5 µM, there was 10% larval mortality within 72 hours (Figure 1). In the analysis of the sum of larval attributes, concentrations of 5 and 10 µM had higher scores, indicating healthy larvae (Figure 2). Based on these results,

concentrations of 5 and 10 μM of AM were considered ideal for TFDa.

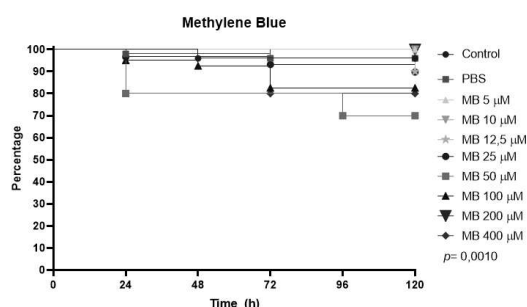


Figure 1: Survival analysis of *G. mellonella* after inoculation of methylene blue

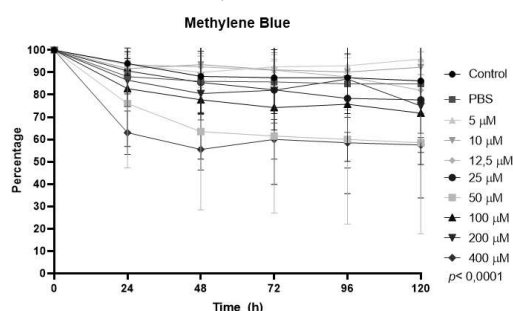


Figure 2: Sum of the attributes of *G. mellonella* after inoculation of methylene blue

For PDZ, the lowest concentration tested (5 μM) was toxic, with 20% larval mortality after 48 h (Figure 3). This result corresponds to that found in the sum of attributes analysis, in which the minimum concentration tested showed a decrease in larval health score (Figure 4). Thus, for PDZ, there was no suitable concentration.

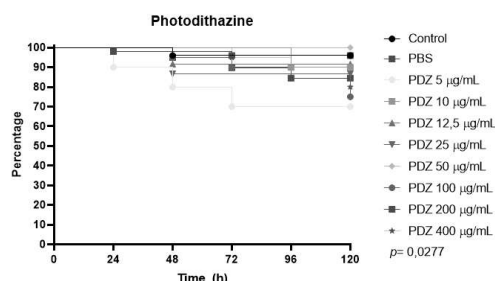


Figure 3: Survival analysis of *G. mellonella* after inoculation of Photodithazine

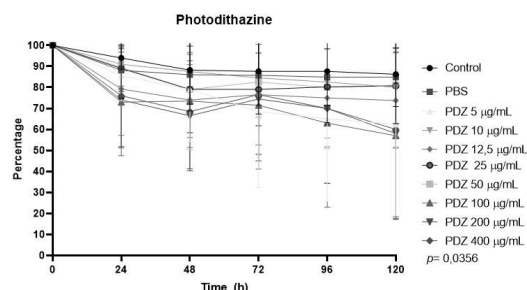


Figure 4: Sum of the attributes of *G. mellonella* after inoculation of Photodithazine

Conclusions

Methylene blue showed promising results for application in aPDT, as it was possible to find a concentration without larval toxicity. However, further testing with PDZ is needed to find a safe concentration for use in aPDT. Further experiments will be conducted in subsequent stages of this study to evaluate the photodynamic effect of both photosensitizers against *P. aeruginosa*. The authors declare that there is no conflict of interest..

References

- [1] WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 2024.
- [2] URGANCI, N. N. et al. Pseudomonas aeruginosa and Its Pathogenicity. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, v. 10, n. 4, p. 726–738, 30 abr. 2022.