

INATIVAÇÃO MICROBIANA COM TERAPIA FOTODINÂMICA E PELE ARTIFICIAL EM RATOS

F. R. Paolillo*, P. G. Rodrigues*, A.V. Corazza**, L. Pires*, C. Kurachi* e V.S. Bagnato*

*Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil

**Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, Brasil
e-mail: fer.nanda.rp@hotmail.com

Resumo: Alterações na integridade da pele, principalmente quando as úlceras são infectadas, constituem um sério problema de saúde pública devido à resistência aos antibióticos. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica utilizada para a desinfecção. Os efeitos citotóxicos estão relacionados com as espécies reativas de oxigênio produzidas após a ativação do fotossensibilizador pela luz. Isto resulta no dano localizado e morte celular. Paralelamente, muitos substitutos de pele têm sido utilizados para a cicatrização de feridas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da PDT e da pele artificial na desinfecção de feridas cutâneas em ratos. Ratos Wistar foram divididos em 3 grupos: G1 - sem tratamento; G2 - tratado com PDT (curcumina e luz azul) e; G3 - tratado com pele artificial à base de alcoóis. A ferida foi induzida por *punch* de 0,80 centímetros de diâmetro. Cada ferida recebeu inóculos de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), imediatamente após a indução da lesão. Para realizar a PDT, foi utilizado gel de curcumina (0,06 ml), e um LED azul (450 nm, 80 mW/cm² e 60 J/cm²) foram utilizados. Swabs de cada rato foram coletadas para determinar o número total de unidades formadoras de colônias (UFC). Foi constatada a redução de aproximadamente 2 Log nos grupos tratados ($p < 0,001$). Portanto, PDT e pele artificial podem promover a desinfecção da ferida para cicatrização tecidual.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, pele artificial, inativação bacteriana.

Abstract: *Healing wounds represent a major public health problem, mainly infected wounds due to antibiotic resistance. Photodynamic therapy (PDT) is a technique used for the disinfection. The cytotoxic effects of this therapy are related to the production of reactive species produced after light activation of a photosensitizer. This results in localized photodamage and cell death. At the same time, in contemporary research, many skin substitutes have been employed for wound healing. The aim of this study was to evaluate the effects of PDT and artificial skin on disinfection of skin wound in rats. Rats Wistar were separated in 3 groups: G1 – untreated; G2 – treated with PDT (curcumin plus blue light) and; G3 – treated with artificial skin alcohols-based. A full-thickness skin circular was removed with a 0.80 cm diameter punch. Each wound has received inocula of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) immediately after the injuries*

have been made. In order to perform the PDT, the curcumin gel (0.06 ml) and a blue LED (450 nm) with intensity of 80 mW/cm² and 60 J/cm² were used. Swabs from each rat were collected for analysis. The total number of colony-forming units (CFU) was determined. There was 2 Log reduction for the treated groups ($p < 0.001$). Therefore, PDT and artificial skin can promote disinfection for healing tissue.

Keywords: *Photodynamic therapy, artificial skin, bacterial inactivation.*

Introdução

Alterações na integridade da pele, conhecidas como úlceras agudas ou crônicas, constituem um sério problema de saúde pública. Soluções para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que são acometidos por deficiências no processo de reparação tecidual têm sido investigadas. Técnicas farmacológicas, fitoterápicas, terapias gênicas e exercícios fisioterapêuticos são utilizados para o tratamento de úlceras cutâneas [1]. Do mesmo modo, existem recursos físicos não-invasivos que auxiliam na contração de feridas na pele [2].

No tratamento de lesões cutâneas, principalmente aquelas que apresentam dificuldade de cicatrização, os efeitos colaterais e a resistência aos medicamentos vem sendo um grande desafio para a prática clínica. Frente às limitações das terapêuticas convencionais para descontaminação de feridas e consequente regeneração tecidual, o uso de novas tecnologias podem ser um método alternativo de tratamento.

Atualmente, a Terapia Fotodinâmica (PDT, acrônimo de Photodynamic Therapy) vem demonstrando efetividade na descontaminação de feridas. O mecanismo de ação desta terapia consiste em gerar dano seletivo as células. Esta técnica induz a citotoxicidade celular associando a luz com medicações fotossensíveis na presença de oxigênio, ou seja, a luz ativa o fotossensibilizador presente nos tecidos, transferindo energia para o oxigênio molecular, resultando em espécies reativas de oxigênio, entre elas o oxigênio singleto, que induz a morte celular ou de microorganismos [3]. Em relação, a medicina regenerativa, novos biomateriais, incluindo a pele artificial, podem acelerar o processo de cicatrização [4].

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o número de Unidade Formadora de Colônia

(UFC) em ferida contaminada com *Staphylococcus aureus* em ratos Wistar.

Materiais e métodos

O presente trabalho com animais foi aprovado pelo “Comitê de Ética em Experimentação Animal” da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos (Parecer nº. 053/2012).

Animais– Foram utilizados 18 ratos Wistar machos com massa corpórea entre 350 e 450 gramas. Os animais foram alojados no Biotério do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) em ambiente controlado (ciclo claro/escuro 12/12 horas) com ambiente higienizado e temperatura controlada de $24\pm 2^\circ\text{C}$. Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas e alimentados com ração comercial e água à vontade. Os animais ($n=18$) foram separados aleatoriamente em 3 grupos: (i) Grupo Controle ($n=6$), ferida contaminada sem tratamento; (ii) Grupo PDT ($n=6$), ferida contaminada tratada com PDT e; (iii) Grupo Pele Artificial ($n=6$), ferida contaminada tratada com pele artificial.

Indução da Ferida– Com os animais previamente anestesiados, foi realizada a tricotomia manual do dorso do animal. Foram realizadas feridas circulares com um “punch” de 0,8 cm de diâmetro. Após a indução da ferida (pós-cirúrgico), foi realizada a coleta de swab para verificar se no ato cirúrgico não houve contaminação.

Contaminação da Ferida– A contaminação com *Staphylococcus aureus* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Burkatovskaya et al. 2008 [5]. A cepa - padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi proveniente da Universidade de São Paulo. Para o preparo do inóculo, esse micro-organismo foi cultivado em caldo Infuso Cérebro-Coração [Brain Heart Infusion-(BHI)] (Laboratório Difco, Detroit, Mich., EUA) por 18 horas a 37°C . Após a obtenção da cultura bacteriana, a mesma foi centrifugada a 3000 durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante, e depois suspensa em 5mL de água destilada. A contagem do número de células viáveis da suspensão na presença de azul de Trypan em Câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Obtendo-se assim o inóculo bacteriano (25×10^7 células). Em seguida, o inóculo foi injetado na lesão cirúrgica dos animais por meio de agulha de insulina ($100\mu\text{l}$) nas bordas da ferida e na região central totalizando 5 pontos sendo aplicado $20\mu\text{l}$ por ponto.

Análise microbiológica– O swab foi colhido em duplicata na borda e no interior de toda a ferida com movimentos circulares totalizando 15 segundos. Em seguida, o swab foi colocado em tubo de ensaio eppendorf com $900\mu\text{l}$ de água destilada. Diluições decimais em série (10^{-1} a 10^{-6}) de cada tubo com água destilada foram obtidas e alíquotas de $100\mu\text{l}$ foram plaqueadas em duplicata em Agar Infusão Cérebro e Coração (Difco Laboratories, Detroit, Mich., EUA) e

incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as placas das diluições foram analisadas para obtenção do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de diluição (UFC/ml).

PDT– Foi realizado uma sessão de PDT. Como fotossensibilizador foi utilizado o gel de curcumina (PDT Pharma, Cravinhos, SP, Brazil), no qual $0,06\text{ ml}$ foi aplicado sobre a ferida e encubado por 20 minutos. Posteriormente, foi aplicado o LED azul ($\sim 450\text{ nm}$) com 80 mW durante 12,5 minutos, que conduziu a dose de $60\text{ J}/\text{cm}^2$ e intensidade de $80\text{ mW}/\text{cm}^2$.

Pele Artificial– A pele artificial denominada Alpha é totalmente natural, biocompatível e biodegradável, é um líquido denso composto de alcoóis e água potável. Após a aplicação no local desejado (por exemplo, em feridas), este líquido se solidifica resultando no aspecto de pele artificial. Esta pele artificial é considerada um elastômero, pois acompanha o movimento da pele e sua microporosidade permite a ventilação (chegada de oxigênio) para cicatrização, enquanto os alcoóis favorecem a assepsia. Foi colocado $250\mu\text{l}$ da pele artificial (55%) sobre a ferida, formando uma fina camada. A pele artificial foi colocada por 4 dias consecutivos para assegurar o tratamento diário. Esta consideração é importante para futuros protocolos clínicos, pois os pacientes podem tomar banho diariamente e em seguida colocar a pele artificial.

O procedimento de PDT e a pele artificial podem ser visualizadas na Figura 1.

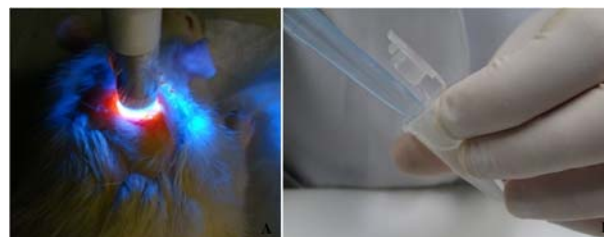


Figura 1: PDT com curcumina e LED azul na ferida (A) e a pele artificial sendo coletada com pipeta (B).

Análise Estatística– Para comparação intergrupos foi calculado o delta entre as situações pré e pós-tratamento e foi utilizada ANOVA One Way com post hoc Tukey. Para análise estatística foi utilizado o software Statistica for Windows Release 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Ok, USA). O nível de significância estatística foi de 5% ($p<0.05$).

Resultados

Foi constatado redução bacteriana nos Grupos PDT e Pele Artificial que foi aproximadamente 2 Logs. A resposta bacteriana pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Efeitos da PDT e da Pele Artificial sobre resposta microbiana.

Grupos	Δ =Pré-Pós (UFC/ml)
Controle	-4,63E-02 \pm 9,06E-01
PDT	2,23E+00 \pm 4,74E-01*
Pele Artificial	2,38E+00 \pm 5,66E-01*

* p<0,001

Discussão

A pele representa cerca de um décimo da massa corpórea humana e lesões decorrentes de trauma, doenças, queimaduras ou cirurgias como parte deste grande órgão, geram severas consequências e, então, a ação fotodinâmica e os substitutos da pele apresentam potencial na inativação microbiana para acelerar a cicatrização de feridas.

O fotossensibilizador é um composto capaz de absorver luz em comprimento de onda específico e resulta em estresse oxidativo. Os radicais livres (oxigênio singlete) geram danos a todos os tipos de biomoléculas e destroem as células microbianas por reação com o DNA e membrana plasmática com inibição enzimática e alterações nos componentes celulares, como as proteínas, ácidos nucleicos e lipídios [6].

Já a pele artificial é composta de alcoóis e o efeito do álcool como antisséptico está relacionado à desnaturação de proteínas e dissolução de lipídios [7].

Os estudos em medicina regenerativa são direcionados para substituição do tecido lesionado e/ou estimulação dos mecanismos de reparação celular do próprio organismo para curar tecidos ou órgãos anteriormente irreparáveis, ainda, sua ação pode envolver várias técnicas, independentes ou associadas. Então, os profissionais da área da saúde podem utilizar as técnicas regenerativas em pacientes quando o organismo não consegue mais curar a si mesmo ou para acelerar o período de recuperação [8].

Conclusão

Portanto, o desenvolvimento de novas técnicas, como a PDT com gel de curcumina e luz azul, bem como a pele artificial mostraram ação bactericida no tratamento de feridas cutâneas em ratos. Estes dados apontam a importância destas técnicas para futuras aplicações clínicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem especialmente ao Sr. Rubens Janota, o inventor da pele artificial Alpha, além do apoio do CNPq (Processo N°. 573587/2008 e 151008/2012-4) e da FAPESP (Processo N°. 2013/07276-1 e 2013/14001-9).

Referências

- [1] Senneville E. Antimicrobial interventions for the management of diabetic foot infections. *Expert Opinion Pharmacotherapy*. 2005; 6(2):263-273.
- [2] Milgram J, Shahar R, Levin-Harrus T, Kass P. The effect of short, high intensity magnetic field pulses on the healing of skin wounds in rats. *Bioelectromagnetics*. 2004; 25(4):271-277.
- [3] Henderson BW, Dougherth TJ. How Does Photodynamic Therapy Work. *Photochemistry & Photobiology*. 1992; 55:145-147.
- [4] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*. 2007; 4:413-437.
- [5] Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16(3):425-431.
- [6] Paschoal MA, Santos-Pinto L, Lin M, Duarte S. Streptococcus mutans photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2014; 32(3):175-180.
- [7] Venturelli AC; de Almeida-Pedrin RR; Ferreira FPC. Avaliação microbiológica da contaminação residual em diferentes tipos de alicates ortodônticos após desinfecção com álcool 70%. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*. 2009; 14(4):43-52.
- [8] Masson C; Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*. 2008; 3:1-5.