UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ILAIÁLI SOUZA LEITE

Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica infravermelha
com indocianina verde e sua interação com macrófagos RAW 264.7

São Carlos

2015

ILAIÁLI SOUZA LEITE

Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica infravermelha com indocianina verde e sua interação com macrófagos RAW 264.7

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Dr^a. Natalia Mayumi Inada

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza Leite, Ilaiáli

Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica infravermelha com indocianina verde e sua interação com macrófagos RAW 264.7 / Ilaiáli Souza Leite; orientadora Natalia Mayumi Inada - versão corrigida -- São Carlos, 2015.

110 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Terapia fotodinâmica. 2. *Streptococcus pneumoniae*. 3. Macrófagos. I. Mayumi Inada, Natalia, orient. II. Título.

*À minha família, que sempre me apoiou
e incentivou a buscar cada vez mais.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Suely, uma das pessoas que mais admiro e que estabeleceu o exemplo de pessoa que quero ser. Obrigada por toda a dedicação, carinho, amor e força. Você é meu porto seguro. À minha irmã Isadora, a quem também admiro profundamente por todo o talento, bom-humor, perseverança e percepção da realidade que tem. Você é a pessoa forte e humilde que eu quero ser. Ao meu pai Francisco, especialmente pela leitura de livros para suas filhas, desde pequenas, antes de dormir. Histórias são sonhos, e toda a minha criatividade e a habilidade de viver cada dia como se fosse uma aventura eu devo a ele.

À família eu escolhi: à Manda, Dani e Quinze, por toda a nossa história, repleta de memórias preciosas. Pela eterna amizade, mesmo à distância, sem a qual não saberia rir ao menos uma vez por dia e que me tornaria incompleta. Ao Alex, pelo carinho, amor, companheirismo, as risadas cotidianas, apoio nos momentos difíceis... À Pan, pela amizade, ajuda e todos os momentos divertidos que dividimos, dentro e fora do laboratório. À Uru, Lok, Thommy, Kuririm, Tom e Kéka, pelos ‘jogos’ de vôlei, festas, conversas, jantares, jogos e, principalmente, por ainda gostarem de mim mesmo eu sendo furona. Vocês moram no meu coração! À Ana Karla, Mari, Issao, Cyx, por todos os momentos que passamos juntos. À Neusa e Nicolau e Ana, por me receberem tão bem na família e por todo o carinho sempre.

À minha orientadora e amiga Natalia, quem me atraiu para esta área de pesquisa durante uma palestra que apresentou no meu período de graduação. Ela me ensinou a arte de ser cientista, o quão prazerosa essa profissão pode ser e o quanto é importante se dedicar com paixão ao que se faz. Obrigada pelo carinho diário, com o qual me incentiva a cada dia, pelas conversas e por tudo o que me ensinou com tanto zelo.

À professora Alexandra Ivo de Medeiros, nossa colaboradora da UNESP de Araraquara. Obrigada por abrir seu laboratório, onde realizei a maior parte do trabalho, por tudo o que me ensinou e pelas estimulantes discussões e reuniões por todo o percurso. Aos seus alunos, em particular Ana, por me receberem e por toda a ajuda ao longo desse período.

À Mariana Geralde, com quem dividi diversos momentos de alegria e de nem tanta assim durante todo o mestrado, que me acompanhou na maior parte do caminho e que ensinou muita coisa, especialmente de Microbiologia. Obrigada pela paciência, pelas risadas e por tudo!

Às professoras Fernanda Anibal e Livia Dovigo por todo o cuidado na avaliação deste trabalho, pelas ótimas contribuições para sua melhora e por tornar minha defesa um evento tão prazeroso e do qual sempre lembrarei com tanto carinho.

À Ariane Baffa e Antonio Carlos Hernandes, que me iniciaram na vida acadêmica de fato. Obrigada por todo o carinho, apoio e ensinamentos durante a iniciação científica, eu não seguiria este rumo se não fossem eles.

À professora Cristina Kurachi, por todo o apoio, ensinamentos e momentos de descontração, tanto no laboratório de microbiologia, onde a conheci na graduação, quanto no grupo. Sem ela eu também não estaria no Grupo de Óptica. Ao professor Vanderlei Bagnato, pelas discussões e por personificar o resultado de anos de empenho na carreira científica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biofotônica, Clara, Thaila, Ana Elisa, Govone, Michelle, Miriam, Cintia, Keiko, Clóvis, Lili, Hilde, Kate, Isa, Paulinha, Ramon, Larissa, Thereza, Renan, Marcelinho, Bruno, Vitor, Tião, Phamilla, Fernanda, Layla, Marcela e Antônio, pelos momentos de descontração, ajuda e discussões produtivas do dia-a-dia. À Fernandinha, Marciana e Didi pela amizade, revisão e ajuda com a redação do texto. Às meninas da secretaria e aos meninos do LAT e LIEPO por toda a ajuda. Ao grupo de corrida I.D. Acessoria Esportiva pela amizade, risadas, conversas e treinos que me ajudam tanto no fim do dia.

Às meninas da biblioteca, Neusa e Sabrina, pessoal da secretaria da pós-graduação, Ricardo, Patrícia e Sílvia, e pessoal da gráfica, pela gentileza, simpatia e eficiência em todos os momentos. Aos meus professores da graduação Otávio, Ana Paula, Luiz Nunes, Valter, Serginho, Andréa, Magon, Ilana, Lino e Irene, pela minha formação básica.

À diretoria do Instituto de Física de São Carlos, pela concessão do prêmio de terceiro melhor projeto de mestrado na SIFSC 3.

À CAPES e CEPOF, pelo apoio financeiro ao projeto e ao Instituto de Física de São Carlos, local que já considero minha segunda casa.

“Sucesso é a habilidade de passar de um fracasso para outro

sem a perda do entusiasmo”

-- Sir Winston Churchill

RESUMO

LEITE, I. S. **Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica infravermelha com indocianina verde e sua interação com macrófagos RAW 264.7.** 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

As infecções do trato respiratório inferior lideram entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Um dos grandes problemas associados ao tratamento das infecções do sistema respiratório, como as pneumonias, advém da crescente resistência aos mais modernos antibióticos adquirida pelos microrganismos. A terapia fotodinâmica, uma técnica baseada na interação da luz com uma substância fotoativa para causar dano oxidativo a células, tem se destacado como uma interessante alternativa para diversas doenças como diferentes tipos de câncer e infecções. Neste trabalho foi realizada, com experimentos *in vitro*, uma prova de princípio da possibilidade de inativar, com um protocolo eficiente e seguro, uma das bactérias mais comumente encontradas em quadros de pneumonia, a *Streptococcus pneumoniae*, com terapia fotodinâmica infravermelha mediada pela indocianina verde. Duas fontes de luz, uma a base de lasers emitindo 780 nm e outra construída com LEDs emitindo 850 nm, foram comparadas para avaliar sua eficiência. Experimentos com a bactéria foram realizados para determinação dos melhores parâmetros de inativação microbiana. Em seguida, ensaios de citotoxicidade foram feitos com macrófagos RAW 264.7 com o intuito de averiguar se as condições microbicidas não apresentavam atividade tóxica para células fagocitárias do sistema imune. Foi possível delinear os parâmetros de concentração de indocianina, tempo de incubação e dose de luz que apresentassem atividade microbicida e que não fossem tóxicas para as células. A interação da terapia fotodinâmica com a ação fagocitária dos macrófagos sobre as bactérias foi avaliada pelo estabelecimento de co-cultura dessas espécies. Concluiu-se que, utilizando-se LEDs de 850 nm fornecendo uma dose de luz de 10 J/cm^2 as amostras contendo indocianina verde $5 \mu\text{M}$, é possível inativar *S. pneumoniae* de modo eficiente e auxiliar a ação fagocitária de macrófagos.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Streptococcus pneumoniae*. Macrófagos.

ABSTRACT

LEITE, I. S. ***Streptococcus pneumoniae* inactivation through infrared photodynamic therapy with indocyanine green and its interaction with RAW 264.7 macrophages.** 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The lower respiratory tract infections lead among the main causes of morbidity and mortality worldwide. A major problem associated with respiratory tract infections, e.g. pneumonia, stems from the increasingly resistance to most modern antibiotics developed by microorganisms. Photodynamic therapy, a technique based on the interaction of light and a photoactive substance to cause oxidative damage to cells, has emerged as an attractive alternative for several diseases such as different kinds of cancer and infections. In this work, with *in vitro* experiments, we accomplished a proof of concept for the possibility of inactivating, with an efficient and secure protocol, one of the most commonly found bacteria in pneumonia cases, *Streptococcus pneumoniae*, with infrared photodynamic therapy mediated by indocyanine green. Two light sources, one based on 780 nm lasers and the other built with 850 nm LEDs, were compared to evaluate their efficiency. Experiments with bacteria determined the best parameters microbial inactivation. Then, cytotoxicity assays with RAW 264.7 macrophages analyzed if the microbicidal parameters had toxic effects on immune cells. It was possible to delineate the indocyanine concentration parameters, incubation time and dose of light to obtain microbicidal results that weren't toxic to the cells. Interaction of photodynamic therapy with the phagocytic action of macrophages on the bacteria was assessed by establishing a co-culture with these species. We concluded that, using 850 nm LEDs providing a light dose of 10 J/cm² to samples containing 5µM indocyanine green, it is possible to inactivate *S. pneumoniae* and efficiently assist the phagocytic action of macrophages.

Keywords: Photodynamic therapy. *Streptococcus pneumoniae*. Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama percentual com as 10 maiores causas de morte no mundo.....	25
Figura 2 -	Rota patogênica de diferentes infecções causadas por <i>S. pneumoniae</i>	29
Figura 3 -	Imagem de microscopia de bactérias do gênero <i>Streptococcus</i> , que apresentam morfologia esférica, formando cadeias.....	30
Figura 4 -	Micrografia eletrônica de varredura de um macrófago murino fagocitando duas células vermelhas do sangue. As setas indicam pseudópodos do macrófago que estão se estendendo para engolfar as células.	33
Figura 5 -	Micrografia de lapso de tempo com contraste de fase da fagocitose e digestão de bacilos (20 µm) por macrófago humano.....	33
Figura 6 -	Geração de espécies tóxicas de oxigênio em células fagocitárias, no interior de fagolisossomos.....	34
Figura 7 -	Diagrama de Jablonski ilustrando o mecanismo de ação da TFD. O FS no estado fundamental, é excitado, passando para um estado de maior energia denominado estado singleto e, posteriormente, para o estado tripleto. Este estado pode interagir com o oxigênio molecular em duas vias: tipo 1 (formação de espécies reativas de oxigênios - EROs) e tipo 2 (formação de oxigênio singleto).....	377
Figura 8 -	A penetração da luz no tecido aumenta com o comprimento de onda. Observando (A) os espectros de absorção da água (azul), hemoglobina (rosa), hemoglobina oxigenada (vermelho) e melanina (preto), verifica-se uma região chamada de janela óptica, que compreende a região do espectro no qual a absorções de cada elemento é baixa, permitindo (B) a maior penetração do vermelho no tecido biológico do que dos outros comprimentos de onda luz visível.	39
Figura 9 -	Estrutura química da ICV.	40
Figura 10 -	Espectro de excitação (azul) e emissão (vermelho) da ICV em sangue.	41
Figura 11 -	Indocianina verde comercializada pela empresa Ophthalmos.	45
Figura 12 -	Imagem de microscopia da linhagem RAW 264.7.	46
Figura 13 -	Câmara de Neubauer com as três possíveis áreas (A, B e C) para contagem de células. Para ambas as linhagens, devido ao tamanho das células, os quadrantes 'A' foram utilizados.	47
Figura 14 -	Cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em ágar-sangue.....	48
Figura 15 -	Esquema ilustrativo da diluição seriada: 50 µL da amostra homogeneizada eram transferidos para 450 µL de PBS estéril, originando a diluição 10 ⁻¹ (ou 1:10). Após homogeneização desta solução, 50 µL eram transferidos para outro microtubo contendo 450 µL de PBS estéril, gerando a diluição 10 ⁻² (ou 1:100), e assim por diante. Uma gota contendo 10 µL de cada uma das diluições era transferida e espalhada em um quadrante de uma placa de Petri contendo ágar-sangue.....	50

Figura 16 -	Esquema da placa de 96 poços destacando as posições das condições experimentais testadas. Todos os poços contêm células e o mesmo desenho foi usada para as placas de 10^5 e 5×10^4 células por poço.....	51
Figura 17 -	Resumo do protocolo experimental para testes de citotoxicidade no escuro de ICV.....	53
Figura 18 -	Equipamentos do tipo protótipo desenvolvidos no IFSC para irradiação de placas de cultura multi-poços A) Lasertable e B) Biotable.	54
Figura 19 -	Espectro de emissão dos lasers de 780 nm (linha preta) utilizados na confecção da Lasertable e dos LEDs (vermelha) da Biotable.	55
Figura 20 -	Disposição das condições experimentais utilizadas no ensaio piloto numa placa de 96 poços, com três diferentes concentrações de ICV e três tempos de incubação.	58
Figura 21 -	Disposição definitiva dos parâmetros experimentais para os testes de IFD. Os experimentos foram montados como ilustrado e as amostras foram tratadas seguindo a metodologia descrita. Após incubações com ICV, as amostras foram irradiadas com 780 ou 850 nm, ou então foram mantidas no escuro (grupo PBS).	59
Figura 22 -	Resumo do protocolo experimental para testes de IFD de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	61
Figura 23 -	Resumo experimental do protocolo dos ensaios de citotoxicidade da TFD em macrófagos RAW 264.7.	64
Figura 24 -	Disposição parâmetros experimentais para os testes de co-cultura. Os experimentos foram montados como ilustrado e as amostras foram tratadas seguindo a metodologia descrita. Após incubações com ICV, as amostras foram irradiadas com 780 ou 850 nm, ou então mantidas no escuro como controle. Somente os poços indicados na figura continham células e <i>S. pneumoniae</i>	65
Figura 25 -	Resumo do protocolo experimental para ensaios de co-cultura.	67
Figura 26 -	Gráficos com espectros de absorção de ICV 10 μ M em PBS, DMSO, DMEM sem vermelho de fenol + 10 % DMSO e PBS + 10 % DMSO coletados por um período de 24 horas seguidas. As medidas foram realizadas num intervalo de 2 horas entre cada uma, demonstrado pela legenda da figura do painel A.	72
Figura 27 -	Gráficos de viabilidade celular de macrófagos alveolares após incubação com seis diferentes concentrações de ICV por 10, 20 e 30 minutos em placas com 10^5 (placas A) e 5×10^4 células (placas B) por poço.	73
Figura 28 -	Primeiro ensaio piloto realizado com <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle e controle de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (10, 50 e 150 μ M), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30', respectivamente) nas amostras irradiadas e por 30 minutos no grupo 'escuro'. A irradiação foi realizada somente com 850 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 30 J/cm ²	79
Figura 29 -	Segundo ensaio piloto realizado com <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle de escuro e de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (10, 1 e 0,1 μ M), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30'). A irradiação foi realizada somente com 850 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 10 J/cm ²	82

- Figura 30 - Terceiro ensaio piloto realizado com *Streptococcus pneumoniae*. Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle de escuro e de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (1, 5 e 10 μM), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30', respectivamente). A irradiação foi realizada somente com 780 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 10 J/cm².84
- Figura 31 - Gráfico dos experimentos de IFD promovida pela irradiação das amostras utilizando-se a Lasertable (780 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras de *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubadas com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.....87
- Figura 32 - Gráfico dos experimentos de IFD promovida pela irradiação utilizando-se a Biotable (850 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras de *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubadas com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.....89
- Figura 33 - Comparação da IFD de *S. pneumoniae* em função de ICV 1, 5 e 10 μM , 10 e 20 J/cm² e 780 e 850 nm.....90
- Figura 34 - Citotoxicidade da TFD quando a irradiação é realizada com a Lasertable (780 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 que não foram incubados com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.....92
- Figura 35 - Citotoxicidade da TFD quando a irradiação é realizada com a Biotable (850 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 que não foram incubados com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.93
- Figura 36 - Comparação da citotoxicidade da TFD sobre RAW 264.7 dos grupos irradiados com diferentes comprimentos de onda e diferentes doses de luz. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro....94
- Figura 37 - Co-cultura de macrófagos e bactéria, comparando os efeitos da irradiação em 780 e em 850 nm. As soluções de ICV (5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a 10 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (780 e 850 nm) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 e *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubados com o FS. O grupo "fagocitose" corresponde aos grupos sem tratamento e ação imunológica. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.....96

Figura 38 - Gráfico de quantificação relativa da produção de peróxido de hidrogênio em cada amostra	98
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Impacto das infecções hospitalares em pacientes internados em UTIs: percentual da taxa de mortalidade que ocorrem em UTIs (global) e taxa de mortalidade devido à internação em UTIs (atribuída), aumento do período de internação e dos gastos devido a pneumonias e infecções de corrente sanguínea.....	27
Tabela 2 -	Relação entre os parâmetros avaliados e a pontuação atribuída ao se aplicar o Escore Clínico de Infecção Pulmonar. PaO_2/FiO_2 representa a razão entre pressão arterial de oxigenação e a fração inspirada de oxigênio	28
Tabela 3 -	Relação das condições experimentais utilizadas.	52
Tabela 4 -	Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de IFD de <i>S. pneumoniae</i> . O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.....	60
Tabela 5 -	Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de citotoxicidade com células RAW 264.7. O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.....	63
Tabela 6 -	Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de co-cultura com células RAW 264.7 e <i>S. pneumoniae</i> . O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.....	66
Tabela 7 -	Valores de potência (P_{medida}) dos equipamentos de iluminação (Biotable – 850 nm – e Lasertable – 780 nm) coletados através da utilização de um potenciômetro. A potência média ($P_{média}$) e o desvio padrão da medida (δP) são calculados para cada tempo, e a média desses valores resulta no valor de potência fornecido por cada equipamento.....	76
Tabela 8 -	Valores da irradiância (I) calculada, a dose de luz (D) desejada e o tempo de irradiação (t_{irr}) correspondente para cada equipamento.	76
Tabela 9 -	Valores das medidas da temperatura (T) de dois meios submetidos a 15 minutos de irradiação.	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CPIS	Escore clínico de infecção pulmonar
DMEM	Meio de Dulbecco modificado por Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
EIOs	Espécies intermediárias de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
H ₂ O ₂	Peróxido de
ICV	Indocianina verde
IFD	Inativação fotodinâmica
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LEDs	Diodos emissores de luz
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO ₂ ⁻	Nitrito
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PAVM	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PBS	Tampão salino fosfato
SARA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SFB	Soro fetal bovino
R.P.M.	Rotações por minuto
TFD	Terapia fotodinâmica
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	255
2.1 Pneumonia.....	255
2.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
2.2 Macrófagos e a Fagocitose	31
2.3 Terapia Fotodinâmica.....	35
2.4 Indocianina Verde	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Indocianina Verde	45
4.2 Linhagens e Cultivo de Células.....	46
4.3 Cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	48
4.3.1 Recuperação de UFCs	49
4.4 Ensaios de Curva Dose-resposta da ICV no Escuro.....	50
4.4.1 Determinação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT	52
4.5 Equipamentos: Lasertable e Biotable	53
4.5.1 Determinação da Irradiância e Cálculo de Tempo de Irradiação	55
4.5.2 Determinação da Variação de Temperatura nas Amostras.....	56
4.6 Inativação Fotodinâmica	56
4.6.1 Padronização das Concentrações de ICV e de Iluminação	57
4.6.2 Experimentos de IFD	59
4.7 Ensaios de Citotoxicidade da TFD.....	62
4.8 Ensaios em Co-cultura	65
4.8.1 Avaliação da produção de nitrito (NO_2^-)	68
4.8.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	68
4.9. Análise Estatística	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	711
5.1. Estabilidade de soluções de ICV	71
5.2. Ensaios de Curva Dose-resposta da ICV no Escuro.....	72
5.3 Equipamentos: Lasertable e Biotable	75
5.3.1 Determinação da Irradiância e Cálculo de Tempo de Irradiação	75
5.3.2 Determinação da Variação de Temperatura nas Amostras.....	77

5.4 Inativação Fotodinâmica	78
5.4.1 Padronização das Concentrações de ICV e de Iluminação.....	78
5.4.2 Experimentos de IFD.....	855
5.5 Ensaios de Citotoxicidade da TFD	911
5.6 Ensaios em Co-cultura.....	95
5.5.1 Avaliação da produção de NO_2^-	97
5.5.2 Avaliação da produção de H_2O_2	98
6 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE	109
A1Publicações geradas no período de mestrado.....	109
A2 Participação em Eventos	109

1 INTRODUÇÃO

As infecções de trato respiratório inferior causaram 3.1 milhões de morte no mundo em 2012. Uma dessas doenças, a pneumonia, é a maior responsável pela mortalidade infantil, e pode ser de origem bacteriana, viral ou fúngica. Atinge o pulmão, causando o preenchimento dos alvéolos com pus, o que torna limitada a oxigenação, torna a respiração dolorosa e causa febre, tosse e náusea. Sua transmissão pode ser aérea, pelo contato com gotículas de saliva contaminada provenientes de espirro ou tosse, mas indivíduos podem se autocontaminar pela inalação de microrganismos comumente encontrados na flora bucal, o que é muito comum em pacientes que necessitam de ventilação mecânica. Casos brandos de pneumonia podem ser tratados em domicílio com o controle da febre, repouso e ingestão de fluidos. Alguns desses casos e os mais graves requerem o uso de antibióticos, porém o crescimento da resistência microbiana a este tipo de fármaco tem reduzido sua eficiência, representando um grande obstáculo para o tratamento convencional.

A terapia fotodinâmica pode representar uma alternativa, ou agir como técnica coadjuvante, para o tratamento de pneumonia. Sua ação oxidativa é capaz de causar dano a diversos componentes celulares e depende da interação da luz com um fotossensibilizador, um composto fotoativo, em um ambiente rico em oxigênio. Até o presente momento, não há relatos do desenvolvimento de resistência a essa modalidade terapêutica por microrganismos. Pensando-se desenvolver uma técnica não invasiva, para reduzir o impacto no paciente com esse quadro clínico, que usualmente já se encontra muito debilitado, é necessário utilizar uma fonte de luz cujo comprimento de onda que seja capaz de atingir o sítio de tratamento – o pulmão – sem que seja ela inserida em seu corpo. Optou-se então por uma fonte de iluminação que operasse na região infravermelha próxima do espectro eletromagnético, uma vez que a luz visível é incapaz de penetrar mais do que poucos milímetros no tecido biológico (aproximadamente 2 mm para luz verde, passando para 10 mm com o uso do vermelho).

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma nova técnica terapêutica é a validação, em sistemas *in vitro*, das hipóteses propostas. Desse modo, neste trabalho, foi realizada a prova de princípio da possibilidade de inativar uma das bactérias mais comumente encontradas em quadros de pneumonia, a *Streptococcus pneumoniae*, com terapia fotodinâmica. Também foi avaliada a segurança da técnica em relação ao macrófago RAW 264.7, uma célula murina de defesa, para garantir que a terapia não cause danos ao sistema

imunológico, e a co-culturas do microrganismo com a célula efetora. Desse modo foi pretendido estabelecer um protocolo *in vitro* que fosse eficiente e seguro para o estudo de um tratamento alternativo de pneumonia pneumocócica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pneumonia

Durante a primeira década dos anos 2000, infecções de vias aéreas inferiores permaneceram entre as dez maiores causas de mortalidade no mundo, causando 3.1 milhões (aproximadamente 5,5 %) de mortes em 2012 (Figura 1).¹ Uma dessas infecções, a pneumonia, é a maior responsável pela mortalidade infantil em países subdesenvolvidos, especialmente no sul da Ásia e África subsaariana, e pela morte de idosos em países desenvolvidos. Estima-se que 450 mil pessoas contraíam a doença anualmente, e que 18% das mortes entre crianças abaixo de 5 anos seja provocado por ela.² No Brasil, entre 2008 e 2012, o terceiro procedimento mais realizado em casos de admissão hospitalar foi o tratamento para essa infecção.³

Figura 1 - Diagrama percentual com as 10 maiores causas de morte no mundo.

Fonte: Adaptada de WORLD.....¹

A pneumonia comumente é causada por bactérias, vírus ou fungos e consiste na inflamação aguda do parênquima pulmonar. Com menor frequência e predominantemente incidente em pacientes imunocomprometidos, pode ser originada por parasitas. Provoca o preenchimento dos alvéolos com fluidos e pus, o que resulta na redução da oxigenação, ocasionando tosse, dores no tórax e redução da capacidade respiratória. Outros sintomas são: febre, calafrios, fadiga, dores de cabeça, dispneia e náusea. A contaminação pode ocorrer através do contato com gotículas infectadas, provenientes de tosse ou espirro, e que são transportadas pelo ar, ou pela microaspiração de vírus ou bactérias comumente encontradas na cavidade oral, nariz ou garganta, ou ainda por translocação hematogênica de microrganismos para o pulmão. A aspiração de alimentos, líquidos ou mesmo vômito também podem levar a este quadro clínico.^{2, 4-6}

Tratando-se do ambiente onde a infecção ocorre, uma classificação comumente utilizada apresenta a divisão dos casos em dois tipos distintos: pneumonia adquirida na comunidade (PAC) ou pneumonia adquirida em hospitais, denominada nosocomial. A PAC é definida como o quadro infeccioso que “se manifesta clinicamente na comunidade ou em hospitais dentro das primeiras 48 horas da internação”⁷ e é considerada potencialmente grave. Seus índices de mortalidade diferem para cada caso: 1% quando não há necessidade de internação, variando entre 5-12% quando ela é necessária. Para pacientes que requerem internação em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), o índice de mortalidade pode chegar a 50%.⁷ Sua etiologia é composta por *Streptococcus pneumoniae*, responsável por cerca de 60% dos casos, *Haemophilus influenzae*, apresentando uma variação entre 3 a 10%. Agentes atípicos, como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* são responsáveis por 20% das infecções, as quais recebem a denominação de pneumonia atípica. Vírus representam 4 a 20% dos casos de PAC, bacilos gram-negativos, 1 a 9% e *Staphylococcus aureus*, 1 a 6% dos casos. Casos de pneumonia parasitária, encontrados majoritariamente em pacientes com sistema imune comprometido, como pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ou *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, AIDS), e fúngica são mais raros, e podem ser provocados por *Toxoplasma gondii* e *Ascaris lumbricoides*, e *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*, respectivamente.^{7,8}

Pneumonia nosocomial é definida como aquela contraída por pacientes com diagnóstico realizado 48 horas após sua admissão hospitalar, sem apresentar sintomas ou estar sendo incubada antes deste período, ou 48 horas após obter alta.⁹⁻¹² Nos Estados Unidos, foi

associada à alta mortalidade, morbidade e a um aumento nos gastos hospitalares pelo país. Estatísticas demonstram que pacientes internados em UTIs são os mais susceptíveis a infecções hospitalares quando comparados aos internados em outros setores, atingindo uma média de 35%.¹⁰ Observando-se o conjunto de todas as alas de um hospital, verifica-se que em UTIs há predominância de casos de pneumonia (Tabela 1).

Tabela 1 - Impacto das infecções hospitalares em pacientes internados em UTIs: percentual da taxa de mortalidade que ocorrem em UTIs (global) e taxa de mortalidade devido à internação em UTIs (atribuída), aumento do período de internação e dos gastos devido a pneumonias e infecções de corrente sanguínea.

Infecção hospitalar	Mortalidade		Prolongamento da internação (dias)	Custos (em dólares)
	Global (%)	Atribuída (%)		
Pneumonia	30 a 54	7 a 27	9 a 15	8000
Infecções da corrente sanguínea	35 a 50	35	8	40 000

Fonte: KNOBEL¹⁰

A maior taxa de incidência de pneumonia nosocomial é encontrada em pacientes que requerem a ventilação (recebendo, nestes casos, o nome de pneumonia associada à ventilação mecânica – PAVM). Ocorre em cerca de 7-27 % de todos os pacientes intubados e sua etiologia é dividida de acordo com os sintomas manifestados. Para casos precoces, cerca de 5-20% deles são causados por *Streptococcus pneumoniae* e 5-15%, por *Haemophilus influenzae*. Em estágios mais avançados, de 20-60% dos pacientes apresentam *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *Acinetobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.¹³⁻¹⁴

Para que a instalação da PAVM ocorra, é necessário que os patógenos responsáveis transponham os mecanismos de defesa do sistema respiratório, como reflexo glótico e da tosse; fluxo salivar e estruturas mucociliares. A presença do tubo endotraqueal em pacientes com ventilação mecânica prejudica a ação destes mecanismos no hospedeiro, permitindo que partículas inaladas tenham acesso direto das vias aéreas superiores às vias aéreas inferiores. Assim, a PAVM tornou-se uma complicação frequente em pacientes internados em UTIs.¹⁴⁻¹⁵

O diagnóstico de pneumonia geralmente é realizado pela análise dos sintomas e da avaliação física, como medição da temperatura, pulsação, frequência respiratória e leitura de oximetria de pulso, acrescidas da presença de indicativos em hemogramas, como neutrofilia, e em radiografias da região torácica, como infiltrados.^{4; 16} No entanto, ausência de um padrão ouro e a utilização de apenas critérios clínicos pode resultar em um diagnóstico equivocado e

tratamento inadequado, principalmente em casos de PAVM.¹⁷⁻¹⁸ Diversas patologias produzem quadros clínicos similares em pacientes em estado grave, como a manifestação de atelectasia, edema pulmonar cardiogênico, infarto pulmonar, síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA) e hemorragia alveolar. Em 1972 foi elaborado o Escore Clínico de Infecção Pulmonar (CPIS, *Clinical Pulmonary Infection Score*, Tabela 2), um sistema de pontuação que considera diferentes aspectos, como por exemplo a coloração de Gram de culturas microbianas provenientes do aspirado traqueal. Uma pontuação total igual ou superior a 6 está associada à elevada probabilidade de PAVM.¹⁸

Tabela 2 - Relação entre os parâmetros avaliados e a pontuação atribuída ao se aplicar o Escore Clínico de Infecção Pulmonar. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ representa a razão entre pressão arterial de oxigenação e a fração inspirada de oxigênio.

Parâmetro	Valores	Pontuação
Temperatura (°C)	$\geq 36,5$ e $\leq 38,4$	0
	$\geq 38,5$ e $\leq 38,9$	1
	≤ 36 ou ≥ 39	2
Contagem de leucócitos (células/mm ³ de sangue)	≥ 4.000 e ≤ 11.000	0
	< 4.000 ou > 11.000	1
	< 4.000 ou > 11.000 e bastões ≥ 500	2
Radiograma do tórax	Ausência de infiltrado	0
	Infiltrado difuso	1
	Infiltrado localizado	2
Secreção traqueal	ausente ou escassa	0
	não purulenta	1
	purulenta	2
Oxigenação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	>240 mmHg ou presença de SARA	0
	≤ 240 mmHg	2

Fonte: CREMONESE et. al.¹⁸

Casos amenos da doença são normalmente tratados em casa, com a recomendação de repouso, hidratação constante e controle de febre pelo uso de anti-inflamatórios não esteroides. Para quadros mais severos, a prescrição de antibióticos - como azitromicina, amoxicilina, cefalexina, levofloxacina, vancomicina e doxiciclina - é tida como tratamento convencional, mesmo quando a pneumonia é viral, dado que um terço dos casos envolve co-infecções com bactérias. No entanto, desde a década de 30, momento no qual foi introduzido o uso desses fármacos no combate de infecções sistêmicas bacterianas, seu recorrente emprego inadequado vem selecionando e favorecendo a proliferação de microrganismos insensíveis a certos antibióticos.¹⁹⁻²¹ Este fenômeno é denominado a resistência microbiana, e representa um dos maiores obstáculos para o tratamento de infecções, como pode ser observado nos casos de PAC e PAVM.²²⁻²⁶

2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Dentre os agentes etiológicos, a bactéria *S. pneumoniae*, também chamada de pneumococo, é uma bactéria comumente encontrada em quadros infecciosos de pneumonia.⁶ ²⁷ Está presente na microbiota normal do sistema respiratório superior, porém sua colonização excessiva ou migração para outras regiões está relacionada com uma grande variedade de outras doenças, desde infecções mais brandas, como otites e sinusite aguda, como quadros infecciosos perigosos, como bacteremia e meningite (Figura 2).^{6,28-32} Doenças pneumocócicas invasivas que não recebem tratamento apresentam taxas de mortalidade próximas a 30 %, e casos de indivíduos hospitalizados com pneumonia causada por pneumococo, mesmo sob tratamento antimicrobiano intensivo, exibem uma mortalidade de 10 %.²⁸⁻³¹

Figura 2 - Rota patogênica de diferentes infecções causadas por *S. pneumoniae*.

Fonte: Adaptada de BOGAERT; DE GROOT; HERMANS.³⁰

É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa com crescimento favorecido em atmosferas com 5 % de CO₂ e nutricionalmente fastidiosa. A temperatura ideal para seu cultivo é 37 °C e, por serem microrganismos alfa-hemolíticos, quando semeados em meio de cultura sólido contendo sangue (água-sangue), produzem um halo esverdeado característico da hemólise parcial dos eritrócitos provocada pelo peróxido de hidrogênio produzido. É sensível

a bíles, uma característica não compartilhada com diversas outras espécies do mesmo gênero. Não é capaz de produzir a enzima peroxidase, o que acaba limitando seu crescimento *in vitro* uma vez que o acúmulo de peróxido de hidrogênio produz efeitos tóxicos sobre ela. Também não é dotada de estruturas que confirmam motilidade, e bactérias individuais possuem uma morfologia ovalada ou esférica, denominada coco, com diâmetro de aproximadamente 0,8 μm , porém apresentam-se, de modo geral, aos pares (diplococos) ou formando curtas cadeias (Figura 3).²⁸⁻³¹

Figura 3 - Imagem de microscopia de bactérias do gênero *Streptococcus*, que apresentam morfologia esférica, formando cadeias.

Fonte: MADIGAN et. al.²⁸

Apresentam glicocálice, polímeros produzidos pelas células que são secretados para revestir a parede celular, constituído por uma rede organizada heteropolissacarídica de glicose, galactose e ramnose.²⁸ Essa rede é rígida e fortemente acoplada à parede, passando a ser chamada de cápsula. Este componente, de espessura variando entre 200 a 400 nm, é um importante antígeno bacteriano e o mais relevante fator de virulência identificado de *S. pneumoniae*, uma vez que células encapsuladas são capazes de se alojar em tecido alveolar e crescer desenfreadamente, passando a desencadear uma forte resposta inflamatória e reduzindo a função pulmonar, o que leva à pneumonia. A ausência da cápsula aumenta consideravelmente a capacidade de reconhecimento da bactéria pelas células de defesa, fazendo com que os microrganismos sejam prontamente fagocitados e eliminados pelo sistema imune. Há mais de 90 diferentes sorotipos capsulares.^{6,29, 32- 34}

2.2 Macrófagos e a Fagocitose

O sistema responsável pela defesa do organismo contra agentes agressores é o imune. Ele é responsável pela manutenção da homeostase e imunidade dos indivíduos, que é a capacidade do corpo de, perante a presença de diferenças substâncias, reconhecê-las e, caso sejam consideradas estranhas, promover uma resposta a elas, tentando eliminá-las. Sua composição é complexa, incluindo moléculas e células, e divide-se em dois subsistemas quando são observadas suas características anatômicas: o monocítico, também chamado de macrofágico ou fagocítico mononuclear, e o linfocítico ou linfocitário. O primeiro deles atua na vigília constante do organismo, e age prontamente frente a agentes estranhos (em especial contra microrganismos intracelulares e células neoplásicas) através do recrutamento de outras células de defesa por quimiotaxia, da realização de fagocitose e da síntese de citocinas, importantes moléculas sinalizadoras. Apresenta antígenos para o sistema linfocítico, que é responsável, além da vigilância, defesa específica e produção de citocinas, pela memória imunológica do organismo, a qual pode perdurar por anos.^{35,36} A resposta imune é coletiva e organizada, e é iniciada pelo reconhecimento de antígenos estranhos. A reconhecimento leva à ativação dos linfócitos, por sua proliferação e diferenciação, o que resulta na ação de células efetoras sobre o alvo da resposta, permitindo sua eliminação.³⁶⁻³⁷

Metchnikoff, um cientista ucraniano, no final do século XIX documentou o primeiro fenômeno de proteção descrito na imunologia: a fagocitose. Através da observação desse evento em larvas de estrelas do mar como mecanismo de defesa, ele propôs que o mesmo poderia ocorrer em humanos. Hoje se sabe que a fagocitose é um dos primeiros mecanismos de defesa, e é efetuada por células fagocitárias, que no ser humano são: neutrófilos, monócitos e macrófagos e eosinófilos. Todas são oriundas de células-tronco hematopoiéticas e podem apresentar variadas morfologias após a maturação e sua ativação. Os monócitos são os primeiros a circular no sangue e se apresentam diferenciação incompleta. Os macrófagos são, em sua grande maioria, derivados de monócitos que se diferenciam após o atingir seu local de atuação.³⁶

Existem diferentes tipos de macrófagos, que são nomeados de acordo com o tecido em que se encontram: histiócitos para tecido conjuntivo, osteoclastos em ossos macrófagos alveolares em alvéolos. São células que apresentam longa meia-vida, baixa taxa de replicação e diferentes formas, podendo apresentar citoplasma abundante. São ativados por diversos

estímulos e produzem fatores de crescimento para células que promovem reparação tecidual, como fibroblastos e células do endotélio vascular. São responsáveis por variados sintomas sistêmicos advindos de inflamação, como a febre, pelo recrutamento de células inflamatórias a partir da produção de citocinas. O componente lipossacarídeo (LPS) de parede bacteriana é um dos indutores mais potentes da resposta e ativação de macrófagos, se ligando ao receptor CD14 da superfície celular.^{34,37}

A fagocitose é o processo de captação de macropartículas, como restos celulares e microrganismos, e é desencadeado pelo reconhecimento do alvo através de receptores de padrões regulares de patógenos. Apresenta quatro etapas: adesão, ingestão, digestão e eliminação. A adesão consiste na ligação das partículas alvo à superfície das células fagocitárias e é seguida da ingestão, na qual o alvo é progressivamente circundado por uma pequena porção projetada da membrana citoplasmática, chamada de pseudópodo (Figura 4), até a formação de uma vesícula chamada fagossomo. Essa vesícula não tem diâmetro definido, uma vez que se adequa às extensões da partícula a ser ingerida, podendo ocupar quase todo o volume do fagócito. Entre as células fagocitárias, os macrófagos apresentam capacidade de fagocitar grandes quantidades de material. Com a interiorização de seu alvo, ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo, formando o fagolisossomo, onde se dará a digestão e degradação do material. A última etapa consiste na eliminação do agente invasor. De modo geral, a fagocitose é um mecanismo eficiente que leva à morte dos patógenos que sofrem a ingestão, porém quando ele falha, os fagócitos atuam como sinalizadores para outras células da defesa (Figura 5).^{28,35-37}

Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura de um macrófago murino fagocitando duas células vermelhas sanguíneas. As setas indicam pseudópodos do macrófago que estão se estendendo para engolfar as células.

Fonte: ALBERTS et. al. ³⁷

Figura 5 - Micrografia de lapso de tempo com contraste de fase da fagocitose e digestão de bacilos (20 µm) por macrófago humano.

Fonte: MADIGAN et al. ²⁸

A atividade microbicida das células fagocitárias deve-se à sua capacidade de produzir grandes quantidades de espécies intermediárias de oxigênio (EIOs) e de nitrogênio. As EIOs têm sua geração iniciada pela ação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Figura 6). Essa enzima é ativada por produtos bacterianos, que prontamente catalisa

a formação de superóxido. Esta molécula pode ser convertida a peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radicais hidroxila, sendo que o microambiente ácido dos fagolisossomos favorece a produção de tais espécies. As reações dependentes de oxigênio acabam demandando quantidades grandes de oxigênio, aumentando seu consumo por fagócitos ativados, fenômeno conhecido como surto de respiração.^{28,38,39}

A produção de óxido nítrico, um radical livre gasoso, é desencadeada por citocinas e fatores bacterianos. É o resultado, junto com a produção de L-citrulina, da conversão do aminoácido L-arginina e oxigênio molecular mediada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Apesar de ser um importante microbicida, é instável em meio aquoso, e sua reação com o oxigênio do meio gera espécies de nitrogênio como o nitrito e nitrato. Tanto essas espécies, quanto as EIOs exercem atividade oxidativa sobre importantes constituintes celulares de microrganismos, resultando na sua perda de viabilidade.³⁸⁻⁴¹

Figura 6 - Geração de espécies tóxicas de oxigênio em células fagocitárias, no interior de fagolisossomos.

Alguns patógenos apresentam mecanismos para neutralizar os produtos tóxicos dos fagócitos, provocar a morte das células de defesa ou ainda evadir a fagocitose. Algumas espécies são capazes de produzir carotenoides, substâncias que neutralizam o oxigênio singlete, ou apresentam estruturas na parede celular que absorvem radicais hidroxila e o ânion superóxido, conseguindo inativar as espécies tóxicas de oxigênio mais letais produzidas pelas células fagocitárias.^{42,28} A produção das citotoxinas denominadas leucocidinas por alguns microrganismos intracelulares permitem sua liberação por matar o fagócito. A presença de cápsula bacteriana é um mecanismo eficiente de evasão da fagocitose por dificultar seu reconhecimento e adesão pelas células.

2.3 Terapia Fotodinâmica

Uma técnica alternativa terapêutica para o tratamento de câncer e de diferentes patologias de origem bacteriana, viral, fúngica e inflamatória é a terapia fotodinâmica (TFD), que faz uso da luz e uma substância ativa para causar dano oxidativo.⁴³⁻⁴⁷ Relatos do uso de procedimentos fotomédicos no tratamento de infecções cutâneas são encontrados em documentos da Antiguidade, como o papiro Ebers e o sagrado livro indiano Arthava-veda, e da Idade Média.⁴⁸ Porém foi só a partir do final do século XIX que a fototerapia foi retomada, com o médico suíço Arnold Rikli e a fundação do Instituto Nacional de Medicina, onde desenvolveu terapias naturais usando luz do sol (helioterapia) que ainda são válidas. São dele as palavras consideradas o âmago dessa modalidade: ‘A Água é benéfica, o Ar é ainda mais mas a Luz é a melhor’.^{48,49} A introdução de uma substância fotoativa ocorreu também no fim de 1800 com Oscar Raab, que observou, devido a um incidente em seu experimento – uma tempestade, a redução da toxicidade do cloridrato de acridina contra *Paramecium caudatum* quando comparada com seus efeitos em um dia normal. Ele relacionou a dependência do dano observado coma quantidade de luz, publicando assim o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos.^{43,50} Em 1903 ocorreu a primeira aplicação clínica da técnica com a utilização de eosina e luz para o tratamento de lúpus vulgaris, sífilis, psoríases e câncer de pele superficial.⁵¹ Desde então, o número de estudos e aplicações da TFD tem sido cada vez mais ampliado.

Essa técnica consiste na ação coadjuvante de três elementos para causar dano ao seu alvo terapêutico: uma substância fotoativa, denominada fotossensibilizador (FS), oxigênio

molecular no alvo do tratamento e luz possuindo um comprimento de onda específico para que seja capaz de interagir com o FS, o que é característico de cada molécula. Seu mecanismo de ação é iniciado com a interação FS-luz: a absorção de um fóton por um elétron da molécula ocasiona sua transição eletrônica, que se encontra inicialmente no seu estado fundamental (que é um estado singleto, pois seus elétrons têm spins pareados em orbitais de baixa energia), para um de maior energia também singleto (Figura 7). Por ser uma configuração instável, o FS retorna ao seu estado original, o que pode ocorrer por processos distintos: pela geração de calor, um processo não-radioativo, que resulta da dissipação da energia absorvida para as moléculas da vizinhança (solvente) ou por fluorescência, que é a emissão de um fóton cujo comprimento de onda corresponda à diferença energética entre os dois estados.

Outro processo possível envolve a reversão do spin do elétron excitado, o que é chamado de cruzamento intersistemas, fazendo com que o FS passe para um estado excitado de menor energia, porém relativamente mais estável do que o singleto, chamado tripleto. A molécula pode passar por outra reversão de spin do elétron excitado e retornar ao estado fundamental pelo processo de fosforescência, ou pode interagir com moléculas do meio. Nas transições eletrônicas, interações tripleto-tripletto são permitidas pelas regras de seleção relacionadas à multiplicidade de spins, o que permite que o FS interaja com o oxigênio molecular, uma vez este se apresenta na forma tripleto em seu fundamental. Para a TFD, este último processo é crítico, havendo dois principais mecanismos da interação do FS no estado tripleto com o oxigênio do meio, que levam à sua atividade microbicida e citotóxica:^{49,52-54}

- Mecanismo tipo 1: através de transferência eletrônica, há geração do ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

- Mecanismo tipo 2: por meio de transferência de energia do FS para o oxigênio, gerando a inversão do spin de um elétron, é produzido o oxigênio singleto. Este é uma forma reativa altamente citotóxica, sendo o principal mediador do dano celular causado pela TFD.^{43,52,55}

Figura 7 - Diagrama de Jablonski ilustrando o mecanismo de ação da TFD. O FS no estado fundamental, é excitado, passando para um estado de maior energia denominado estado singlete e, posteriormente, para o estado tripleto. Este estado pode interagir com o oxigênio molecular em duas vias: tipo 1 (formação de espécies reativas de oxigênio - EROs) e tipo 2 (formação de oxigênio singlete).

Fonte: DENIS et. al.⁵²

Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, e tanto as EROs quanto o oxigênio singlete são capazes de interagir com diversos componentes biológicos, como membranas celulares, membranas de organelas e diversas biomoléculas, promovendo sua oxidação e morte celular.⁵⁶

A especificidade da técnica baseia-se na delimitação da área irradiada, na absorção preferencial do FS pelo alvo terapêutico e pelo baixo tempo de vida do oxigênio singlete, cuja ação fica limitada a poucas centenas de nanômetros do sítio de sua geração. Quando o alvo terapêutico é um determinado tipo de câncer, diversos fatores como a fisiologia anormal do tumor, a rede de irrigação sanguínea que o alimenta e as diferenciadas taxas de proliferação das células cancerígenas ocasionam a absorção e retenção preferencial do FS.^{45,57} O mesmo fenômeno, apesar de ocorrer por diferentes mecanismos, é observado quando o foco da terapia são microrganismos. Esta modalidade de TFD é comumente chamada de inativação fotodinâmica (IFD).

A aplicação da TFD está centrada em estudos clínicos principalmente no tratamento, ou ação coadjuvante, de diversos tipos de câncer e de condições dermatológicas, utilizando diferentes tipos de FSs. Estudos da aplicação tópica do ácido 5-aminolevulínico, um pró-fotossensibilizador pois é precursor da protoporfirina-IX - a qual apresenta fotossensibilidade, demonstraram eficácia no tratamento de condiloma acuminado, carcinoma basocelular, câncer

de pele não melanoma, acne vulgar e queratose actínica, com resultados comparáveis ou superiores aos tratamentos convencionais e apresentando menos efeitos colaterais.^{44,58- 62}

O uso de IFD como técnica coadjuvante no tratamento de periodontite crônica revelou ser benéfica, amplificando o efeito terapêutico.⁶³ A aplicação de um derivado de hematoporfirina promoveu a completa eliminação de onicomicose, uma infecção fúngica de unha, em um paciente com 30 anos de lesão, e um estudo clínico com este FS e curcumina apresentaram a cura dessa micose em 62 pacientes.⁶² O número de ensaios *in vitro* contra bactérias multirresistentes é extenso, e ainda não há relatos do desenvolvimento de resistência à IFD por microrganismos, mesmo após numerosas tentativas de sua indução por repetição de ciclos desta técnica, com doses semiletais e permitindo-se o crescimento microbiano.⁴⁷

Os FS são componente chave da TFD. Variam em classe, regiões de absorção e muitos outros parâmetros, mas ao avaliar as estruturas químicas dos compostos mais empregados, identifica-se a vasta presença de sistemas conjugados com bandas de absorção intensas na região visível e infravermelha próxima do espectro eletromagnético. Para as aplicações clínicas, características como baixa toxicidade, seletividade pelo alvo terapêutico, capacidade de ser eliminado rapidamente pelo organismo e bom rendimento quântico são limitantes para a seleção do composto apropriado.

A adequação da luz aplicada com um bom FS e com o sítio de tratamento é determinante para o sucesso da TFD na clínica. Além de ser capaz de promover a excitação do agente fotossensível, é necessário que a irradiação empregada atinja o alvo terapêutico. Sabe-se que a capacidade de penetração da luz nos tecidos biológicos possui uma dependência inversa de seu comprimento de onda. Considerando-se a elevada absorção da hemoglobina, o principal cromóforo desses tecidos, em comprimentos de ondas inferiores a 600 nm e que o efeito da absorção da água é pronunciado acima de 1150 nm, estabeleceu-se a chamada “janela óptica” (Figura 8). Nesta região, que compreende a parte vermelha e infravermelha próxima do espectro eletromagnético, observa-se que a penetração da luz é maximizada podendo atingir profundidades de aproximadamente 10 mm, em contraposição com os 1-2 mm tipicamente abrangidos pelo restante do espectro da luz visível. Portanto, para tratamentos cujo alvo localiza-se em camada mais profundas do tecido biológico, é interessante fazer uso de FSs e fontes de luz que operem na região infravermelha.^{64,65}

Figura 8 – A penetração da luz no tecido aumenta com o comprimento de onda. Observando (A) os espectros de absorção da água (azul), hemoglobina (rosa), hemoglobina oxigenada (vermelho) e melanina (preto), verifica-se uma região chamada de janela óptica, que compreende a região do espectro no qual a absorções de cada elemento é baixa, permitindo (B) a maior penetração do vermelho no tecido biológico do que dos outros comprimentos de onda luz visível.

Fonte: Adaptada de HAMBLIN et. al. e AGOSTINIS et. al.^{64,65}

2.4 Indocianina Verde

A indocianina verde (ICV) é um dos poucos FSs que apresenta absorção na região infravermelha. Pertence a uma classe de corantes orgânicos denominada “cianinas”. Apresenta-se como um composto de peso molecular igual a 774,96 g/mol, formado por duas estruturas policíclicas, de caráter lipofílico, ligadas por uma cadeia carbônica que compõe um extenso sistema conjugado (Figura 9). Devido à presença de grupos sulfônicos carregados negativamente em suas extremidades, também possui solubilidade em água, constituindo uma molécula anfipática.^{66,67} Vem sendo utilizada para diagnóstico desde 1956, fazendo parte de métodos como angiografia oftalmológica, determinação do volume plasmático, medidas de gasto cardíaco, estudos de função hepática e localização de objetos em tecidos.^{68,69} Com uma baixa incidência de efeitos colaterais relatados, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1959 nos Estados Unidos.

Figura 9 - Estrutura química da ICV.

Fonte: Adaptada de SILVA ⁷⁰

Seu pico de absorção está localizado entre 700 – 810 nm (Figura 10), dependendo do solvente no qual está inserida. Para aplicações médicas, quando a ICV encontra-se em plasma sanguíneo, seu máximo localiza-se próximo a 800 nm em baixas concentrações, região na qual a penetração da luz no tecido é maior e que evita uma significativa absorção por parte da melanina. É metabolizada pelo fígado e excretada somente via fígado e ducto biliar, apresentando baixa toxicidade e com conhecida segurança para aplicação intravenosa em humanos.⁷¹

Algumas desvantagens de sua aplicação em ensaios clínicos são seu baixo rendimento quântico na produção de EROs, sua afinidade por albumina e lipoproteínas de alta densidade, gerando agregados e sua instabilidade em condições fisiológicas. No entanto, estudos demonstram a eficácia de TFD com o uso de ICV como FS em estudos *in vitro* contra células de melanoma, células de câncer de cólon, em câncer de mama e em carcinoma de células escamosas da cavidade oral, na inativação de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gengivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Em estudos clínicos, bons resultados foram obtidos com PDT e ICV no tratamento de acne vulgar, na oclusão de neovascularização de coroide e na erradicação de microrganismos presentes em feridas e queimaduras.⁷¹⁻⁷⁸ Desse modo, a ICV representa uma alternativa para tratamentos em locais mais profundos com TFD.

Figura 10 - Espectro de excitação (azul) e emissão (vermelho) da ICV em sangue.

Fonte: Adaptada de GIRAUDEAU et. al.⁷⁸

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto foi avaliar, em experimentos *in vitro*, a eficácia da indocianina verde como fotossensibilizador quando ativado na região do infravermelho do espectro eletromagnético e estudar a interação da inativação fotodinâmica com a atividade fagocitária de macrófagos sobre *S. pneumoniae*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar parâmetros experimentais (concentração de FS, tempo de incubação e dose de luz) para estabelecer protocolos de IFD capazes de inativar *S. pneumoniae*;
- Comparar a eficiência da IFD de *S. pneumoniae* ao empregarem-se dois sistemas de irradiação: um a base de lasers emitindo luz de 780 nm, e outro a base diodos emissores de luz (Light Emitting Diode - LEDs) emitindo 850 nm;
- Avaliar a segurança dos protocolos de IFD estabelecidos, através de ensaios de citotoxicidade em culturas de macrófagos;
- Estudar a interação da IFD com a resposta fagocitária de macrófagos através do estabelecimento de co-culturas destas células com *S. pneumoniae* e quantificação de espécies moleculares produzidas por macrófagos durante sua resposta fagocitária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Indocianina Verde

Neste estudo foi utilizada como FS a indocianina verde produzida pela empresa nacional Ophthalmos (São Paulo, SP, Figura 11), a qual se apresenta em forma de um pó liofilizado na coloração verde escura. Foram fracionadas alíquotas de 1 mg pesada em balança do tipo analítica para facilitar sua utilização. As alíquotas foram armazenadas em microtubos para centrífuga cônica de 1 mL em temperatura ambiente (aproximadamente 26 °C), protegidos da luz até o momento de sua utilização.

Figura 11 - Indocianina verde comercializada pela empresa Ophthalmos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o intuito de averiguar a estabilidade do fotossensibilizador em diferentes solventes, foram preparadas diferentes soluções de concentração correspondente a 10 μM . Os espectros de absorção foram coletados no espectrofotômetro Cary[®] 50 Bio UV-Vis (Varian, Estados Unidos da América - EUA) por um período de 24 horas com um intervalo de 2 horas entre cada medida. Durante todo o experimento, as soluções permaneceram no interior do equipamento, e os solventes utilizados na preparação das soluções foram: dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA), tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline – PBS), PBS com 10% de DMSO (v/v) e meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM, Cultilab, Campinas, SP) sem vermelho de fenol com 10% de DMSO (v/v). Todas as medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, as referência utilizadas foram os respectivos solventes, cujos espectros de absorção

devem ser subtraídos do espectro produzido pelo solvente na presença de ICV, foram preparadas e medidas imediatamente antes do início da coleta dos dados.

4.2 Linhagens e Cultivo de Células

Duas linhagens de macrófagos murinos foram utilizadas: macrófagos RAW 264.7 e macrófagos alveolares AMJ2-C11. A linhagem RAW 264.7 (Figura 12), de macrófagos aderentes derivados de camundongos BALB/c, foi fornecida pela colaboradora Prof. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros do Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Araraquara, sendo obtida por ela previamente na *American Type Culture Collection* (ATCC®, EUA). Os macrófagos alveolares, células semi-aderentes oriundas de camundongos C57BL/6J, foram obtidos no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Figura 12 -Imagem de microscopia da linhagem RAW 264.7.

Fonte: AMERICA ...⁷⁹

Ambas as linhagens encontravam-se estocadas congeladas a -80°C em criotubos contendo 1 mL com 10^7 células em solução de congelamento composta por soro fetal bovino (SFB, Cultilab – Campinas, SP) inativado com 10% de DMSO. Elas foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, com meio de cultivo para sua manutenção consistindo em DMEM com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e 0,1% de gentamicina (10 mg/mL, Gibco, EUA). As culturas foram mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO_2 .

Para a realização dos experimentos que exigiam células, aproximadamente 24 horas antes, elas foram raspadas dos frascos de cultura utilizando-se *cell scrapers* e a suspensão era centrifugada por 10 minutos a 1500 rotações por minutos (R.P.M.), para que o conteúdo celular decantasse formando um pellet. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (material decantado) ressuspensionado em um volume conhecido, para a realização da técnica de exclusão por azul de tripan. Em uma placa de 96 poços, 90 μL de azul de tripan (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP) foram adicionados a poços adjacentes, e 10 μL da suspensão celular, devidamente homogeneizada, foram adicionado a um dos poços, gerando uma diluição da solução de 1:10. Após sua homogeneização, 10 μL dessa nova suspensão foram adicionados a um poço com azul de tripan, realizando-se uma diluição seriada de 1:100. Por fim, 10 μL de cada suspensão com azul de tripan era inserida em uma câmara de Neubauer, e as células viáveis (aquelas que permaneciam sem coloração, uma vez que o corante só marca células cuja membrana se encontra danificada, perdendo sua integridade) foram contadas em cada um dos quadrantes externos (quadrantes A da Figura 13) utilizando-se um microscópio óptico.

Figura 13 - Câmara de Neubauer com as três possíveis áreas (A, B e C) para contagem de células. Para ambas as linhagens, devido ao tamanho das células, os quadrantes 'A' foram utilizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a contagem das células viáveis nos quatro quadrantes, o número de células por mililitro da suspensão original foi quantificado de acordo com a equação, onde 10^4 corresponde ao fator de correção da câmara:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{Diluição} \quad (1)$$

A cada teste foram plaqueados 200 μL /poço contendo 10^5 células (nos testes preliminares também foram utilizadas 5×10^4 células por poço). Deste modo o volume necessário da suspensão original, a qual continha o total de células removido do frasco de cultura, para realizar o experimento era calculado e separado. A este volume foi adicionado DMEM com vermelho de fenol e 0,1% de gentamicina de modo que a concentração final de SFB da suspensão a ser plaqueada sempre correspondesse a 5%. Os 200 μL foram plaqueados em placas de 96 poços, em posições específicas determinadas em cada experimento (descritas nas seções 4.5 e 4.7), e foram mantidas em estufa por 24 horas. O restante das células era devolvido para frascos de cultura, com meio de cultivo de manutenção, para a perpetuação da cultura. Todos os procedimentos envolvendo células e bactérias, com exceção da contagem do número de células no microscópio óptico, foram realizados assepticamente em cabine de segurança biológica e o meio de cultura, assim como a maioria dos materiais e reagentes usados neste trabalho, também era estéril.

4.3 Cultivo de *Streptococcus pneumoniae*

Para os ensaios de inativação fotodinâmica, foi utilizada a cepa ATCC[®] 49619[™] de *Streptococcus pneumoniae* (Figura 14), cedida pela colaboradora Profa. Alexandra Ivo de Medeiros (UNESP-Araraquara). As amostras armazenadas em Biofreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em criotubos contendo 10^8 unidades formadoras de colônia (UFCs) são mantidas em 1 mL de caldo triptona de soja (tryptic soy broth, TSB, Acumedia, EUA) com 15% de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 μL de sangue desfibrinado de carneiro (Ebefarma Biológica e Agropecuária Ltda, RJ).

Figura 14 – Cultivo de *Streptococcus pneumoniae* em ágar-sangue.

A quantificação do número de UFCs presente no meio de cultura foi padronizada através da correlação com o valor da absorbância da suspensão bacteriana, seguindo o protocolo: após descongelar a amostra em banho-maria, adiciona-se 9 mL de meio tipo TSB em um tubo de centrifuga, mantendo-se fechado em uma incubadora com agitação orbital a 37° C e 180 R.P.M. por 3 horas. Para cada experimento era preparado um novo meio, podendo apresentar um valor distinto de absorbância, tornando a. Uma alíquota de 200 µL do meio de cultura puro, após ser homogeneizado em agitador de tubos tipo vórtex, foi adicionado em um poço de uma placa de 96 poços para que sua absorbância pudesse ser subtraída das leituras posteriores. A absorbância da suspensão bacteriana foi medida, com o comprimento de onda de 600 nm, no leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek, EUA) periodicamente: alíquotas de 200 µL foram removidas da suspensão bacteriana, após sua homogeneização e adicionadas à placa de 96 poços que já continha a alíquota de TSB puro. Ao atingir-se a absorbância de 0,2 o que ocorria entre 3 – 4 horas de crescimento, duas alíquotas de 500 µL da suspensão foram centrifugadas a 15.000 R.P.M. por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de PBS.

4.3.1 Recuperação de UFCs

A recuperação das UFCs das amostras foi realizada através de sua diluição seriada: uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana foi adicionada a 450 µL de PBS em um microtubo e homogeneizada, dando origem a uma diluição 1:10 (10^{-1}). Para obter-se uma diluição 1:100 (10^{-2}), 50 µL da diluição 10^{-1} foram diluídos em 450 µL de PBS, e assim por diante¹. No total, foram preparadas diluições de 10^{-1} a 10^{-9} e 10 µL e cada uma foi plaqueada em um quadrante de uma placa de Petri contendo ágar-sangue (Figura 15). Para ambas as amostras, este procedimento foi realizado em triplicata, e as UFCs foram contadas após aproximadamente 24 h, permitindo quantificar sua quantidade na amostra inicial pela equação abaixo, sendo $\text{UFCs}_{\text{amostra}}$ corresponde ao número de UFCs na amostra, $\text{UFCs}_{\text{quadrante}}$ ao número de colônias presente em um quadrante da placa de Petri, o fator de diluição é o inverso da diluição no qual as colônias foram contadas, $\text{Vol}_{\text{amostra}}$ é o volume total da amostra da qual a alíquota foi retirada e Vol_{gota} é o volume da gota plaqueada:

¹ O procedimento de recuperação de UFCs, nas seções 4.6 e 4.8, foi realizado com diluições em placas de 96 poços e ajustando-se os volumes para 10 µL de amostra para 90 µL de PBS. A homogeneização foi executada, cautelosamente, com a própria pipeta.

$$UFCs_{amostra} = \frac{UFCs_{quadrante} \times \text{fator de diluição} \times Vol_{amostra}}{Vol_{gota}} \quad (2)$$

Para correlacionar o valor da absorbância da amostra com o número de UFCs/mL, a equação (1) foi utilizada com a substituição de $Vol_{amostra}$ por 1 mL. Estabeleceu-se que a absorbância de 0,2 correspondia a, aproximadamente, 5×10^7 UFC/mL. A correlação da absorbância, ainda em 600 nm, de 0,4 da suspensão bacteriana com a presença de 10^9 UFC/mL foi previamente estabelecida.⁸¹

Figura 15 - Esquema ilustrativo da diluição seriada: 50 µL da amostra homogeneizada foram transferidos para 450 µL de PBS estéril, originando a diluição 10^{-1} (ou 1:10). Após homogeneização desta solução, 50 µL foram transferidos para outro microtubo contendo 450 µL de PBS estéril, gerando a diluição 10^{-2} (ou 1:100), e assim por diante. Uma gota contendo 10 µL de cada uma das diluições era transferida e espalhada em um quadrante de uma placa de Petri contendo ágar-sangue.

Fonte: Adaptada de LIMA⁸².

4.4 Ensaios de Curva Dose-resposta da ICV no Escuro

Testes preliminares de citotoxicidade no escuro foram realizados com a linhagem de macrófagos alveolares, como testes de padronização para determinação da concentração inicial do FS a ser utilizada. Uma placa, contendo 10^5 células por poço e a outra, 5×10^4 , foram

preparadas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2. Após as 24 horas de incubação das placas, o sobrenadante de cada um dos 96 poços foi cuidadosamente removido, os poços lavados com PBS duas vezes, pois o vermelho fenol presente no meio de cultura interfere nas medidas com o espectrofotômetro e as condições experimentais de cada grupo foram adicionadas aos poços. A solução estoque do fotossensibilizador foi preparado em PBS com 10% de DMSO, e as concentrações iniciais de ICV escolhidas foram: 300; 150; 75; 37,5; 18,75 e 9,37 μM . Os controles utilizados foram: 8 poços com 100 μL de DMEM sem vermelho de fenol e 100 μL de PBS (ver “PBS” na Figura 16), 8 poços continham 180 μL de DMEM sem vermelho de fenol e 20 μL de LPS (“LPS”, desempenhando papel de controle positivo por promover a ativação máxima dos macrófagos) e 4 poços com 200 μL de DMSO (“DMSO”, controle negativo: morte total dos macrófagos) (Tabela 3). Os outros poços continham 100 μL de DMEM sem vermelho de fenol e 100 μL das diferentes concentrações de ICV, distribuídas pela placa, em quadruplicatas, como demonstrado na Figura 16. Outro parâmetro experimental variado foi o tempo de incubação do FS: após a adição das soluções de ICV, as placas foram incubadas no escuro por 10, 20 e 30 minutos.

Figura 16 - Esquema da placa de 96 poços destacando as posições das condições experimentais testadas. Todos os poços contêm células e o mesmo desenho foi usada para as placas de 10^5 e 5×10^4 células por poço.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Relação das condições experimentais utilizadas.

<i>Condição Experimental</i>	<i>Descrição do Grupo</i>
Controles	DMEM e PBS
	DMEM e LPS
	DMSO
ICV incubada por 30, 20 e 10 minutos	DMEM e ICV 300 μ M
	DMEM e ICV 150 μ M
	DMEM e ICV 75 μ M
	DMEM e ICV 37,5 μ M
	DMEM e ICV 18,75 μ M
	DMEM e ICV 9,37 μ M

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a incubação da ICV, as placas foram mantidas na incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ por 4 horas no escuro, para simular as condições experimentais presentes em um experimento de co-cultura (a descrição detalhada do procedimento encontra-se na seção 4.8).

4.4.1 Determinação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT

Para determinar a o efeito da ICV sobre a viabilidade celular², o sobrenadante foi novamente removido com cuidado e foram adicionados 160 μ L de DMEM sem vermelho de fenol juntamente com 10 μ L de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 5 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). Ambas as placas foram envolvidas em papel alumínio e mantidas em incubadora de CO₂ por mais 3 horas. Por fim adicionaram-se 50 μ L de uma solução 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma-Aldrich, EUA) e ácido clorídrico (HCl, Sigma-Aldrich, EUA) 0,01 M, e as placas, ainda envoltas por papel alumínio,

² O ensaio de MTT é um método colorimétrico que consiste na conversão do MTT, de cor amarela, a cristais azulados de formazan pela ação de enzimas mitocondriais.⁸³ Há, na literatura, uma recorrente discussão a respeito do que é mensurado pelo ensaio de MTT.^{84,85} Por ser um ensaio rápido e mais barato do que outras técnicas de quantificação de viabilidade celular, seu uso é bastante disseminado para a obtenção deste parâmetro. No entanto, a influência de diferentes variáveis pode interferir no metabolismo celular, o que pode refletir diretamente sobre a produção de cristais de formazan. Considerando-se essas informações, parece adequado referir-se aos resultados do ensaio de MTT como medidas de metabolismo celular no momento da realização do teste, visto que pode haver um ganho ou perda do ritmo metabólico em longo prazo. Porém, neste trabalho, será mantido o termo “viabilidade celular” para os resultados de MTT obtidos.

foram mantidas a temperatura ambiente (25 °C) *overnight* (aproximadamente 12 horas). As absorbâncias de cada poço foram então medidas em 570 nm pelo leitor de microplaca Synergy H1. O procedimento experimental resumido pode ser observado na Figura 17. Os gráficos foram elaborados considerando-se como 100 % de viabilidade os valores de absorbância fornecidos pelo grupo PBS.

Figura 17 - Resumo do protocolo experimental para testes de citotoxicidade no escuro de ICV.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Equipamentos: Lasertable e Biotable

Para irradiar as amostras, utilizaram-se dois equipamentos que trabalham na região infravermelha próxima, os quais foram desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT, Instituto de Física de São Carlos - IFSC) da USP: um a base de lasers de 780 nm, denominado Lasertable (Figura 18A), e outro a base de LEDs de 850 nm, denominado Biotable³ (Figura 18B). O uso de ambos os equipamentos permite avaliar a inativação fotodinâmica produzida por cada um.

³ A especificação nominal dos LEDs, determinada pelos fabricantes, indica que seu pico de absorção é 850 nm, porém a medida de seu espectro de absorção indica 843 nm. No texto foi mantido o valor da especificação nominal.

Figura 18 - Equipamentos do tipo protótipo desenvolvidos no IFSC para irradiação de placas de cultura multipoços A) Lasertable e B) Biotable.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Lasertable é um protótipo construído com lasers de 780 nm capazes de iluminar a área central de uma placa de 96 poços. O equipamento é capaz de irradiar, de modo individual e homogêneo, os 12 poços centrais (C5/6/7/8, D5/6/7/8 e E5/6/7/8), com o espectro de emissão mais estreito, com banda de emissão localizada entre 770-790 nm, quando comparado à Biotable (LEDs), como pode ser observado na Figura 19. O outro equipamento utiliza 24 LEDs de 850 nm para irradiar de modo uniforme diversas placas multipoços. Seu espectro (em vermelho na Figura 19) apresenta uma banda de emissão compreendida entre, aproximadamente, 750-900 nm. O perfil de emissão mais largo do que o apresentado pelo equipamento de 780 nm era um comportamento esperado, uma vez que lasers emitem luz coerente, e que sua capacidade monocromática é mais elevada do que as dos LEDs.

Figura 19 - Espectro de emissão dos lasers de 780 nm (linha preta) utilizados na confecção da Lasertable e dos LEDs (vermelha) da Biotable.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.1 Determinação da Irradiância e Cálculo de Tempo de Irradiação

Para determinar a irradiância da luz que chega a cada poço, diversas medidas da potência entregue pelo equipamento foram coletadas com um potenciômetro FieldmasterTM (Coherent, USA) com coletores com 2,5 cm² (usado para a Biotable) ou 0,5 cm² (Lasertable) de área a uma altura similar à da placa multipoços, ao longo de toda a área de irradiação, por um intervalo de 30 minutos. Sabendo-se que:

$$I = \frac{P}{A_c} \quad (3)$$

onde P corresponde à potência medida e A_c à área do coletor, é possível calcular a irradiância I fornecida pelo equipamento às amostras. Durante os experimentos, para evitar que a luminosidade ambiente interferisse na irradiação das placas contendo as amostras, a luz

ambiente sempre era apagada e um tecido preto, não muito espesso, era colocado sobre o equipamento.

Com o valor de I (em W/cm^2), pode-se calcular o tempo de iluminação das amostras (em segundos) com base na dose de luz desejada (em $\text{Joules}/\text{cm}^2$):

$$D = I \cdot t_{irr} \quad (4)$$

onde D é a dose de luz (ou fluência) e t_{irr} corresponde ao tempo de irradiação.

4.5.2 Determinação da Variação de Temperatura nas Amostras

Uma vez que a variação de temperatura no meio onde se encontram tanto as células quanto os microrganismos tem grande influência em sua viabilidade, este parâmetro ao longo do período de irradiação foi medido para ambos os protótipos. Essa variação nas amostras foi determinada utilizando-se um multímetro, na função de termômetro, associado a um termopar. Uma placa de 96 poços, contendo somente 100 μL de PBS e 100 μL de DMEM sem vermelho de fenol foi irradiada por um período de 15 minutos, com os valores de temperatura sendo medidos em intervalos de 1 minuto.

4.6 Inativação Fotodinâmica

Antes de avaliar o impacto da TFD sobre a cultura de células, foi necessário estabelecer os parâmetros experimentais, como tempo de incubação, concentração de ICV e dose de luz, capazes de promover a IFD do microrganismo de interesse clínico para o tratamento de pneumonias, o *S. pneumoniae*.

Os experimentos foram realizados seguindo-se sempre a mesma metodologia: a primeira etapa da preparação das amostras foi idêntica ao protocolo descrito na seção 4.3. Com a suspensão bacteriana apresentando o valor de absorbância desejado, o tubo era retirado da estufa e o volume contendo o total de UFCs necessário para a realização do experimento era removido e centrifugado a 15.000 R.P.M. por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante era

cuidadosamente removido, o *pellet* ressuspendido em 1 mL de PBS e a amostra era novamente centrifugada. Por fim, o *pellet* era ressuspendido no volume adequado de DMEM sem vermelho de fenol calculado para que, ao utilizarem-se placas de 96 poços, cada poço de amostra contivesse 100 μ L do meio com 10^7 UFCs. A utilização de DMEM como meio deve-se à necessidade de mimetizar as condições que posteriormente foram usadas nos ensaios de co-cultura (ver seção 4.8).

Após a adição da suspensão bacteriana nos poços, 100 μ L das soluções de ICV (concentrações particulares de cada experimento, que são especificadas em cada seção) ou do PBS (para os grupos “controle”) foram inseridos nas placas, de modo que o volume final dos poços sempre fosse 200 μ L, e a seguir, incubadas no escuro. A irradiação foi realizada nos grupos de “controle de luz” ou de “IFD” e os grupos ‘controle escuro’ e ‘ICV escuro’ foram mantidos protegidos da luz ambiente. Todas as placas foram então mantidas por 4 h em incubadora de CO₂, condição experimental esta também devida aos ensaios de co-cultura e que deve ser simulada nos ensaios de IFD para posterior comparação. Ao término deste intervalo, o procedimento para recuperação de UFCs era realizado, como descrito na seção 4.3.1.

4.6.1 Padronização das Concentrações de ICV e de Iluminação

Para determinar os parâmetros de ICV e de irradiação que promovem a eficaz inativação do microrganismo de interesse, ensaios piloto com condições elevadas de dose de luz e concentração do FS foram primeiramente realizados.

O ensaio piloto inicial foi realizado com as concentrações de 10, 50 e 150 μ M de ICV incubadas por 10, 20 e 30 minutos e irradiadas com 30 J/cm² somente com a Biotable de 850 nm. O volume de 100 μ L da suspensão bacteriana ressuspendida em DMEM era inserido em placas de 96 poços juntamente com 100 μ L das seguintes soluções: PBS (grupo PBS), ICV 10 μ M, ICV 50 μ M e ICV 150 μ M. A disposição dos grupos nas placas está representada na Figura 20; sendo que duas placas foram preparadas a cada experimento: uma para irradiação, preparada exatamente como a placa da Figura 20 e uma que foi incubada pelo maior tempo e mantida no escuro (contendo, então, os grupos PBS e controle ICV 10, 50 e 150 de 30 minutos). Neste experimento em particular, o procedimento de recuperação de UFCs não foi

realizado para todas as amostras de uma única condição, mas sim para seu *pool* (junção do conteúdo de cada poço de uma mesma condição). Neste caso, a equação (1) para a obtenção do número de UFC foi dividido por 4.

Figura 20 - Disposição das condições experimentais utilizadas no ensaio piloto numa placa de 96 poços, com três diferentes concentrações de ICV e três tempos de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Baseado nos resultados obtidos (descritos e discutidos na seção 5.4.1), os parâmetros de concentração de ICV e irradiação foram reduzidos para 0,1, 1 e 10 μM de ICV (dispostas nas placas “espelho” como na Figura 20, substituindo-se as soluções, porém mantendo-se a configuração das linhas com a solução mais concentrada sendo seguida pela intermediária e terminando com a mais diluída) e uma dose de luz de 10 J/cm^2 para a realização de um segundo teste, também utilizando a Biotable.

A avaliação dos resultados obtidos (seção 5.4.1) novamente indicou que uma alteração deveria ser realizada nas concentrações de ICV. Assim, os novos parâmetros experimentais testados foram: irradiação, inicialmente com a Lasertable de 780 nm, fornecendo 10 J/cm^2 de dose de luz e concentrações de 10, 5 e 1 μM do fotossensibilizador, 10, 20 e 30 minutos de incubação (mantendo-se a disposição das condições na placa como exibido na Figura 21, devido à área limitada que é irradiada pelo equipamento utilizado). Por serem ensaios piloto, não foram realizadas repetições de ocasião.

4.6.2 Experimentos de IFD

Após a seleção das concentrações adequadas de ICV (1, 5 e 10 μM) foram selecionadas para a execução dos experimentos de IFD, com tempo de incubação de 20 minutos. A irradiação das amostras foi avaliada com tanto 850 nm (Biotable) quanto com 780 nm (Lasertable), com duas doses de luz: 10 e 20 J/cm^2 (Tabela 4). Os experimentos foram realizados como de acordo com o protocolo descrito na seção 4.6 e disposição das condições experimentais nas placas espelho está demonstrada na Figura 21, sendo que cada parâmetro foi testado em triplicata, e o total de três repetições de ocasião foram realizadas para estes experimentos. O resumo do procedimento experimental pode ser visto na Figura 22.

Figura 21 - Disposição definitiva dos parâmetros experimentais para os testes de IFD. Os experimentos foram montados como ilustrado e as amostras foram tratadas seguindo a metodologia descrita. Após incubações com ICV, as amostras foram irradiadas com 780 ou 850 nm, ou então foram mantidas no escuro (grupo PBS).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de IFD de *S. pneumoniae*. O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.

<i>Irradiação</i>	<i>Concentração de ICV</i>	<i>Dose de Luz (D)</i>	<i>Tempo de Irradiação (t_{irr})</i>	<i>Irradiância (I)</i>
Ausente (Escuro)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	1 μM			
	5 μM			
	10 μM			
780 nm (Lasertable)	Ausente	10 J/cm²	4'10"	40 mW/cm²
	1 μM			
	5 μM			
	10 μM			
	Ausente	20 J/cm²	8'20"	
	1 μM			
	5 μM			
	10 μM			
850 nm (Biotable)	Ausente	10 J/cm²	4'34"	36,5 mW/cm²
	1 μM			
	5 μM			
	10 μM			
	Ausente	20 J/cm²	9'08"	
	1 μM			
	5 μM			
	10 μM			

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Resumo do protocolo experimental para testes de IFD de *Streptococcus pneumoniae*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Ensaios de Citotoxicidade da TFD

Com o intuito de averiguar com maior precisão o impacto da TFD em células fagocitárias do sistema imune, os ensaios de viabilidade foram realizados utilizando-se macrófagos RAW 264.7 devido à sua maior aderência às placas.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2: cinco placas de 96 poços preparadas 24 horas antes do experimento, com 10^5 células da linhagem RAW 264.7 por poço (nas posições demarcadas na Figura 21). Inicialmente foram lavadas cautelosamente com PBS duas vezes, para a remoção completa do meio de cultura com vermelho de fenol, sendo adicionados 200 μ L de DMEM sem vermelho de fenol em cada poço. As placas foram mantidas na incubadora por um período de 3 horas, lavadas novamente com PBS (etapa necessária para simular o experimento de co-cultura descrito na seção 4.8) e em cada poço foram adicionados 100 μ L de DMEM sem vermelho de fenol. As soluções de 1, 5 e 10 μ M de ICV foram então preparadas e, em cada placa, foram adicionados: 100 μ L de PBS no grupo PBS, 100 μ L de ICV 10 μ M, 100 μ L de ICV 5 μ M e 100 μ L de ICV 1 μ M (a disposição dos grupos, na placa, também segue o esquema exposto na Figura 21). Todas as placas foram incubadas por 20 minutos no escuro e irradiadas, com exceção da placa que continha os controles de escuro (Tabela 5). Após esta etapa, as amostras foram incubadas por 4 horas adicionais em estufa de CO₂.

As placas foram então lavadas com PBS. Para a obtenção da viabilidade celular, o mesmo procedimento descrito na seção 4.4.1 foi realizado e os valores de absorbância fornecidos pelo grupo ‘controle escuro’ foram considerados como 100 % de viabilidade para a elaboração dos gráficos da seção 5.5. Cada parâmetro dos experimentos de citotoxicidade foi testado em triplicata, e o total de três repetições de ocasião foi realizado. O resumo do procedimento experimental realizado pode ser verificado na Figura 23.

Tabela 5 - Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de citotoxicidade com células RAW 264.7. O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.

<i>Irradiação</i>	<i>Concentração de ICV</i>	<i>Dose de Luz (D)</i>	<i>Tempo de Irradiação (t_{irr})</i>	<i>Irradiância (I)</i>
Ausente (Escuro)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	1 µM			
	5 µM			
	10 µM			
780 nm (Lasertable)	Ausente	10 J/cm²	4'10"	40 mW/cm²
	1 µM			
	5 µM			
	10 µM			
	Ausente	20 J/cm²	8'20"	
	1 µM			
	5 µM			
	10 µM			
850 nm (Biotable)	Ausente	10 J/cm²	4'34"	36,5 mW/cm²
	1 µM			
	5 µM			
	10 µM			
	Ausente	20 J/cm²	9'08"	
	1 µM			
	5 µM			
	10 µM			

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 - Resumo experimental do protocolo dos ensaios de citotoxicidade da TFD em macrófagos RAW 264.7.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Ensaios em Co-cultura

Para avaliar a interação da TFD com a ação fagocitária de macrófagos, uma co-cultura de *S. pneumoniae* e macrófagos RAW 264.7 foi estabelecida e alguns parâmetros estudados previamente nos ensaios de IFD e citotoxicidade foram testados. Para tanto, placas de 96 poços contendo 10^5 células por poço (as posições estão demonstradas na Figura 24) foram preparadas 24 horas antes do experimento, como descrito na seção 4.2. As amostras de *S. pneumoniae* foram obtidas como relatado na seção 4.6, de modo a obter uma suspensão bacteriana em DMEM sem vermelho de fenol que contivesse 5×10^6 CFU por poço.

Figura 24 - Disposição parâmetros experimentais para os testes de co-cultura. Os experimentos foram montados como ilustrado e as amostras foram tratadas seguindo a metodologia descrita. Após incubações com ICV, as amostras foram irradiadas com 780 ou 850 nm, ou então mantidas no escuro como controle. Somente os poços indicados na figura continham células e *S. pneumoniae*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Cada placa foi lavada duas vezes com PBS, para remover células em suspensão ou fracamente aderidas e para que 200 μ L do meio contendo *S. pneumoniae* fossem adicionados em cada poço. As placas foram mantidas em estufa incubadora com 5% de CO₂ por 3 horas, intervalo necessário para que os macrófagos realizassem a fagocitose das bactérias. Após a lavagem cuidadosa dos poços com PBS, para garantir que as bactérias presentes nas amostras fossem somente aquelas que sofreram fagocitose e que permaneceram no interior dos macrófagos, no grupo denominado ‘fagocitose’, foram adicionados 200 μ L de uma solução gelada de TSB com 5% de saponina (Across Organics, EUA), para lisar os macrófagos sem causar danos à bactéria. Após 15 minutos de incubação da solução contendo saponina, a recuperação das UFCs foi realizada como descrito na seção 4.3.1, para obtenção do número de bactérias que foi efetivamente fagocitado. Nos demais poços, foram adicionados 100 μ L de

DMEM sem vermelho de fenol, juntamente com 100 μL de PBS, da solução de ICV 5 μM e de 10 μM nos respectivos grupos (Figura 24). Todas as placas foram incubadas por 20 minutos no escuro, e uma delas retornou imediatamente para a estufa (controles de escuro). As outras receberam diferentes irradiações, 10 J/cm^2 fornecidos pela Lasertable ou pela Biotable (Tabela 6), sendo recolocadas na estufa após esse processo.

Tabela 6 - Resumo dos parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de co-cultura com células RAW 264.7 e *S. pneumoniae*. O tempo de incubação do fotossensibilizador (20 minutos) foi repetido para todas as condições.

<i>Irradiação</i>	<i>Concentração de ICV</i>	<i>Dose de Luz (D)</i>	<i>Tempo de Irradiação (t_{irr})</i>	<i>Irradiância (I)</i>
Ausente (Escuro)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	5 μM			
	10 μM			
780 nm (Lasertable)	Ausente	10 J/cm^2	4'10"	40 mW/cm^2
	5 μM			
	10 μM			
850 nm (Biotable)	Ausente	10 J/cm^2	4'34"	36,5 mW/cm^2
	5 μM			
	10 μM			

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras foram incubadas por 4 horas, intervalo de tempo no qual os macrófagos exercem sua ação imunológica sobre os microrganismos fagocitados, denominada *killing*. O sobrenadante de cada poço foi então removido cautelosamente e armazenado em placas de 96 poços, devidamente anotadas, mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para avaliação posterior de algumas substâncias produzidas durante o *killing*. Após a adição de 200 μL da solução gelada de TSB com 5% de saponina para a lise dos macrófagos, a determinação da eficiência do protocolo foi novamente realizada com o procedimento de recuperação das UFCs descrito na seção 4.3.1. Cada parâmetro dos experimentos de co-cultura foi testado em triplicata, e cada ensaio foi repetido cinco vezes em diferentes ocasiões. O resumo do procedimento experimental pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 - Resumo do protocolo experimental para ensaios de co-cultura.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.1 Avaliação da produção de nitrito (NO_2^-)

Para avaliar a ação da TDF sobre a produção de espécies reativas pelo macrófago que atuam na eliminação dos microrganismos, a quantificação de NO_2^- foi realizada. Os sobrenadantes dos experimentos de co-cultura foram descongelados a 0 °C em banho de gelo e, em seguida, 100 μL de cada poço foram adicionados a placas de 96 poços. Foram adicionados 100 μL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5% e N-(1-Naftil) etilenodiamina dicloridrato – NED – 0,1%, Sigma-Aldrich, EUA) a cada poço e os valores de absorbância de cada amostra foram medidas em 540 nm pelo leitor de microplaca Synergy H1.⁴ Por ser um método colorimétrico, foi necessário determinar os valores de absorbância produzidos por soluções com concentrações conhecidas de NO_2^- . Para tanto, soluções de nitrito de sódio de concentrações variando entre 0,2 e 200 μM foram utilizadas, passando pelo mesmo procedimento descrito acima.⁸⁶ A quantificação de NO_2^- foi realizada com os sobrenadantes de quatro experimentos de co-cultura.

4.8.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Outro importante composto produzido por macrófagos durante sua ação fagocitária é o H_2O_2 . Para a sua quantificação, 50 μL do sobrenadante já descongelado de cada poço foram adicionados a placas de 384 poços juntamente com dihidrorodamina 123 25 μM (Sigma-Aldrich, EUA).⁵ Os valores de intensidade de fluorescência foram obtidos pelo leitor de microplaca Synergy H1 com excitação e emissão em 485 e 530 nm, respectivamente. A quantificação de H_2O_2 foi realizada com os sobrenadantes de quatro experimentos de co-cultura.

⁴ O teste de Griess é um método colorimétrico para detectar indiretamente a presença de NO_2^- no meio. A adição do reagente provoca a formação de sais de diazônio pela reação da sulfanilamida com NO_2^- em ambiente ácido. O sal formado reage com o NED, produzindo a coloração rosada característica do ensaio.

⁵ A dihidrorodamina 123 é uma sonda para EROs que naturalmente não apresenta fluorescência. Ao ser oxidada, é convertida a rodamina catiônica, que exibe uma fluorescência verde.

4.9. Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão dos grupos. Para a análise estatística dos resultados, foi realizada a Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey utilizando-se o software GraphPad Prism 5. O tamanho de cada amostra para os experimentos de IFD e de citotoxicidade correspondeu a $n = 9$, e para os ensaios de co-cultura, $n = 15$. O tratamento precedente à avaliação estatística dos valores recuperados de UFC dos ensaios de IFD e co-cultura consistiu em sua conversão para escala logarítmica e, no caso dos valores de absorbância obtidos nos experimentos de citotoxicidade, conversão para valores percentuais. A avaliação da normalidade das amostras revelou que os grupos de ICV 10 μ M ocasionalmente não apresentavam uma distribuição normal, de modo que a aplicação do *One-Way ANOVA* foi realizada fora dos pressupostos previstos por este teste. Consideraram-se diferenças significativas as comparações que apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabilidade de soluções de ICV

Análises de varredura espectral de absorbância nas regiões do ultravioleta (UV) e visível de absorção foram efetuadas durante 24 horas seguidas para a determinação do solvente a ser utilizado na preparação das amostras de ICV, de modo a conferir a estabilidade após solubilização em meio fisiológico, sem alteração dos picos de absorção na região do infravermelho. A Figura 26 evidencia o comportamento de soluções de ICV 10 μ M em diferentes solventes: PBS (A), DMSO (B), DMEM sem vermelho de fenol com 10 % de DMSO (C) e PBS com 10 % de DMSO (D). Como pode ser observado, o perfil de absorção do FS se mantém similar em todas as soluções, exceto para a condição “B” (somente DMSO; figura 26B). Seu emprego ocasiona a intensificação do pico de absorção localizado próximo a 780 nm, que apresenta um ganho de aproximadamente 100 % em seu valor. Uma hipótese para esse efeito é o aumento da solubilidade da ICV nesse composto, que foi verificado no momento da preparação das amostras e o menor grau de agregação do FS⁸⁷.

Avaliando-se o decréscimo dos espectros de absorção das soluções, com 13 medidas a cada 2 horas, ao longo das 24 horas, observa-se que a ICV apresenta maior estabilidade em DMSO e em PBS com 10 % de DMSO (somente quando se comparam os tempos 0 e 2 horas), com um intervalo temporal maior no decaimento dos valores de absorbância. No entanto, visando-se minimizar a presença de DMSO nas soluções de ICV, uma vez que tal substância apresenta efeito tóxico mesmo em baixas concentrações^{88; 89}, e visto que, apesar do composto ser solúvel em meio aquoso, sua solubilização nos volumes de PBS utilizados não era completa e que esse procedimento era facilitado pela presença de DMSO, optou-se por preparar as soluções estoques do FS em PBS com 10% de DMSO. Assim, para os experimentos, um microtubo contendo 1 mg de ICV era solubilizado em 1 mL de PBS com 10 % de DMSO (solução estoque: 1 mg/mL). Observamos na figura 26 nos painéis A, C e D uma redução nos valores de absorbância a cada 2 horas de intervalo, indicando que ao longo desse intervalo, há uma degradação da ICV. Para padronizar as condições do FS pós preparo da solução estoque, todas as amostras foram preparadas imediatamente antes de sua utilização e depois descartadas.

Figura 26 - Gráficos com espectros de absorção de ICV 10 μ M em PBS, DMSO, DMEM sem vermelho de fenol + 10 % DMSO e PBS + 10 % DMSO coletados por um período de 24 horas seguidas. As medidas foram realizadas num intervalo do de 2 horas entre cada uma, demonstrado pela legenda da figura do painel A.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2. Ensaios de Curva Dose-resposta da ICV no Escuro

Testes iniciais para avaliar os efeitos citotóxicos da ICV quando incubada no escuro foram realizados com macrófagos alveolares. Objetivando-se estabelecer o número mais adequado de células por poço para a efetuarem-se os experimentos posteriores, duas placas foram preparadas: uma com 10^5 células por poço (placa A) e outra com 5×10^4 (placa B). Três tempos de incubação (10, 20 e 30 minutos) e seis concentrações de ICV (variando de 9,37 a 300 μ M, que foram preparadas a partir de diluição seriada da mais concentrada) foram avaliadas. Os resultados podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 - Gráficos de viabilidade celular de macrófagos alveolares após incubação com seis diferentes concentrações de ICV por 10, 20 e 30 minutos em placas com 10^5 (placas A) e 5×10^4 células (placas B) por poço.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se, pelos gráficos das placas A (Figura 27), que, de maneira geral, a viabilidade celular é reduzida com o aumento tanto da concentração do FS quanto do período de incubação. Observando-se somente a variação da concentração, especialmente no tempo de 30 minutos, a relação de proporcionalidade inversa entre a concentração utilizada e a viabilidade celular torna-se mais evidente: para a menor concentração utilizada (9,37 μM), os valores de viabilidade orbitam em torno de 93 %, enquanto que os valores apresentados ao se empregar a solução mais concentrada (300 μM) encontram-se em torno de 82 %. Essa diferença tende a ser minimizada com a diminuição da incubação da ICV: quando incubada por apenas 10 minutos, a viabilidade celular da solução menos concentrada é aproximadamente 104 % (este valor, superando 100 %, pode ser atribuído a pequenas variações experimentais, como a presença de um número marginalmente maior de células nos poços referentes a essa condição) enquanto que o valor apresentado pela solução de 300 μM é próximo a 98 %.

Ainda examinando os resultados da placa A, é possível observar a relação também inversamente proporcional entre a viabilidade das amostras e o tempo de incubação. Para uma avaliação qualitativa, pode-se calcular a média das viabilidades apresentadas por cada concentração utilizada no mesmo intervalo de incubação. Verifica-se que a viabilidade média apresentada no tempo de 10 minutos é próxima a 98 %, a qual sofre uma pequena redução quando as soluções de ICV são incubadas por 20 minutos, passando para 95,5 %. Quando incubadas por 30 minutos, a viabilidade celular torna-se ainda mais comprometida, apresentando uma média de 89 %.

Já os resultados apresentados pelas placas B (Figura 27), que continham a metade do número de células das placas A, não seguem o mesmo padrão emergente. Ao avaliar a viabilidade média de todas as concentrações de um mesmo tempo de incubação, percebe-se uma inversão do que foi observado anteriormente: o menor tempo de incubação apresenta uma viabilidade geral em torno de 69 %, enquanto 30 minutos de incubação aparenta exercer um efeito citotóxico menor, com valor de viabilidade das amostras próximo a 83 %.

A cuidadosa inspeção visual das placas em microscópio óptico invertido, entre cada etapa do protocolo experimental, revelou que a adição e incubação das soluções de ICV favorecia o desprendimento das células do fundo das placas. Deste modo, no momento da realização do ensaio de MTT, quando o sobrenadante dos poços era cautelosamente removido, células que não estavam mortas e sim viáveis, mas em suspensão, foram removidas

das placas, o que resultava na menor produção de cristais de formazan. Observou-se também que a simples lavagem das amostras com PBS também causava o desprendimento de algumas células, indicando que em todos os experimentos haveria perda de material celular, devido à característica intrínseca de semi-aderência da linhagem AMJ2-C11. Essa perda poderia ocasionar divergências consideráveis nos experimentos, uma vez que não seria possível determinar se os valores de viabilidade observados eram resultado direto de um efeito tóxico da ICV sobre as amostras ou se ao desprendimento ocasionado.

Assim, para a realização dos ensaios posteriores com células, e por sugestão da colaboradora Profa. Alexandra Ivo de Medeiros, optou-se pela substituição da linhagem AMJ2-C11 pela linhagem de macrófagos RAW 264.7, os quais são similares aos macrófagos alveolares, porém são classificados como aderentes⁷⁹. Também foi determinado que 10^5 seria o número de células por poço para os demais ensaios, uma vez que tal confluência de células exibiu menor variabilidade nos resultados e menor susceptibilidade aos erros inerentes ao experimento.

5.3 Equipamentos: Lasertable e Biotable

5.3.1 Determinação da Irradiância e Cálculo de Tempo de Irradiação

A dose de luz é um parâmetro de fundamental importância na TFD. Seu cálculo é descrito pela equação (4), e depende de dois parâmetros: a irradiância e o tempo de iluminação. Para um cálculo mais preciso da irradiância fornecida por cada equipamento, medidas da potência nas posições usualmente ocupadas pelas amostras foram coletadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de potência (P_{medida}) dos equipamentos de iluminação (Biotable – 850 nm – e Lasertable – 780 nm) coletados através da utilização de um potenciômetro. A potência média ($P_{média}$) e o desvio padrão da medida (δP) são calculados para cada tempo, e a média desses valores resulta no valor de potência fornecido por cada equipamento.

Biotable (850 nm)						Lasertable (780 nm)					
$t (min)$	$P_{medida}(mW)$				$P_{média} \pm \delta P$	$t (min)$	$P_{medida}(mW)$				$P_{média} \pm \delta P$
0	89,2	90,1	91,2	89,6	90,03±0,87	0	20,1	19,50	19,6	19,6	19,7±0,27
5	91,2	92,7	90,1	91,3	91,33±1,07	5	19,7	19,9	20	20,6	20,05±0,39
10	90,9	91,7	91,2	90,4	91,05±0,55	10	19,6	20,3	20,6	20,9	20,35±0,56
15	91,2	91,4	92,3	92,5	91,85±0,65	15	20,3	19,9	20,2	20,3	20,18±0,19
20	91,1	93,5	92,1	91,8	92,13±1,01	20	20,5	19,8	19,7	19,3	19,83±0,50
25	92,4	91,2	90,3	91,6	91,34±0,87	25	20,2	20,1	19,5	20,1	19,98±0,32
30	92,1	90,3	90,6	91,1	91,03±0,79	30	20,4	19,3	19,9	20,6	20,05±0,58
$P (mW \pm mW)$					91,25±0,83	$P (mW \pm mW)$					20,0±0,4

Fonte: Elaborada pela autora

Com os valores médios de potência ao longo de todo o intervalo de coleta, a equação (3) e o valor da área do detector ($2,5 \text{ cm}^2$ para a Biotable e $0,5$ para a Lasertable), conclui-se que o valor de irradiância da Biotable é $36,5 \pm 0,3 \text{ mW/cm}^2$ e o da Lasertable $40,0 \pm 0,8 \text{ mW/cm}^2$. A determinação dos tempos de irradiação das amostras obedece à equação (4). Assim, para as doses de luz estabelecidas nas seções 4.6.1, 4.6.2, 4.7 e 4.8, os tempos de irradiação correspondentes foram calculados (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores da irradiância (I) calculada, a dose de luz (D) desejada e o tempo de irradiação (t_{irr}) correspondente para cada equipamento.

Biotable (850 nm)			Lasertable (780 nm)		
$I (mW/cm^2)$	$D (J/cm^2)$	t_{irr}	$I (mW/cm^2)$	$D (J/cm^2)$	t_{irr}
36,5	30	13'42"	40	20	8'20"
	20	9'08"		10	4'10"
	10	4'34"			

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Determinação da Variação de Temperatura nas Amostras

Antes do início dos ensaios, foi fundamental garantir que o impacto observado nos valores de viabilidade celular e no total de UFCs recuperadas nos experimentos fosse majoritariamente oxidativo, devido à interação do FS com a luz, e não tivesse contribuição do efeito fototérmico. Para tanto, medidas de temperatura foram coletadas em PBS e DMSO sem vermelho de fenol. Optou-se por realizar o acompanhamento nesses dois líquidos, pois todas as irradiações das amostras ocorreriam nestas duas substâncias.

Como é possível observar na Tabela 9, a mudança da temperatura foi pequena em todos os casos, com variação máxima ocasionada pela irradiação com 850 nm de amostras de PBS (diferença de 5 °C até sua estabilização). Além disso, é importante ressaltar que, em nenhum momento da iluminação, o valor da temperatura superou aquele no qual se encontravam as amostras durante os experimentos, 37 °C. A temperatura máxima observada (29 °C) manteve-se seguramente distante de valores altos, tipicamente 40 °C para células animais e diversos microrganismos não extremófilos, nos quais efeitos como a desnaturação de enzimas, colapso da membrana citoplasmática e por fim a lise térmica são observados²⁸.

Tabela 9 - Valores das medidas da temperatura (T) de dois meios submetidos a 15 minutos de irradiação.

	Biotable (850 nm)				Lasertable (780 nm)			
	<i>t (min)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (min)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (min)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (min)</i>	<i>T (°C)</i>
PBS	0	24	1	25	0	23	1	23
	2	26	3	26	2	23	3	23
	4	27	5	27	4	23	5	23
	6	28	7	28	6	23	7	23
	8	28	9	29	8	23,5	9	23,5
	10	29	11	29	10	23,5	11	23,5
	12	29	13	29	12	23,5	13	23,5
	14	29	15	29	14	23,5	15	23,5
DMEM sem vermelho de fenol	0	23	1	24	0	23,5	1	23,5
	2	24	3	25	2	23,5	3	23,5
	4	25	5	25	4	23,5	5	23,5
	6	25	7	25	6	24	7	24
	8	26	9	26	8	24	9	24
	10	26	11	26	10	24	11	24
	12	26	13	26	12	24	13	24
	14	26	15	26	14	24	15	24

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Inativação Fotodinâmica

5.4.1 Padronização das Concentrações de ICV e de Iluminação

A fim de determinar as melhores concentrações e tempo de incubação de ICV e a dose de luz mais adequada a serem utilizados, alguns ensaios piloto foram realizados variando-se estes parâmetros.

O piloto inicial foi delineado baseando-se nos resultados da seção 5.2 e, mesmo se tratando de um piloto, observou-se que a concentração de 300 µM de ICV indicou uma

atividade citotóxica. As três soluções utilizadas foram então 10, 50 e 150 μM , incubadas por 10, 20 e 30 minutos. Esses tempos foram escolhidos com base em um estudo que revelou que soluções de ICV penetram em quantidades significativas diferentes bactérias após um intervalo de incubação de 10 minutos.⁹⁰ A dose inicial de luz foi 30 J/cm^2 , e os resultados podem ser observados na Figura 28.

Figura 28 - Primeiro ensaio piloto realizado com *Streptococcus pneumoniae*. Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle e controle de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (10, 50 e 150 μM), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30', respectivamente) nas amostras irradiadas e por 30 minutos no grupo 'escuro'. A irradiação foi realizada somente com 850 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 30 J/cm^2 .

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao observar os resultados obtidos no primeiro ensaio, percebe-se o efeito citotóxico da ICV sobre *Streptococcus pneumoniae*: mesmo sem irradiação, todas as soluções do FS ocasionaram redução no número de UFCs. A menor redução ocasionada no grupo 'escuro' foi de aproximadamente 3 ordens logarítmicas pela concentração 10 μM , seguida de 4 ordens logarítmicas (50 μM) até haver a completa inativação do microrganismo pela maior concentração aplicada. Ao irradiar as amostras, esse efeito é pronunciado nos grupos de TFD, nos quais não se observou crescimento bacteriano.

Outro importante fenômeno é evidenciado pela Figura 28: a fototoxicidade produzida pela dose de luz escolhida. A irradiação das amostras sem adição de ICV ocasionou a diminuição de 5 ordens logarítmicas da bactéria somente pela ação da luz. Os resultados da seção 5.3.2 permitem a exclusão do efeito térmico sobre as amostras, uma vez que a temperatura nos poços não foi alterada ao irradiar tanto PBS quanto DMEM por 14 minutos. Apesar da ausência de repetições para verificar a recorrência deste evento, foi relatada a inibição bacteriana de diferentes espécies ao aplicar-se a mesma dose de luz, entre outras, com irradiação infravermelha.^{77, 91- 92}

A ação inibitória (ou estimulante, dependendo do comprimento de onda e dose de luz utilizados) da luz sobre microrganismos e células ainda não foi elucidada. Segundo estudos, há indícios de que a aplicação e absorção de comprimentos de onda vermelhos, por exemplo, ocasiona a excitação de elétrons pertencentes a moléculas da cadeia respiratória de bactérias. Assim, a geração de ROS resulta em dano oxidativo, e a inativação de enzimas desidrogenase envolvidas na respiração celular podem ser fatores envolvidos na inativação bacteriana.⁹² Um mecanismo de antiporte favorecendo o acúmulo excessivo de cálcio citosólico também foi proposto para justificar tanto a proliferação quanto o dano celular ocasionados em culturas de células pela sua irradiação com luz visível ou infravermelha⁹³. Outras hipóteses envolvem o efeito direto da luz em pigmentos fotolábeis bacterianos, a absorção de irradiação infravermelha por cromóforos endógenos resultando na produção de oxigênio singlete, de radicais livres e substâncias bactericidas e o impacto resultante em componentes celulares, como membrana citoplasmática, proteínas e DNA.^{77,94-97}

Apesar da completa eliminação da carga bacteriana, a variação de diferentes parâmetros experimentais pode ser realizada para otimizar a ação fotodinâmica observada e minimizar possíveis danos a tecidos saudáveis. Como indicado na sessão 2.3, o quadro ideal buscado ao aplicar-se a TFD consiste na eficácia terapêutica sendo produzida pela ação conjunta dos parâmetros de FS e de luz utilizados, e na ausência ou reduzida nocividade de sua ação individual sobre o alvo terapêutico. Portanto optou-se por reduzir as concentrações do FS para 0,1, 1 e 10 μM e a dose de luz para 10 J/cm^2 e, para aumentar a confiabilidade dos resultados, a recuperação de UFCs foi realizada individualmente para cada amostra, como descrito em 4.3.1. Os resultados (Figura 29) evidenciam a perda completa do efeito fototóxico da irradiação com o ajuste da dose de luz entregue às amostras.

Como pode ser observado, os controles de escuro das concentrações de 0,1 e 1 μM não apresentaram efeito nocivo às amostras, e o dano observado no gráfico 1 da maior concentração de ICV sofreu pouca alteração (Figura 29), exibindo uma redução um pouco mais pronunciada do que 3 ordens logarítmicas no número de UFCs recuperadas. Os grupos de controle de escuro PBS, 1 e 0,1 μM não apresentaram diferenças entre si nos três tempos de incubação, enquanto que os danos sobre as amostras, causados pelos grupos de 10 μM , permaneceram próximos com incubações de 10 e 20 minutos. No maior tempo de incubação, essa concentração de FS ocasionou a completa inibição de *Streptococcus pneumoniae*.

Nos grupos irradiados, observa-se primeiramente que a dose de luz escolhida não teve influência sobre as amostras controle (ver “PBS” no gráfico). Percebe-se também que a menor concentração de ICV não promoveu redução no número de UFCs em todas as incubações. A concentração intermediária, no entanto, foi capaz de promover a inativação de aproximadamente 1 ordem logarítmica da bactéria, também não sendo possível distinguir a influência dos diferentes períodos de incubação do FS. A maior diminuição no número de colônias viáveis promovida pelo efeito fotodinâmico foi resultante da incubação, por 20 minutos, da solução de ICV 10 μM : ao comparar esses grupos na condição de escuro e de 10 J/cm^2 , averigua-se a redução de aproximadamente 3 ordens logarítmicas. Se o grupo que sofreu irradiação for comparado aos grupos PBS, observa-se a redução de 6 ordens logarítmicas nas amostras. A comparação entre a incubação desta concentração por 30 minutos não pode ser estabelecida, uma vez que tanto o controle de escuro quanto o grupo irradiado inibiram completamente o crescimento bacteriano.

Figura 29 - Segundo ensaio piloto realizado com *Streptococcus pneumoniae*. Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle de escuro e de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (10, 1 e 0,1 μM), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30'). A irradiação foi realizada somente com 850 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 10 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o único efeito fotodinâmico produzido foi ocasionado por uma condição que já apresentava citotoxicidade no escuro, novamente as concentrações de ICV foram variadas. As novas concentrações (10, 5 e 1 μM) foram escolhidas uma vez que o grupo amostral anterior revelou que a condição ideal para a IFD encontrava-se entre 10 e 1 μM , devido ao efeito tóxico da maior concentração e praticamente inexistente da menor. Apesar da dose de luz ter sido mantida, as irradiações foram realizadas utilizando-se 780 nm. A alteração do comprimento de onda por si só não apresentou efeito fototóxico no grupo PBS (Figura 30).

Os grupos de incubação no escuro, na presença das menores concentrações de ICV permaneceram apresentando efeito mínimo sobre as amostras e a solução de 10 μM manteve seu comportamento consistente nas incubações de 10 e 20 minutos, preservando os valores de redução microbiana em torno de 3 ordens na escala logarítmica. Curiosamente, na incubação de 30 minutos não observa a completa inativação dos microrganismos. O aparecimento de aproximadamente 10^3 UFC nesta condição pode ser atribuído a erros experimentais, neste ensaio ou mesmo no ensaio anterior, uma vez que não foram realizadas repetições de ocasião, uma vez que os ensaios pilotos visavam delinear as melhores condições de IFD. Sem elas, não é possível inferir qual dos dois ensaios tem a maior probabilidade de refletir qual dos comportamentos verificados está mais próximo do que realmente ocorre. No entanto, o que foi repetidamente verificado nestes ensaios foi o impacto da maior concentração do FS sobre as amostras bacterianas, mesmo na ausência da irradiação. Tal efeito poderia ou não se apresentar citotóxico para macrófagos, e como não existem terapias sem qualquer efeito colateral, mesmo que mínimo, essa concentração foi mantida nos ensaios.

Nos grupos que sofreram irradiação, o comportamento geral da solução de 1 μM de ICV é mantido, com quase nenhuma variação sendo observada ao variarem-se os períodos de incubação. A nova concentração (5 μM), no entanto, exhibe o decréscimo de quase 4 ordens logarítmicas no número de UFCs ao ser incubada por 10 minutos e irradiada com 10 J/cm². O aumento do tempo de incubação provoca um efeito fotodinâmico marginalmente maior em 20 minutos, porém em 30 minutos verifica-se um aumento de aproximadamente 1 ordem na escala log o número de colônias de *Streptococcus* quando comparado com o tempo anterior. A maior concentração do FS quase não apresenta divergência entre as incubações de 10 e 20 minutos, mesmo quando se comparam os grupos irradiados com os que foram mantidos no escuro. Novamente essa divergência pode ser atribuída a erros experimentais e, principalmente, ao baixo número de repetições das condições estudadas, não permitindo haver base estatística para comparações.

Figura 30 - Terceiro ensaio piloto realizado com *Streptococcus pneumoniae*. Os grupos nos quais não foi adicionado FS (controle de escuro e de luz) estão designados por 'PBS'. Três concentrações de ICV foram testadas (1, 5 e 10 μM), incubadas por 10, 20 e 30 minutos (10', 20' e 30', respectivamente). A irradiação foi realizada somente com 780 nm, com o equipamento fornecendo uma dose final de 10 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

A realização dos ensaios piloto permitiu o *screening*, ou seja, uma análise geral, das diferentes condições para a determinação dos parâmetros mais adequados de IFD. Foi verificado um comportamento minimamente tóxico das concentrações de ICV 5 μM que não foram expostas à luz, independentemente do tempo de incubação utilizado. Nos grupos irradiados, essa concentração apresenta um efeito tóxico que é um pouco mais pronunciado quando a incubação do FS é realizada por 20 minutos. Deste modo, este tempo de incubação foi selecionado para a realização dos experimentos de IFD com ambos os equipamentos de irradiação.

5.4.2 Experimentos de IFD

Apesar da dose de luz de 10 J/cm^2 indicar uma redução significativa no número de colônias viáveis de *Streptococcus pneumoniae*, 20 J/cm^2 foram testados para avaliar seu impacto sobre a eficácia da IFD. Para facilitar a visualização dos dados, os resultados serão divididos em dois: os obtidos com a irradiação das amostras com 780 nm (Figura 31) e os obtidos com 850 nm (Figura 32).

Os resultados dos experimentos realizados com 780 nm como comprimento de onda utilizado para a irradiação das amostras bacteriana são analisados inicialmente (Figura 31). No grupo que não foi irradiado, pode-se observar que não houve, efetivamente, ação tóxica das concentrações de ICV de 1 e 5 μM sobre o grupo controle, designado por PBS, das amostras. O comportamento exibido nos ensaios piloto da solução 10 μM , com redução aproximada de 3 ordens logarítmicas de UFC, apresenta-se consistentes nestes testes, confirmando sua atividade tóxica contra os microrganismos. Estudos apresentam relatos, ainda que menos impactantes, deste efeito nocivo da ICV na ausência da irradiação: a incubação por 15 minutos dessa mesma concentração em amostras de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria também Gram-positiva, ocasionou a morte de aproximadamente 20 % dos microrganismos.⁹⁸ Ainda com a mesma cepa, ao incubar por 10 minutos soluções 30 μM do FS, a redução observada na viabilidade das UFCs foi de apenas meia ordem na escala logarítmica.⁷⁷ A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* também exibiu redução pouco pronunciada de viabilidade (apenas 10 %) quando incubada com ICV de elevada concentração (65 μM).⁹⁸ O aumento da toxicidade do FS com sua concentração também foi

visto ao incubarem-se soluções de ICV variando entre 65 e 300 μM com *Porphyromonas gingivalis*, com a maior concentração ocasionando a redução de $1,5\log_{10}$ das UFC.⁹⁹

Avaliando-se os grupos que sofreram irradiação, nota-se, ao comparar as três amostras de grupos controle (PBS), que nenhuma das doses de luz apresentou impacto significativo sobre o número de UFC. Os grupos de ICV irradiados com a menor dose de luz apresentam, todos, diferença significativa quando comparados aos seus controles sem irradiação. A menor concentração é a que exibe a menor diferença, passando de uma média de $7,55 \times 10^6$ UFCs presentes no seu grupo mantido no escuro para 8×10^5 . O grupo de 5 μM apresenta-se como a condição ótima para a inativação dos microrganismos, uma vez que inicialmente apresentava aproximadamente $2,4 \times 10^6$ UFCs no grupo de escuro e, após a irradiação, este foi reduzido a um valor próximo a 400. A solução mais concentrada foi capaz de reduzir em quase 3 ordens logarítmicas o número de colônias viáveis observado no seu correspondente sem irradiação, exibindo uma média de 11 UFCs no total.

Ao aplicar 20 J/cm², novamente se observa uma redução modesta, estatisticamente significativa, entre o grupo 1 μM irradiado e o protegido da luz. Não há, entretanto, diferença verificável ao irradiar-se essa mesma concentração com as duas doses de luz, o que também é observado ao irradiar a solução de 5 μM com ambas as doses. Apesar da maior concentração de ICV também não demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados, apresentou a inviabilização completa das amostras de *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 31 - Gráfico dos experimentos de IFD promovida pela irradiação das amostras utilizando-se a Lasertable (780 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μ M) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras de *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubadas com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Antes de discutir os efeitos observados e seus possíveis motivos, é interessante avaliar os resultados obtidos com os mesmo parâmetros sendo irradiados com 850 nm (Figura 32). Os grupos que não sofreram irradiação são os mesmos do experimento com a 780 nm, uma vez que ambos os testes foram realizados simultaneamente.

Um comportamento muito similar das amostras de ICV 1 μM ao que foi exibido pela mesma concentração quando irradiada com 780 nm foi verificado, apresentando a redução de aproximadamente 1 ordem logarítmica das UFCs quando comparadas com o grupo não irradiado, porém não exibindo diferenças significativas entre si com o aumento de dose de luz. A concentração 5 μM , por sua vez, além de apresentar diferença estatística dos dois grupos irradiados com o seu controle de escuro, novamente promove uma eficiente inativação das amostras bacterianas. Quando irradiada com a menor dose de luz, produz uma redução de aproximadamente 3 ordens logarítmicas das UFCs nas amostras bacterianas. A variação da dose de luz não promove a potencialização da ação microbida e o perfil impactante da solução de 10 μM observado sob sua irradiação com 780 nm é conservado.

Com esses resultados, dois parâmetros ganham destaque: as concentrações 5 e 10 μM . A menor delas confirma a hipótese de que a ICV exibe potencial para a IFD do microrganismo de interesse, apresentando-se até o momento como parâmetro ótimo de inativação. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, no entanto, poderão corroborar essa atribuição ou descartá-la completamente, caso promova um elevado nível de morte celular. Já a maior concentração do FS, apesar da ação tóxica apresentada nos grupos não irradiados, essa atividade é amplificada na presença da luz de modo a promover a inativação completa de *S. pneumoniae*. Fenômenos como a disputa pelo FS pelas células co-cultivadas e a existência de um número maior de barreiras a serem transpostas, uma vez que o ambiente no qual o tratamento ocorrerá será o término da fagocitose e o início da ação digestiva do fagolisossomo, podem ser vistos como indicativos de que os efeitos da IFD podem ser atenuados. É, portanto, imprescindível a presença de uma condição mais agressiva nos parâmetros experimentais avaliados.

Figura 32 - Gráfico dos experimentos de IFD promovida pela irradiação utilizando-se a Biotable (850 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μ M) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras de *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubadas com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa (quando comparados com seus respectivos grupos de escuro).

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, a comparação entre os grupos irradiados pelos diferentes comprimentos de onda não apresenta distinção estatisticamente significativa entre os grupos de interesse para a IFD (5 e 10 μM , Figura 33).

Figura 33 - Comparação da IFD de *S. pneumoniae* em função de ICV 1, 5 e 10 μM , 10 e 20 J/cm^2 e 780 e 850 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A literatura reporta o potencial da ICV como FS na inativação de bactérias pelo emprego de concentrações e doses de luz mais elevadas: quantidades três vezes mais altas do composto ativo foram necessários para promover a redução de 3 a 6 ordens logarítmicas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.⁷⁷ Para a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* foram necessárias soluções de até 300 μM . Os parâmetros mais próximos dos verificados neste trabalho foram contra a bactéria *Aggregatibacter actinomycetes*, pelo emprego de ICV 3,5 μM .⁷⁸ O menor parâmetro de irradiação utilizado entre tais estudos foi 84 J/cm^2 , porém pensa-se que a divergência verificada é, possivelmente, ocasionada pela ação dos fotoprodutos da ICV sobre os microrganismos. Esse argumento se baseia na grande diferença de metodologia entre o que foi realizado nesse estudo e nos relatos

avaliados. Grande parte de ensaios de IFD realizaram o procedimento para obtenção da viabilidade dos microrganismos imediatamente após a realização da irradiação. Aqui, no entanto, a solução contendo as amostras foi incubada por um período adicional de 4 horas, permitindo que os fotoprodutos interagissem de modo tóxico, o que já foi observado em estudos anteriores.⁷⁸ Esse período pode também ter atenuado diferenças observáveis nos ensaios 5.4.1. Por outro lado, essa incubação estendida pode simular uma situação um pouco mais próxima da realidade. Ao idealizar uma situação na qual uma pessoa é submetida a um ensaio clínico de IFD/TFD, os fotoprodutos da reação inevitavelmente permanecerão em contato mais prolongado com o alvo terapêutico, uma vez que o tempo de meia vida da ICV no organismo humano é de 1 hora, até sua completa eliminação pelo organismo.⁷⁸ Indo além e pensando no quadro de pneumonia, onde parte das bactérias estará livre – especialmente no caso de microrganismos como *S. pneumoniae* que apresentam mecanismos de evadir o sistema imune (seção 2.1.1) - no tecido pulmonar e parte no interior de células fagocíticas, a amplificação da atividade bactericida é desejável, desde que não haja dano no paciente.

5.5 Ensaios de Citotoxicidade da TFD

Com as condições de IFD estabelecidas, é necessário averiguar o impacto dos parâmetros estudados sobre células fagocitárias do sistema imune. Para tanto, os mesmos comprimentos de onda e doses de luz, para a irradiação das amostras, e concentrações de ICV que foram utilizadas com *S. pneumoniae* foram testadas em culturas de macrófagos RAW 264.7. Os resultados, como na seção 5.4.2, também foram separados em dois gráficos para facilitar a visualização dos dados, sendo que os grupos não irradiados são os mesmos.

Considerando-se os experimentos realizados com irradiação de 780 nm das amostras, um interessante efeito é observado. Como exibido na Figura 34, os únicos dois grupos que apresentam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo PBS escuro são as duas maiores concentrações de ICV quando irradiadas pela maior dose de luz. Quando submetidas a essas condições experimentais, as culturas de célula apresentam uma queda em seus valores de viabilidade, exibindo uma morte de aproximadamente 12,6 % e 11 %, para ICV 5 e 10 μM , respectivamente. Além disso, a comparação entre esses e seus respectivos grupos de irradiação 10 J/cm^2 e de escuro também apresentam diferença

significativa, com valores de viabilidade da solução intermediária de ICV próximos de 96 % e o da maior, de 100 %.

Figura 34 - Citotoxicidade da TFD quando a irradiação é realizada com a Lasertable (780 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μ M) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm²) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 que não foram incubados com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

O aumento do comprimento de onda ao irradiar as amostras revela um impacto maior sobre as células de defesa: o número de grupos que apresenta divergência significativa quando comparados ao grupo PBS escuro passa de 2 (Figura 34) para 5 (Figura 35). Além das concentrações mais elevadas do FS quando irradiadas por 20 J/cm², incluem-se todas as condições de ICV que foram irradiadas com a menor dose de luz. Somente a solução 1 μ M irradiada pela maior dose de luz como o único grupo de FS que não causou danos nas células. A irradiação 10 J/cm² ocasionou a morte de aproximadamente 11,2 %, 14,3 % e 14,7 % dos macrófagos para as concentrações de 1, 5 e 10 μ M, respectivamente. Não é possível afirmar que o aumento de morte está relacionado ao aumento das concentrações do FS porque, quando se comparam os valores de viabilidade das duas maiores concentrações, a avaliação estatística não indica diferença entre eles. De todos os grupos avaliados nos experimentos de

citotoxicidade, o responsável pelo dano mais pronunciado sobre as células foi o parâmetro mais extremo avaliado: a maior concentração sendo irradiada pela maior dose de luz provocou uma redução de 24,2 % no número de células viáveis. Este valor é considerado pequeno, uma vez que é equiparável a procedimentos cotidianos em culturas de células, como, por exemplo, os verificados com a ação da tripsinização.

Figura 35 - Citotoxicidade da TFD quando a irradiação é realizada com a Biotable (850 nm). As soluções de ICV (1, 5 e 10 μM) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a duas doses de luz: 10 e 20 J/cm^2 . Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (10 e 20 J/cm^2) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 que não foram incubados com o FS. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferenças significativas nos grupos irradiados, comparando-se o efeito da citotoxicidade quando a TFD é realizada com diferentes comprimentos de onda, podem ser visualizadas na Figura 36. Somente 3 grupos evidenciaram divergências consideráveis entre seus resultados: a menor e maior concentração de ICV, quando irradiadas com 10 J/cm^2 , e a maior concentração quando iluminada com o dobro da dose inicial de luz.

Figura 36 – Comparação da citotoxicidade da TFD sobre RAW 264.7 dos grupos irradiados com diferentes comprimentos de onda e diferentes doses de luz. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa.

Fonte: Elaborado pela autora.

A avaliação dos resultados deixou evidente o impacto pernicioso da TFD sobre os macrófagos quando a dose de luz de 20 J/cm² é aplicada. Como um dos objetivos deste trabalho é avaliar a interação da ação imunológica da célula da defesa associada à TFD, condições que não promovam uma elevada morte celular de macrófagos devem ser utilizadas. Especialmente quando se imagina uma situação mais próxima de um quadro infeccioso real, no qual o paciente com pneumonia normalmente já se apresenta debilitado, deve-se procurar ao máximo uma abordagem terapêutica que não prejudique seu sistema imune. Assim, para os ensaios de co-cultura, somente a dose de 10 J/cm² foi utilizada. Ainda, considerando-se os resultados observados na seção 5.4.2 para concentração de ICV de 1 µM, que não exibiu características microbicidas mesmo com a maior dose de luz, a remoção deste grupo para os ensaios de co-cultura aparentou ser uma escolha lógica a ser tomada. Visto que, no panorama no qual se estabelece fagocitose das bactérias, o número de obstáculos para a absorção seletiva do FS só tende a aumentar, parece ser contraditório assumir que uma concentração de

da substância fotoativa incapaz de fotossensibilizar a bactéria livre no meio tenha sua ação potencializada.

5.6 Ensaios em Co-cultura

Co-culturas do macrófago alveolar RAW 264.7 e da bactéria envolvida em pneumonias *Streptococcus pneumoniae* foram estabelecidas com dois objetivos principais: investigar o papel da fagocitose e *killing* durante e após IFD e analisar a especificidade da técnica em inativar o microrganismo, causando o mínimo de dano em células saudáveis responsáveis pela defesa do organismo em infecções pulmonares. Após o evento da fagocitose e a lavagem cuidadosa do meio da co-cultura, para remover completamente bactérias livres no sobrenadante, as amostras foram incubadas por 20 minutos com concentrações de 5 e 10 μM de ICV. A irradiação dos grupos de TFD foi realizada com 10 J/cm² e a incubação foi efetuada por 4 horas foi efetuada, para permitir que as células da defesa pudessem dar procedência à sua ação imunológica sobre os microrganismos. Para estabelecer um controle sobre a quantidade de UFCs que efetivamente foram fagocitadas, mas que não sofreram ação imunológica, um grupo de amostras foi *lisada* (ou seja, tiveram a membrana rompida para a liberação das bactérias que estavam em seu interior) antes de receber qualquer tratamento (denominado ‘Fagocitose’ na Figura 37).

Figura 37 - Co-cultura de macrófagos e bactéria, comparando os efeitos da irradiação com 780 e em 850 nm. As soluções de ICV (5 e 10 μ M) foram incubadas por 20 minutos e as amostras foram expostas a 10 J/cm². Os grupos designados por 'PBS' são os grupos controle (escuro) e controle de luz (780 e 850 nm) de amostras contendo macrófagos RAW 264.7 e *Streptococcus pneumoniae* que não foram incubados com o FS. O grupo "fagocitose" corresponde aos grupos sem tratamento e ação imunológica. Os símbolos * indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com seus respectivos grupos de escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados revelam que todos os grupos apresentaram diferença significativa, de ao menos 1 ordem na escala logarítmica, do grupo Fagocitose. A comparação do grupo PBS com o controle de fagocitose indica que a ação microbicida não assistida do macrófago em questão resulta na redução de quase 2log₁₀. A avaliação dos grupos irradiados demonstra que somente a concentração 5 μ M de ICV, quando irradiada por uma fonte de luz de 850 nm é capaz de produzir algum efeito sobre as bactérias internalizadas pela célula imunológica. Esse efeito promove a redução de um total de aproximadamente $4,2 \times 10^3$ para $6,2 \times 10^2$. Percentualmente falando, significa uma redução aproximada de 85 %, indicando a ação conjunta dos dois mecanismos. A redução da morte microbiana observada aqui, quando comparada à obtida nos ensaios de IFD, podem ser provenientes de diferentes fatores, como o ambiente quimicamente mais agressivo existente nos fagolisossomos, que pode agir sobre a ICV fazendo com que sua

ação seja reduzida. Outras possíveis hipóteses são uma redução do número de moléculas de ICV próximas ou no interior das bactérias, uma vez que há novas barreiras a serem transpostas pelo FS, como a membrana dos macrófagos e do próprio fagolisossomo, ou ainda a competição pelo oxigênio molecular do meio. A produção de EIOS por macrófagos, um de seus mecanismos microbicidas, depende da disponibilidade de oxigênio, assim como ambos os mecanismos de ação da TFD.

Um resultado importante deste ensaio foi a verificação da seletividade do tratamento. Observando a diferença entre o grupo fagocitose e os demais, a ausência de quantidades equiparáveis de UFC recuperadas ao controle fagocitário indica que não houve elevada morte celular, especialmente considerando que cada macrófago, consegue fagocitar um número elevado de bactérias. Caso houvesse um número não desprezível de morte eucariota, era esperado um valor elevado de colônias bacterianas, e que superassem significativamente o valor apresentado pelo grupo PBS não irradiado. Além disso, a capacidade da do FS adentrar no fagolisossomo e causar dano diretamente em *S. pneumoniae* é evidenciada pela não verificação de diferença entre os grupos PBS sem irradiação e os irradiados com 780 nm. No entanto, há ação microbicida na irradiação de ICV 5 μ M do grupo irradiado com 850 nm.

Um hipótese para a Biotable (850 nm) ter se mostrado mais eficiente do que a Lasertable (780 nm), apesar desta última apresentar emissão muito mais próxima ao pico de absorção do FS usado, é que a banda de emissão do LED de 850 nm é mais larga, podendo excitar outras espécies moleculares. Em particular, considera-se a hipótese da possibilidade de um dos próprios fotoprodutos da ICV poder ser ativado por algum comprimento de onda irradiado pela Biotable. Outra hipótese é a alteração da banda de absorção do FS perante o microambiente ácido do fagolisossomo. Alterações de pH apresentam grande influência sobre a interação luz-FS, uma vez que sua mudança pode alterar a configuração eletrônica das moléculas fotoativas, que é diretamente responsável, como visto na seção 2.3 no mecanismo da PDT.

5.6.1 Avaliação da produção de NO_2^-

O primeiro produto da atividade imunológica do macrófago sobre o patógeno que se procurou quantificar foi o íon nitrito. Ele é um bom indicativo da geração de um importante fator microbicida, o óxido nítrico. Sua instabilidade em meio aquoso dificulta sua detecção

direta, sendo que a presença de NO_2^- , um de seus produtos, pode ser relacionada às suas quantidades. No entanto, ao realizar o teste de Griess, concentrações insignificantes de NO_2^- foram detectadas. Conclui-se desse modo que essa espécie, que é naturalmente produzida em baixas quantidades em macrófagos na presença de exotoxinas da bactéria de interesse, não foi responsável pelo dano observado na Figura 37, uma vez que se a TFD fosse capaz de estimular a produção de óxido nítrico e nitrato, esse efeito também seria observado no grupo irradiado com 780 nm, que produziria uma inativação também significativa como a que foi verificada com ICV 5 μM com 850 nm.¹⁰⁰

5.6.2 Avaliação da produção de H_2O_2

Apesar da produção de NO_2^- ser baixa neste tipo celular, a metodologia de quantificação de peróxido de hidrogênio foi explorada (Figura 38) devido à propriedade dos macrófagos ativados gerarem quantidades elevadas dessa substância. No entanto, não foi possível verificar a produção diferenciada dessa espécie, muito provavelmente pelo tempo de 4 horas ser insuficiente para sua detecção. No entanto, somente experimentos de cinética, por períodos longos, da ordem de 24 ou 48 horas, podem confirmar esta hipótese.

Figura 38 - Gráfico de quantificação relativa da produção de peróxido de hidrogênio em cada amostra.

Fonte: Elaborada pela autora.

6 CONCLUSÕES

O estudo da aplicação de ICV como FS revelou ser possível determinar os parâmetros experimentais adequados para estabelecer um protocolo eficiente de IFD contra *S. pneumoniae*. Resultados destes ensaios revelaram uma elevada redução da carga bacteriana das amostras com a aplicação de 10 e 20 J/cm² utilizando-se dois distintos comprimentos de onda e fontes de irradiação, lasers de 780 nm e LEDs de 850 nm. A eficiência de ambas as fontes foi equiparável, e duas concentrações do FS foram capazes de promover a inativação da bactéria: 5 e 10 µM, indicando a susceptibilidade de *S. pneumoniae* livre no meio à IFD infravermelha. Ensaio de citotoxicidade com macrófagos, importantes células de defesa, demonstraram a segurança do protocolo de inativação estabelecido, com efeito mais pronunciado sobre a viabilidade celular produzido pela aplicação de 20 J/cm² com o equipamento a base de LEDs. Experimentos de co-cultura, que foram conduzidos somente com a dose de luz segura para as células eucarióticas (10 J/cm²), revelaram que somente ICV 5 µM com 10 J/cm² entregues pelo equipamento a base de LEDs emitindo 850 nm produz uma interação favorável com a atividade microbica de macrófagos, auxiliando na eliminação da carga bacteriana já fagocitada.

Foram avaliadas condições envolvendo bactérias livres e fagocitadas, com resultados positivos em ambos os panoramas. Essa avaliação é importante considerando-se que o ambiente no qual o patógeno se encontra em um paciente com pneumonia, as duas condições estão presentes. Parte dos microrganismos estão localizados nos fagossomos das células de defesa, porém a cápsula presente em *S. pneumoniae* dificulta sua fagocitose, o que resulta no elevado número de bactérias livres nos alvéolos. Este panorama confere grande importância aos experimentos de IFD realizados somente com bactérias em suspensão, pois os resultados obtidos indicaram uma eficiente redução no número de UFCs. Soma-se a esta inativação os resultados obtidos com os ensaios de co-cultura, que também indicaram uma diminuição dos patógenos fagocitados e auxiliaram, de modo modesto, a ação microbica das células de defesa. Conclui-se então, por prova de princípio, que a TFD utilizando ICV e fontes de luz infravermelhas pode ser uma boa candidata à terapia complementar ou alternativa para o tratamento de pneumonia pneumocócica.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 24 mar. 2014.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pneumonia**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>>. Acesso em: 25 abr. 2014.
- 3 AGENCIA NACIONAL DE SAUDE SUPLEMENTAR. Diretoria de Desenvolvimento Setorial. **Utilização do sistema público por beneficiários da saúde suplementar**. 2014. 242 p. Disponível em: <http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/beneficiarios_sus_2014.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2014.
- 4 RANGANATHAN, S. C.; SONNAPPA, S. Pneumonia and other respiratory infections. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, n. 1, p. 135-156, 2009.
- 5 KUSAHARA, D. M. et al. Colonização e translocação bacteriana orofaríngea, gástrica e traqueal em crianças submetidas à ventilação pulmonar mecânica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 3, p. 393-400, 2012.
- 6 MUSHER, D. M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 801-807, 1992.
- 7 PINHEIRO, B. V.; OLIVEIRA, J. C. A. **Pneumonia adquirida na comunidade**. 2006. Disponível em: <<http://www2.unifesp.br/dmed/pneumo/Download/Pneumonia%20Adquirida%20na%20Comunidade.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2013.
- 8 PNEUMONIA adquirida na comunidade em adultos. Disponível em: <<http://www.famema.br/assistencial/epidemi/docs/PneumoniaAdquiridanacomunidadeemAdultos.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2013.
- 9 ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. **Medicina Ribeirao Preto**, v. 32, n. 4, p. 492-497, 1999.
- 10 KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2006.
- 11 ULTRA, R. B. **Fisioterapia intensiva**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- 12 MACIEL, C. C. S., CANDIDO, H. R. L. F. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas. **Veredas Revista Eletrônica de Ciências**, v. 3, n. 1, p. 34-42, 2010.
- 13 CRAVEN, D. E.; STEGER, K. A. Epidemiology of nosocomial pneumonia: new perspectives on an old disease. **CHEST Journal**, v. 108, p. 1S-16S, 1995. Supplement 2.

- 14 DIRETRIZES brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica - 2007. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, p. S1-S30, 2007. Suplemento 1.
- 15 BARBOSA, J. C. S. et al. Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 4, p. 201-206, 2010.
- 16 BROWNE, L. R.; GORELICK, M. H. Asthma and pneumonia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, n. 6, p. 1347-1356, 2010.
- 17 ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. S131-S135, 2010. Supplement 1.
- 18 CREMONESE, R. V. et al. Há espaço para o CPIS no manuseio da pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 17, n. 2, p. 129-134, 2005.
- 19 TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. cap. 1, p.3-8.
- 20 WILLIAMS, J.; MOOSDEEN, F. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*: epidemiology, mechanisms, and therapeutic possibilities. **Review of Infectious Diseases**, v. 8, p. S555-S561, 1986. Supplement 5.
- 21 ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.
- 22 FRICK, P. A. et al. Prevalence of antimicrobial drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Washington State. **Western Journal of Medicine**, v. 169, n. 6, p. 364-369, 1998.
- 23 HOFMANN, J. et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 8, p. 481-486, 1995.
- 24 OVERWEG, K. et al. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1739-1745, 1999.
- 25 TORRES, A. Antibiotic treatment against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospital-and ventilator-acquired pneumonia: a step forward but the battle continues. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, p. 630-632, 2012.
- 26 IREGUI, M. et al. CLinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v. 122, n. 1, p. 262-268, 2002.
- 27 GROSS, P. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia. **Seminars in Respiratory Infections**, 1987. p. 2-7.
- 28 MADIGAN, M. et al. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. San Francisco, USA: Pearson Education, 2012.

- 29 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 11th ed. Boston: Pearson, 2013.
- 30 BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 144-154, 2004.
- 31 OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 98-104, 2002.
- 32 MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 5, p. 411-418, 2010.
- 33 HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of Streptococcus pneumoniae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2759-2762, 1995.
- 34 UM, S. et al. Activation of murine peritoneal macrophages by Streptococcus pneumoniae type II capsular polysaccharide: involvement of CD14-dependent pathway. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, n. 1, p. 39-45, 2000.
- 35 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2000. 486 p.
- 36 FORTE, W. C. N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 364 p.
- 37 ALBERTS, B. J. A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 38 BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2000.
- 39 NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.
- 40 FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- 41 STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. **Cancer Research**, v. 47, n. 21, p. 5590-5594, 1987.
- 42 LIU, G. Y. et al. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 209-215, 2005.

- 43 BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
- 44 INADA, N. M. et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 60-68, 2012.
- 45 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 1, p. 11, 2004.
- 46 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.
- 47 KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755-767, 2011.
- 48 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.
- 49 ABDEL-KADER, M. H. Photodynamic therapy: from theory to application. New York: **Springer Science & Business Media**, 2014.
- 50 MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.
- 51 DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, 1978.
- 52 DENIS, T. G. et al. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509-520, 2011.
- 53 POTTIER, R. H. et al. **Photodynamic therapy with ALA: a clinical handbook**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006.
- 54 PRASAD, P. N. **Introduction to biophotonics**. New York: John Wiley & Sons, 2004.
- 55 ROBERTS, D. J.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **British journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 6, p. 360-370, 1995.
- 56 NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

57 CHOROMANSKA, A. et al. Can photodynamic therapy be an alternative method in melanoma treatment? In: MORTON, R. (Ed.). **Treatment of metastatic melanoma**. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. cap. 12. p. 271-294.

58 WANG, I. et al. Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 4, p. 832-840, 2001.

59 WANG, X.-L. et al. Treatment of skin cancer and pre-cancer using topical ALA-PDT—a single hospital experience. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, n. 2, p. 127-133, 2008.

60 ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 263-277, 2004.

61 HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.

62 SILVA, A. P. et al. Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328-330, 2013. ISSN 1572-1000.

63 BRAUN, A. et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 877-884, 2008.

64 HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. Biomedical Optics 2006: **International Society for Optics and Photonics**, 2006. 614001-614001-12 p.

65 AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

66 DESMETTRE, T.; DEVOISSELLE, J.; MORDON, S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 15-27, 2000.

67 GENINA, E. A. et al. In vitro study of indocyanine green solution interaction with skin. **Proceedings of SPIE**, v. 65351, 2007. doi: 10.1117/12.740992.

68 FICKWEILER, S. et al. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 38, n. 2, p. 178-183, 1997.

69 YASEEN, M. A. et al. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1321-1332, 2009.

70 SILVA, A. R. A. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 2010. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

71 CRESCENZI, E. et al. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 5, p. 537-544, 2004.

72 URBANSKA, K. et al. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p. 4, 2002.

73 BÄUMLER, W. et al. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 3-4, p. 360, 1999.

74 MONTAZERABADI, A. R. et al. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 109, p. 42-49, 2012. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.004.

75 LIM, H.-J.; OH, C.-H. Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 4, p. 337-342, 2011.

76 COSTA, R. A. et al. Choriocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green. **American Journal of Ophthalmology**, v. 132, n. 4, p. 557-565, 2001.

77 OMAR, G. S.; WILSON, M.; NAIR, S. P. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 111, 2008.

78 GIRAUDEAU, C. et al. Indocyanine green: photosensitizer or chromophore? Still a debate. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 1871-1897, 2014.

79 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™). Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

80 PARULAN, R. **Streptococcus pneumoniae**. Disponível em: <<http://www.pbase.com/mediman30/image/148308764>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

81 SOUZA, T. P. D. **Impacto da eferocitose na fagocitose e atividade microbicida via receptores "scavenger" em macrófagos alveolares: papel de prostaglandina E2**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2013.

82 LIMA, A. L. **Caracterização estrutural da proteína spliceosomal de Trypanosoma brucei U5-15K**. 2015. 99 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

83 CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359-364, 1993.

84 SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In: SATYANARAYANAJOIS, S. D. (Ed.). **Drug design and discovery: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011. cap. 9. p.157-168. (Methods in Molecular Biology, v. 716).

85 VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, 1991.

86 LYU, S.-Y.; PARK, W.-B. Production of Cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 5, p. 573-581, 2005

87 HOMOCIANU, M. Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra. **Journal of Advanced Research in Physics**, v. 2, n. 1, p. 011105, 2011.

88 GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

89 BASCH, H.; GADEBUSCH, H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1953, 1968.

90 BOEHM, T. K.; CIANCIO, S. G. Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 13, n. 2, p. 58-63, 2011.

91 NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of low-level laser therapy (LLL) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 5, p. 283-290, 2003.

92 NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 6, p. 325-333, 2002.

- 93 FRIEDMANN, H. et al. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 11, n. 1, p. 87-91, 1991.
- 94 GUFFEY, J. S.; WILBORN, J. Effects of combined 405-nm and 880-nm light on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 24, n. 6, p. 680-683, 2006.
- 95 BORNSTEIN, E. et al. Near-infrared photoinactivation of bacteria and fungi at physiologic temperatures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 6, p. 1364-1374, 2009.
- 96 NEUMAN, K. C. et al. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 5, p. 2856-2863, 1999.
- 97 PIRNAT, S.; LUKAC, M.; IHAN, A. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 6, p. 755-761, 2011.
- 98 TOPALOGLU, N.; GULSOY, M.; YUKSEL, S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 4, p. 155-162, 2013.
- 99 KRANZ, S. et al. Antibacterial photodynamic treatment of periodontopathogenic bacteria with indocyanine green and near-infrared laser light enhanced by TroloxTM. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 350-360, 2015.
- 100 WEINBERG, J. et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

APÊNDICE

A1 Publicações geradas no período de mestrado

- Ilaiáli Souza Leite, Mariana C. Geralde, Ana C. Salina, Alexandra I. Medeiros, Cristina Kurachi, Vanderlei S. Bagnato, Natalia M. Inada. **Photodynamic inactivation of microorganisms which cause pulmonary diseases with infrared light: an *in vitro* study.** Endoscopic Microscopy IX; and Optical Techniques in Pulmonary Medicine, edited by Guillermo J. Tearney, Thomas D. Wang, Melissa J. Suter, Stephen Lam, Matthew Brenner, Proc. of SPIE Vol. 8927, 89271A, 2014.

- Mariana Carreira Geralde, Ilaiáli S. Leite, Natalia M. Inada, Clóvis Grecco, Alexandra I. Medeiros, Cristina Kurachi, Vanderlei S. Bagnato. **Pulmonary decontamination for photodynamic inactivation with extracorporeal illumination.** Endoscopic Microscopy IX; and Optical Techniques in Pulmonary Medicine, edited by Guillermo J. Tearney, Thomas D. Wang, Melissa J. Suter, Stephen Lam, Matthew Brenner, Proc. of SPIE Vol. 8927, 89271B, 2014.

A2 Participação em Eventos

- Participação no I Encontro Nacional de Física na Indústria (São Carlos, 2013)

- Participação e apresentação oral na Terceira Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 3). (São Carlos, Outubro/2013)

Título da apresentação - Photodynamic Inactivation of Microorganisms Which Cause Pulmonary Diseases with Infrared Light: an *in vitro* study.

Autores: Ilaiáli Souza Leite, Mariana C. Geralde, Ana C. Salina, Alexandra I. Medeiros, Cristina Kurachi, Vanderlei S. Bagnato, Natalia M. Inada.

- Participação e apresentação oral na Laser Europe 2014 (Amsterdam, maio/2014)

Título da apresentação - Photodynamic therapy using indocyanine green for *Streptococcus pneumoniae* inactivation.

Autores: Ilaiáli Souza Leite, Mariana C. Geralde, Ana C. Salina, Alexandra I. Medeiros, Cristina Kurachi, Vanderlei S. Bagnato, Natalia M. Inada.

-Participação e apresentação de pôster na Quarta Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 4). (São Carlos, Outubro/2014)

Título da apresentação - Photodynamic Inactivation of Microorganisms Which Cause Pulmonary Diseases with Infrared Light: an *in vitro* study.

Autores: Ilaiáli Souza Leite, Mariana C. Geralde, Ana C. Salina, Alexandra I. Medeiros, Cristina Kurachi, Vanderlei S. Bagnato, Natalia M. Inada.