

ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* APÓS QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Fernanda Maria Prado Braga^{1,2}, Cristina Pacheco Soares²

¹Universidade do Vale do Paraíba/IP&D/Laboratório de Cultura de Células
Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, fmpbraga@yahoo.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba/IP&D/Laboratório de Cultura de Células
Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, cpsoares@univap.br

Resumo: A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica recente, não invasiva, utilizada *a priori* em doenças cancerígenas, mas que está sendo aplicada em outras enfermidades. A Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (QTFDA), segue princípios semelhantes a TFD, tendo aplicação limitada a infecções localizadas, devido a dificuldades na entrega de luz no caso de infecções mais profundas. *Yersinia enterocolitica*, uma bactéria gram-negativa, responsável por vários quadros clínicos no homem, foi adotada como modelo para o estudo da ação da QTFDA sobre este tipo de bactéria utilizando como o fotossensibilizador a cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS₄) nas concentrações de 15, 25 e 35 µM e irradiadas com diodo laser Thera-Laser DMC, meio ativo Índio-Gálio-Alumínio, 685nm, 4.5J/cm², 30 mW. As bactérias submetidas a este tratamento foram incubadas com células Vero, por 24 horas para avaliação de sua patogenicidade. Os resultados obtidos demonstram que, as bactérias tratadas com 35µM após 24 horas de interação com as células não conseguiram sobreviver e conseqüentemente infectar novas células.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Ftalocianina Tetrasulfonada, *Yersinia enterocolitica*.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um novo tratamento para câncer e certas doenças não-cancerígenas que geralmente são caracterizadas por um alto crescimento de células não desejáveis ou células anormais [1, 2]. Recentemente a TFD também vêm sendo utilizada para matar células bacterianas através do uso de fotossensibilizadores alvos [3].

A ciência da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (QTFA) ainda está no início mas segue princípios semelhantes ao da TFD, envolvendo a morte de organismos por luz na presença de um agente fotossensibilizante [4]. O uso de QTFA pode ser limitado a infecção localizada devido aos problemas de entrega de luz [5].

As ftalocianinas são potentes fotossensibilizadores para inativação fotodinâmica de vírus [6] e bactérias [7].

Infeções clínicas humanas com *Yersinia enterocolitica* resultam após ingestão de microorganismos em comidas contaminadas ou

água ou pela inoculação direta através de transfusão sanguínea. No trato gastrointestinal, a *Yersinia enterocolitica* pode causar enterite aguda (especialmente em crianças), enterocolite mesentérica e doenças terminais. Por virulência a *Yersinia enterocolitica* manifesta sua presença através de uma síndrome clínica [8]. O mecanismo da patogenicidade da *Yersinia* ainda não está bem compreendida [9].

Materiais e métodos

Cepa Bacteriana: A cepa bacteriana de *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610) foi gentilmente cedida pelo Dr. Ivano de Filippis (Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde). Para a manutenção da cultura foi utilizado meio BHI (Difco).

Linhagem celular: Células Vero foram gentilmente cedidas pela Dr. Técia Maria Ulisses de Carvalho (UFRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Estas células foram cultivadas de forma padrão em garrafas de cultura de 25 cm² (Nunc) com

Meio MEM (Gibco-Invitrogen) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) por 24 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Fotossensibilizador: A Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS₄) foi gentilmente cedida. A Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada foi dissolvida em PBS em uma concentração estoque de 1mM, esterilizada através de filtragem com filtro Millipore (diâmetro 0.22 µl; Millipore, Bedford, MA, USA) e estocado no escuro a 4°C até o momento da utilização.

Incubação e irradiação: A cultura bacteriana foi incubada por um período de 4 horas a 37°C. Ao término deste período a cultura foi centrifugada e ressuspensa nas seguintes concentrações 15, 25 e 35 µM, por uma hora ao abrigo da luz. Após este período as células foram centrifugadas, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS e irradiadas com diodo laser Thera-Laser, meio ativo Índio-Gálio-Alumínio, DMC 685nm, 4.5J/cm², 30 mW, tempo de 107segundos, área de 2cm², distância de 12 cm.

Avaliação de unidades formadoras de colônia: Para contagem de unidades formadoras de colônia foram utilizados os seguintes grupos controle (somente bactéria), bactéria+ftalocianina nas concentrações citadas, bactéria+ QTFDA nas concentrações citadas. A cultura foi diluída 10⁻⁶ em PBS e desta 100 µL foram semeados, com auxílio de alça de Drigalsky, em placas com ágar TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período os resultados foram registrados com máquina Cybershot 4.1 Megapixel (Sony).

Interação das células Vero com a bactéria Yersinia Enterocolitica: As células Vero foram cultivadas (5x10⁴ células/mL) em placas de 24 poços (Nunc, Denmark), contendo lamínulas estéreis, com Meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas "overnight" para adesão à 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a irradiação 100µL de cultura bacteriana foi adicionada a cultura de células Vero e incubadas por um período de 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Microscopia de Fluorescência: Após interação *Yersinia enterocolitica* x células Vero, as células foram fixadas em 4% paraformaldeído em 0,1M tampão PHEM, por 10 minutos. As células foram lavadas com tampão PHEM, para remoção do excesso de fixador. Adicionou-se o corante DAPI (0,3µM) para marcação do núcleo celular, por 10 minutos. Após a marcação com DAPI, as lamínulas foram lavadas com tampão PHEM e montadas em lâminas com N-propil galato e vedadas com esmalte. Para observação dos resultados utilizou-se Microscópio de Epifluorescência (Leica DMLB).

Resultados

Unidades formadoras de colônia:

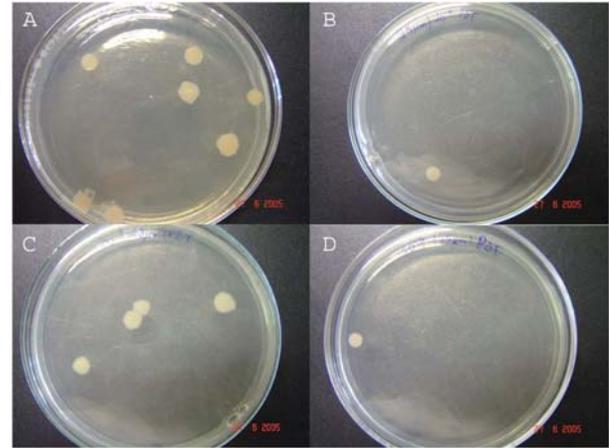


Figura 1: A) Análise do crescimento bacteriano. Cultura de *Yersinia enterocolitica* não submetida a QTFDA. B) Análise do crescimento bacteriano. Cultura de *Yersinia enterocolitica* submetidas a QTFDA na concentração de 15 µM. C) Análise do crescimento bacteriano. Cultura de *Yersinia enterocolitica* submetidas a QTFDA na concentração de 25 µM. D) Análise do crescimento bacteriano. Cultura de *Yersinia enterocolitica* submetidas a QTFDA na concentração de 35 µM.

Microscopia de Fluorescência

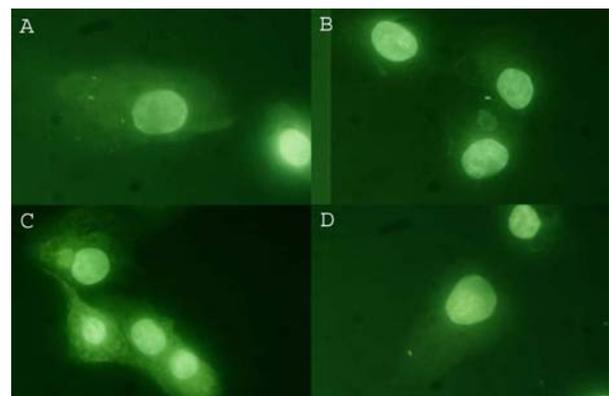


Foto 1: Análise da interação célula Vero x *Yersinia* após 24 horas de incubação. A - Cultura de célula Vero incubada com *Yersinia*. Observa-se a presença de bactérias nos vacúolos (seta). B - Interação célula x bactéria após QTFDA (AIPcS₄ 15µM) onde é possível observar a presença de uma bactéria no vacúolo (seta). C - Interação após QTFDA (AIPcS₄ 25µM), observa-se uma bactéria no vacúolo (seta). D - Interação

após QTFDA (AIPcS₄ 35µM) nenhuma bactéria e observada, ausência de vacúolos.

Discussão

De acordo com os dados da literatura a utilização da QTFDA como alternativa no tratamento de infecções bacterianas tem sido muito explorada [4]. Os resultados obtidos neste estudo, possibilitaram observar que o tratamento de *Yersinia enterocolitica* com ftalocianina, associada a irradiação, diminui a patogenicidade desta bactéria gram-negativa, como observado nas figuras 2B e C. Com o aumento da concentração do corante 35µM, as bactérias perdem a capacidade de multiplicação no interior do vacúolo e conseqüente rompimento da célula hospedeira e reinfecção de novas células.

Conclusão

A QTFDA é um tratamento alternativo, no caso de bactérias que apresentam resistência a antibióticos, porém restringe-se a infecções superficiais, havendo a necessidade de mais estudos, relacionados a aplicação da técnica em outros tipos de infecção.

Referências Bibliográficas

- [1] Pazos, M.C; Pacheco-Soares, C; Silva, N.S; DaMatta, R.A; Pacheco, M.T.T. Ultrastructural effects of two Phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell**. V.27, p. 301-309, 2003.
- [2] Oleinick, N.L; Morris, R.L; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **J. Photochem. Photobiol.Sci**. V.1, p.1-21, 2002.
- [3] Rovaldi, C.R; Pievsky, A; Sole, N.A; Friden, P.M; Rothstein, D.M; Spacciapoli P. Photoactive Porphyrin Derivative with Broad-Spectrum Activity against Oral Pathogens In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.44, N.12, p.3364-3367, 2000.
- [4] Zeina, B; Greenman, J; Corry, D; Purcell, W.M. Cutaneous Biology. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. **British Journal of Dermatology**. V.146, p.568-573, 2002.
- [5] Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.42, p.13-28, 1998.

[6] Smetana, Z; Ben-Hur, E; Mendelson, E; Salzberg, S; Wagner, P; Malik, Z. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. V.44, p.77-83, 1998.

[7] Merchat, M; Bertolini, G; Giacomini, P; Villanueva, A; Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. V.32, p.153-157, 1996.

[8] Bottone, E.J. *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. **Clinical Microbiology Reviews**. V.10, N.2, p. 257-276, 1997.

[9] Singh, I; Viridi, J.S. Interaction of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains of Diverse Origin with Cultured Cells In Vitro. **Clin. Immunol**. V. 114, N.3, p.216-226, 2005.