

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – CCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA
TRATAMENTO DE PNEUMONIA**

DOUTORANDA

Mariana Carreira Geralde

ORIENTADORES

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Julho 2017

São Carlos – SP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – CCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA
TRATAMENTO DE PNEUMONIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de São
Carlos como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

DOUTORANDA

Mariana Carreira Geralde

ORIENTADORES

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Julho 2017

São Carlos – SP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mariana Carreira Geralde, realizada em 31/07/2017:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
USP

Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino
UNIVAP

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto
UFSCar

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

À minha família, que me fornece suporte
e incentivo para concretizar meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Selma, meu pai Walmir e meu irmão Rodrigo. É com eles que divido todos os sorrisos e lágrimas.

Ao Guilherme, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e principalmente vibrando a cada conquista. Obrigada, te amo.

Aos meus orientadores Prof. Vanderlei S. Bagnato e Prof^ª. Cristina Kurachi, sem os quais este trabalho nunca teria acontecido.

Aos meus queridos amigos Eliza, Augusto, Michelle, Ives Gabriel, Mariana, José Dirceu, Layla, Sebastião e Thaila. Sem vocês em minha vida, teria menos motivos para sorrir.

À Natalia M. Inada, obrigada por toda a dedicação por este trabalho e por mim. Sua ajuda e experiência foram essenciais. Obrigada por tudo.

À Ilaiáli e à Giulia, obrigada por serem minhas parceiras de experimentos, cada uma em uma fase da pesquisa. Formamos uma ótima equipe.

Ao José Dirceu, Clovis, Sebastião e Michelle por terem contribuído em várias etapas da elaboração da minha tese, desde os experimentos às discussões.

À todos os alunos, funcionários e colaboradores do grupo de Óptica do IFSC/USP.

À toda equipe do Laboratório Apoio Tecnológico (LAT) pelo auxílio e desenvolvimento dos dispositivos para irradiação, em especial ao Guilherme Ferraz e ao Elizeu Ribeiro por terem trabalhado ativamente na elaboração do dispositivo.

À secretaria do Grupo de Óptica por todo o apoio durante meu doutorado.

À toda equipe do Laboratório de Instrumentação Eletrônica (LIEPO) por todo o suporte ao longo desses anos.

À Prof^ª. Alexandra I. de Medeiros e seus alunos, em especial à Ana Carolina que foi meu braço direito durante os experimentos.

To Prof. Wolfgang M. Kuebler and to the people from Kuebler's Lab, specially Mazharul, Adrienn, Sarah, Diana, and Arata, who received me with arms wide open and made my days in Toronto unforgettable. (Ao Prof. Wolfgang M. Kuebler e seu laboratório, Kuebler's Lab, em especial ao Mazharul, Adrienn, Sarah, Diana e Arata que me receberam de braços abertos e tornaram meus dias em Toronto inesquecíveis).

Ao Recanto, por toda a companhia e grande amizade, dignas da realeza. Mirian, Michelle, Cintia, Thereza, Layla e os agregados Didi, Tião e Clovis.

Ao meu orientador de mestrado Prof. Clovis W. O. de Souza, por abrir a primeira porta da minha carreira. Agradeço a oportunidade e o ensinamento sobre microbiologia.

À secretária da pós-graduação Claudia Pastega, obrigada por toda ajuda, paciência e carinho durante meu mestrado e doutorado.

À todos os funcionários e colaboradores da UFSCar.

Ao Prof. Ricardo Borra, por gentilmente ceder o uso do equipamento para a digitalização das lâminas histológicas.

À CAPES, à FAFQ, ao CNPq e à FAPESP, por todos os auxílios. Em especial à FAFQ pelo auxílio em um período do doutorado, e à CAPES por ter concedido minha bolsa de PDSE para o período no exterior e bolsa durante parte do doutorado.

“Tudo é uma questão de manter

A mente quieta

A espinha ereta

E o coração tranquilo

Viver é afinar o instrumento

De dentro para fora

De fora para dentro

A toda hora, todo momento”

Serra do Luar – Leila Pinheiro

RESUMO

GERALDE, M. C. **Avaliação *in vivo* da inativação fotodinâmica para o tratamento de pneumonia.** 2017. 107 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

A pneumonia infecciosa é uma das principais causas de morbidade/mortalidade no mundo, principalmente devido à taxa crescente de micro-organismos resistentes a antibióticos. A inativação fotodinâmica (IFD) está emergindo como uma abordagem promissora, cujos efeitos são baseados no estresse oxidativo, impedindo o surgimento de cepas de micro-organismos resistentes. Em estudos anteriores, a inativação *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae* utilizando indocianina verde (ICV) e fonte de luz de infravermelho foi efetiva, inativando $5 \log^{10}$ (UFC/mL) com apenas $10 \mu\text{M}$ ICV. Neste estudo, foi avaliado protocolo de prova de princípio para tratar infecções pulmonares por IFD usando irradiação extracorpórea com dispositivo a laser emitindo em 780 nm e ICV como fotossensibilizador (FS). Em uma primeira série de experimentos, camundongos *hairless* SKH-1 foram infectados com *S. pneumoniae* e a IFD foi realizada dois dias após a infecção. Para os grupos de controles, a recuperação de UFC variou entre 10^3 - 10^4 UFC/mL/animal. Para o grupo IFD, no entanto, nenhuma bactéria foi recuperada em 80% dos animais. A sobrevivência animal foi avaliada durante 50 dias. Não ocorreram mortes no grupo IFD, enquanto 60% do grupo controle foi a óbito. Foram realizadas análises de lesões pulmonares em camundongos BALB/c, onde a redução bacteriana foi de 2 e $4 \log^{10}$ em dois animais (total 5) em comparação com o grupo controle, e a proporção de peso úmido e seco mostrou que a IFD não aumentou o edema nos pulmões. Os dados de lavagem broncoalveolar indicaram um aumento no número absoluto de células (mononucleares e polimorfonucleares) no grupo IFD, o que indica que a técnica pode aumentar a resposta do sistema imunológico. Os resultados *in vitro* mostraram que a ICV irradiada pode gerar agregados ou fotoprodutos que auxiliam a IFD a inativar a bactéria. Os resultados deste estudo indicam que a IFD com irradiação extracorpórea tem potencial para o tratamento de pneumonia, e a descontaminação pulmonar com IFD pode ser usada como terapia ou como adjuvante aos antibióticos.

Palavras-chaves: Inativação fotodinâmica. Terapia fotodinâmica. *Streptococcus pneumoniae*. Pneumonia. Indocianina verde.

ABSTRACT

GERALDE, M. C. ***In vivo* evaluation of photodynamic inactivation for pneumonia treatment.** 2017. 107 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

Infectious pneumonia is a major cause of morbidity/mortality, mainly due to the increasing rate of microorganisms resistant to antibiotics. Photodynamic Inactivation (PDI) is emerging as a promising approach, as effects are based on oxidative stress, preventing the emergence of resistant microorganism strains. In previous studies, the *in vitro* inactivation of *Streptococcus pneumoniae* using indocyanine green (ICG) and infrared light source was successful, and achieved reduction of $5 \log^{10}$ colony-forming units (CFU/mL) with concentration as low as $10 \mu\text{M}$ ICG. In the present study, a proof-of-principle protocol was designed to treat lung infections by PDI using extracorporeal illumination with a 780 nm laser device and ICG as photosensitizer. In a first row of experiments, hairless mice were infected with *S. pneumoniae* and PDI was performed two days after infection. For control groups, CFU recovery ranged between 10^3 - 10^4 CFU/mL/mouse. For PDT group, however, no bacteria were recovered in 80% of the animals. Animal survival was evaluated separately over 50 days. No deaths occurred in PDT group, whereas 60% of the control did not survive. Lung injury analyses were performed in BALB/c mice, the bacteria reduction were 2 and $4 \log^{10}$ in 2 mice (5 in total) and the wet-to-dry ratio showed that PDI did not increase the edema in lungs. The bronchoalveolar lavage data indicated a larger absolute number of cells (mononuclear and polymorphonuclear) in the PDI group in contrast to control group, meaning that the technique could increase the immune system response. *In vitro* results showed the irradiated ICG could generate aggregates or photoproducts that help PDI to inactivate the bacteria. Our results indicate that extracorporeal PDI has potential for pneumonia treatment, and pulmonary decontamination with PDI may be used as a single therapy or as an antibiotics adjuvant.

Keywords: Photodynamic inactivation. Photodynamic therapy. *Streptococcus pneumoniae*. Pneumonia. Indocyanine green.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração das 10 principais causas de mortes ocorridas no mundo em 2015. Nota-se que as infecções das vias respiratórias inferiores ocuparam o terceiro lugar entre as patologias que mais fizeram vítimas naquele ano. 26
- Figura 2:** Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica, incluindo o diagrama de Jablonski. 35
- Figura 3:** Estrutura da molécula da indocianina verde. 37
- Figura 4:** Espectro de excitação ou absorção (azul) e emissão de fluorescência (vermelho) da ICV em sangue. 37
- Figura 5:** Imagem do processo de instilação utilizado para induzir a infecção pulmonar e para entrega do fotossensibilizador indocianina verde. 44
- Figura 6:** (a) Esquema do equipamento utilizado para irradiação, evidenciando os pontos de lasers. (b) Foto do equipamento irradiando a região do tórax do animal. 45
- Figura 7:** Esquema que descreve o procedimento de análise da transmissão da luz. A fonte de luz utilizada com emissão em 810 nm foi posicionada acima do dorso do animal. (T) Termistor inserido em baixo da pele do animal. (F) fibra coletora posicionada embaixo da placa de vidro utilizada como suporte para o animal. . 47
- Figura 8:** Esquema que descreve o procedimento da verificação da quantidade de luz que atravessa o tecido. (I_0) intensidade de luz detectada à distância de 5 cm da fonte dos lasers, (I) intensidade da luz detectada à mesma distância da medida de I_0 , porém com as barreiras de pele, músculo, ossos e pulmão (caixa torácica do animal). 47
- Figura 9:** (a) imagem lateral do dorso do animal evidenciando em branco (apontado pela flecha preta) a fluorescência da ICV no pulmão vista externamente. (b) imagem colorida evidenciando em verde (apontado pela flecha branca) a fluorescência da ICV vista externamente do dorso do animal. (c) imagem da fluorescência da ICV vista nos pulmões após 40 minutos após a instilação, a imagem foi realizada após laparotomia do animal. N=2. 49
- Figura 10:** Análise da transmissão da luz através do corpo animal. O p1 - p12 referem-se a diferentes posições dos pontos varridos aleatoriamente pela fibra coletora posicionada na parte de baixo da cavidade torácica do animal. Eixo Y: intensidade normalizada da luz expressa em unidades arbitrárias. Eixo X: comprimentos de onda. A ausência de barras de erro se deve à avaliação em um único animal (N=1). 51

- Figura 11:** Aumento da temperatura medido durante 200 segundos de irradiação. Eixo Y: escala de temperatura expressa em °C. Eixo X: tempo de irradiação expresso em segundos. A ausência de barras de erro se deve à avaliação em um único animal (N=1)..... 52
- Figura 12:** (I_0) intensidade de luz detectada à distância de 5 cm da fonte dos lasers, (I) intensidade da luz detectada à mesma distância da medida de I_0 , porém com as barreiras de pele, músculo, ossos e pulmão (caixa torácica do animal). Eixo Y: intensidade da luz detectada expressa em unidades arbitrárias. Eixo X: intensidades detectadas com a fibra posicionada fora e dentro da caixa torácica do animal. Valores expressos em média e desvio padrão sobre medidas em um único animal (N=1)..... 53
- Figura 13:** *Boxplot* de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10^8 *S. pneumoniae*. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle), instilação de PBS seguida de irradiação de 120 J/cm^2 (Luz), instilação de $100 \mu\text{M}$ de indocianina verde (ICV), ou a combinação de instilação de $100 \mu\text{M}$ de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). * $P < 0.05$ vs. Controle, teste de Mann-Whitney, N= 4-5. Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em \log_{10} de UFC/mL. N=4-5..... 55
- Figura 14:** A curva de Kaplan-Meier mostra a sobrevivência de camundongos infectados não tratados (Controle) e camundongos infectados tratados com IFD (120 J/cm^2 de irradiação + $100 \mu\text{M}$ de ICV) (IFD) durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. O tratamento foi realizado 2 dias após a inoculação bacteriana. No grupo controle, 60% dos animais (3 de 5) morreram dentro de 32 dias após a infecção. Entretanto, nenhum animal no grupo tratado com IFD morreu ao longo dos 50 dias após a infecção. Eixo Y: sobrevivência expressa em porcentagem (%). Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5..... 56
- Figura 15:** Curva de perda e ganho de massa dos animais do grupo Controle durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. Cada curva representa o perfil de perda e ganho de massa de cada animal individualmente. Eixo Y: valores de perda e ganho de massa (em gramas) em relação à massa dos animais antes da infecção. Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5..... 57
- Figura 16:** Curva de perda e ganho de massa dos animais do grupo IFD durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. Cada curva representa o perfil de perda e ganho de massa de cada animal individualmente. Eixo Y: valores de

perda e ganho de massa (em gramas) em relação à massa dos animais antes da infecção. Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5.....	58
Figura 17: Foto do equipamento utilizado para irradiação do de placas de 96 poços utilizadas em experimento <i>in vitro</i>	66
Figura 18: Esquema das análises pulmonares realizadas a partir de cada lobo pulmonar. O asterisco (*) indica onde foi feita a amarração para isolamento dos lobos do lado direito.....	67
Figura 19: <i>Boxplot</i> de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10^7 <i>S. pneumoniae</i> . Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μ M de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em \log_{10} de UFC/mL. N= 4-5.	70
Figura 20: Micrografia das lâminas obtidas por meio da centrifugação do LBA o que permite a diferenciação celular em PMN e Mono. (A) grupo Controle e (B) grupo IFD. As imagens estão com aumento original de 40 vezes. A escala da micrografia (50 μ m) está representada em branco no canto superior esquerdo.....	72
Figura 21: Eixo Y: número absoluto de células contadas no lavado broncoalveolar (LBA). Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μ M de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). Valores expressos em média e desvio padrão. N= 4-5.	73
Figura 22: Razão de peso úmido e seco do lobo médio e inferior. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μ M de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). Eixo Y: razão de peso úmido e seco. Valores expressos em média e desvio padrão. N= 4-5.....	74
Figura 23: Micrografia dos cortes histológicos dos lobos superiores dos pulmões corados com HE. As imagens da coluna à esquerda (A, C, E e G) são referentes ao grupo Controle, animais infectados que receberam apenas instilação de PBS. As imagens da coluna à direita (B, D, F e H) referem-se ao grupo IFD, animais infectados submetidos à IFD. Nas imagens G e H, as setas verdes indicam os infiltrados de células PMN e Mono, e as setas vermelhas indicam a presença de células vermelhas nos espaços alveolares. As imagens A e B estão com o aumento original de 5 vezes, C e D de 10 vezes, E e F de 20 vezes, enquanto G e H de 40 vezes. A escala de cada micrografia está representada no canto superior esquerdo, medindo A e B 500 μ m, C e D 200 μ m, E e F 100 μ m e G e H 50 μ m.	76

- Figura 24:** Gráfico de redução bacteriana *in vitro*. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), grupo Luz 20 J/cm² (bactéria + PBS + irradiação), ICV 10 µM (bactéria + ICV 10 µM) e IFD (bactéria + ICV 10 µM + irradiação). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo IFD apresenta redução de aproximadamente 3 log UFC/mL de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=3. 77
- Figura 25:** Gráfico de redução bacteriana *in vitro* avaliada 4 horas de incubação após a irradiação. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), grupo Luz 20 J/cm² (bactéria + PBS + irradiação), ICV 20 µM (bactéria + ICV 20 µM), IFD 10 µM (bactéria + ICV 10 µM + irradiação) e IFD 20 µM (bactéria + ICV 20 µM + irradiação). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo IFD apresenta inativação total de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=2. 78
- Figura 26:** Gráfico de redução bacteriana *in vitro*. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), ICV 10 µM irradiada (bactéria + ICV 10 µM irradiada). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo ICV irradiada apresenta redução de aproximadamente 5 log UFC/mL de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=3. 79
- Figura 27:** Imagem do nebulizador utilizado nos testes preliminares. 82
- Figura 28:** Esquema de como foi feita a nebulização da ICV em contato com a região inoculada na placa de ágar sangue. A cânula de nebulização foi posicionada a aproximadamente 1 cm da superfície do ágar sangue inoculada, com entrega de uma taxa constante de 0,3 ml/min da solução de ICV a 700 µM. 83
- Figura 29:** Imagem das placas de ágar sangue inoculadas com *S. pneumoniae*, seguidas dos tratamentos. (A) IFD com ICV nebulizada, (B) ICV nebulizada sem irradiação, (C) IFD com ICV líquida, (D) ICV líquida sem irradiação, (E) somente irradiação e (F) somente a inoculação de *S. pneumoniae*. 85
- Figura 30:** *Boxplot* de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10⁷ *S. pneumoniae*. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle), animais que receberam a nebulização de ICV a 800 µM e 20 minutos após foram irradiados (IFD 20') e animais que receberam a nebulização de ICV a 800 µM simultaneamente à irradiação (IFD+N). A fluência utilizada nos grupos IFD 20' e IFD+N foi de 120 J/cm². Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. No gráfico não é possível expressar barra de erro por terem sido

avaliados apenas 2 animais no grupo controle e 3 animais nos demais grupos. N=
2-3. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Impacto das infecções hospitalares em paciente internados em UTI. A taxa de mortalidade que ocorrem em UTIs, representada como “global”; taxa de mortalidade devido à internação em UTIs “atribuída”; período de internação “prolongamento da internação” e dos gastos “custos”; para tratamento de pneumonia e infecções de corrente sanguínea.	30
Tabela 2: Índice de pontuação clínica de infecção pulmonar (<i>Clinical Pulmonary Infection Score - CPIS</i>).	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
μM	Micromolar
μL	Microlitros
$^\circ\text{C}$	Grau(s) Celsius
CO_2	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
g	Gramas
J/cm^2	Joules por centímetro quadrado
mL	Mililitros
mg	Miligramas
nm	Nanômetros
mm^3	Milímetros cúbicos
mW/cm^2	Miliwatts por centímetro quadrado
W/cm^2	Watts por centímetro quadrado
ACK	<i>Ammonium Chloride/Potassium</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CPIS	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i> - escore clínico de infecção pulmonar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fotossensibilizador
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
ICV	Indocianina verde
IFD	Inativação fotodinâmica
LBA	Lavado broncoalveolar
LEDs	<i>Light Emitting Diode</i>
LIP	Luz intensa pulsada
Mono	Monocuclear
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PAH	Pneumonia adquirida no hospital
PAVM	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PBS	Tampão salino fosfato
PMN	Polimorfonuclear
r.p.m.	Rotações por minuto
SARA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VM	Ventilação mecânica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 PNEUMONIA	29
2.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA	34
2.3 FONTE DE LUZ	36
2.4 FOTOSENSIBILIZADOR	36
3. OBJETIVO GERAL	39
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	41
5. CAPÍTULO I	43
5.1 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1.1 <i>Cultivo de Streptococcus pneumoniae</i>	43
5.1.2 <i>Animais</i>	44
5.1.3 <i>Indocianina Verde</i>	44
5.1.4 <i>Fonte de Luz</i>	45
5.1.5 <i>Análises de transmissão da luz, variação da temperatura e distribuição do FS nos pulmões</i> ...	46
5.1.6 <i>Recuperação de UFC</i>	48
5.1.7 <i>Curva de sobrevivência</i>	48
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.2.1 <i>Análises de transmissão da luz, variação da temperatura e distribuição do FS nos pulmões</i> ...	49
5.2.2 <i>Recuperação de UFC</i>	54
5.2.3 <i>Curva de sobrevivência</i>	56
5.2.4 <i>Potencial da IFD com ICV – resultados e discussão</i>	58
5.3 CONSIDERAÇÕES	61
6. CAPÍTULO II.....	64
6.1 MATERIAL E MÉTODOS	64
6.1.1 <i>Cultivo de Streptococcus pneumoniae</i>	64
6.1.2 <i>Animais</i>	65
6.1.3 <i>Indocianina verde</i>	65
6.1.4 <i>Fontes de Luz</i>	65
6.1.5 <i>Análise Pulmonar</i>	66
6.1.6 <i>Experimentos in vitro</i>	68

6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6.2.1	<i>Análise pulmonar</i>	69
6.2.2	<i>Experimentos in vitro</i>	77
5.4	CONSIDERAÇÕES	80
7.	CAPÍTULO III	81
7.1	MATERIAL E MÉTODOS – TESTES DE NEBULIZAÇÃO.....	81
7.1.1	<i>Cultivo de Streptococcus pneumoniae</i>	81
7.1.2	<i>Indocianina verde</i>	81
7.1.3	<i>Fontes de Luz</i>	82
7.1.4	<i>Animais</i>	82
7.1.5	<i>Teste in vitro</i>	82
7.1.6	<i>Experimento piloto in vivo</i>	84
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.5	CONSIDERAÇÕES	87
8.	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9.	ANEXO I.....	98
10.	ANEXO II	102

1. INTRODUÇÃO

Define-se pneumonia como a inflamação aguda das estruturas do parênquima pulmonar, que pode ser causada por diferentes agentes etiológicos (bactérias, vírus, organismos atípicos e fungos). Inicialmente apresenta-se como uma colonização da mucosa nasofaríngea, difundindo-se posteriormente para o trato respiratório inferior. A infecção pode ser adquirida na comunidade (PAC) ou em hospitais, sendo que a última é frequentemente denominada pneumonia nosocomial (PAH) (1,2).

Características clínicas (como tosse, expectoração e febre) e achados radiológicos são os principais meios de diagnosticar pneumonia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza taquipnéia, além de febre e sintomas respiratórios agudos, como um importante indicador de pneumonia quando instalações radiológicas não estão disponíveis (1).

Nos países em desenvolvimento, os principais agentes causadores de pneumonias são bactérias, e estudos microbiológicos apontam *Streptococcus pneumoniae* como o micro-organismo responsável por 30-50% dos casos de pneumonia. O segundo agente mais comum é *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), seguido por *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (3).

A PAC é a principal causa de doenças infantis - 20% das mortes de crianças em todo o mundo (4). No Brasil, durante o ano de 2007, a pneumonia foi a principal causa não-obstétrica de internação, representando cerca de um milhão de casos (5). De acordo com a OMS, a incidência de pneumonia é de cerca de 450 milhões de casos por ano, com aproximadamente 4 milhões de mortes por ano. É responsável pela morte de cerca de 1 milhão de crianças com menos de cinco anos de idade por ano no mundo (6). Nos Estados Unidos da América (EUA), o número anual estimado de episódios de PAC em adultos é de aproximadamente 5,2 milhões, com maior incidência em pessoas entre os 65 anos ou mais (7).

Ainda segundo dados da OMS publicados em 2017, as infecções do trato respiratório inferior são as doenças transmissíveis que mais matam, tendo causado cerca de 3,2 milhões de mortes em todo o mundo em 2015 (Figura 1) (8). Nota-se que na sequência destas infecções vêm as doenças pulmonares obstrutivas crônicas, cujos quadros clínicos muitas vezes são piorados por estas infecções.

As 10 principais causas de morte no mundo em 2015

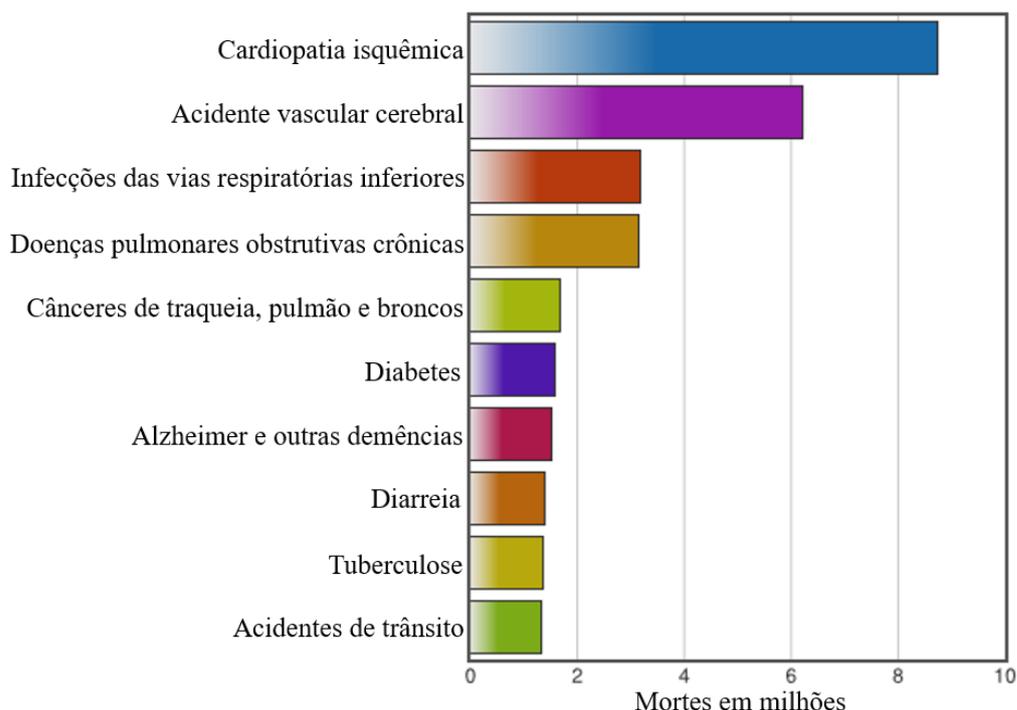


Figura 1: Ilustração das 10 principais causas de mortes ocorridas no mundo em 2015. Nota-se que as infecções das vias respiratórias inferiores ocuparam o terceiro lugar entre as patologias que mais fizeram vítimas naquele ano.

Fonte: Adaptada de OMS (2017) (8).

Esses números descrevem uma situação que é propensa a piorar ao invés de melhorar devido ao perfil de envelhecimento da população em países ocidentais e ao crescente número de micro-organismos resistentes a antibióticos. Como consequência, surge a necessidade de tratamentos alternativos ou complementares.

Um dos mais novos avanços no tratamento de diferentes patologias de origem microbiana, viral e fúngica é a aplicação da terapia fotodinâmica (TFD) como atividade antimicrobiana (9). Esta terapia consiste na utilização de um fotossensibilizador (FS) que, quando ativado por radiação eletromagnética em comprimento de onda específico, pode reagir com moléculas de sua vizinhança. A reação resultante pode ocorrer por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à formação de radicais livres (reação tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio molecular (reação tipo II), ocasionando a produção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). As duas reações podem levar à morte celular ou à destruição do tecido. Devido à natureza destes mecanismos de ação, é altamente improvável que cepas de micro-organismos adquiram resistência a esta técnica (9,10).

São muitos os termos encontrados na literatura para descrever a TFD, como por exemplo, os provenientes da língua inglesa: PACT - *photodynamic antimicrobial*

chemotherapy, PDT - *photodynamic therapy*, PAD - *photoactivated disinfection*, PDD - *photodynamic disinfection*, PDI - *photodynamic inactivation*, aPDT - *antibacterial photodynamic therapy*, entre outros. Neste trabalho foi escolhido o termo IFD, referente à inativação fotodinâmica de micro-organismos, uma vez que o termo TFD é mais amplamente utilizado quando os alvos terapêuticos são células mamíferas e tumorais (9,11–15).

A IFD de micro-organismos fundamenta-se no acúmulo preferencial do FS no alvo terapêutico como, por exemplo, bactérias, e não nas células ou tecidos circundantes. Tal condição é essencial para que, ao ser posteriormente ativado por baixas fluências de luz (muitas vezes chamadas “doses de luz” na literatura, por conta de uma correlação com a quantidade entregue de energia às células-alvo), não ocorra um efeito tóxico nas células (16). A técnica já é usada clinicamente como tratamento para várias doenças infecciosas, como úlceras da pele, candidíase oral, doenças periodontais, acne vulgar e muitas outras (17–21).

Dentro destes contextos, a indocianina verde (ICV) foi escolhida como FS neste trabalho por apresentar o pico de absorção na região do infravermelho próximo (805 nm). Nesta região do espectro, a penetração em tecidos biológicos é maior devido à baixa absorção por hemoglobina, melanina e água, o que faz da ICV um FS ideal para aplicações de IFD em tecidos profundos (22,23). A ICV é um corante orgânico utilizado clinicamente para fins de diagnóstico desde 1956 em várias aplicações (24–26), e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulamentador dos EUA, em 1959.

Existem indicações do uso de ICV para o tratamento de vários tipos de câncer, acne vulgar, em oclusão da neovascularização coróideia e na erradicação de micro-organismos presentes em feridas e queimaduras (27–32).

Diante da gravidade das pneumonias bacterianas e do aumento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, surge a necessidade de tratamentos alternativos ou associados para que haja potencialização da eficácia do tratamento e, como consequência, sucesso na terapêutica diminuindo a morbidade e a mortalidade. A IFD foi proposta neste trabalho como tratamento alternativo ou auxiliar de pneumonia, podendo agir concomitantemente aos convencionais.

Para este fim, portanto, neste estudo foi avaliada a eficácia da IFD com irradiação extracorpórea utilizando uma fonte de luz infravermelha e ICV como FS para o tratamento de pneumonia em modelo experimental em camundongos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PNEUMONIA

A pneumonia, ou pneumonia adquirida na comunidade (PAC), é uma infecção do trato respiratório inferior, apresentando sintomas como febre, expectoração e problemas respiratórios agudos, com diagnóstico evidenciado por taquipnéia ou infiltrados parenquimatosos visíveis em radiografias. Comumente se inicia como uma colonização na mucosa da nasofaringe, seguida por propagação para o trato respiratório inferior (1,2).

Existem diferentes vírus e classes de micro-organismos causadores de infecções, como fungos e bactérias, sendo que estas são as mais frequentes em infecções hospitalares por constituírem parte da microbiota humana. Estes micro-organismos não trazem risco a indivíduos saudáveis, mas podem acometer indivíduos com comprometimento clínico (33). O patógeno predominante na PAC é *Streptococcus pneumoniae*, que é responsável por cerca de dois terços dos casos de pneumonia causada por bactérias. Outros agentes como *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella* spp., *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e os vírus respiratórios (vírus da gripe, adenovírus, vírus sincicial respiratório, vírus da parainfluenza, coronavírus) também podem ser causadores de pneumonia (1,2,34).

Os micro-organismos podem contaminar o trato respiratório inferior, considerado estéril, por quatro mecanismos:

- aspiração de secreções contendo agentes patogênicos provenientes da orofaringe, da cavidade gástrica ou cavidades nasais;
- disseminação de bactérias a partir de uma área próxima, como a pleura;
- por meio de dispositivos utilizados na terapia respiratória e inalação de aerossóis contaminados;
- translocação hematogênica para o pulmão, provenientes de locais distintos de infecção (35).

A avaliação física de um paciente com suspeita de PAC deve incluir a temperatura do paciente, pulsação, frequência respiratória e a leitura de oximetria de pulso. A taquipneia é o mais sensível e mais específico de todos os sinais clínicos associados. Ardência nasal, retrações da caixa torácica, grunhido, e outros sinais de desconforto respiratório podem sugerir a presença de infecção do trato respiratório inferior (2).

A pneumonia nosocomial ou pneumonia adquirida no hospital (PAH) e a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) são complicações frequentes em

pacientes hospitalizados, principalmente naqueles admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). A PAH pode ser causada por diferentes tipos de agentes etiológicos incluindo bactérias de amplo espectro e, raramente, vírus e fungos (33,36,37).

As infecções hospitalares podem ser transmitidas por várias vias como por contato (mãos), partículas de saliva, pelo ar, vetores biológicos, fluidos corpóreos e materiais contaminados como equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos. Os profissionais de saúde e os diversos instrumentos utilizados nos atendimentos hospitalares (circuitos de ventilação, termômetros, estetoscópios, entre outros meios) podem ser responsáveis pela manutenção da colonização e da infecção, além da contaminação de dispositivos invasivos (cateteres venosos centrais, sonda urinária, cateteres arteriais, entre outros). Podem também estar relacionados ao desenvolvimento de surtos, muitas vezes associados à quebra de normas básicas de manuseio (38).

Os pacientes internados em UTIs são os que apresentam maior risco de adquirir infecção hospitalar quando comparados aos pacientes internados em outros setores do hospital, atingindo uma média de 45%. Observando-se o conjunto de todas as alas de um hospital, a infecção hospitalar mais encontrada é a do trato urinário, enquanto em UTIs predominam as infecções do trato respiratório inferior (Tabela 1) (39).

Tabela 1: Impacto das infecções hospitalares em paciente internados em UTI. A taxa de mortalidade que ocorrem em UTIs, representada como “global”; taxa de mortalidade devido à internação em UTIs “atribuída”; período de internação “prolongamento da internação” e dos gastos “custos”; para tratamento de pneumonia e infecções de corrente sanguínea.

<i>Infecção hospitalar</i>	Mortalidade		Prolongamento da internação	Custos (Dólares)
	Global (%)	Atribuída (%)		
<i>Pneumonia</i>	30 a 40	7 a 27	9 a 15 dias	8.000
<i>Infecções da corrente sanguínea</i>	35 a 50	35	8	40.000

Fonte: Knobel, 2006 (39).

A PAH é a inflamação do tecido pulmonar causada por agentes etiológicos não presentes nem incubados no momento da internação hospitalar, sendo diagnosticada após 48 horas ou mais após internamento hospitalar. Acomete pacientes internados nas unidades de internação (enfermarias/apartamentos), ainda não intubados ou em ventilação mecânica (VM). O paciente pode, no entanto, apresentar um agravamento em seu quadro clínico e ser encaminhado para a UTI, sendo submetido à intubação endotraqueal e VM. Após 48 - 72 h, ele pode correr risco de desenvolver uma infecção do trato respiratório inferior associado à VM, sendo esta conhecida como pneumonia a PAVM (33,40,41).

A PAVM é a infecção hospitalar mais frequente na Europa e a segunda causa mais comum de mortalidade nos hospitais norte-americanos, acometendo de 30 a 60% dos pacientes internados. A pneumonia nosocomial constitui mais de 25% de todas as infecções e corresponde a mais de 50% das prescrições de antibióticos. A necessidade da VM, eleva o risco do desenvolvimento de pneumonia em três vezes, aumentando a permanência dos pacientes no hospital em 7 a 9 dias (42,43). De acordo com o tempo de internação a PAVM pode ser classificada como precoce ou tardia. A precoce ocorre até o quarto dia de intubação e início da VM, e apresenta micro-organismos sensíveis a antibióticos. A PAVM tardia se inicia após o quinto dia de intubação e VM, envolvendo micro-organismos multirresistentes e apresentando alto índice de mortalidade do hospedeiro (37).

Para que haja o desenvolvimento da PAVM, é necessário que os micro-organismos sejam capazes de vencer os mecanismos de defesa do sistema respiratório, tais como reflexo glótico e da tosse; fluxo salivar e estruturas mucociliares. No entanto, estes se apresentam deficientes nos pacientes submetidos a VM, pois a presença do tubo endotraqueal prejudica esses mecanismos no hospedeiro e permite que as partículas inaladas tenham acesso direto das vias aéreas superiores às vias aéreas inferiores (36,37).

Há quatro vias relacionadas à patogênese da PAVM, contribuindo para a colonização e infecção: aspiração de conteúdo orofaríngeo, gástricas ou dos seios sinusais; contaminação de equipamento respiratório; transmissão cruzada de micro-organismos e disseminação hematogênica proveniente de outros focos extrapulmonares (33).

Dentre os fatores de risco relacionados à PAVM, podem estar o uso prolongado de antibióticos (a antibioticoprofilaxia inadequada pode se relacionar à seleção de cepas de bactérias multirresistentes), a presença de tubo endotraqueal, equipamentos respiratórios contaminados, administração de dieta enteral, posição supina e cateter venoso central. Pacientes com mais de 5-7 dias de VM submetidos ao uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro são propensos a infecções por agentes multirresistentes como: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA), Gram-negativos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e Gram-negativos produtores de β -lactamases de amplo espectro como a *Klebsiella pneumoniae* (37).

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2007) classifica os fatores de risco como modificáveis e não modificáveis. Os fatores não modificáveis estão

relacionados à idade do paciente, escore da gravidade do estado do paciente ao entrar na UTI e presença de co-morbidades (doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC, doenças neurológicas, traumas, cânceres e cirurgias). A interferência nos fatores modificáveis pode ser realizada por meio de medidas de relativa simplicidade, tais como: lavagem e desinfecção das mãos, instituição de protocolos que visem à redução de prescrições inadequadas de antimicrobianos e vigilância microbiológica, com informação periódica dos profissionais quanto à prevalência e resistência da microbiota (37).

O diagnóstico apropriado para PAVM ainda é difícil devido à falta de critérios precisos (44). Além do quadro clínico apresentado pelo paciente, alguns parâmetros utilizados são divergências laboratoriais como febre (acima de 38 °C), secreção traqueal purulenta, leucocitose (acima de 10.000/mm³) ou leucopenia (abaixo de 4.000/mm³) e verificação de infiltrado pulmonar novo ou progressivo em radiografias torácicas (40).

A utilização de critérios unicamente clínicos pode incorrer em diagnóstico errado e em tratamentos inadequados. Além disso, esses critérios podem estar presentes em diversas outras patologias às quais pacientes em estado grave estão expostos, como atelectasias, edema pulmonar cardiogênico, infarto pulmonar, síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA) e hemorragia alveolar. Os eventuais falsos positivos resultam no uso indiscriminado de antibióticos, propiciando a seleção de micro-organismos resistentes, aumentando a taxa de mortalidade (45). Em 1991, Pugin *et al.* criaram o Escore Clínico de Infecção Pulmonar (*Clinical Pulmonary Infection Score*, CPIS), no qual os achados da coloração de Gram e culturas, presentes no aspirado traqueal coletado no momento da suspeita diagnóstica, são pontuados, gerando um escore total de, no máximo, 12 pontos. Um valor de CPIS (Tabela 2) maior do que 6 está associado à alta probabilidade de pneumonia relacionada à ventilação, com sensibilidade de 93% e especificidade de 100% (44–46).

Tabela 2: Índice de pontuação clínica de infecção pulmonar (*Clinical Pulmonary Infection Score* - CPIS).

Parâmetros	0 ponto	1 ponto	2 pontos
<i>Temperatura (°C)</i>	≥ 36,5 e ≤ 38,4	≥ 38,5 e ≤ 38,9	≤ 36 ou ≥ 39
<i>Leucócitos (células/mm³)</i>	≥ 4.000 e ≤ 11.000	< 4.000 ou > 11.000	< 4.000 ou > 11.000 + ≥ 500 bastões
<i>Secreção traqueal[§] (24h)</i>	< 14 + de aspirações	≥ 14 + de aspirações	≥ 14 + de aspirações com aspecto purulento
<i>Oxigenação (PaO₂ /FiO₂)</i>	> 240 ou SDR		≤ 240
<i>Radiograma do tórax</i>	Sem infiltrado	Infiltrado difuso	Infiltrado localizado
<i>Cultural do aspirado traqueal semiquantitativo^{&}</i>	Ausência de crescimento ou cultivo (0 ou 1+) de bactéria patogênica	Cultivo (2+ ou 3+) de bactéria patogênica	Bactéria patogênica visualizada no Gram (>1+) e cultivo de bactéria patogênica (2+ ou 3+)

* Total de pontos = CPIS (varia de 0 a 12 pontos) SDR = Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto PaO₂ /FiO₂ = razão entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio.

[§] Em cada aspiração de secreções é atribuída, pela equipe de enfermagem, uma graduação de 0 a 4 cruces (+). A soma das cruces em 24 horas é utilizada para o cálculo do escore.

[&] A análise subjetiva é graduada em cruces (+). Pode variar de zero até 3 cruces.

Fonte: Cremonese *et al.*, 2005 (44)

Dentre as bactérias responsáveis pelas infecções pulmonares, a *Streptococcus pneumoniae* é o agente patogênico mais comum causador de CAP em adultos e crianças, representando cerca de 550.000 casos de pneumonia a cada ano (47). Nos EUA, o número anual de infecções pneumocócicas fatais é de 40.000. A meningite pneumocócica adquirida na comunidade possui uma taxa de mortalidade maior (20% e 50% em países mais e menos desenvolvidos, respectivamente) (48).

O pneumococo *S. pneumoniae*, está presente na microbiota normal do sistema respiratório superior, porém quando há uma colonização excessiva e/ou uma migração para outras regiões ocorre uma grande variedade de doenças, podendo ser infecções brandas, como otites e sinusite aguda, e quadros infecciosos graves, como bacteremia e meningite (49,50). Trata-se uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa com crescimento favorecido em atmosferas enriquecidas com 5 % de CO₂ e nutricionalmente fastidiosa. A temperatura ideal de crescimento é em torno de 37 °C e, quando semeados em meio de cultura sólido enriquecido com sangue (ágar-sangue), produzem um halo esverdeado característico da hemólise parcial dos eritrócitos (α hemólise) provocada pelo peróxido de hidrogênio produzido. É sensível a bÍlis, e é capaz de produzir enzima peroxidase, não possui estruturas que atribuem motilidade, e bactérias individuais

possuem uma morfologia ovalada ou esférica (coco), com aproximadamente 0,8 μm de diâmetro, mas é encontrada na forma de pares (diplococos) ou em curtas cadeias (49).

O fator de virulência mais relevante identificado na *S. pneumoniae*, é a presença de cápsula. Bactérias encapsuladas podem se alojar em tecido alveolar desencadeando forte resposta inflamatória, reduzindo assim, a função pulmonar levando à pneumonia. A presença da cápsula dificulta consideravelmente a capacidade de reconhecimento da bactéria pelas células de defesa, fazendo com que os microrganismos não sejam fagocitados e eliminados pelo sistema imune (49–51).

2.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Em 1900, Oscar Raab observou que, devido a um incidente em seu experimento, a toxicidade do cloridrato de acridina contra *Paramecium caudatum* mostrou-se dependente da quantidade de luz, publicando assim o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (9,16). Em 1903 ocorreu a primeira aplicação clínica da técnica com a utilização de eosina e luz para o tratamento de lúpus vulgar, sífilis, psoríases e câncer de pele superficial (52).

A inativação fotodinâmica (IFD) como atividade antimicrobiana – entendida como a TFD aplicada especificamente ao controle microbiológico – é um dos mais novos avanços no tratamento de diferentes patologias de origem microbiana, viral, fúngica e inflamatória (9). As bactérias possuem elevada taxa de multiplicação e, caso ocorra uma mutação que auxilie um único micro-organismo a sobreviver na presença de um antibiótico, esta se tornará predominante na população microbiana, criando uma cepa com resistência ao medicamento. Com o aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, há um crescente interesse no desenvolvimento de diferentes terapias antimicrobianas. A IFD é uma alternativa para o tratamento de doenças causadas por esses patógenos, e tem apresentado um retorno promissor como tratamento de infecções resistentes a múltiplos fármacos. Ainda não há relatos do desenvolvimento de resistência à IFD por micro-organismos, mesmo após numerosas tentativas de sua indução por repetição de ciclos desta técnica, com subdoses de energia e permitindo-se o crescimento microbiano (14).

A ação do FS pode ocorrer de duas maneiras:

- Mecanismo tipo I: Há interação direta do FS, excitado pela fonte de luz, com o substrato (componentes do sistema), gerando íons-radicaís. Esses radicais livres vão interagir quase que instantaneamente com o oxigênio disponível no estado

fundamental, formando espécies intermediárias de oxigênio altamente reativas, capazes de oxidar diversas biomoléculas.

- Mecanismo tipo II: Há transferência de energia do FS no estado tripleto para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto. Este é uma forma reativa altamente citotóxica, sendo o principal mediador do dano celular causado pela IFD, como mostrado na Figura 2 (9,10,53,54).

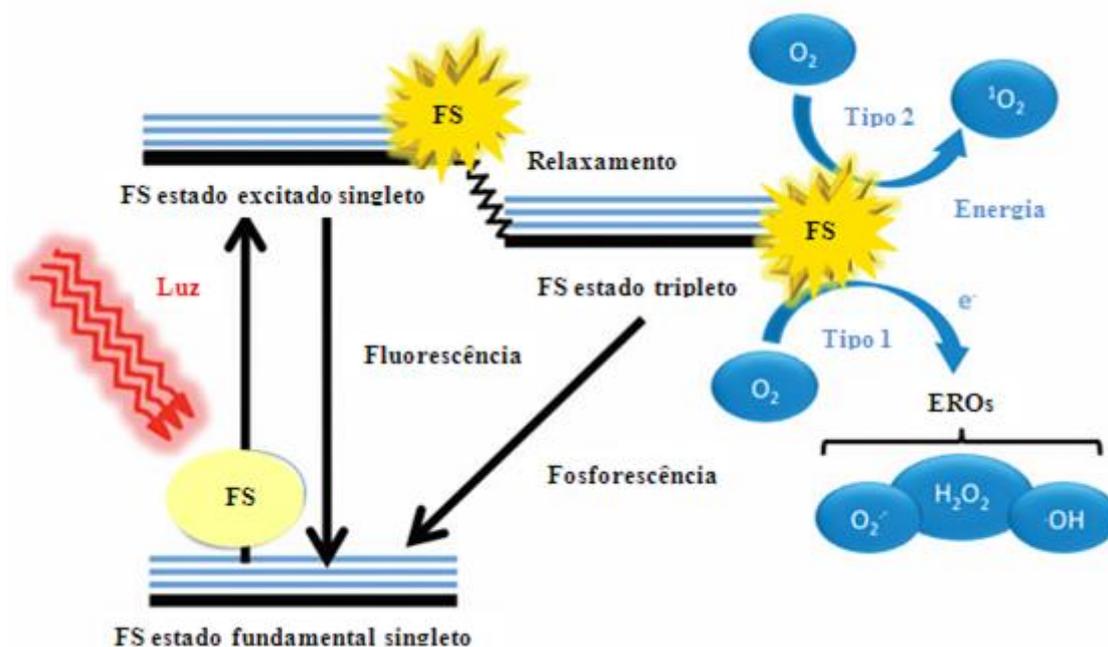


Figura 2: Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica, incluindo o diagrama de Jablonski.
Fonte: Adaptado de Denis *et al.*, 2011 (55).

A molécula de FS no estado fundamental singleto, quando absorve energia luminosa, passa a um estado singleto excitado e, posteriormente, sofre uma transição para um estado tripleto meta-estável. Este FS no estado tripleto pode interagir com o oxigênio molecular por meio das reações tipo I (formação de radicais livres) e tipo II (formação de oxigênio singleto) (55).

A formação do oxigênio singleto consiste numa conversão a partir de um estado fundamental tripleto, com dois elétrons desemparelhados em seus orbitais moleculares. Ao receber a energia liberada pela interação de uma molécula orgânica (FS) com a luz, ocorre a inversão do spin de um desses elétrons, transformando-o em um oxigênio singleto. Esta espécie possui dois elétrons emparelhados no mesmo orbital ou em orbitais diferentes, sendo assim uma molécula extremamente reativa (55).

Os dois tipos de reação podem ocorrer simultaneamente e a razão entre essas reações e os produtos formados é influenciada pelas características do FS, pela concentração de oxigênio presente e pelos substratos intracelulares. A morte celular causada pela IFD tem como principais mecanismos de ação a produção destas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) – particularmente do oxigênio singlete – e a indução de lise/necrose ou apoptose (56).

2.3 FONTE DE LUZ

A fonte de luz é de extrema importância na IFD, pois é necessário que a luz utilizada atravesse os tecidos eficientemente e, ative o FS para produzir o efeito fotodinâmico nas células (57).

Lasers e LEDs (Diodos Emissores de Luz - do inglês *Light Emitting Diodes*) são as fontes de luz mais utilizadas na TFD em dermatologia pela possibilidade de obtenção de luz monocromática, disponibilidade de altas potências ópticas e facilidade de transporte. É importante adequar a escolha da fonte de luz ao FS utilizado e ao alvo da terapia, uma vez que o comprimento de onda utilizado caracteriza a capacidade de penetração da luz. Dentre as diversas possibilidades para a escolha dos comprimentos de onda, a faixa dos 600-800 nm costuma ser a região ideal para ser utilizada na IFD, e é conhecida comumente como “janela terapêutica” por esse motivo. Comprimentos de onda abaixo de 600 nm apresentam elevado índice de espalhamento e absorção em tecidos biológicos, dificultando que alcancem as regiões desejadas, enquanto comprimentos maiores que 800 nm (particularmente acima de 1200 nm) passam a ser altamente absorvidos pelas moléculas de água dos tecidos biológicos, interferindo com o processo fotodinâmico e gerando importantes efeitos térmicos (57–59).

Neste estudo, foi escolhida a utilização de fonte de luz em comprimento de onda na região do infravermelho por possuir maior penetração no tecido, podendo assim atingir o interior dos pulmões e ativar o FS.

2.4 FOTOSSENSIBILIZADOR

Dentre as diversas possibilidades de FS disponíveis atualmente, para este estudo foi escolhida a indocianina verde (ICV). Ela faz parte de uma classe de corantes orgânicos denominada “cianinas”, pertencente à segunda geração de FS. Apresenta-se como um

composto (Figura 3) de peso molecular igual a 775 g/mol, formado por duas estruturas policíclicas, de caráter lipofílico, ligadas por uma cadeia carbônica. Devido à presença de grupos sulfônicos carregados negativamente em suas extremidades, também possui solubilidade em água, constituindo uma molécula anfipática (60,61). Suas propriedades ópticas são sensíveis a vários fatores, incluindo o solvente onde é dissolvida, a concentração e a temperatura (26).

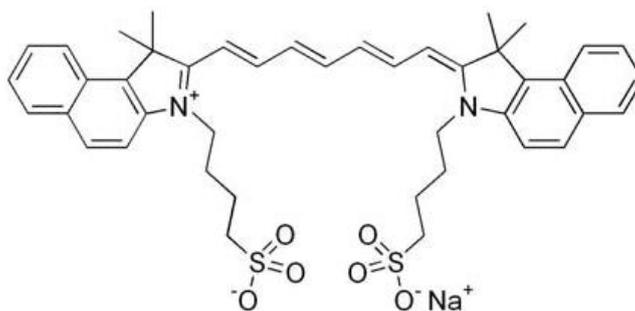


Figura 3: Estrutura da molécula da indocianina verde.

Fonte: Giraudeau *et al.*, 2014 (62).

O pico de absorção da ICV está localizado entre 700 – 810 nm (**Figura 4**), região na qual a penetração da luz no tecido é maior evitando absorção por parte da melanina. Desse modo, a ICV representa uma alternativa para tratamentos mais profundos com TFD/IFD (22,23).

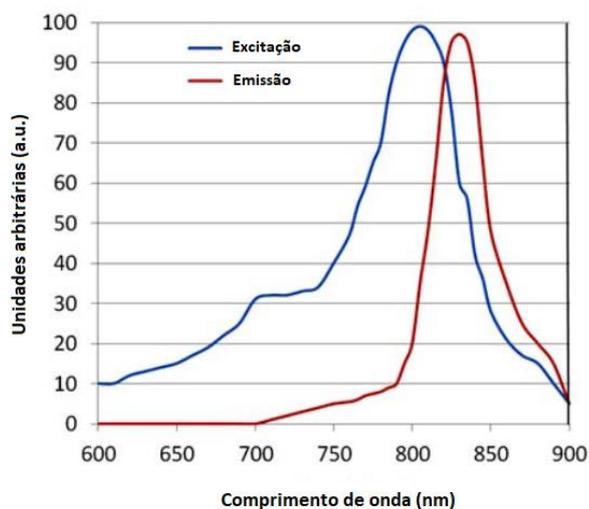


Figura 4: Espectro de excitação ou absorção (azul) e emissão de fluorescência (vermelho) da ICV em sangue.

Fonte: Adaptado de Giraudeau *et al.*, 2014 (62).

A ICV é 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 (24,26). Por apresentar uma baixa incidência de efeitos colaterais relatados, foi aprovada pelo FDA em 1959 nos EUA. Na literatura encontram-se estudos que demonstram a eficácia do uso de ICV como FS em células de melanoma, células de câncer de cólon, em câncer de mama e em carcinoma de células escamosas da cavidade oral, no tratamento de acne vulgar, na oclusão de neovascularização de coróide e na erradicação de micro-organismos presentes em feridas e queimaduras (22,27–30,32).

Após a injeção de solução de ICV na corrente sanguínea, sua concentração total diminui a uma taxa exponencial, relatada como meia-vida, na ordem de 2-4 minutos. A ICV se liga facilmente à albumina e lipoproteínas de alta densidade no plasma sanguíneo, e é eliminada da circulação pelo fígado e excretada em forma não metabolizada na bile, embora o mecanismo de eliminação do sangue ainda não seja claramente compreendido (26).

Fotossensibilizadores com cargas neutras, aniônicas ou catiônicas são conhecidamente mais eficientes para inativar bactérias Gram-positivas, ao passo que apenas FS catiônicos são capazes de inativar bactérias Gram-negativas. Esta diferença de susceptibilidade entre as espécies pode ser explicada pela sua fisiologia, uma vez que as espécies Gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática cercada por uma parede celular relativamente porosa composta de peptidoglicano e ácido lipoteicóico que permite a passagem do FS. O envelope celular de bactérias Gram-negativas, entretanto, é formado por uma membrana citoplasmática interna e uma membrana externa, separadas pelo periplasma contendo peptidoglicano, sendo essa membrana externa uma barreira de permeabilidade efetiva entre a célula e o ambiente, restringindo a ligação e a penetração de muitas estruturas de FS (63). Todas essas características devem ser levadas em consideração para a escolha do FS. Neste estudo foi proposta a inativação de *S. pneumoniae* que, por ser Gram-positiva, é susceptível à interação com a ICV.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi definir um protocolo de tratamento e avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica, em experimento com pneumonia induzida por *Streptococcus pneumoniae*, em modelo animal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação da fluência a ser utilizada no protocolo de tratamento por meio de testes piloto, avaliando a transmissão da luz através do tecido em experimentos *ex vivo*. E avaliação da presença da ICV nos pulmões de camundongos.
- Avaliação da eficácia da IFD quanto à redução bacteriana nos pulmões de camundongos infectados com *S. pneumoniae*.
- Determinação da curva de sobrevivência de camundongos infectados e submetidos à IFD.
- Determinação do efeito de redução bacteriana promovido pela geração de fotoprodutos após a irradiação da ICV *in vitro*.
- Avaliação de parâmetros de dano pulmonar (razão de peso úmido e seco, histologia e contagem de células infiltradas) após a IFD em camundongos infectados.

4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Nos próximos capítulos serão apresentados os delineamentos experimentais de testes *in vivo*, conduzidos em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros, docente da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Araraquara-Brasil), os experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados durante o estágio no exterior em colaboração com o Prof. Dr. Wolfgang M. Kuebler, docente da Universidade de Toronto e do St. Michael's Hospital (Toronto, Canadá), e por fim os testes preliminares executados com a ICV nebulizada.

Para facilitar o entendimento do delineamento experimental e respectivos resultados, esta tese foi dividida em três capítulos. No capítulo I, são apresentados os experimentos *in vivo* realizados para avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica para tratamento pulmonar. No capítulo II, são apresentados os experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados no laboratório do Prof. Kuebler, no St. Michael's Hospital, onde foram executados os experimentos de análise pulmonar, visando avaliar microscopicamente as alterações teciduais induzidas pela modalidade de IFD proposta neste estudo. No capítulo III, são apresentados os testes preliminares para a entrega da ICV aos pulmões por meio de nebulização, a fim de aprimorar a IFD e favorecer a translação da pesquisa para a clínica.

5. CAPÍTULO I

Neste capítulo, são apresentados os experimentos *in vivo* realizados para avaliação da efetividade da IFD para tratamento pulmonar, lançando as bases para que se possa realizar o tratamento da pneumonia causada por *S. pneumoniae* em modelo animal.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 *Cultivo de Streptococcus pneumoniae*

Para os ensaios de inativação fotodinâmica foi utilizada cepa ATCC[®] 49619[™] de *Streptococcus pneumoniae*, cedida pela colaboradora Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Ivo de Medeiros (UNESP-Araraquara). As amostras foram armazenadas em Biofreezer a - 80 °C em criotubos contendo 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFCs) 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).

Para o preparo dos inóculos utilizados nos experimentos, o número de UFCs presente no meio de cultura foi correlacionado com o valor da absorbância da suspensão bacteriana. Após o descongelamento da amostra em banho-maria, adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana em 9 mL de meio TSB em um tubo de centrífuga, mantendo-se fechado em uma incubadora com agitação orbital a 37 °C e 180 r.p.m. por 4 horas. Para cada experimento foi preparado um novo inóculo. Após o período de 4 horas de crescimento, a amostra foi centrifugada a 15.000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em tampão salino fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS). Em seguida, foi feita a leitura de absorbância em comprimento de onda de 600 nm para confirmar a concentração de bactérias presentes na amostra. Ao atingir-se a absorbância de 0,3 unidades de absorbância, correspondendo a aproximadamente 10⁹ UFC/mL, o que ocorria em torno de 4 horas de crescimento, o inóculo foi ajustado por meio de diluições para a concentração de 10⁸ UFC para cada 30 µL (volume que foi instilado em cada animal – Figura 5).



Figura 5: Imagem do processo de instilação utilizado para induzir a infecção pulmonar e para entrega do fotossensibilizador indocianina verde.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.2 Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos fêmeas da linhagem SKH-1 *hairless*, com idade entre 8-10 semanas e pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram adquiridos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Os protocolos apresentados nesse capítulo I foram aprovados e seguidos de acordo com parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara – CEUA/FCF/CAr # 30/2013, parecer nº 46/2013.

5.1.3 Indocianina Verde

Neste estudo foi utilizado como FS a indocianina verde (ICV), de peso molar 774,96 g/mol, produzida pela empresa nacional Ophthalmos (Ophthalmos S. A., Brasil). Alíquotas de 1 mg foram armazenadas em temperatura ambiente (em torno de 26 °C), protegidos da luz até o momento de sua utilização.

As alíquotas foram diluídas somente no momento do experimento para garantir a estabilidade e eficiência fotodinâmica. Um miligrama de ICV foi diluído primeiramente em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®, EUA), em seguida foram adicionados 900 µL de PBS. Esta solução foi considerada a solução mãe, e a partir dela foi feita a diluição final em PBS para a concentração de 100 µM utilizada para a instilação nos animais. Foram instilados, no total, 30 µL de ICV por animal (15 µL em cada narina).

5.1.4 Fonte de Luz

O equipamento para irradiação extracorpórea dos animais foi desenvolvido no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do IFSC. Para realizar os experimentos *in vivo*, foi desenvolvido um equipamento com formato anatômico para irradiar adequadamente a região torácica do dorso do animal (Figura 6).

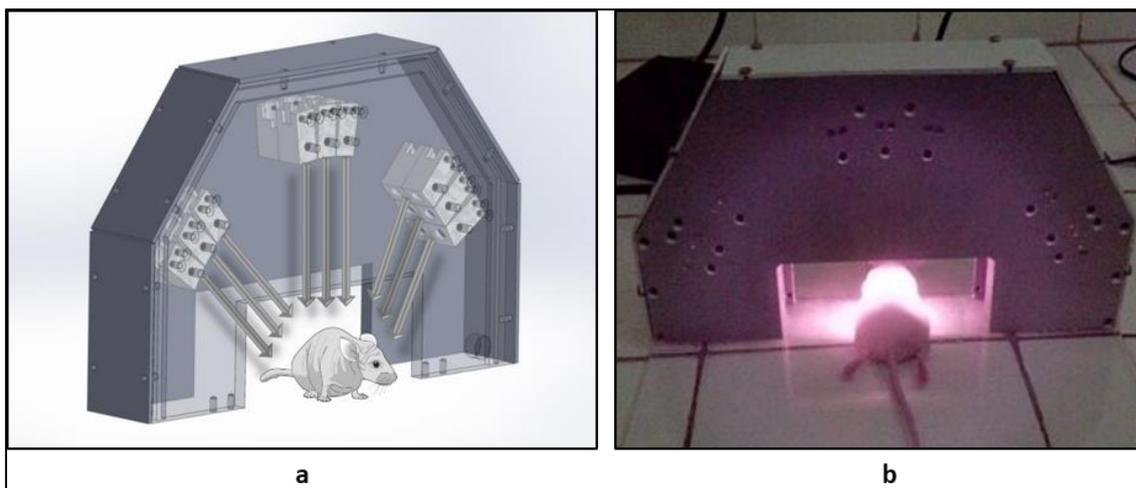


Figura 6: (a) Esquema do equipamento utilizado para irradiação, evidenciando os pontos de lasers. (b) Foto do equipamento irradiando a região do tórax do animal.

Fonte: Elaborado pela autora(64).

O equipamento é formado por 18 lasers de diodo com emissão em 780 nm. Os lasers foram arranjados de maneira a atingir a superfície da pele de um camundongo o mais uniformemente possível. A irradiância foi ajustada para 60 mW/cm², e determinada por meio de um medidor de potência óptica (Power Meter LM 10, Coherent, EUA) posicionado no centro do equipamento, simulando a posição do animal durante a irradiação. A luz emitida pelos lasers pode ser visualizada na imagem da Figura 6 por conta do sensor sensível à emissão de luz infravermelha da câmera utilizada, uma vez que a olho nu não é possível observar luz emitida em tal comprimento de onda.

Durante a IFD os animais receberam irradiação extracorpórea por 33 minutos e 20 segundos, totalizando uma fluência (ou dose de luz) de 120 J/cm², calculada de acordo com a equação (1).

$$D = I \cdot t \quad (1)$$

Nesta equação, D corresponde à fluência em J/cm², I à irradiância dada em W/cm² e t ao tempo de irradiação em segundos.

5.1.5 *Análises de transmissão da luz, variação da temperatura e distribuição do FS nos pulmões*

Testes preliminares foram realizados para demonstrar que o FS e a luz em 780 nm estavam sendo entregues aos pulmões. Para o primeiro teste, foi utilizado um camundongo da linhagem SKH-1 fêmea, que recebeu, por meio de instilação, 30 μ L de ICV a 200 μ M (protocolo de preparação do FS conforme sessão 5.1.3). Após a instilação, por 40 minutos foram tiradas sequências de imagens com auxílio de uma câmera desenvolvida a fim de captar a fluorescência de compostos fotoativados no infravermelho. O equipamento é composto por uma câmera acoplada a lasers com emissão de 780 nm, que permitem a excitação do FS e a coleta da fluorescência por imagem (mais detalhes do equipamento podem ser encontrados na dissertação de mestrado de Govone (2016) (65).

Para as análises de transmissão de luz e variação de temperatura foi utilizado modelo *ex vivo*. Após a eutanásia de um camundongo fêmea da linhagem SKH-1 *hairless*, um laser de diodo com emissão em 810 nm (DEN7A, Wuhan Gigaa Optronics Technology Company Ltd, China) e irradiância de 200 mW/cm² foi posicionado na parte superior do sistema. O animal foi posicionado em cima de uma placa de vidro, e em seguida foi posicionada uma fibra coletora difusora isotrópica (IP85, Medlight S. A., Suíça), fixada a um sistema portátil de espectrometria (Spectrometer USB2000, Ocean Optics, EUA), na parte de baixo da região torácica do animal. A função desta fibra era coletar a luz proveniente do feixe do laser e que tivesse atravessado as estruturas teciduais do animal (Figura 7). Foi utilizada a placa de vidro como apoio do corpo do animal para que não houvesse interferência na transmissão da luz. Neste mesmo experimento, foi medido o aquecimento do tecido pela luz. Para isto, foi inserido na pele na região dorsal do animal o termistor do medidor de temperatura (Termo Meter MT 600, Minipa, China).

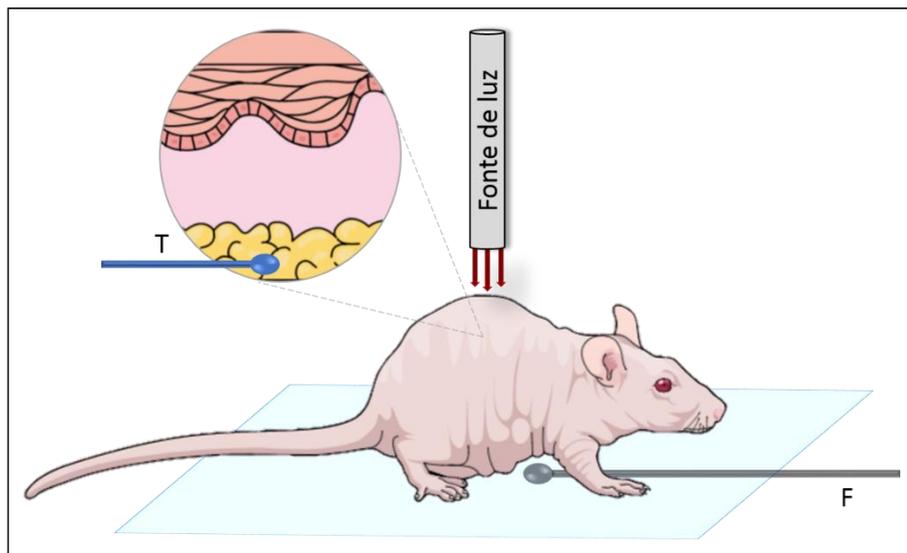


Figura 7: Esquema que descreve o procedimento de análise da transmissão da luz. A fonte de luz utilizada com emissão em 810 nm foi posicionada acima do dorso do animal. (T) Termistor inserido em baixo da pele do animal. (F) fibra coletora posicionada embaixo da placa de vidro utilizada como suporte para o animal.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em um segundo experimento de transmissão da luz, foi utilizado equipamento de irradiação com emissão em 780 nm (Figura 17). Após a eutanásia de um camundongo fêmea da linhagem SKH-1 *hairless*, o corpo do animal foi posicionado sob o equipamento de irradiação, e uma fibra coletora do tipo difusora isotrópica, acoplada ao sistema portátil de espectrômetro (os mesmos utilizados no experimento anterior), foi inserida na cavidade torácica. A fibra coletora foi movida nos eixos X e Y, e pelas médias dos valores coletados, foi obtida a porcentagem da perda da luz ao chegar nos pulmões (Figura 8).

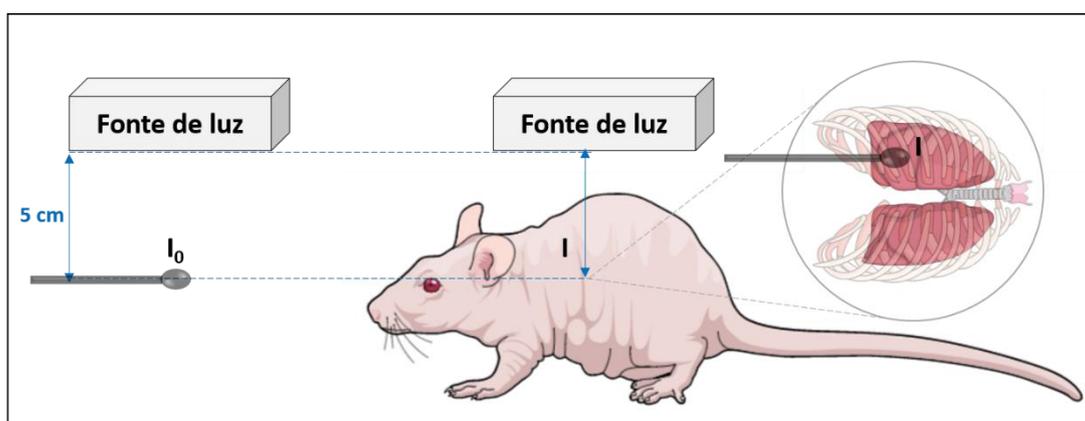


Figura 8: Esquema que descreve o procedimento da verificação da quantidade de luz que atravessa o tecido. (I_0) intensidade de luz detectada à distância de 5 cm da fonte dos lasers, (I) intensidade da luz detectada à mesma distância da medida de I_0 , porém com as barreiras de pele, músculo, ossos e pulmão (caixa torácica do animal).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.6 Recuperação de UFC

Camundongos fêmeas das linhagens SKH-1 *hairless* foram anestesiados por via intraperitoneal (Xilazina [0,1 mg/kg] e Quetamina [100 mg/kg]) e infectados intranasalmente com 30 µL/animal (15 µL por narina do animal) de inóculos sub-letais (10^8 UFC/animal) de *S. pneumoniae*. Após dois dias de infecção, em um grupo de animais foram instilados 30 µL de ICV a uma concentração de 100 µM, e após 3 minutos de intervalo, estes animais foram submetidos à IFD com irradiação extracorpórea com fluência de 120 J/cm². Em um segundo grupo de animais, foram instilados 30 µL/animal de PBS e, após 3 minutos, os animais receberam a irradiação – grupo utilizado como “controle” para a luz. Em um terceiro grupo, foi instilada apenas ICV – grupo utilizado como “controle” para o FS. Por fim, em um último grupo controle, foi instilado apenas PBS, sem irradiação, para servir como negativo de luz e FS. Após sete dias, os animais foram eutanasiados, e os pulmões foram macerados em 500 µL de PBS. Após a homogeneização dos pulmões, foram feitas diluições seriadas e cultivo das amostras em ágar sangue (ágar tripton de soja – TSA, enriquecido com 5% sangue desfibrinado de carneiro). As placas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ à 37 °C e, após 24 horas, foi feita a contagem de UFC. A eficácia do tratamento foi avaliada quanto à carga bacteriana pela recuperação de UFC de *S. pneumoniae* no macerado de pulmão.

Os parâmetros para a concentração de ICV e irradiação foram escolhidos com base em um estudo desenvolvido simultaneamente a este, para dissertação de mestrado de Leite (2015) (66). Foram realizados testes *in vitro* a fim de avaliar os efeitos da IFD para inativação de *S. pneumoniae* planctônicas, *S. pneumoniae* em co-cultura com células de macrófagos alveolares (RAW 264.7) e a viabilidade destas células pulmonares após a IFD.

5.1.7 Curva de sobrevivência

Camundongos fêmeas das linhagens SKH-1 *hairless* foram anestesiados por via intraperitoneal (Xilazina [0,1 mg/kg] e Quetamina [100 mg/kg]) e infectados intranasalmente com inóculos sub-letais (10^8 UFC/animal) de *S. pneumoniae* (mesmo protocolo descrito na sessão 5.1.6). Após dois dias de infecção, em um grupo de animais foram instilados 30 µL de ICV a 100 µM, e em seguida os animais foram submetidos à IFD (mesmos parâmetros utilizados no item 5.1.6), por um tempo de 33 minutos e 20

segundos de irradiação. Em outro grupo de animais, foi instilado PBS para que fossem utilizados como grupo controle, negativo de luz e FS. A sobrevivência dos animais foi monitorada por 50 dias, e ao final deste período, a eficácia do tratamento foi avaliada de acordo com as taxas de morte e sobrevivência. A massa dos animais foi monitorada durante o período da curva de sobrevivência e a perda ou ganho de massa calculados em relação à massa inicial dos animais antes da infecção.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 *Análises de transmissão da luz, variação da temperatura e distribuição do FS nos pulmões*

O primeiro teste preliminar demonstrou que a ICV instilada foi distribuída com eficiência nos pulmões, por meio da detecção da emissão de sua fluorescência. Uma vez que a fluorescência de um composto só é observada após a molécula ser excitada e retornar ao estado fundamental na forma de fluorescência, podemos considerar que a ICV permaneceu com suas propriedades fotodinâmicas inalteradas ao chegar ao pulmão (Figura 9).

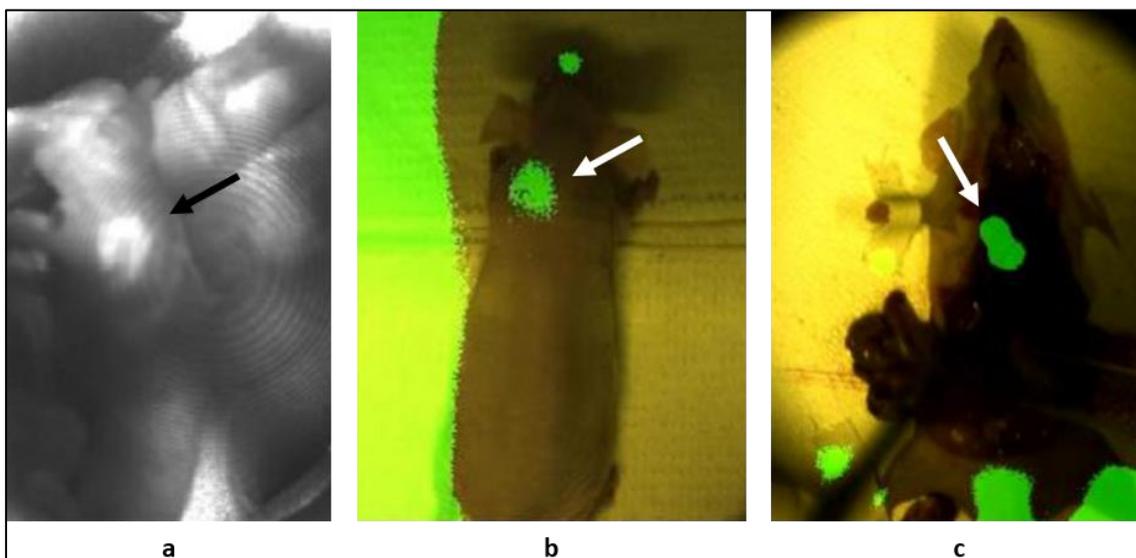


Figura 9: (a) imagem lateral do dorso do animal evidenciando em branco (apontado pela flecha preta) a fluorescência da ICV no pulmão vista externamente. (b) imagem colorida evidenciando em verde (apontado pela flecha branca) a fluorescência da ICV vista externamente do dorso do animal. (c) imagem da fluorescência da ICV vista nos pulmões após 40 minutos após a instilação, a imagem foi realizada após laparotomia do animal. N=2.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram eutanasiados 40 minutos após a instilação, e por meio da imagem de fluorescência, foi possível detectar a presença da ICV nos pulmões, como mostrado na Figura 9 (c). Em 2009, um estudo em camundongos avaliou a biodistribuição da ICV intravenosa dissolvida em PBS. A concentração utilizada foi de 2 mg/kg, e 2 minutos após a injeção a ICV podia ser encontrada nos pulmões, porém em baixa concentração (menos que 1% em relação a massa de ICV injetada na corrente sanguínea), e em 60 minutos a concentração foi reduzida a quase zero (26). Em contrapartida, quando a ICV foi entregue diretamente no pulmão, sinal intenso da fluorescência do FS foi observada 40 minutos após a instilação.

A ICV é absorvida por células parenquimatosas hepáticas e é secretada inteiramente na bile, o que é consistente com a característica lipofílica da molécula. Isso explica a sua rápida eliminação na circulação após injeção intravenosa, com tempo de meia-vida plasmática de cerca de 2 a 4 minutos. A depuração plasmática de ICV é bifásica, mostrando uma fase inicial rápida com meia-vida de 2-4 minutos e uma fase secundária com meia-vida de mais de uma hora em baixas concentrações, o que pode relacionar os resultados preliminares deste estudo no qual foi utilizada concentração de ICV relativamente baixa (200 μ M) (60).

O segundo teste preliminar foi realizado com o intuito de verificar se a luz seria capaz de atingir os pulmões. Para isso, foi avaliada a transmissão da luz pelo corpo do camundongo e o aquecimento causado pela emissão do laser infravermelho. A luz transmitida pelo feixe (Figura 10) do laser é capaz de atravessar o corpo do animal e ser coletada pela fibra, posicionada na parte de baixo do corpo do animal. Para este teste, o laser operou com irradiância de 200 mW/cm². Com o resultado, foi possível provar que a luz estava atingindo os pulmões, uma vez que ela atravessou toda a cavidade torácica e foi coletada na parte externa da região torácica anterior. É importante ressaltar que estas medidas foram feitas unicamente com a intenção de verificar a presença de luz depois de o feixe atravessar o corpo do animal. Por isso, apenas foram coletados os espectros que mostram que a linha de emissão do laser foi detectada sob o animal.

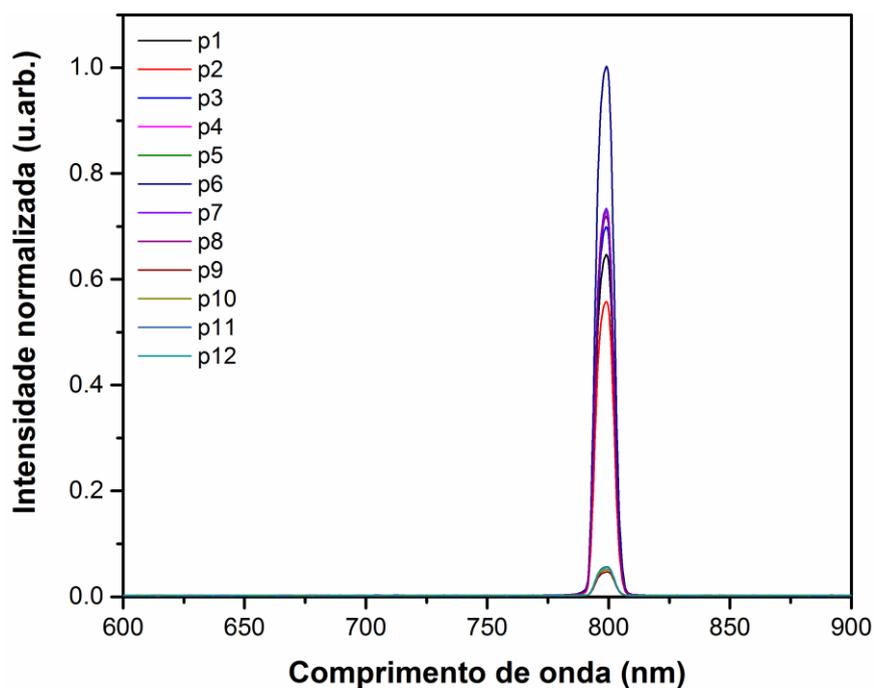


Figura 10: Análise da transmissão da luz através do corpo animal. O p1 - p12 referem-se a diferentes posições dos pontos varridos aleatoriamente pela fibra coletora posicionada na parte de baixo da cavidade torácica do animal. Eixo Y: intensidade normalizada da luz expressa em unidades arbitrárias. Eixo X: comprimentos de onda. A ausência de barras de erro se deve à avaliação em um único animal (N=1).

Fonte: Elaborado pela autora.

A análise de aumento de temperatura (Figura 11), durante a irradiação com laser de emissão em 810 nm foi realizada com o corpo de um único animal a uma temperatura inicial de 27 °C. Após 200 segundos de irradiação, a temperatura atingiu 32,5 °C. Apesar do aumento de aproximadamente 5,5 °C, em um animal vivo essa variação não é esperada devido à capacidade do organismo de autorregular sua temperatura.

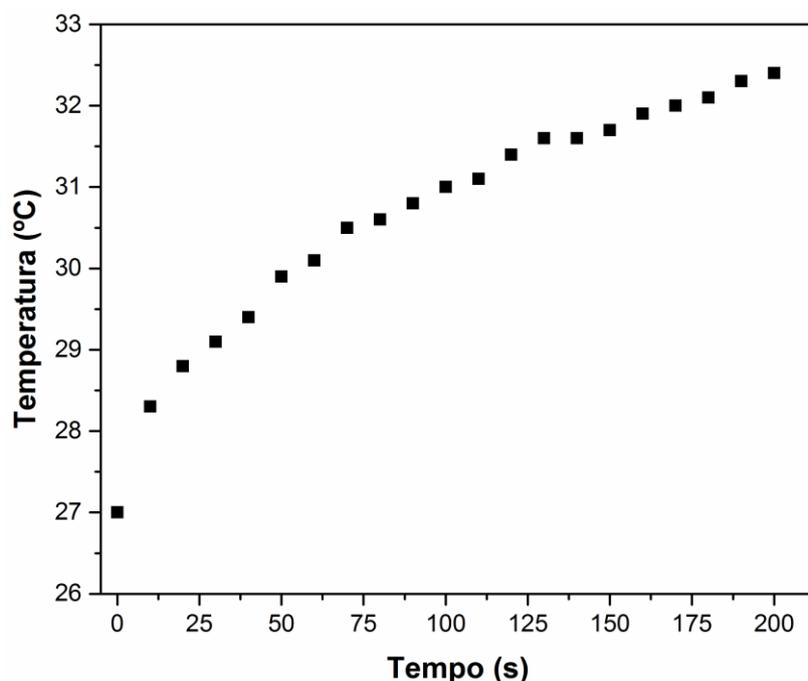


Figura 11: Aumento da temperatura medido durante 200 segundos de irradiação. Eixo Y: escala de temperatura expressa em °C. Eixo X: tempo de irradiação expresso em segundos. A ausência de barras de erro se deve à avaliação em um único animal (N=1).

Fonte: Elaborado pela autora.

Por fim, foi realizado um experimento também em modelo *ex vivo* no qual, para transmissão da luz, foi utilizado equipamento de irradiação com emissão em 780 nm (Lasertable, Figura 17) e uma fibra coletora do tipo difusora, acoplada ao sistema portátil de espectrômetro, que foi inserida na cavidade torácica. A fibra coletora moveu-se nos eixos X e Y, e a média dos valores coletados em 8 pontos, medidos em unidades arbitrárias proporcionais à intensidade de luz coletada pelo dispositivo, indicaram que aproximadamente 50% da luz é absorvida e/ou dispersa no tecido (Figura 12).

Um estudo realizado por Cassidy *et al.* (2011) em pulmões extraídos de porcos avaliou a distribuição de luz em comprimentos de onda entre 663 e 785 nm. Os autores puderam observar que aproximadamente 11% da fluência total penetrou através de toda a espessura do tecido pulmonar inflado com emissão em 663 nm. Entretanto, quando a emissão com comprimento de onda de 663 nm foi alterada para 785 nm, a fluência aumentou aproximadamente 23% (67).

Os pulmões de mamíferos são compostos por duas áreas distintas: as zonas condutoras de ar e o parênquima pulmonar. O tecido parenquimatoso, composto por alvéolos e dutos alveolares, forma a grande área superficial do pulmão necessária para as trocas gasosas no trato respiratório. A espessura média dos septos alveolares é de aproximadamente 10 μm . O pulmão é um órgão altamente complexo, composto de dobras

de tecido de espessura da ordem de micrometros (67). Nos mamíferos inferiores, como camundongos, as estruturas são semelhantes, embora de dimensões reduzidas. Em camundongos, a espessura de toda a caixa torácica é de aproximadamente 12 mm, englobando pele, ossos e pulmão (68).

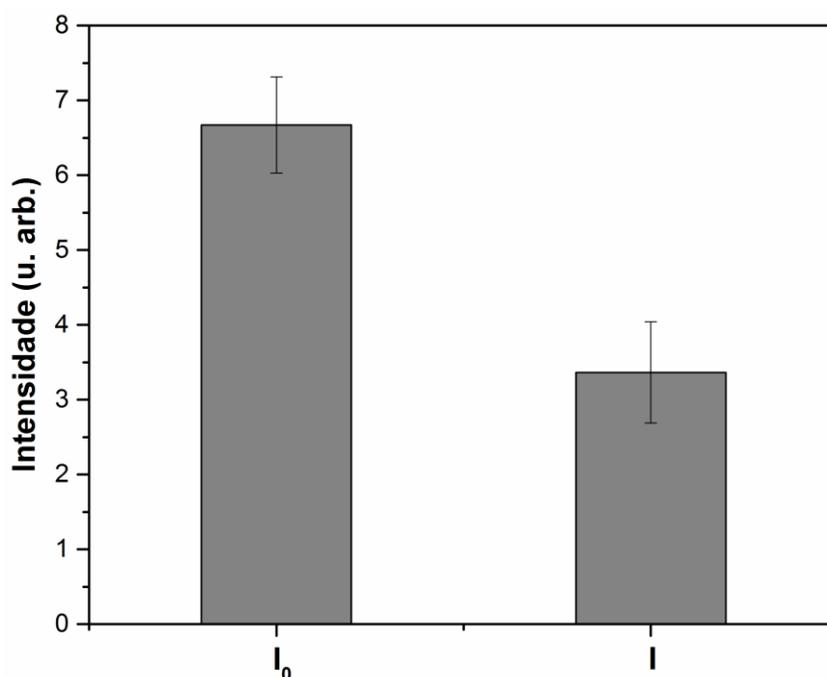


Figura 12: (I_0) intensidade de luz detectada à distância de 5 cm da fonte dos lasers, (I) intensidade da luz detectada à mesma distância da medida de I_0 , porém com as barreiras de pele, músculo, ossos e pulmão (caixa torácica do animal). Eixo Y: intensidade da luz detectada expressa em unidades arbitrárias. Eixo X: intensidades detectadas com a fibra posicionada fora e dentro da caixa torácica do animal. Valores expressos em média e desvio padrão sobre medidas em um único animal (N=1).

Fonte: Elaborado pela autora.

A transmitância e refletância na região do infravermelho em pele de camundongos foram medidas por Sabino *et al.* (2016). Os autores avaliaram peles de camundongos machos e fêmeas das linhagens BALB/c albinos e C57BL/6, e observaram que machos BALB/c apresentam transmitância de aproximadamente 50% na região de 780 nm, enquanto que em fêmeas da mesma linhagem possuem transmitância em torno de 65% na mesma região do espectro. Quanto à refletância, nas fêmeas é de aproximadamente 15%, enquanto em machos é pouco mais de 20%. Concluíram também que o gênero sexual afeta principalmente as propriedades ópticas da pele do animal em comprimento de onda visível, devido às diferenças no sangue e à abundância de tecido conjuntivo denso, enquanto a pigmentação da pele pode apresentar variações devido ao nível de hidratação, levando diferenças quanto à absorção na região do infravermelho. A melanina, no entanto,

é acumulada em pequenas quantidades em torno dos folículos capilares e não apresenta grandes variações ópticas (69). Os animais albinos utilizados no estudo de Sabino *et al.* são semelhantes aos utilizados neste trabalho (SKH-1 *hairless*). Portanto, os resultados dessa avaliação corroboram os achados anteriores, explicando a fração da luz que não atravessa os tecidos.

Os resultados dos experimentos preliminares apresentam dados importantes, propondo que a luz infravermelha pode ser usada efetivamente para irradiação extracorpórea na IFD. A partir dos dados encontrados, determinamos a fluência com aplicação extracorpórea de 120 J/cm² para atingir uma fluência final de aproximadamente 60 J/cm² no pulmão.

5.2.2 *Recuperação de UFC*

No experimento de recuperação de UFC, para os grupos controle (sem tratamento), somente luz e somente ICV, a recuperação de UFC variou em média entre 10³ e 10⁴ UFC/mL, e não houve diferenças estatísticas entre esses grupos. Para o grupo IFD, no entanto, nenhuma bactéria foi recuperada em 80% dos animais. Assim, a IFD reduziu em aproximadamente três ordens de grandeza a recuperação de UFC (Figura 13), o que valida, como prova de princípio, a eficiência da IFD para descontaminação bacteriana em quadro de pneumonia.

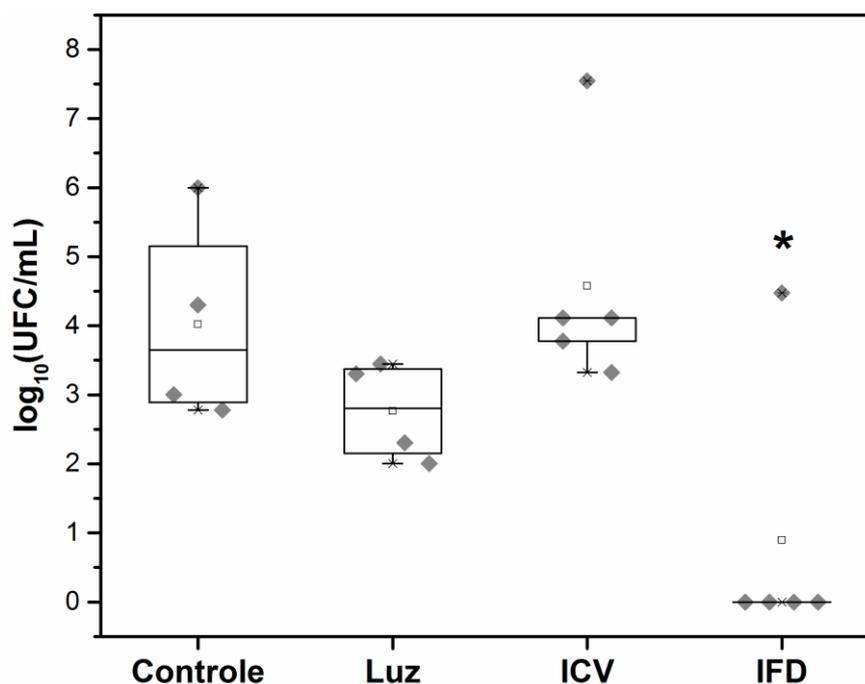


Figura 13: *Boxplot* de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10^8 *S. pneumoniae*. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle), instilação de PBS seguida de irradiação de 120 J/cm^2 (Luz), instilação de $100 \mu\text{M}$ de indocianina verde (ICV), ou a combinação de instilação de $100 \mu\text{M}$ de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). * $P < 0.05$ vs. Controle, teste de Mann-Whitney, $N = 4-5$. Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em \log_{10} de UFC/mL. $N = 4-5$.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota-se uma pequena diminuição da UFC (menor de $1 \log_{10}$) em camundongos infectados tratados somente com luz, quando comparados com animais do grupo controle não tratado, embora essa diminuição não tenha alcançado o nível de significância estatística. Este efeito pode ser atribuído a efeitos de foto-estimulação sobre o sistema imunológico (70,71).

A luz vermelha pode apresentar propriedades que auxiliam na cicatrização, pois influencia a liberação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos, que estimulam a proliferação de fibroblastos e a produção de fatores de crescimento (70).

A fotobiomodulação por meio de terapia com luz/laser de baixo nível com emissão entre 600-1000 nm pode estimular significativamente tanto a atividade quanto a proliferação celular de queratinócitos, células epiteliais, células do músculo esquelético, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Além disso, favorece atividades quimiotáticas e fagocíticas de neutrófilos e macrófagos (72).

5.2.3 Curva de sobrevivência

Com base nos resultados da recuperação das unidades formadoras de colônias, foi conduzido um experimento para avaliar os efeitos da IFD sobre a sobrevivência no modelo de pneumonia em camundongos. Durante o período de 50 dias após a infecção, houve morte de 60% do grupo controle (animais infectados sem tratamento). Em contraste, não foram observados óbitos no mesmo período no grupo IFD, conforme mostrado na curva de Kaplan-Meier na Figura 14. Foram avaliados nesta etapa somente o grupo IFD e o grupo Controle negativo de luz e FS, pois no experimento de recuperação de UFC (sessão 5.2.2) não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos Controle, ICV e Luz.

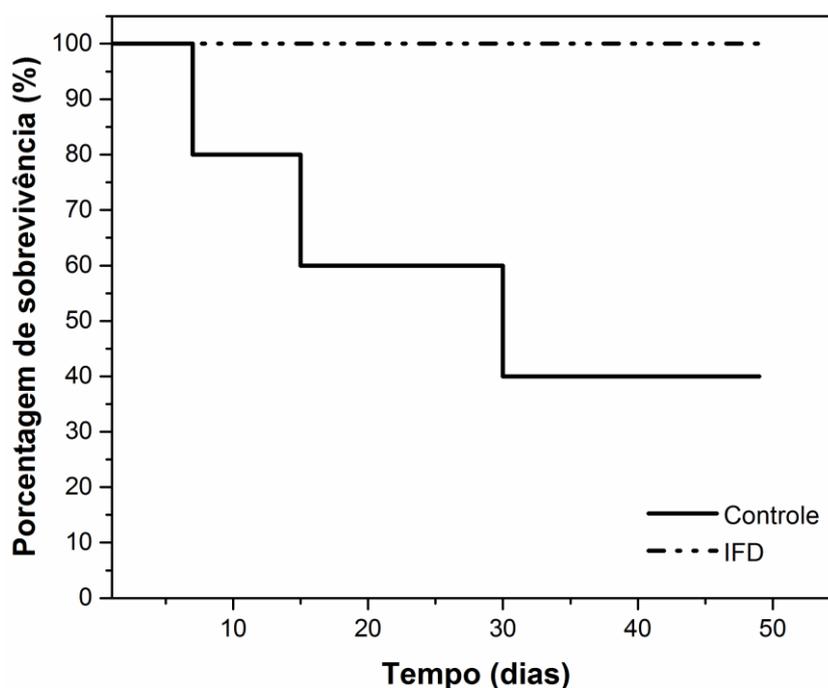


Figura 14: A curva de Kaplan-Meier mostra a sobrevivência de camundongos infectados não tratados (Controle) e camundongos infectados tratados com IFD (120 J/cm^2 de irradiação + $100 \mu\text{M}$ de ICV) (IFD) durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. O tratamento foi realizado 2 dias após a inoculação bacteriana. No grupo controle, 60% dos animais (3 de 5) morreram dentro de 32 dias após a infecção. Entretanto, nenhum animal no grupo tratado com IFD morreu ao longo dos 50 dias após a infecção. Eixo Y: sobrevivência expressa em porcentagem (%). Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados da Figura 14 demonstram sobrevivência total dos animais depois da IFD em pneumonia experimental e fornecem, portanto, importante evidência do potencial terapêutico da IFD para o tratamento de infecções pulmonares como a pneumonia.

A massa dos animais foi monitorada durante o período da curva de sobrevivência e a perda ou ganho de massa calculados em relação à massa inicial dos animais antes da infecção. O resultado do grupo Controle é apresentado na Figura 15, e o resultado da curva de ganho e peso de massa do grupo IFD é apresentado na Figura 16.

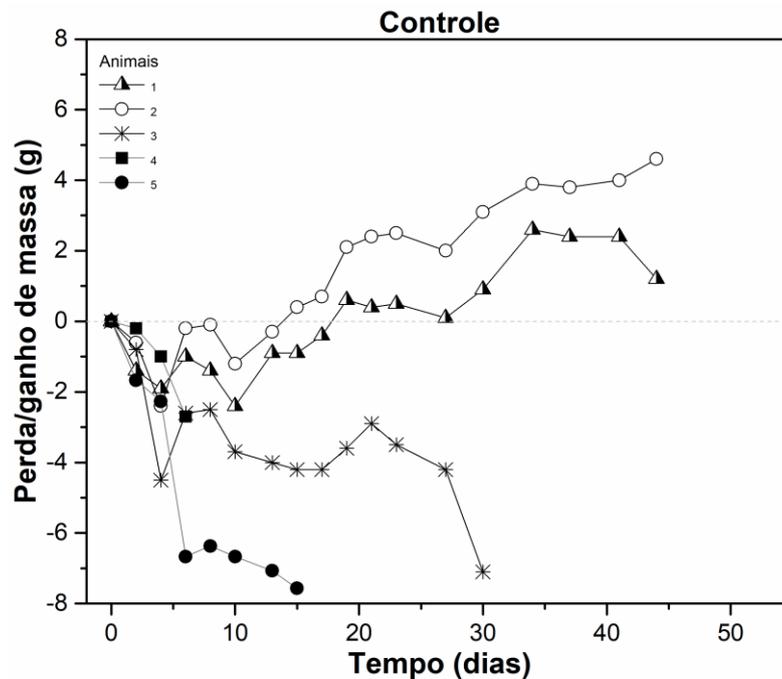


Figura 15: Curva de perda e ganho de massa dos animais do grupo Controle durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. Cada curva representa o perfil de perda e ganho de massa de cada animal individualmente. Eixo Y: valores de perda e ganho de massa (em gramas) em relação à massa dos animais antes da infecção. Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5.

Fonte: Elaborado pela autora.

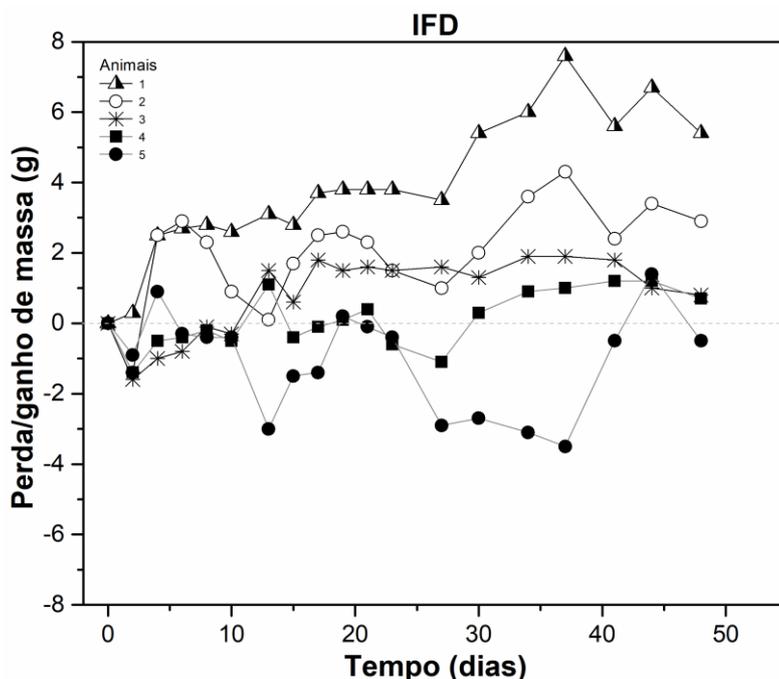


Figura 16: Curva de perda e ganho de massa dos animais do grupo IFD durante 50 dias após a infecção com 10^8 UFC de *S. pneumoniae*. Cada curva representa o perfil de perda e ganho de massa de cada animal individualmente. Eixo Y: valores de perda e ganho de massa (em gramas) em relação à massa dos animais antes da infecção. Eixo X: tempo de avaliação expresso em dias. N=5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados das curvas de ganho e perda de massa dos animais indicam que os animais do grupo Controle tiveram uma perda de massa consideravelmente maior em relação à massa dos animais do grupo IFD, principalmente nos dias que antecederam à morte. A medida de perda e ganho de massa não é considerada uma análise sensível, porém auxilia como indicativo de qualidade de sobrevivência. Apesar da baixa sensibilidade, esta é uma medida bastante utilizada como rotina em experimentação animal envolvendo infecção pulmonar, seja de origem viral, bacteriana ou fungica (73–75).

5.2.4 Potencial da IFD com ICV – resultados e discussão

Estes resultados corroboram uma série de dados publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa sobre a eficácia da IFD na descontaminação bacteriana e ampliam seu uso para a técnica com irradiação extracorpórea em casos de pneumonia. Em outro trabalho, foram realizados experimentos *in vitro* cujos resultados mostram uma inativação de *S. pneumoniae* por IFD, com combinação de luz com emissão em 850 nm e ICV a $10 \mu\text{M}$ (76). No estudo, foi avaliado o efeito da IFD em macrófagos alveolares, que são fagócitos fundamentais na defesa imune inata do pulmão. Outro resultado

importante encontrado no referido estudo, foi a viabilidade de macrófagos alveolares superior a 90% após IFD com ICV e luz em 850 nm sugerindo que o tratamento com IFD é seguro e não prejudica o sistema imunológico do hospedeiro. Esses resultados também apontaram para o grande potencial da ICV como FS. Ainda no mesmo estudo, foi testada a eficiência da IFD em modelo *in vitro* de co-cultura de *S. pneumoniae* com macrófagos alveolares, e os autores concluíram que é possível aperfeiçoar a IFD trabalhando na combinação entre concentração de ICV, tempo de incubação e a fluência, de forma a obter considerável morte bacteriana com ausência de efeitos tóxicos nos macrófagos. Embora estes sejam resultados obtidos *in vitro*, eles apontam para uma potencial utilidade terapêutica da IFD para a descontaminação bacteriana, e os resultados *in vivo* mostrados nesse capítulo fornecem a primeira evidência para a viabilidade e eficácia desta técnica em modelo animal.

Em uma importante revisão bibliográfica publicada em 2014 (62) se discutiu se a ICV seria um FS ou um cromóforo. Apesar de esta questão ter sido apresentada há alguns anos, ainda não se pôde concluir a efetividade da ICV como FS. Independentemente da fonte de luz utilizada, é relatado que o $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) não é detectável em grande quantidade quando a ICV é utilizada como FS. Porém, é importante considerar que a ICV possui baixa taxa de toxicidade sistêmica, devido à rápida eliminação pelo sistema hepatobiliar, e a citotoxicidade possui uma dose letal mediana com DL50 de 50-80 mg/kg (62,77).

A entrega efetiva da luz é um problema crítico do uso terapêutico da TFD/IFD. Apesar das técnicas que vem sendo bem-sucedidas para o tratamento de cânceres e para tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias na pele ou mucosa do corpo, que são facilmente acessíveis por irradiação extracorpórea, verifica-se situação mais complexa para órgãos internos como o pulmão, devido à capacidade limitada de penetração da luz pelo tecido. Mesmo abordagens envolvendo sondas e iluminação interna são arriscadas e nem sempre factíveis, dependendo das condições do paciente. A irradiação extracorpórea com luz na região do infravermelho próximo continua a ser um desafio, porém apresenta grande potencial para ser utilizada na IFD, especificamente para doenças infecciosas de tecidos e órgãos mais profundos, com a grande vantagem de ser completamente não-invasiva.

O uso da IFD com ICV e luz infravermelha para o tratamento de infecções é ainda validado por um recente relato de caso. No artigo, os autores trataram um nevo epidérmico verrucoso com IFD usando ICV como um FS e luz pulsada intensa (LPI) com

emissão de 500 a 800 nm. Após seis sessões, as respostas clínica e cosmética foram consideradas excelentes e não houve recorrência durante um acompanhamento de dois anos (78). Ainda com IFD, Genina *et al.* (2004), usaram ICV como FS e luz infravermelha (emissão de 830 nm) para o tratamento da acne. Foram realizados dois regimes de tratamento diferentes, um com uma única sessão de IFD e o outro com oito tratamentos sequenciais. Após um mês, observaram que apenas os múltiplos tratamentos reduziram a inflamação e melhoraram o estado da pele, enquanto o tratamento único não teve efeito (70). Desta forma, a realização de múltiplas sessões de IFD pode proporcionar benefícios adicionais também para o tratamento de pneumonia clínica.

Topaloglu *et al.* (2013) reportou que a potência de saída de até 1 W de um laser de diodo emissor em 809 nm não causa efeito fototérmico relevantes durante aplicações de IFD *in vitro* usando uma bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* e uma Gram-positiva *S. aureus*, com ICV como FS (30). Os mecanismos de como o ICV inativa bactérias com IFD ainda não são claros, mas pode ser uma combinação de vários efeitos, como a produção de espécies reativas de oxigênio, possíveis efeitos térmicos, geração de fotoprodutos e agregados moleculares (62).

Em conjunto, os achados confirmam o potencial do uso da IFD com ICV para inativar bactérias e tratar doenças infecciosas por meio de irradiação extracorpórea com luz infravermelha. Os resultados apresentados nesse capítulo I demonstram a primeira evidência da viabilidade e efetividade desta técnica para o tratamento de infecções pulmonares, a qual pode ser aperfeiçoada com estudos de diferentes tempos de incubação de FS e fluências para uma aplicação *in vivo* segura.

À medida que aumentam em número, as cepas de bactérias resistentes a antibióticos, ameaçam a vida de pacientes hospitalizados, surgindo uma necessidade crescente de novas técnicas de descontaminação bacteriana visando o tratamento de pneumonia e de outras doenças infecciosas. A IFD é bem estabelecida para a inativação de micro-organismos por iluminação direta, e no presente estudo foi demonstrada a aplicabilidade deste princípio também nos casos em que a iluminação deve superar barreiras compostas por tecido saudável, como para o tratamento de infecções pulmonares.

A redução de UFC de *S. pneumoniae* em várias ordens de grandeza por meio da IFD demonstra a viabilidade da iluminação extracorpórea, e abre uma nova gama de oportunidades terapêuticas. Além disso, foram apresentadas evidências, em modelo

experimental, de que a IFD com irradiação extracorpórea pode aumentar a sobrevivência de indivíduos que apresentam infecção por *S. pneumoniae*.

Os antibióticos têm sido amplamente utilizados por várias décadas e, uma alta porcentagem de antibióticos é descarregada do corpo humano sem degradação, isso significa que diferentes habitats são poluídos com antibióticos (água dos rios e solos). Assim, a concentração de antibióticos presentes em diferentes ecossistemas pode afetar a estrutura e a produtividade da microbiota que coloniza tais habitats. Esse efeito pode desencadear mudanças na estrutura geral da população, seleção de organismos resistentes ou alterações na fisiologia bacteriana (79). O uso de antibióticos traz uma extensa lista de efeitos colaterais no organismo tais como febre medicamentosa, erupções cutâneas, anormalidades lipídicas, lipodistrofia, náuseas, vômitos, desconforto abdominal, diarreia, potencial ototóxico, potencial nefrotóxico, comprometimento da agregação plaquetária, sangramento, alterações hematológicas, entre outros (80).

Um estudo publicado em 2014 revelou que pneumonia causada por pneumococos resistentes à antibióticos foi responsável por cerca de 32.398 visitas ambulatoriais e 19.336 hospitalizações, representando um gasto de US\$ 91 milhões (4%) em custos médicos diretos e US\$ 233 milhões (5%) nos custos totais, incluindo perdas de trabalho e produtividade nos EUA (81).

Considerando o alto custo dispensado com internações e medicamentos, é importante ressaltar que, com apenas uma sessão de IFD, foi possível inativar grande número de UFC, o que sugere a possibilidade de menores tempos de tratamento e diminuição de gastos com medicação.

5.3 CONSIDERAÇÕES

- Verificou-se que comprimentos de onda na região de 780 nm atravessaram os tecidos entre a superfície da pele e o parênquima pulmonar (*ex vivo*) de camundongos, de modo a permitir a ativação do FS.

- Foi possível determinar parâmetros para o tratamento da infecção por *S. pneumoniae* por IFD, estabelecendo um modelo para investigação desta abordagem terapêutica.

- Foi observado que 100 μM de ICV ativada com uma fluência de 120 J/cm^2 foi suficiente para reduzir de maneira expressiva o número de UFC dos pulmões de camundongos contaminados com *S. pneumoniae*.

- Foi determinada curva de sobrevivência dos camundongos infectados e tratados com IFD, onde 60% do grupo não tratado foi a óbito em até 30 dias, enquanto todos os animais submetidos a IFD sobreviveram aos 50 dias de estudo.

6. CAPÍTULO II

Neste capítulo, seguindo a comprovação da possibilidade de exploração da ICV como FS na IFD extracorpórea em modelo animal, são apresentados os experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados no laboratório do Prof. Kuebler, no St. Michael's Hospital. O período no exterior foi financiado pela CAPES, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) número de processo 99999.003154/2015-07. Foram executados nesta etapa experimentos de análise pulmonar, visando avaliar microscopicamente as alterações teciduais induzidas pela modalidade de IFD proposta neste estudo, permitindo que se estimem potenciais riscos ao paciente e as possibilidades de expansão da técnica.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Cultivo de *Streptococcus pneumoniae*

Para indução de infecção nos experimentos *in vivo* e preparação dos inóculos nos testes *in vitro*, foram utilizadas cepas liofilizadas ATCC[®] 49619[™] de *Streptococcus pneumoniae*, adquiridas da ATCC Globally delivered[™]. As amostras foram hidratadas em caldo TSB (triptona de soja, TSB, Acumedia, EUA) e armazenadas em Biofreezer à -80 °C em criotubos contendo 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFCs) mantidas em 2 mL de caldo TSB com 15% de glicerol (Hardy diagnostics[™], EUA) e 50 µL de sangue desfibrinado de carneiro (Hardy diagnostics[™], EUA).

Para o preparo dos inóculos utilizados nos experimentos, o número de UFCs presente no meio de cultura foi correlacionado com o valor da absorbância da suspensão bacteriana, conforme descrito no capítulo I, sessão 5.1.1. Após o descongelamento da amostra, 20 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a 10 mL de meio tipo TSB, e incubados em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por um período de 4 horas. Para cada experimento, foi preparado um novo inóculo. Após o período de 4 horas de crescimento, a amostra foi centrifugada a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em PBS. Em seguida, foi feita a leitura de absorbância em comprimento de onda de 600 nm para confirmar a concentração de bactérias presentes na amostra. Ao atingir-se a absorbância de 0,3 unidade de absorbância, que correspondia a aproximadamente 10⁹ UFC/mL, o que ocorria após cerca de 4 horas de crescimento, o

inóculo era ajustado por meio de diluições para a concentração de 10^7 UFC por animal para os experimentos *in vivo* e 10^7 UFC/mL para os experimentos *in vitro*.

6.1.2 Animais

Os animais, camundongos livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF) machos da linhagem BALB/c, foram adquiridos do biotério de Charles River-Canadá. Foram utilizados nos experimentos animais com idade entre 8-10 semanas e peso entre 20-25 gramas. Para o grupo controle foram utilizadas 4 animais e para o grupo tratado com IFD foram utilizados 5 animais.

Os testes realizados neste capítulo foram aprovados e seguidos de acordo com a comissão de ética do *The Keenan Research Center* no *Li Ka Shing Knowledge Institute of St. Michael's Hospital Animal Care Committee – Animal Utilization Application*, parecer número ACC 656.

6.1.3 Indocianina verde

Nos experimentos realizados neste capítulo, tanto a ICV quanto os protocolos foram os mesmos utilizados no capítulo I, com exceção dos experimentos *in vitro*. Para os experimentos *in vitro*, a ICV foi diluída como já descrito no capítulo I sessão 5.1.3, porém as concentrações finais foram de 10 e 20 μ M.

6.1.4 Fontes de Luz

Os equipamentos foram desenvolvidos no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do IFSC. Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada uma mesa iluminadora, denominada LaserTable, que é um protótipo construído com lasers com espectro de emissão em (780 ± 10) nm capazes de irradiar a área central de uma placa de 96 poços (Figura 17), com irradiância média de 40 mW/cm^2 . Para realizar os experimentos *in vivo*, foi utilizado o mesmo equipamento com formato anatômico descrito no capítulo I, sessão 5.1.4, para irradiar adequadamente a região torácica do dorso do animal (Figura 6).

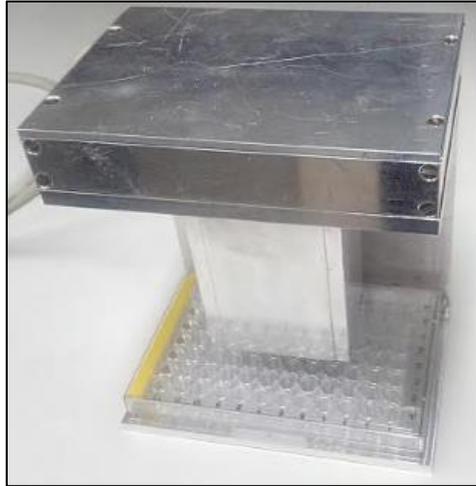


Figura 17: Foto do equipamento utilizado para irradiação do de placas de 96 poços utilizadas em experimento *in vitro*.

Fonte: Leite (66).

6.1.5 Análise Pulmonar

Camundongos machos das linhagens BALB/c foram anestesiados via intraperitoneal (Xilazina [0,1 mg/kg] e Quetamina [100 mg/kg]) e infectados intranasalmente com 30 μL /animal (15 μL por narina do animal) de inóculos sub-letais (10^7 UFC/animal) de *S. pneumoniae*, e após dois dias de infecção, os pelos dos animais foram removidos com creme depilatório na região dorsal para que os pelos não interferissem na transmissão da luz, e em um grupo de animais foram instilados 30 μL de ICV a uma concentração de 100 μM e submetidos a inativação fotodinâmica com irradiação extracorpórea com fluência total de 120 J/cm^2 , correspondendo a um tempo de 33 minutos e 20 segundos de irradiação. Em outro grupo de animais, foi instilado apenas PBS (sem irradiação) como grupo controle. Após sete dias, sob anestesia, a traqueia foi exposta e canulada para indução de respiração mecânica (MiniVent Ventilator for Mice - Modelo 845). Passados 30 minutos de ventilação, os animais foram eutanasiados, e realizadas as análises de parâmetros de dano pulmonar como mostrado na Figura 18.

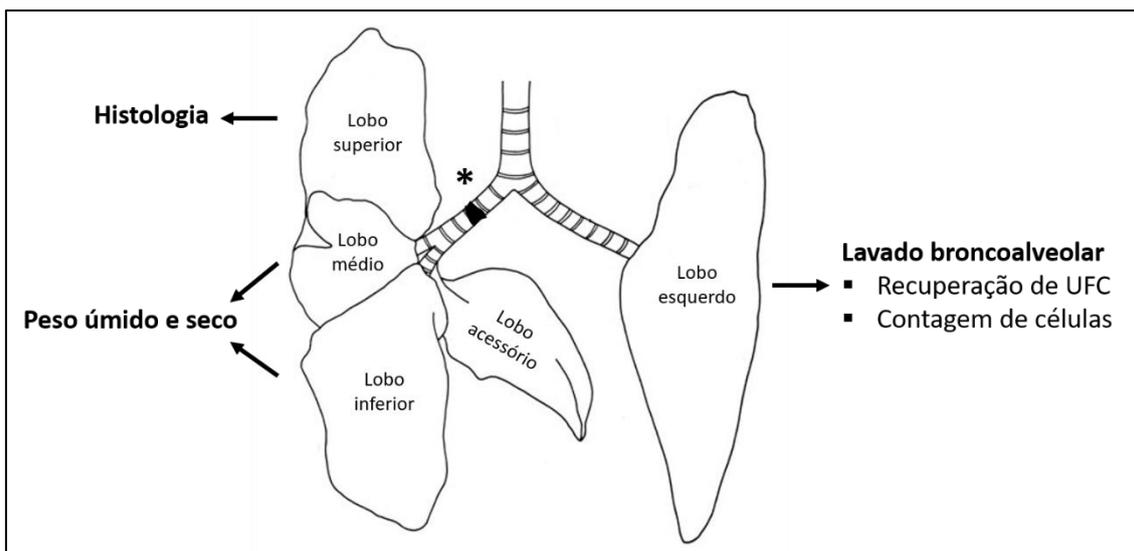


Figura 18: Esquema das análises pulmonares realizadas a partir de cada lobo pulmonar. O asterisco (*) indica onde foi feita a amarração para isolamento dos lobos do lado direito.
Fonte: Adaptado de Cook (82).

No lobo esquerdo, foi feito o lavado broncoalveolar (LBA) com 400 μL de PBS, de onde 10 μL foram separados para diluição e cultivados em ágar sangue (5% sangue). As placas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO_2 à 37 $^\circ\text{C}$ por 24 horas, e após isso foi feita a contagem de UFC. Outros 20 μL do LBA foram corados com 5 μL de solução de Türk (91 mL de água + 4,5 mL ácido acético + 4,5 mL de violeta genciana a 1%; todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®], Canadá), e 10 μL da solução foram contados em câmara de Neubauer para obtenção de contagem total de células presentes no fluido de acordo com a Equação 2. Após a contagem de células na câmara, por meio da Equação 2 foi obtido o número de células totais considerando o volume de LBA. Em seguida o LBA foi centrifugado, e o *pellet* ressuspensionado em tampão de lise de eritrócitos ACK (*Ammonium Chloride/Potassium* - 8,03 g/L NH_4Cl + 1g/L KHCO_3 + 37,2 mg/L Na_2EDTA ; pH 7,2–7,4), e 100 μL da amostra contendo o total de 10^5 células foi centrifugado em citocentrífuga a 400 r.p.m. por cinco minutos (Shandon Cytopin 4, ThermoFisher Scientific, Canadá) para obtenção das lâminas. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (kit Harleco - HemaColor, EMD Chemicals, Inc., Alemanha) e contadas em microscópio para obtenção de número absoluto de células (diferenciação em células mononucleares – Mono, e polimorfonucleares – PMN) presentes no LBA (conforme Equações 3 e 4).

$$\# \text{ células (LBA)} = \text{média do \# células} \times 10 \times \frac{5}{4} \times \text{vol. de LBA} \quad (2)$$

$$\# \text{ células abs.} = \text{média do } \# \text{ células} \times 10 \times \frac{5}{4} \times (\% \text{ Mono ou PMN}) \quad (3)$$

$$\# \text{ células abs. (corrigido)} = \# \text{ células abs.} \times \left(\frac{\text{vol. de LBA}}{\text{vol. de LBA} - \text{vol. morto}} \right) \quad (4)$$

Na Equação 2, a multiplicação por 10 corresponde ao fator de correção do volume da câmara, e a multiplicação por 5/4 corresponde ao fator de correção da diluição da solução de Türk utilizada para a coloração das células. Da mesma forma, na Equação 3, o número de células contadas na câmara de Neubauer é corrigido em termos do volume da câmara (termo multiplicado por 10), e o termo 5/4 corrige a diluição da solução de Türk. Nesta equação, entretanto, multiplica-se o número de células pelo percentual de PMN ou de Mono, de modo a obter a contagem total destas células individualmente. Finalmente, na Equação 4, corrige-se o número absoluto de células PMN ou Mono pelo volume morto (volume residual de 100 µL de LBA que permanece na seringa e na agulha durante a sua manipulação).

Os lobos pulmonares médio e inferior foram pesados logo após a remoção e, em seguida, desidratados por equipamento de micro-ondas operando em potência alta pelo tempo de 50 minutos. Após a desidratação, os lobos foram pesados novamente para obter a razão de peso úmido e seco. Por meio desta análise, é possível avaliar o edema nos pulmões, que poderia ser agravado pela IFD ou pela infecção.

O lobo superior direito do pulmão foi removido e fixado em formalina a 10%, embebido em parafina, e as secções longitudinais do tecido foram coradas com HE para realização de análise histológica pulmonar. As imagens das lâminas foram obtidas por meio de um scanner de lâminas (Scanner de Lâminas Histológicas, Panoramic Desk, 3DHISTECH Ltd, Hungria).

6.1.6 Experimentos in vitro

Após o crescimento bacteriano conforme descrito no item 6.1.1, foram adicionados 100 µL do inóculo a 10⁸ UFC/mL + 100 µL da solução de ICV em placa de 96 poços, preparada em dupla concentração para atingir as concentrações finais de 10 ou 20 µM (para os grupos IFD e controle da ICV) ou PBS (para os grupos controles e somente luz). A placa foi incubada por 20 minutos, coberta por papel laminado para que não houvesse fotodegradação do FS durante o período de incubação. Após o tempo de

incubação, os grupos IFD e somente luz foram irradiados por 8 minutos e 20 segundos, totalizando uma fluência de 20 J/cm^2 . Os grupos ICV e controles permaneceram no escuro pelo mesmo tempo dos grupos irradiados. Após a irradiação, foram feitas diluições seriadas até 10^{-6} , e em seguida foram cultivadas todas as diluições em placas de ágar sangue (5% de sangue, Hardy Diagnostics™, EUA). As placas foram incubadas em estufa contendo 5% CO_2 à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas e, após isso, foi feita a contagem de UFC. Os resultados foram expressos em número de UFC/mL.

Em um segundo experimento, após a irradiação, a placa foi incubada por mais 4 horas em estufa contendo 5% de CO_2 à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e em seguida foram feitas as diluições e cultivos, da mesma forma como descrito para o experimento anterior.

Em um terceiro experimento, após o crescimento bacteriano, foram adicionados em placa de 96 poços $100 \mu\text{L}$ do inóculo + $100 \mu\text{L}$ da ICV iluminada, o que significa que neste grupo não foi realizada a IFD. A ICV em uma concentração de $10 \mu\text{M}$ foi irradiada por 8 minutos e 20 segundos (20 J/cm^2), em seguida incubada com a bactéria por 4 horas em estufa contendo 5% de CO_2 à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a incubação foram feitas as diluições, cultivos e contagem de UFC como descrito nos procedimentos anteriormente. Este experimento foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito de possíveis fotoprodutos ou de agregados gerados após o processo de irradiação.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 *Análise pulmonar*

É sabido que a TFD é efetiva no tratamento de cânceres em geral. Para tratamentos de câncer de pulmão, a TFD também é aplicada com sucesso, o que respalda a IFD para tratamento de pneumonia uma vez que o tumor é combatido sem causar danos acentuados ao tecido não acometido. Em 1980, foi realizado o primeiro procedimento de TFD com endoscópico para câncer de pulmão em um paciente com má função cardiopulmonar em que a cirurgia não era possível. No estudo, foi tratado um carcinoma de células escamosas avançado que obstruía o brônquio principal direito, no qual a TFD resultou na abertura do brônquio (83,84).

Para avaliar a segurança da técnica, foram realizadas análises de danos pulmonares em camundongos com pneumonia induzida e submetidos a tratamento por IFD. Todas as amostras foram retiradas do mesmo animal – ou seja, de um mesmo animal

foram coletadas as análises de LBA referentes ao crescimento bacteriano e ao número absoluto de células infiltradas, à razão de peso úmido e seco, e à histologia.

Quanto ao número de UFC de bactérias recuperadas no LBA (Figura 19), em uma primeira observação é possível perceber que não houve a mesma redução bacteriana encontrada nos experimentos realizados previamente no Brasil (capítulo I), quando a redução foi a máxima e o número de UFC contadas chegou a zero em 80% dos animais (Figura 13, capítulo I). Em apenas 40% dos animais foram reduzidas UFC com índices diferentes dos do grupo controle. Esta observação pode ter resultado do fato de a cepa da bactéria ter sido de procedência diferente.

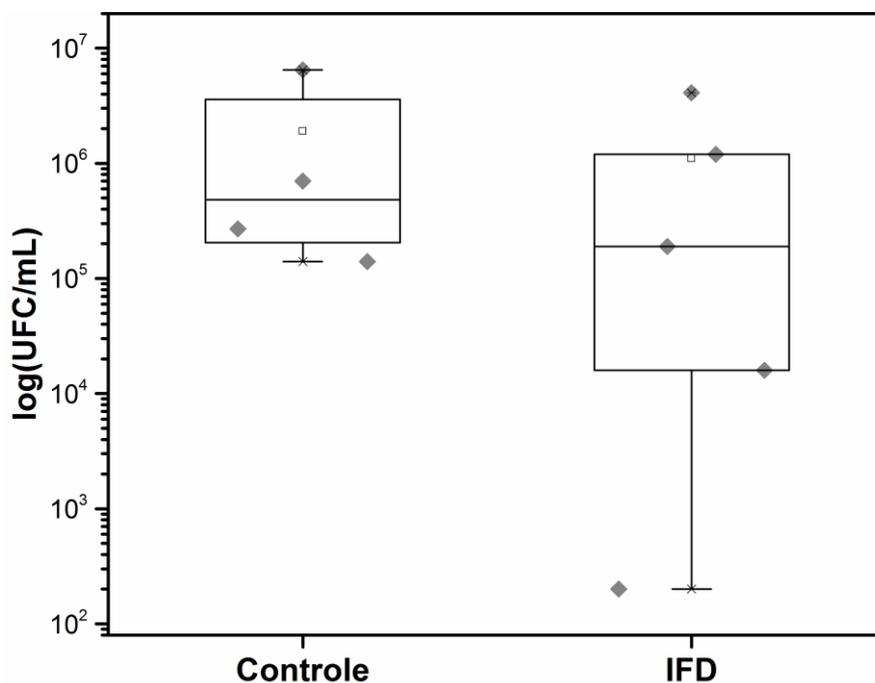


Figura 19: Boxplot de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10^7 *S. pneumoniae*. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μ M de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm² (IFD). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. N= 4-5.

Fonte: Elaborado pela autora.

A cepa utilizada nos experimentos do capítulo II foi adquirida liofilizada diretamente do banco de amostras da ATCC, enquanto a cepa utilizada nos testes apresentados no capítulo I foi adquirida em caráter de doação, inicialmente já hidratadas e armazenadas em biofreezer à -80 °C. A diferença entre as cepas pode implicar em variações na virulência da bactéria e na agressividade da infecção. Assim, a indução de infecção feita a partir de cepa mais virulenta resulta em infecção mais agressiva. Nota-se que, no experimento apresentado neste capítulo II, recuperou-se nos animais dos grupos

controle em torno de $10^6 - 10^7$ UFC/animal, e nos experimentos realizados no capítulo I foram recuperadas em torno de $10^3 - 10^4$ UCF/animal sendo que em os ambos experimentos a recuperação foi feita sete dias após a infecção. Uma infecção mais severa pode exigir múltiplas sessões de IFD para eficácia significativa, uma vez que é mais difícil obter um tratamento completo com apenas uma aplicação. Mesmo com a infecção mais agressiva, ainda foi possível reduzir de 2-4 unidades logarítmicas o número de UFC/animal, em 2 de um total de 5 animais.

Um estudo com cepas de *S. pneumoniae* resistentes e sensíveis à penicilina G, demonstrou que para inativar $2 \log_{10}$ de bactérias nos pulmões de camundongos infectados com cepas resistentes, era necessária a administração subcutânea de 30 mg/kg de penicilina G. Enquanto isso, para inativar $3 \log_{10}$ de *S. pneumoniae* sensível foram necessárias doses de 0,6 mg/kg de penicilina G, administrada seis vezes com intervalos de 1 h entre uma aplicação e outra. Ainda neste estudo, foi avaliada a eficácia do antibiótico Imipenem, que apresenta maior espectro dentre os betalactâmicos e é altamente resistente às betalactamases, sendo por isso muito utilizado para infecções polimicrobianas e hospitalares. Para reduzir de 10^7 UFC/animal para 10^5 UFC/animal, foi necessária uma dose de 0,6 mg/kg de Imipenem (85). É importante ressaltar que no presente estudo foi aplicada uma única sessão de IFD e, ainda sim, foi obtida redução bacteriana semelhante à redução observada com uso de antibióticos. Além disso, a resposta fotodinâmica apresenta uma ação de morte celular que é mais inespecífica, ou seja, quando com quantidades suficientes de FS e fluência, atuam indistintamente quanto ao tipo de micro-organismo.

Ainda sobre a diferença do número de UFC recuperadas nos diferentes experimentos, é preciso considerar a diferença do gênero sexual dos animais utilizados. Nos resultados mostrados no capítulo I, foram utilizados camundongos fêmeas SKH-1, e nos resultados apresentados no capítulo II foram utilizados camundongos machos BALB/c.

Sabino *et al.* (2016), avaliaram parâmetros de luz em amostras de pele de camundongos albinos BALB/c e C57BL/6 (machos e fêmeas), e em sua discussão levantam o fato de que as peles de camundongos fêmeas possuem camada adiposa mais abundante em comparação com as de machos, os quais, por outro lado, apresentam derme mais grossa e maior quantidade de tecido subcutâneo (especialmente BALB/c). Apesar da epiderme e a espessura da camada muscular terem sido parecidas entre os grupos, foi observado que a pele de camundongos machos BALB/c apresentaram menor

transmitância e maior refletância em comparação às de fêmeas, especialmente entre 600 e 1300 nm. Os machos BALB/c apresentam um tecido de pele significativamente mais espesso devido a uma maior quantidade de tecido conjuntivo na derme (69). Variações na transmitância da luz na pele podem interferir na ativação do FS dentro dos pulmões, diminuindo assim, a efetividade de IFD.

Os resultados da contagem e diferenciação das células infiltradas no espaço alveolar indicam que a IFD pode favorecer o aumento da resposta imune. Isso se dá porque há um aumento no número absoluto de células polimorfonucleares (PMN) no grupo submetido à IFD quando comparado com o grupo controle (Figura 20 e Figura 21), apesar de não haver diferença estatística por conta do grande desvio padrão encontrado no grupo controle. Nota-se que não há diferença entre o grupo controle e o tratado com IFD quanto ao número de células mononucleares (Mono). Por outro lado, esses resultados demonstram que a reação fotodinâmica induzida foi de resposta localizada e que não provocou importante ativação da cascata de reação inflamatória. Existe um aumento do recrutamento dessas células, como esperado após a produção de espécies citotóxicas, mas que não foi estatisticamente maior ao do grupo controle. Importante ressaltar que a IFD não induziu uma resposta inflamatória exacerbada, quadro crítico que deve ser evitado – especialmente durante o tratamento de pneumonia.

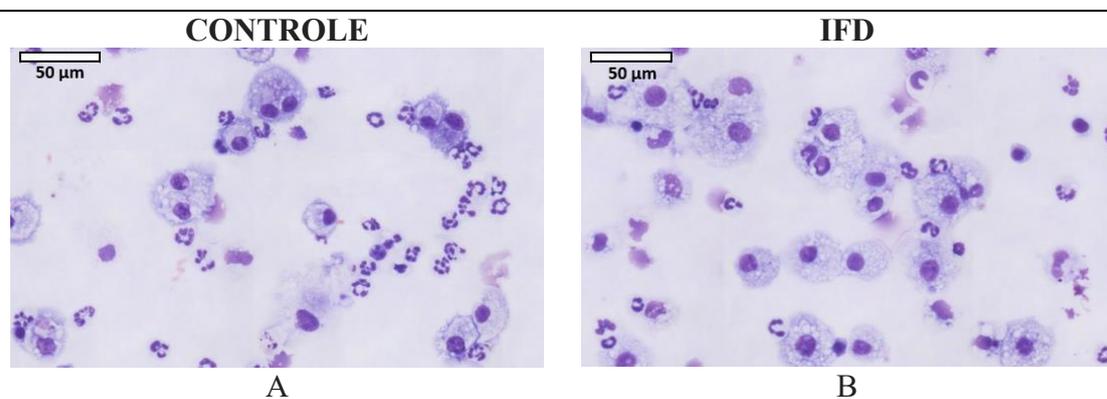


Figura 20: Micrografia das lâminas obtidas por meio da centrifugação do LBA o que permite a diferenciação celular em PMN e Mono. (A) grupo Controle e (B) grupo IFD. As imagens estão com aumento original de 40 vezes. A escala da micrografia (50 µm) está representada em branco no canto superior esquerdo.

Fonte: Elaborado pela autora.

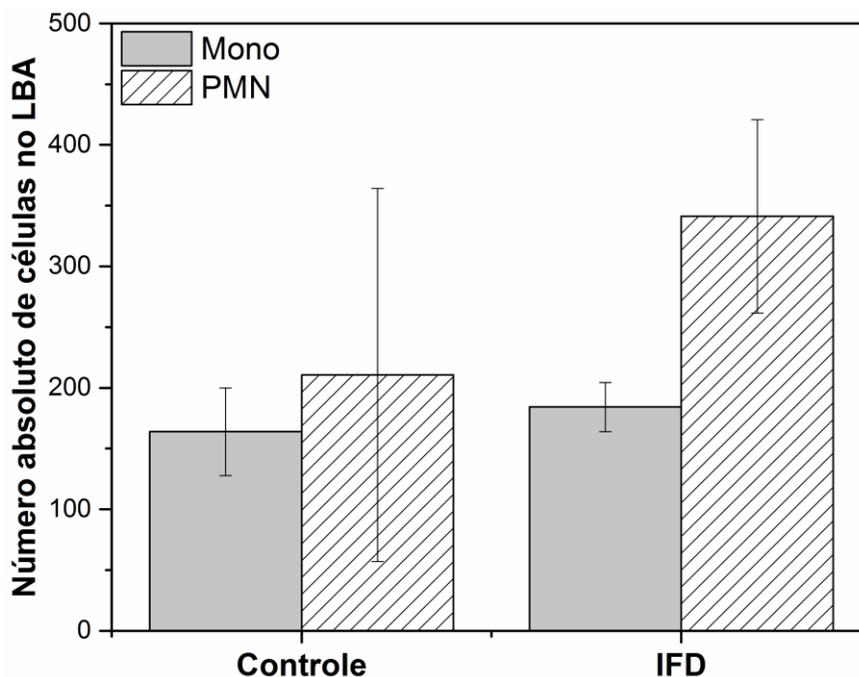


Figura 21: Eixo Y: número absoluto de células contadas no lavado broncoalveolar (LBA). Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μ M de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm² (IFD). Valores expressos em média e desvio padrão. N= 4-5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os macrófagos alveolares representam a primeira linha de defesa fagocítica nos pulmões. Contudo, são capazes de fagocitar e matar um número reduzido de pneumococos. Quando há um grande número de pneumococos introduzidos nas vias aéreas inferiores, os neutrófilos são recrutados e se tornam as principais células fagocíticas no pulmão. Os macrófagos alveolares são então encarregados de limpar os neutrófilos apoptóticos. Os macrófagos também sofrem apoptose, o que ajuda a eliminar as bactérias fagocitadas prevenindo assim a contaminação na corrente sanguínea, evitando o quadro de sepse (86). Os neutrófilos predominam dentro de infiltrados celulares em pneumonia pneumocócica, o que justifica os achados nas lâminas histológicas (Figura 23).

Dos lobos médio e inferiores, foi calculada a razão de peso úmido e seco, a qual indica se há sinais de edema. Para a razão, valores entre 4,0-4,5 são considerados indicativos de tecidos normais, enquanto valores entre 4,5-5,0 são considerados indicativos de condições limítrofes e, por fim, valores maiores que 5,0 são considerados indicativos de tecidos com edema (Figura 22).

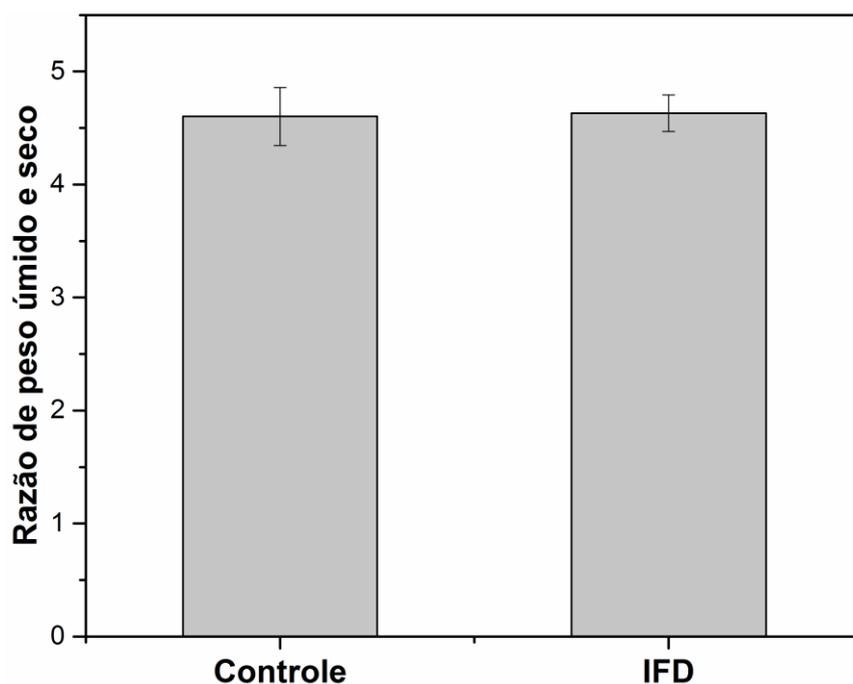


Figura 22: Razão de peso úmido e seco do lobo médio e inferior. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle) ou a combinação de instilação de 100 μM de indocianina verde e irradiação de 120 J/cm^2 (IFD). Eixo Y: razão de peso úmido e seco. Valores expressos em média e desvio padrão. N= 4-5.

Fonte: Elaborado pela autora.

Não houve diferença estatística nas relações entre peso úmido e seco dos grupos controle e IFD. Por um lado, isto pode significar que não ocorre edema significativo para os tecidos pulmonares ocasionado pela ação da IFD extracorpórea fazendo uso da ICV. Por outro lado, a sinalização na faixa tênue de valores pode ser resultado da baixa sensibilidade do método em detectar pequenos níveis de edema pulmonar (87).

Resultados semelhantes foram descritos por Anner *et al.* (1987), e por Pinheiro *et al.* (2000) os quais não obtiveram diferenças significantes em análises de razões de peso úmido e seco, apesar de terem observado índices de edema por meio de outros testes mais sensíveis, como por exemplo, acúmulo de neutrófilos e áreas de edema alveolar analisada por histologia (87,88).

As imagens das lâminas histológicas realizadas a partir dos cortes longitudinais do lobo superior evidenciam a presença de células infiltradas no espaço alveolar em ambos os grupos (Controle e IFD) (setas verdes, Figura 23 G e H), e presença de células vermelhas nos espaços alveolares (setas vermelhas), o que são achados condizentes com a presença de infecção bacteriana, ou seja, da pneumonia induzida por *S. pneumoniae* (86). É importante destacar que se observa a morfologia tecidual/celular pulmonar sem alterações após a IFD e semelhante ao grupo Controle (infectado). Assim a IFD, no período de tempo observado após o tratamento, não induziu danos pulmonares evidentes,

uma vez que não se observa diferenças significativas ao quadro já existente. Esses resultados são importantes, pois a redução microbiana foi obtida empregando a IFD, sem agravar o quadro da pneumonia.

Em imagens histológicas, disponíveis na literatura, de camundongos sadios (sem infecção ou dano pulmonar de outra origem), a parede alveolar é fina e a maioria dos alvéolos, não contém células infiltradas e bronquíolos com grande espaço de ar (89), enquanto a micrografia de ambos os grupos (IFD e Controle) do presente estudo evidencia o espessamento das paredes alveolares, células infiltradas e diminuição no espaço de ar dos bronquíolos.

A IFD se mostrou segura para o tratamento da pneumonia, assim torna-se possível futuros experimentos para a otimização da resposta de redução microbiana. O protocolo testado no presente estudo já se apresenta eficiente, sendo que se pode ainda variar os parâmetros de concentração e entrega do FS, fluência e número de sessões de IFD, buscando a translação da tecnologia para modelos *in vivo* mais similares ao humano, como o estudo em porcos, e ensaios clínicos.

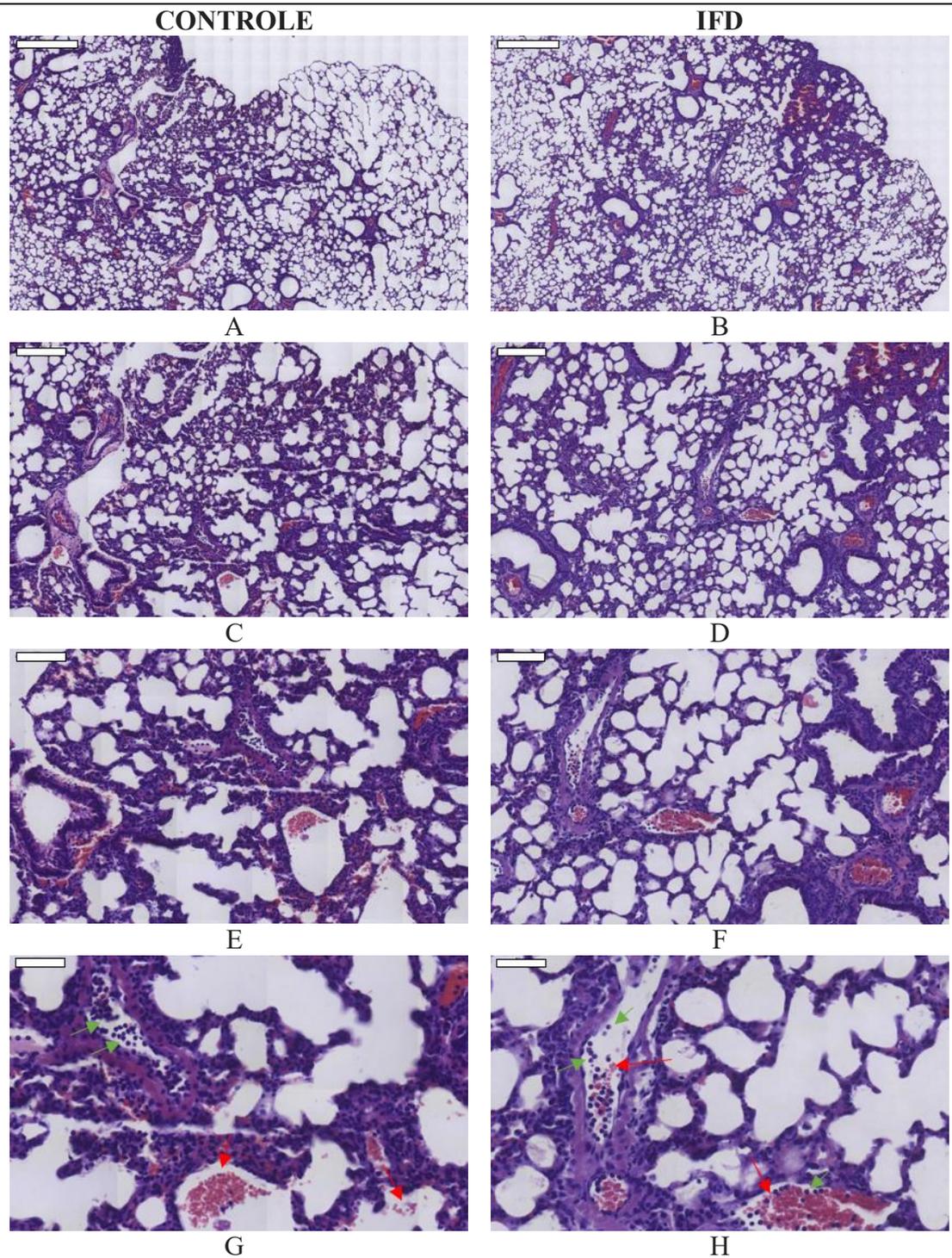


Figura 23: Micrografia dos cortes histológicos dos lobos superiores dos pulmões corados com HE. As imagens da coluna à esquerda (A, C, E e G) são referentes ao grupo Controle, animais infectados que receberam apenas instilação de PBS. As imagens da coluna à direita (B, D, F e H) referem-se ao grupo IFD, animais infectados submetidos à IFD. Nas imagens G e H, as setas verdes indicam os infiltrados de células PMN e Mono, e as setas vermelhas indicam a presença de células vermelhas nos espaços alveolares. As imagens A e B estão com o aumento original de 5 vezes, C e D de 10 vezes, E e F de 20 vezes, enquanto G e H de 40 vezes. A escala de cada micrografia está representada no canto superior esquerdo, medindo A e B 500 μm , C e D 200 μm , E e F 100 μm e G e H 50 μm .

Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.2 Experimentos *in vitro*

Há relatos na literatura de que a ICV, após ser irradiada, gera fotoprodutos, e/ou mesmo agregados que podem ser tóxicos para células e bactérias (62). A presença destes fotoprodutos pode gerar implicações inesperadas a favor ou contra os efeitos desejados para a IFD, tornando relevante, conhecer o efeito da ICV irradiada sobre as células e bactérias. Sendo assim, foram conduzidos experimentos *in vitro* com o objetivo de avaliar a efetividade da IFD com ICV imediatamente após a irradiação, 4 horas após a irradiação, e com a ICV já irradiada sendo incubada com as bactérias (e conseqüentemente, não sendo assim considerada IFD).

A Figura 24 mostra os resultados da IFD logo após irradiação, onde há redução de aproximadamente 3 log de UFC/mL de *S. pneumoniae* quando comparados aos grupos controle, nos quais a bactéria foi apenas incubada com PBS sem irradiação, ou incubada com PBS e irradiada pelo mesmo tempo que a IFD.

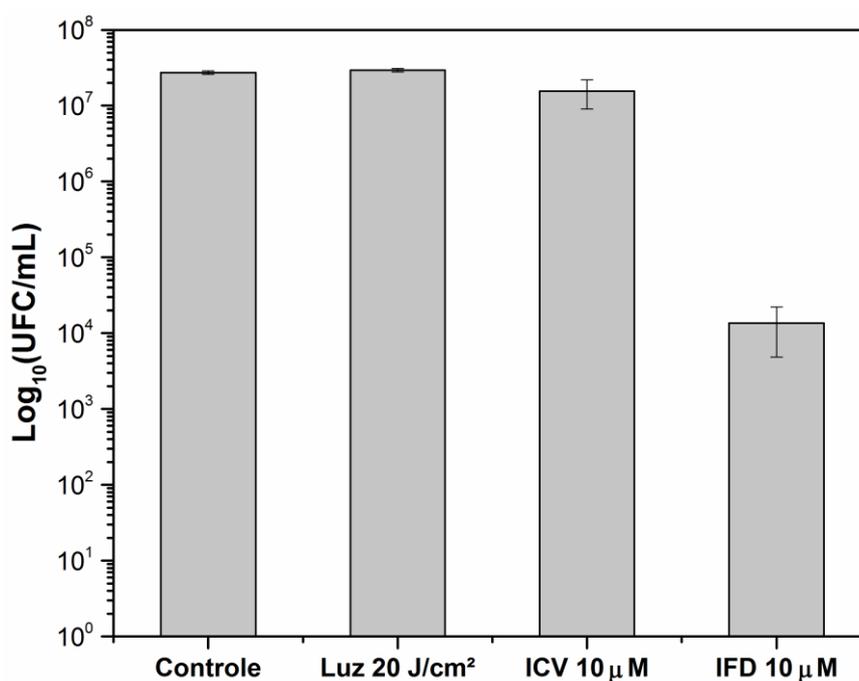


Figura 24: Gráfico de redução bacteriana *in vitro*. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), grupo Luz 20 J/cm² (bactéria + PBS + irradiação), ICV 10 µM (bactéria + ICV 10 µM) e IFD (bactéria + ICV 10 µM + irradiação). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo IFD apresenta redução de aproximadamente 3 log UFC/mL de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=3.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em um segundo teste *in vitro*, foi avaliada a efetividade da IFD com 4 horas de incubação após a irradiação (Figura 25). O resultado indica redução de aproximadamente 7 log UFC/mL de *S. pneumoniae*, ou seja, uma completa inativação da bactéria.

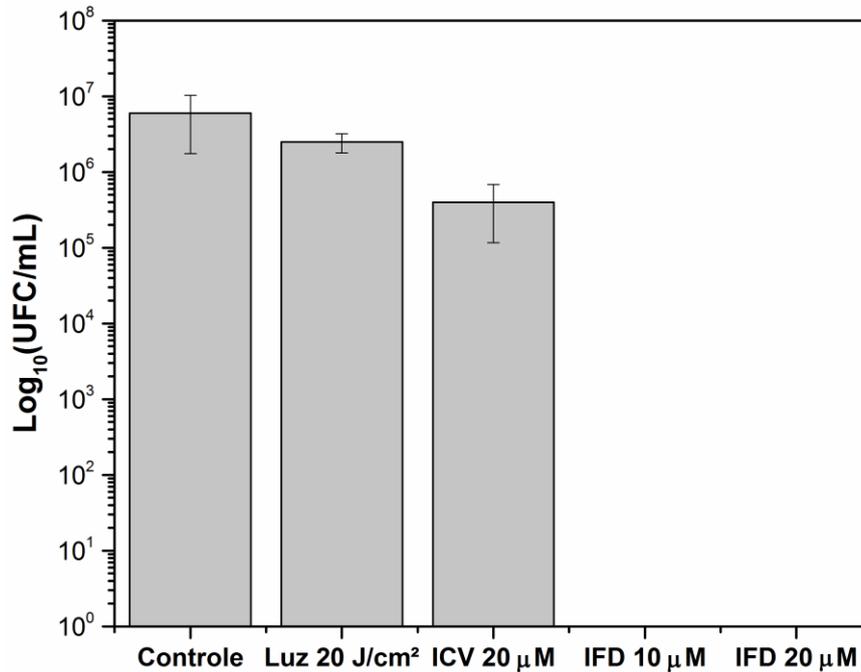


Figura 25: Gráfico de redução bacteriana *in vitro* avaliada 4 horas de incubação após a irradiação. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), grupo Luz 20 J/cm² (bactéria + PBS + irradiação), ICV 20 µM (bactéria + ICV 20 µM), IFD 10 µM (bactéria + ICV 10 µM + irradiação) e IFD 20 µM (bactéria + ICV 20 µM + irradiação). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo IFD apresenta inativação total de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=2.

Fonte: Elaborado pela autora.

Estes resultados *in vitro*, referentes à irradiação do FS, demonstram que a ICV está agregando ou gerando algum fotoproduto com efeito citotóxico após ser irradiada. Quando a bactéria é cultivada imediatamente após a irradiação ocorre uma redução parcial, em oposição à completa inativação encontrada quando a bactéria volta a ser incubada por mais 4 horas após a irradiação da ICV. É possível afirmar que tais produtos e/ou agregados são gerados após a irradiação uma vez que a ICV sem irradiar foi incubada também por 4 horas, porém apresenta redução bacteriana pouco mais de 1 log de UFC/mL.

Com base nos achados dos experimentos reportados na Figura 24 e Figura 25, conduzimos outro experimento *in vitro*, onde não foi realizada a IFD clássica. A ICV a 10 µM foi irradiada com fluência de 20 J/cm² e, a seguir, incubada por 4 horas em

S. pneumoniae planctônico. O resultado indica que a ICV irradiada inativou aproximadamente 5 log₁₀ de UFC/mL (Figura 26).

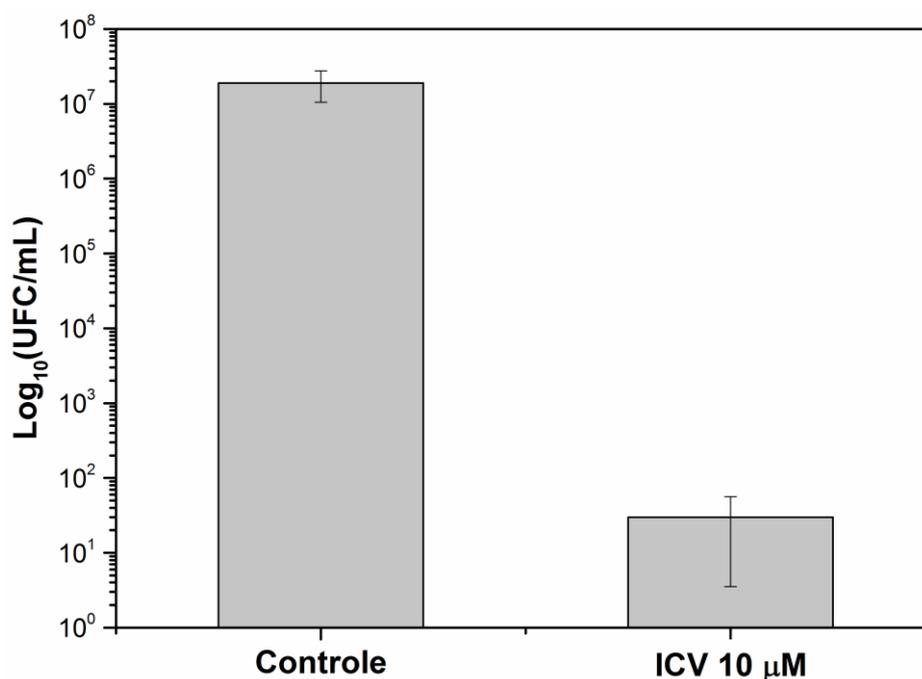


Figura 26: Gráfico de redução bacteriana *in vitro*. Eixo X: grupo controle (bactéria + PBS), ICV 10 µM irradiada (bactéria + ICV 10 µM irradiada). Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em log₁₀ de UFC/mL. O grupo ICV irradiada apresenta redução de aproximadamente 5 log UFC/mL de *S. pneumoniae*. Valores expressos em média e desvio padrão. N=3.

Fonte: Elaborado pela autora.

Engel *et al.* (2008), investigaram os produtos gerados a partir da decomposição da ICV irradiada (fotoprodutos) e a citotoxicidade desses produtos. A ICV em solução foi irradiada com laser, luz solar ou foco de luz cirúrgico e os produtos da decomposição induzidos pelas fontes de luz foram analisados por espectroscopia de massa acoplada à cromatografia líquida. Independentemente da fonte de luz utilizada, os autores relataram que o ¹O₂ foi formado (mas não detectado), levando a formação de dioxetanos. A ICV dissolvida, independentemente do solvente, é muito instável, particularmente quando exposta à luz. Os resultados do estudo mostraram claramente que os fotoprodutos reduziram a viabilidade das células do epitélio pigmentado da retina *in vitro*. Os autores sugeriram que a ICV produz ¹O₂ e que, após a irradiação, são gerados produtos que são responsáveis pela destruição das células. Concluíram, a partir disso, que as células do epitélio pigmentado da retina não são predominantemente mortas por oxidação de constituintes celulares, mas sim devido à toxicidade dos fotoprodutos gerados após a irradiação da ICV (90).

Assim como Engel, Melendez *et al.* (2005) avaliaram o efeito *in vitro* em células do epitélio pigmentado da retina, porém sem estudar os fotoprodutos. Observaram que com ICV abaixo de 0,5 mg/ml, a viabilidade celular é $\geq 75\%$. Concluíram também que concentrações mais elevadas de ICV indicam uma citotoxicidade dose-dependente e, quando a ICV é associada à fotossensibilização, a viabilidade celular também é diminuída (91).

A toxicidade da ICV associada a IFD para inativação de bactérias é validada também por Omar *et al.* (2008), que avaliaram os efeitos em bactérias associadas a feridas. Os autores demonstraram que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* eram susceptíveis à inativação pela ICV aliada à luz de baixa intensidade (808 nm), sendo o efeito bactericida dependente da concentração de ICV e da fluência. Além disso, sugeriram que o $^1\text{O}_2$ estava envolvido na inativação bacteriana (31).

O presente estudo permitiu comprovar o efeito bactericida dos fotoprodutos e/ou agregados gerados a partir da irradiação da ICV. Estes achados podem oferecer mais uma possibilidade de terapia utilizando os produtos gerados a partir da irradiação, além da soma deste efeito e o da reação fotodinâmica propriamente dita. Porém, é preciso compreender melhor estes fotoprodutos por meio de estudos mais aprofundados, podendo assim alcançar uma terapia efetiva a partir deles.

5.4 CONSIDERAÇÕES

- A segurança da IFD foi indicada pelos resultados dos testes de avaliação do dano pulmonar.

- O estudo permitiu ainda comprovar *in vitro* o efeito bactericida dos fotoprodutos/agregados gerados a partir da irradiação da ICV.

7. CAPÍTULO III

Neste capítulo, são apresentados experimentos pilotos realizados no laboratório de Biofotônica - IFSC/USP, com objetivo de aprimorar a entrega do FS aos pulmões, uma vez que a nebulização de fármacos é a melhor maneira de entrega de um composto para os pulmões, em comparação à instilação de uma solução. Deste modo, foram conduzidos alguns testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a efetividade da ICV como FS por meio de nebulização.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS – TESTES DE NEBULIZAÇÃO

7.1.1 *Cultivo de Streptococcus pneumoniae*

Para preparação dos inóculos nos testes *in vitro* e para indução de infecção no experimento *in vivo*, foi utilizada mesma cepa (ATCC® 49619™) de *Streptococcus pneumoniae* e protocolo do capítulo II, sessão 6.1.1.

O inóculo foi ajustado por meio de diluições para a concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL para os experimentos *in vitro* e 10^8 UFC/animal para os experimentos *in vivo*.

7.1.2 *Indocianina verde*

Nos experimentos realizados neste capítulo, a ICV (mesma utilizada nos capítulos anteriores) foi dissolvida em água para injeção estéril (Equiplex, Brasil) e ajustada a concentração de 700 μ M para os experimentos *in vitro*. Para os experimentos *in vivo* a ICV foi dissolvida em PBS para atingir a concentração de 800 μ M.

Para a entrega da ICV, a fim de substituir a instilação, foi utilizado um nebulizador do tipo de compressão de ar (Omron NEC801 Bivolt V, Brasil - Figura 27) para formação da névoa de FS. Em todos os testes foram adicionados no reservatório do nebulizador 2 mL de ICV e, ao final de 5 minutos de nebulização houve uma sobra de 0,5 mL de ICV no recipiente do nebulizador.



Figura 27: Imagem do nebulizador utilizado nos testes preliminares.
Fonte: Omron Brasil, acesso em 11/07/2017(92).

Segundo o fabricante, o inalador NE-C801 possui tecnologia de válvula virtual que produz uma névoa com taxa constante de nebulização de 0,3 ml/min e tamanho de partícula de 3 μm (92).

7.1.3 Fontes de Luz

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a mesma fonte de irradiação utilizada nos capítulos I e II (Lasertable, Figura 17), e fluência de 20 J/cm². Para realizar os experimentos *in vivo*, foi utilizado o mesmo equipamento com formato anatômico descrito no capítulo I, sessão 5.1.4, para irradiar adequadamente a região torácica do dorso do animal (Figura 6).

7.1.4 Animais

Os testes realizados neste capítulo foram aprovados e executados de acordo com as orientações da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IFSC (Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos), conforme protocolo nº 12/2016.

Os animais, camundongos machos da linhagem BALB/c, foram adquiridos do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB de Campinas, Brasil. Foram utilizados nos experimentos animais com idade de 10 semanas e peso entre 20-25 gramas. Foram utilizados dois animais para o grupo controle e 3 animais para os demais grupos.

7.1.5 Teste in vitro

A fim de melhorar a entrega do FS foram conduzidos alguns testes para avaliar a entrega da ICV por meio de nebulização.

O primeiro teste realizado teve como objetivo avaliar se a névoa de ICV gerada após a nebulização permanecia efetiva como agente fotossensibilizante. Para isto, foram inoculados em uma placa de ágar sangue (TSA enriquecido com 5% de sangue de carneiro, PlastLabor microbiologia, Brasil) 10 μ L de *S. pneumoniae*, a aproximadamente 10^6 UFC/mL. O inóculo foi preparado seguindo os mesmos protocolos apresentados no capítulo II (sessão 6.1.1). Após a inoculação da bactéria, a saída do nebulizador foi posicionada em contato com a região da placa inoculada (Figura 28), seguida da nebulização por 5 minutos da ICV a uma concentração de 700 μ M dissolvida em água para injeção estéril (EquiPLEX, Brasil). Após a nebulização, a região foi irradiada com o equipamento utilizado nos experimentos *in vitro* do capítulo II, por 8 minutos e 20 segundos, totalizando uma fluência de 20 J/cm². O efeito da ICV nebulizada também foi testado em outra região da placa, onde foi feita apenas a inoculação da bactéria seguida da nebulização da ICV. A fim de comparar o efeito da IFD com ICV nebulizada, uma segunda placa foi inoculada com bactérias em 4 regiões diferentes. Na primeira região foram colocados 10 μ L de ICV líquida a 700 μ M (a mesma utilizada para a nebulização). Na segunda região, foram adicionados 10 μ L de ICV seguida da irradiação. Na terceira região, após a inoculação, a placa foi irradiada. Por fim, a quarta região permaneceu somente com a inoculação da bactéria para servir de controle negativo de FS e luz. As placas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ à 37 °C por 24 horas.

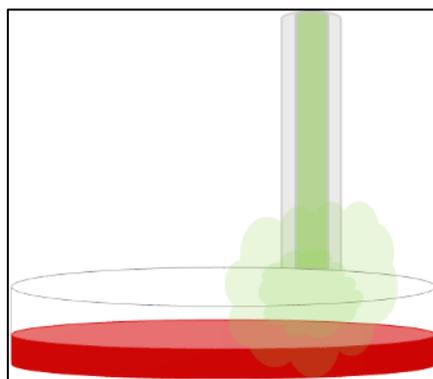


Figura 28: Esquema de como foi feita a nebulização da ICV em contato com a região inoculada na placa de ágar sangue. A cânula de nebulização foi posicionada a aproximadamente 1 cm da superfície do ágar sangue inoculada, com entrega de uma taxa constante de 0,3 ml/min da solução de ICV a 700 μ M.

Fonte: Elaborado pela autora.

7.1.6 *Experimento piloto in vivo*

Foram infectados 8 camundongos machos da linhagem Balb/c com instilação de 10^8 UFC/animal de *S. pneumoniae*, como descrito no capítulo II, sessão 6.1.1. Dois dias após a infecção, os pelos dos animais foram removidos com creme depilatório na região dorsal para que os pelos não interferissem na transmissão da luz. Os animais foram divididos em 3 grupos, onde um primeiro grupo de 2 animais recebeu apenas nebulização PBS (Controle) durante 5 minutos; um segundo grupo de 3 animais recebeu nebulização a $800 \mu\text{M}$ de ICV por 5 minutos e, após 20 minutos no escuro, foram irradiados com fluência de 120 J/cm^2 (IFD 20'); e num terceiro grupo, 3 animais receberam ICV nebulizada a $800 \mu\text{M}$ por 5 minutos, porém, irradiados simultaneamente à nebulização (IFD+N).

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos apresentados nos capítulos I e II, a ICV foi depositada nos pulmões dos animais por meio da instilação, ou seja, na forma líquida. É sabido que este não é o método ideal para entrega de drogas ao sistema respiratório, pois a presença de líquido nos pulmões prejudica a frequência respiratória, podendo agravar o quadro clínico do paciente, principalmente em indivíduos com pneumonia. Sendo assim, para os experimentos apresentados neste capítulo foi proposta a entrega do FS na forma de névoa por meio da nebulização, facilitando assim a translação do estudo em modelos animais para um futuro estudo clínico, uma vez que a entrega da ICV líquida não seria viável e adequada para tal aplicação. O nebulizador do tipo compressão de ar utilizado neste estudo, usa gás comprimido para converter soluções aquosas ou suspensões em spray. Um jato de gás de alta velocidade passa por um bico “venturi” estreito, de modo que o líquido é extraído de um reservatório para cima de um tubo de alimentação e emerge como filamentos finos que colapsam nas gotículas de aerossol (93).

No experimento *in vitro* (Figura 29) é possível observar que a ICV permanece sendo efetiva na inativação bacteriana após a nebulização, pois no grupo IFD com ICV nebulizada houve redução da colonização bacteriana (Figura 29 A). Deste mesmo modo, é possível observar que a ICV nebulizada e não irradiada não reduziu a formação de colônias (Figura 29 B). Para servir de parâmetro de efetividade da ICV na IFD, foi testada a ICV em solução seguida da irradiação (Figura 29 C), e foi possível detectar redução na

colonização. A ICV em solução também foi avaliada (Figura 29 D) e não foi observada redução bacteriana, assim como no grupo somente irradiação (Figura 29 E) e no grupo controle (Figura 29 F), o qual foi inoculada apenas *S. pneumoniae*.

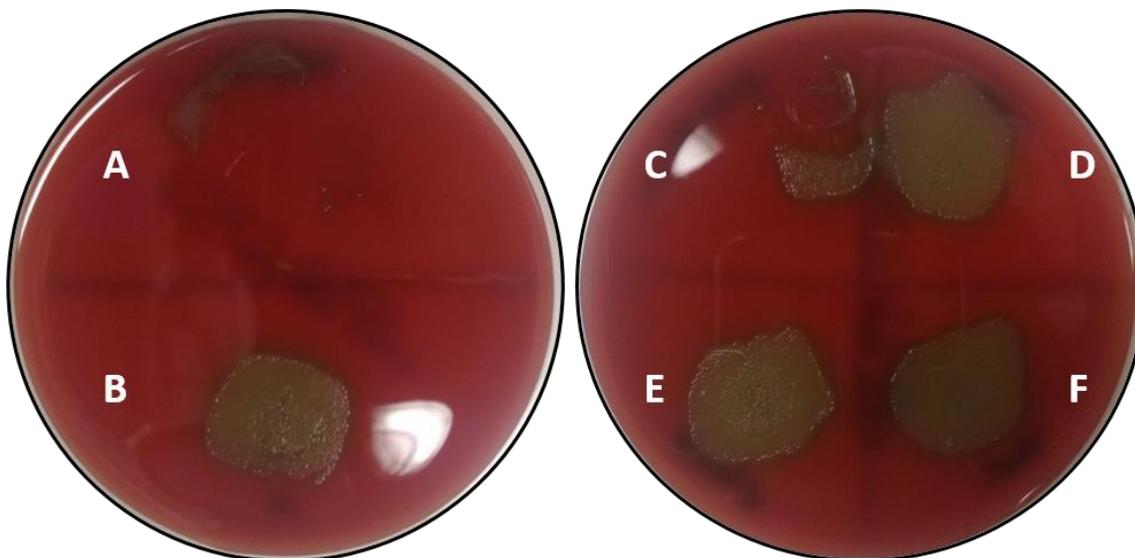


Figura 29: Imagem das placas de ágar sangue inoculadas com *S. pneumoniae*, seguidas dos tratamentos. (A) IFD com ICV nebulizada, (B) ICV nebulizada sem irradiação, (C) IFD com ICV líquida, (D) ICV líquida sem irradiação, (E) somente irradiação e (F) somente a inoculação de *S. pneumoniae*. Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado deste teste preliminar *in vitro* foi de grande importância para demonstrar como prova de princípio a viabilidade da ICV nebulizada e, de certa forma, evidenciar que o processo de nebulização não degrada a ICV ou altera suas propriedades, o que prejudicaria sua efetividade como FS.

Um experimento *in vivo* foi conduzido para também avaliar a efetividade da ICV nebulizada como nova forma de entrega de FS na IFD. Não foi possível observar diferenças expressivas entre os grupos tratados e controle, conforme mostra a Figura 30.

Foram testados dois protocolos de nebulização. Em um deles, os animais receberam a nebulização de ICV a 800 μ M durante 5 minutos e, após o término da nebulização, foi aguardado 20 minutos antes de iniciar a irradiação (IFD 20'). Este protocolo foi escolhido com base em outros resultados *in vivo*, que fazem parte dos experimentos realizados para a dissertação de mestrado de Giulia Kassab (estudo em desenvolvimento; dados não mostrados e ainda não publicados), os quais evidenciaram que 20 minutos após a nebulização há um aumento na captação de fluorescência da ICV, indicando que houve sua distribuição nos pulmões dos animais. No teste em questão, o animal recebeu nebulização de ICV e, durante 60 minutos, a fluorescência da ICV foi monitorada por meio de fibra óptica coletora varrendo a região dorsal do camundongo.

Passados os 60 minutos, o animal foi eutanasiado e, após realizada a laparotomia, não foram detectados sinais da fluorescência do FS no estômago, fígado, rins, ou nos demais órgãos, exceto no pulmão. Isto indica que a ICV permaneceu somente nos pulmões durante o tempo de 60 minutos, ou que a quantidade de ICV que chegou a atingir a corrente sanguínea já havia sido metabolizada e eliminada. É possível ainda que pequenas quantidades da ICV tenham alcançado pontos específicos dos tecidos, mas em quantidades inferiores às detectáveis pelas técnicas e dispositivos de espectroscopia e imagem utilizados.

Para a excitação da fluorescência da ICV, foi utilizada fonte de luz externa no comprimento de onda de 780 nm (mesma utilizada no teste preliminar apresentado no capítulo I, sessão 5.1.5).

No segundo grupo, foi utilizada a nebulização durante 5 minutos, simultaneamente à irradiação dos animais, com o intuito de avaliar se este protocolo aumentaria a efetividade da IFD, uma vez que novas moléculas de ICV não degradadas estariam sendo entregue aos pulmões durante o processo de irradiação (IFD+N).

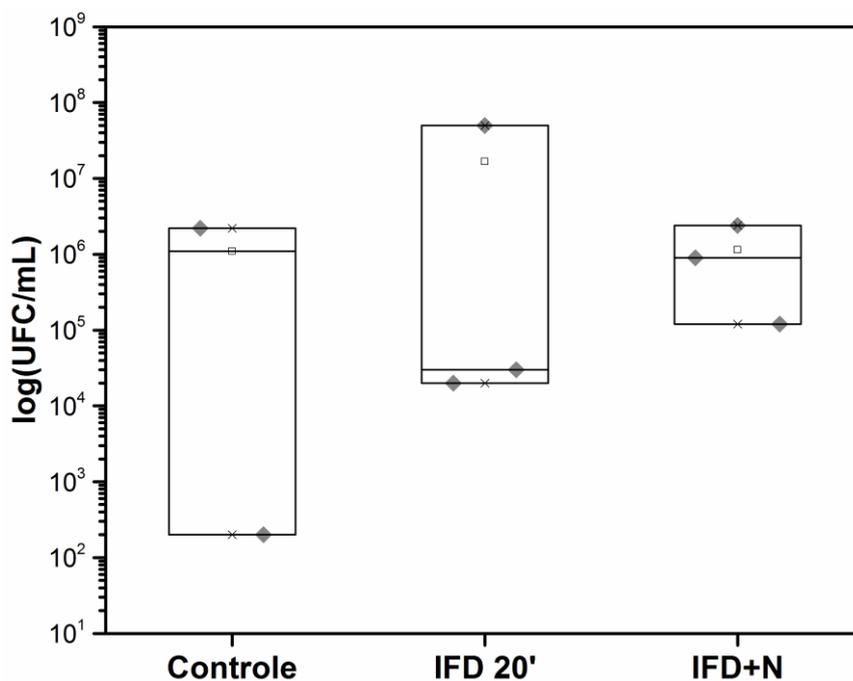


Figura 30: Boxplot de recuperação de UFC para camundongos infectados com 10^7 *S. pneumoniae*. Eixo X: animais tratados com apenas instilação de PBS (Controle), animais que receberam a nebulização de ICV a $800 \mu\text{M}$ e 20 minutos após foram irradiados (IFD 20') e animais que receberam a nebulização de ICV a $800 \mu\text{M}$ simultaneamente à irradiação (IFD+N). A fluência utilizada nos grupos IFD 20' e IFD+N foi de 120 J/cm^2 . Eixo Y: escala de crescimento bacteriano expresso em \log_{10} de UFC/mL. No gráfico não é possível expressar barra de erro por terem sido avaliados apenas 2 animais no grupo controle e 3 animais nos demais grupos. N= 2-3.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em um dos animais do grupo controle, é possível observar que a infecção não se estabeleceu completamente, ou que o sistema imune do animal em questão foi mais eficiente que nos demais animais, pois houve menor recuperação de UFC de *S. pneumoniae*. Para uma avaliação significativa da efetividade da ICV nebulizada como FS para a IFD, faz-se necessário um teste de recuperação de UFC com maior número de indivíduos estudados (ou seja, maior N), de modo a garantir a eficácia do método.

A avaliação da recuperação da UFC após o tratamento demonstra que a nebulização da ICV e a irradiação simultânea resultou em uma resposta de redução microbiana mais uniforme, uma vez que existe uma menor variância dos resultados. Considerando isso, a IFD com nebulização e irradiação simultâneas pode apresentar resultados superiores aos da instilação da solução, no entanto, o protocolo ainda necessita de otimização para a definição de melhores parâmetros como diâmetro das gotas e concentração do FS.

A nebulização de drogas para tratamentos de patologias pulmonares é bem conhecida na área clínica. Porém, até a conclusão desta tese, havia sido descrito na literatura apenas um estudo piloto realizado por Cassidy *et al.* (2011), no qual foi utilizada a nebulização para entrega de FS como proposta para futuro tratamento pulmonar. No estudo em questão, foi avaliada a entrega de azul de metileno nebulizado em pulmões retirados de porcos, e a distribuição da luz no regime entre 663-785 nm foi estabelecida nos pulmões por meio de fibra inserida em broncoscópio. No referido estudo, nenhuma análise quanto a inativação de bactérias foi realizada (67).

Assim como a entrega de FS nebulizado, estudos da IFD para tratamento de pneumonia são igualmente recentes e pouco explorados, assim como as técnicas de irradiação extracorpórea. Por ser tratar de um estudo inovador, há a necessidade de testes complementares e maior aprofundamento, para que técnica venha a ser considerada de fato efetiva, e para que possa vir a ser aplicada com segurança clinicamente.

5.5 CONSIDERAÇÕES

- Testes preliminares, *in vitro* e *in vivo*, envolvendo uma alternativa de entrega da ICV aos pulmões utilizando de nebulização, evidenciaram resultados promissores.

8. CONCLUSÕES

O presente estudo apresentou uma proposta para provar o princípio de que a IFD poderia ser utilizada como técnica para o combate a infecções pulmonares por *Streptococcus pneumoniae* por meio de irradiação extracorpórea com uso da ICV como FS.

Este é um estudo pioneiro, que abre caminhos para o avanço no tratamento de infecções pulmonares, apresentando um protocolo promissor de inativação bacteriana. A IFD apresenta potencial para uma renovação nas práticas clínicas utilizadas corriqueiramente para tratamento de infecções pulmonares, o que difere do uso de antibióticos.

Como avanço adicional no campo de pesquisa, foi ainda desenvolvido um protótipo que permitiu irradiar de maneira adequada os animais. Com isso, este equipamento de irradiação pôde ser utilizado como modelo para a elaboração de dispositivos semelhantes para irradiar outros modelos animais e para pesquisa translacional clínica (patente em fase de depósito, protocolo USP N.ref.: 201790117).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Ranganathan, S.C.; Sonnappa, S. Pneumonia and Other Respiratory Infections. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, n. 1, p. 135–156, 2009.

2 Browne, L.R.; Gorelick, M.H. Asthma and Pneumonia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, n. 6, p. 1347–1356, 2010.

3 Singh, V.; Aneja, S. Pneumonia – Management in the Developing World. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 12, n. 1, p. 52–59, 2011.

4 Berezin, E.N.; Moraes, J.C. De; et al. Pneumonia hospitalization in Brazil from 2003 to 2007. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. e583–e590, 2012.

5 Corrêa, R.D.A.; Luiz, F.; et al. Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults - 2009. **J Bras Pneumol**. v. 35, n. April, p. 574–601, 2009.

6 WHO | Care seeking for pneumonia. http://www.who.int/gho/child_health/prevention/pneumonia_text/en/. Acesso em: 25/06/2017.

7 Jiang, Y.; Leung, A.W.; et al. Inactivation of Staphylococcus aureus by photodynamic action of hypocrellin B. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 600–606, 2013.

8 WHO | The top 10 causes of death. **WHO**, 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acesso em: 05/07/2017..

9 Bagnato, V.S. **As Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde**. Editora Livraria da Física, 2008.

10 Mantareva, V.; Kussovski, V.; et al. Non-aggregated Ga-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 91–102, 2011.

11 Cassidy, C.M.; Tunney, M.M.; et al. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 2, p. 71–80, 2009.

12 Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**. 2009;64(10):666-73.

13 Street, C.N.; Gibbs, A.; et al. In vitro photodynamic eradication of Pseudomonas aeruginosa in planktonic and biofilm culture. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 137–143, 2009.

14 Kharkwal, G.B.; Sharma, S.K.; et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Laser in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.

15 Dovigo, L.N.; Pavarina, A.C.; et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 927–934, 2011.

16 Maisch, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 83–91, 2007.

17 Christodoulides, N.; Nikolidakis, D.; et al. Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 9, p. 1638–1644, 2008.

18 Lei, X.; Liu, B.; et al. A clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 1, p. 49–55, 2015.

19 Moftah, N.H.; Ibrahim, S.M.; et al. Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 4, p. 263–268, 2016.

20 Scwingel, A.R.; Barcessat, A.R.P.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Treatment of Oral Candidiasis in HIV-Infected Patients. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 8, p. 429–432, 2012.

21 Yang, Y.; Sang, J.; et al. Off-label photodynamic therapy for recalcitrant facial flat warts using topical 5-aminolevulinic acid. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 929–936, 2016.

22 Urbanska, K.; Romanowska-Dixon, B.; et al. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p. 387–391, 2002.

23 Crescenzi, E.; Varriale, L.; 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.

24 Fickweiler, S.; Szeimies, R.M.; et al. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 38, n. 2–3, p. 178–83, 1997.

25 Steinbrink, J.; Fischer, T.; et al. Relevance of depth resolution for cerebral blood flow monitoring by near-infrared spectroscopic bolus tracking during cardiopulmonary bypass. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 132, n. 5, p. 1172–1178, 2006.

26 Yaseen, M. a.; Yu, J.; et al. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1321–1332, 2009.

27 Bäumlner, W.; Abels, C.; 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. 360–363, 1999.

28 Costa, R. a; Farah, M.E.; et al. Choriocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green. **American journal of ophthalmology**, v. 132, n. 4, p. 557–565, 2001.

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

30 Montazerabadi, A.R.; Sazgarnia, A.; 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.

31 Omar, G.S.; Wilson, M.; et al. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 111, 2008.

32 Tuchin, V. V.; Genina, E. a.; et al. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: Photodynamic and photothermolysis treatment. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 296–310, 2003.

33 Maciel, C.C.S.; Cândido, H.R.L.F. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **Veredas Favip**, v. 3, n. 1, p. 33–43, 2010.

34 File, T.M. Community-acquired pneumonia. **Lancet**, v. 362, n. 9400, p. 1991–2001, 2003.

35 Kusahara, D.M.; Canezin, C.C.S. Da; 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.

36 Cristina, J.; Barbosa, D.S.; et al. Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial : principais agentes etiológicos. v. 39, n. 4, p. 201–206, 2010.

37 Sociedade Brasileira de Pneumonia e Tisiologia Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. Suppl. 1, p. s1–s30, 2007.

38 Khan, H.A.; Baig, F.K.; et al. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

39 Knobel, E. **Condutas no paciente grave**. Atheneu, 2006.

40 Carvalho, C.R.R. De Pneumonia associada à ventilação mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4, p. xx–xxii, 2006.

41 Amaral, S.M. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J Bras Pneumol**. v. 35, n. 11, p. 1116–1124, 2009.

42 Freire, I.L.S.; Farias, G.M. de; et al. Prevenindo pneumonia nosocomial: cuidados da equipe de saúde ao paciente em ventilação mecânica invasiva. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 8, n. 7, p. 377–397, 2006.

43 Souza, C.R. De; Santana, V.T.S. Impact of supra-cuff suction on ventilator-associated pneumonia prevention. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 401–406, 2012.

44 Cremonese, R.V.; Tonietto, T.F.; et al. Há Espaço para o CPIS no Manuseio da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica? **RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 17, 2005.

45 Roberto, C.; Carvalho, R.D.E. Ventilator-associated pneumonia. **J Bras Pneumol**. n. 5, p. 6–8, 2006.

46 Pugin, J.; Auckenthaler, R.; et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. **The American review of respiratory disease**, v. 143, n. 5 Pt 1, p. 1121–9, 1991.

47 Tan, T.Q.; Mason, E.O.; et al. Clinical Characteristics of Children With Complicated Pneumonia Caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatrics Jul**, v. 110, n. 1, p. 1–8, 2002.

48 Bogaert, D.; Groot, R. De; et al. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 144–54, 2004.

49 Obaro, S.; Adegbola, R. The pneumococcus: Carriage, disease and conjugate vaccines. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 98–104, 2002.

50 Mitchell, A.M.; Mitchell, T.J. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 5, p. 411–418, 2010.

51 Musher, D.M.. Infections Caused by *Streptococcus pneumoniae* : Clinical Spectrum , Pathogenesis , Immunity , and Treatment. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, n. 4, p. 801–807, 1992.

52 Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors I. v. 38, n. August, p. 2628–2635, 1978.

53 Roberts, D.J.; Cairnduff, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **Br J Plast Surg**, v. 48, n. 6, p. 360–370, 1995.

54 Ferreira, Juliana. Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica - Estudo in vivo. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade de São Paulo.

55 Denis, T.G. St.; Dai, T.; et al. All you need is light. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509–520, 2011.

56 Nowis, D.; Stokłosa, T.; et al. The influence of photodynamic therapy on the immune response. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 283–298, 2005.

57 Bagnato, V.S.; Kurachi, C.; et al. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107–118, 2005.

58 Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How Does Photodynamic Therapy Work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.

59 Allison, R.R.; Downie, G.H.; et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1000, p. 7–9, 2004.

60 Desmettre, T.; Devoisselle, J.M.; et al. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. **Survey of ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 15–27, 2000.

61 Genina, E. a; Kuzmina, M.Y.; et al. In vitro study of indocyanine green solution interaction with skin. **SPIE Proceedings**, v. 6535, n. 65351, p. 65351H–65351H–10, 2007.

62 Giraudeau, C.; Moussaron, A.; et al. Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a Debate. **Current Medicinal Chemistry**, 2014.

63 Dai, T.; Huang, Y.Y.; et al. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, 2009.

64 Geralde, M.C.; Leite, I.S.; et al. Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. **Physiological Reports**, v. 5, p. 1–7, 2017.

65 Govone, Angelo Biasi. Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando indocianina verde. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.

66 Leite, Ilaiáli Souza. Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica infravermelha com indocianina verde e sua interação com macrófagos RAW 264.7. 2015. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.

67 Cassidy, C.M.; Tunney, M.M.; et al. Drug and light delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) of pulmonary pathogens: A pilot study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2011.

68 Ford, N.L.; Martin, E.L.; et al. In vivo characterization of lung morphology and function in anesthetized free-breathing mice using micro-computed tomography. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, p. 2046–2055, 2007.

69 Sabino, C.P.; Deana, A.M.; et al. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 72–78, 2016.

70 Genina, E.A.; Bashkatov, A.N.; et al. Low-intensity indocyanine-green laser phototherapy of acne vulgaris: pilot study. **Journal of biomedical optics**, v. 9, n. 4, p. 828–34, 2004.

71 Aranow, C. Vitamin D and the immune system. **Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 59, n. 6, p. 881–6, 2011.

72 Celine Lee, S.Y.; Seong, I.W.; et al. Enhancement of cutaneous immune response to bacterial infection after low-level light therapy with 1072 nm infrared light: A preliminary study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 175–182, 2011.

73 Fukushi, M.; Ito, T.; et al. Serial histopathological examination of the lungs of mice infected with influenza A virus PR8 strain. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–7, 2011.

74 Saini, Y.; Kim, K.Y.; et al. Role of hypoxia-inducible factor 1{alpha} in modulating cobalt-induced lung inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 298, n. 2, p. L139-47, 2010.

75 Walzer, P.D.; Jr, R.D.P. Experimental pneumonia in different strains of cortisonized Experimental Pneumocystis carinii Pneumonia in Different Strains of Cortisonized Mice. **Infection and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 939–947, 1979.

76 Leite, I.S.; Geralde, M.C.; Salina, A.C.G.; Medeiros, A.I.; Dovigo, L.N.; Bagnato, V.S.; Inada, N.M. Near-infrared photodynamic inactivation of *S. pneumoniae* and its interaction with RAW 264.7 macrophages. **J. Biophotonics**, p. 1–9, 2017.

77 Taichman, G.C.; Hendry, P.J.; et al. The use of cardio-green for intraoperative visualization of the coronary circulation: evaluation of myocardial toxicity. **Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital**, v. 14, n. 2, p. 133–8, 1987.

78 Kim, T.I.; Jeong, K.H.; et al. Verrucous epidermal nevus (VEN) successfully treated with indocyanine green (ICG) photodynamic therapy (PDT). **JAAD Case Reports**, v. 1, n. 5, p. 312–314, 2015.

79 Martínez, J.L. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 51, 2017.

80 Cunha, B.A. Antibiotic Side Effects. **Medical clinics of north america**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2001.

81 Reynolds, C. a; Finkelstein, J. a; et al. Attributable healthcare utilization and cost of pneumonia due to drug-resistant streptococcus pneumonia: a cost analysis. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 3, n. 1, p. 16, 2014.

82 Margaret J. Cook The Anatomy of the Laboratory Mouse. <http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure53.shtml>. Acesso em: 23/06/2017

83 Usuda, J.; Kato, H.; et al. Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 1, n. 5, p. 489–493, 2006.

84 Kato, H.; Harada, M.; et al. Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer : experience of the Tokyo Medical University. v. 1000, p. 0–6, 2004.

85 Tateda, K.; Takashima, K.; et al. Noncompromised penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 6, p. 1520–1525, 1996.

86 Poll, T. van der; Opal, S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **The Lancet**, v. 374, n. 9700, p. 1543–1556, 2009.

87 Pinheiro, B.D.V.; Horta, C.M.M.; et al. Lesão pulmonar de reperfusão por oclusão da aorta abdominal: modelo experimental em ratos. **Jornal de Pneumologia**, v. 26, n. 4, p. 163–168, 2000.

88 Anner, H.; Kaufman Jr., R.P.; et al. Pulmonary hypertension and leukosequestration after lower torso ischemia. **Ann.Surg.**, v. 206, n. 0003–4932 (Print), p. 642–648, 1987.

89 Matute-Bello, G.; Frevert, C.W.; et al. Animal models of acute lung injury. **American Journal Of Physiology**, p. 379–399, 2008.

90 Engel, E.; Schraml, R.; et al. Light-induced decomposition of indocyanine green. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 49, n. 5, p. 1777–1783, 2008.

91 Melendez, R.F.; Kumar, N.; et al. Photodynamic actions of indocyanine green and trypan blue on human lens epithelial cells in vitro. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 1, p. 132–134, 2005.

92 Omron Brasil Inalador Compressor (NE-C801). http://www.omronbrasil.com/pt_BR/product/inalador-compressor. Acesso em: 10/07/2017.

93 Elhissi, A.M.A.; Karnam, K.K.; et al. Formulations generated from ethanol-based proliposomes for delivery via medical nebulizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 7, p. 887–894, 2006.

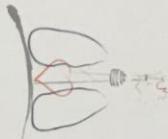
9. ANEXO I





UNIVERSITY OF
TORONTO

INTERDEPARTMENTAL DIVISION
OF CRITICAL CARE MEDICINE



Award for Best Abstract (Basic and Translational Science)

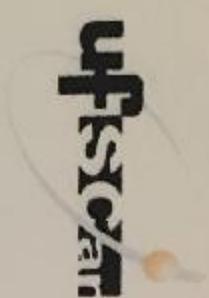
Mariana Geralde

ART SLUTSKY DAY
2016

ANDREW STEEL
PROGRAM DIRECTOR

ALEJANDRO FLOH
CHAIR, ABSTRACT COMMITTEE

LAURENT BROCHARD
DIVISION DIRECTOR



**A comissão organizadora do V Simpósio de Biotecnologia da
UFSCar - 2016, parabeniza o 1º colocado na modalidade
apresentação de pôster.**

*“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as
ideias”*

Marie Curie

Cristina Paiva de Sousa
Coordenadora do PPG-Biotec

Ângela Merice de O. Leal
Vice-Coordenadora do PPG-Biotec

Mariana Geralde is Recipient of 2017 Basic PDT Research Excellence Award



NEWS PROVIDED BY
International Photodynamic Association →
Jul 14, 2017, 09:47 ET

COIMBRA, Portugal, July 14, 2017 /CNW/ - At the 16th International Photodynamic Association (IPA) World Congress in Coimbra, Mariana Geralde was the recipient of the 2017 BASIC PDT RESEARCH EXCELLENCE AWARD.



Mariana Geralde was recognized for research excellence at the Sao Carlos Institute of Physics (Brazil) for her work involving the clinical application of Photodynamic Therapy (PDT) as a method to treat pulmonary infections through extracorporeal illumination. This innovative research has resulted in the significant advancement of both PDT protocols and clinical outcomes, accelerating the potential for PDT treatment of multi-drug resistant pneumonia.

The Coimbra World Congress was the 16th conference held by the International Photodynamic Association, marking 32 years of this global meeting. The IPA World Congresses, held every two years, are the leading PDT meetings bringing together members of the global photodynamic community in order to advance scientific and clinical research relating to photodiagnosis and photodynamic therapies. The next IPA World Congress is to be hosted in Boston, USA and will be led by Dr. Tayyaba Hasan, Professor of Dermatology at the Wellman Center for Photomedicine, Harvard Medical School (HMS) and a Professor of Health Sciences and Technology (Harvard-MIT).

About Photodynamic Therapy (PDT)

Photodynamic Therapy (PDT) is a combination therapy involving light activated photosensitizers to diagnose and treat various types of cancers and pre-cancers, macular degeneration and multidrug resistant biofilm infections involving bacteria, viruses and fungi.

please contact: ipasecretary@internationalphotodynamic.com

Physiological Reports

Open Access

Physiological Reports ISSN 2051-817X

ORIGINAL RESEARCH

Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model

Mariana C. Geralde^{1,2}, Ilaiáli S. Leite¹, Natalia M. Inada¹, Ana Carolina G. Salina³,
Alexandra I. Medeiros³, Wolfgang M. Kuebler⁴, Cristina Kurachi¹ & Vanderlei S. Bagnato¹

¹ University of São Paulo, São Carlos, Brazil

² Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

³ São Paulo State University, Araraquara, Brazil

⁴ Keenan Research Centre of St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada

Keywords

Extracorporeal illumination, indocyanine green, photodynamic therapy, pneumonia, *Streptococcus pneumoniae*.

Correspondence

Mariana C. Geralde, São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, PO Box 369, 13560-970, São Carlos, SP Brazil.

Tel: 55 16 33739810

Fax: 55 16 33739811

E-mail: mcgeralde@outlook.com

Funding information

This work was supported by grants from The São Paulo Research Foundation (FAPESP/CEPOF Grant # 13/07276-1, infrastructure) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Grant # 99999.003154/2015-07, MCG's fellowship).

Received: 22 December 2016; Revised: 2 February 2017; Accepted: 4 February 2017

doi: 10.14814/phy2.13190

Physiol Rep. 5(5), 2017, e13190.

doi: 10.14814/phy2.13190

Abstract

Infectious pneumonia is a major cause of morbidity/mortality, mainly because of the increasing rate of microorganisms resistant to antibiotics. Photodynamic Therapy (PDT) is emerging as a promising approach, as effects are based on oxidative stress, preventing microorganism resistance. In two previous studies, the *in vitro* inactivation of *Streptococcus pneumoniae* using indocyanine green (ICG) and infrared light source was a success killing 5 log₁₀ colony-forming units (CFU/mL) with only 10 μmol/L ICG. In this work, a proof-of-principle protocol was designed to treat lung infections by PDT using extracorporeal illumination with a 780 nm laser device and also ICG as photosensitizer. Hairless mice were infected with *S. pneumoniae* and PDT was performed two days after infection. For control groups, CFU recovery ranged between 10³–10⁴/mouse. For PDT group, however, no bacteria were recovered in 80% of the animals. Based on this result, animal survival was evaluated separately over 50 days. No deaths occurred in PDT group, whereas 60% of the control group died. Our results indicate that extracorporeal PDT has the potential for pneumonia treatment, and pulmonary decontamination with PDT may be used as a single therapy or as an antibiotics adjuvant.

Introduction

Nosocomial infections are usually caused by resistant pathogens and occur in hospitals worldwide, with high index of morbidity, mortality, and hospital costs (Sopena et al. 2014). Microorganisms can infect the lower respiratory tract, which is considered largely sterile in healthy individuals, by four different mechanisms (Nair and Niederman 2013): (1) aspiration of secretions containing

pathogens from oropharynx, gastric cavity, or nasal cavities; (2) spread of bacteria from a nearby area, such as pleura; (3) aspiration through respiratory therapy devices and inhalation of contaminated aerosols; (4) hematogenous translocation into lungs from systemic infection sites. In hospitals, intubation and mechanical ventilation are commonly followed by infection ("ventilator-associated pneumonia"), which is considered the main complication for ventilated patients.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. LEITE, ILAIÁLI S.; GERALDE, MARIANA C.; SALINA, ANA C.G.; MEDEIROS, ALEXANDRA I.; DOVIGO, LÍVIA N.; BAGNATO, VANDERLEI S.; INADA, NATALIA M. Nearinfrared photodynamic inactivation of *S. pneumoniae* and its interaction with RAW 264.7 macrophages. **Journal of Biophotonics.** , v.x, p.1 9, 2017.
2. GERALDE, MARIANA C.; LEITE, ILAIÁLI S.; INADA, NATALIA M.; SALINA, ANA CAROLINA G.; MEDEIROS, ALEXANDRA I.; KUEBLER, WOLFGANG M.; KURACHI, CRISTINA; BAGNATO, VANDERLEI S. Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination an experimental model. **Physiological Reports.** , v.5, p.e13190,2017.
3. GERALDE, MARIANA C.; LEITE, ILAIÁLI S.; INADA, NATALIA M.; MEDEIROS, ALEXANDRA I.; SALINA, ANA CAROLINA G.; BAGNATO, VANDERLEI S.; KURACHI, CRISTINA. A promising in vivo protocol for noninvasive pneumonia treatment. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (Print). v.12, p.336,2015.
4. LEITE, ILAIÁLI SOUZA; GERALDE, MARIANA CARREIRA; SALINA, ANA CAROLINA GUERTA; IVO DE MEDEIROS, ALEXANDRA; BAGNATO, VANDERLEI SALVADOR; INADA, NATALIA MAYUMI. Nearinfrared antimicrobial PDT for *S. pneumoniae* and its effects on macrophage RAW 264.7 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (Print). v.12, p.352, 2015.
5. PANHOCA, V. H.; GERALDE, M. C.; CORREA, T. Q.; CARVALHO, M. T.; SOUZA, C. W. O.; BAGNATO, V. S. Enhancement of the Photodynamic Therapy Effect on Streptococcus Mutans Biofilm. **Journal of Physical Science and Application.** v.4, p.107 114, 2014.

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

1. LEITE, I. S.; GERALDE, M. C.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. Inativação de *Streptococcus pneumoniae* por terapia fotodinâmica: estudos in vitro e in vivo In: Controle Microbiológico com Ação Fotodinâmica.1 Ed. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017, v.1, p. 139160.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. GERALDE, M. C.; LEITE, ILAIÁLI S.; INADA, N. M.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KUEBLER, W. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. PDI on Pneumonia infection in vitro and in vivo study.16th International Photodynamic Association World Congress, 2017, Coimbra.
2. RAMIREZ, D. P.; SERRANO, A. P. P.; BARRETO, J. A.; CORREA, T. Q.; GERALDE, M. C.; INADA, N. M.; PIRES, L.; SALVIO, A. G.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photodynamic therapy associated with antifungal medication for

treatment of chromoblastomycosis In: European Academy of Dermatology and Venereology, 2014, Amsterdam.

3. GERALDE, M. C.; CORREA, T. Q.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; SOUZA, C. W. O. Study on the incubation time of curcumin in photodynamic therapy In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2012, Guarujá.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO EXPANDIDO)

1. CORRÊA, THAILA Q.; GERALDE, MARIANA C.; CARVALHO, MARIANA T.; BAGNATO, VANDERLEI S.; KURACHI, CRISTINA; DE SOUZA, CLOVIS W. O. Photodynamic inactivation of with curcuminoids: an study In: SPIE BiOS, San Francisco, 2016. p.969415

2. LEITE, ILAIÁLI S.; GERALDE, MARIANA C.; SALINA, ANA C.; MEDEIROS, ALEXANDRA I.; KURACHI, CRISTINA; BAGNATO, VANDERLEI S. Photodynamic inactivation of microorganisms which cause pulmonary diseases with infrared light: an study In: SPIE BiOS, San Francisco, 2014. p.89271A

3. GERALDE, MARIANA C.; LEITE, ILAIÁLI S.; INADA, NATALIA M.; GRECCO, CLÓVIS; MEDEIROS, ALEXANDRA I.; GERALDE, MARIANA C.; BAGNATO, VANDERLEI S. Pulmonary decontamination for photodynamic inactivation with extracorporeal illumination In: SPIE BiOS, San Francisco, 2014. p.89271B

ARTIGOS EM JORNAL DE NOTÍCIAS

1. LEITE, I. S.; INADA, N. M.; KURACHI, C.; GERALDE, M. C.; BAGNATO, V. S.; MEDEIROS, A. I. Terapia Fotodinâmica poderá ajudar a tratar pneumonia. Primeira Página. p.A4, 2014.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E PALESTRA

1. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KUEBLER, W. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. PDI on Pneumonia infection in vitro and in vivo study, 2017.

(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Portugal/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Univeristy of Coimbra; Cidade:Coimbra; Evento: 16th International Photodynamic Association World Congress.

2. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; TABUCHI, A.; KUEBLER, W. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Evaluation of the effect of PDI therapy on Pneumonia infection, 2016.

(Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Canadá/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Cidade: Toronto; Evento: ARTSLUTSKY DAY 2016; Inst.promotora/financiadora: Interdepartmental Division of Critical Care Medicine University of Toronto.

3. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; TABUCHI, A.; KUEBLER, W. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Evaluation of the effect of PDI therapy on Pneumonia infection: an in vitro and in vivo investigation, 2016.

(Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Canadá/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Cidade: Toronto; Evento: Annual Research Day Respirology day; Inst.promotora/financiadora: Department of Medicine University of Toronto.

4. GERALDE, M. C. Evaluation of the effect of PDI therapy on Pneumonia infection: an in vitro and in vivo investigation, 2016.

(Seminário, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Canadá/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Li Ka Shing Knowledge Institute (The Keenan Research Centre); Cidade: Toronto; Evento: Monday Meeting; Inst.promotora/financiadora: St. Michael's Hospital.

5. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KUEBLER, W. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Inativação fotodinâmica para tratamento de pneumonia – modelo *in vivo*, 2016.

(Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Cidade: São Carlos; Evento: V Simpósio de Biotecnologia da UFSCar 2016; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de São Carlos.

6. CORREA, T. Q.; GERALDE, M. C.; CARVALHO, M. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; SOUZA, C. W. O. Photodynamic inactivation of *Acanthamoeba polyphaga* with curcuminoids: an in vitro study, 2016.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: United States of America; Cidade: San Francisco; Evento: SPIE BiOS 2016; Inst.promotora/financiadora: SPIE.

7. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; MEDEIROS, A. I.; SALINA, A. C. G.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. A promising in vivo protocol for noninvasive pneumonia treatment, 2015.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Brasil; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: 15th International Photodynamic Association World Congress; Inst.promotora/financiadora: International Photodynamic Association.

8. LEITE, I. S.; GERALDE, M. C.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. Near infrared Antimicrobial PDT for *S. pneumoniae* and its Effects on Macrophage RAW 264.7 cells, 2015.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Brasil; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: 15th International Photodynamic Association World Congress; Inst.promotora/financiadora: International Photodynamic Association.

9. LEITE, I. S.; GERALDE, M. C.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. Photodynamic inactivation of microorganisms which cause pulmonary diseases with infrared light: an in vitro study, 2014.

(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Evento: SPIE Photonics West Event.

10. RAMIREZ, D. P.; GERALDE, M. C.; INADA, N. M.; PIRES, L.; ABBADE, L. P. F.; MARQUES, S. A.; BARRETO, J. A.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photodynamic therapy for treatment of chromoblastomycosis, 2014.

(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: The Moscone Center; Cidade: San Francisco; Evento: SPIE Photonics West Event; Inst.promotora/financiadora: SPIE.

11. LEITE, I. S.; GERALDE, M. C.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. Photodynamic therapy using indocyanine green for *Streptococcus pneumoniae* inactivation, 2014.

(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Holanda/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: NH Grand Hotel Krasnapolsky; Cidade: Amsterdam; Evento: Laser Europe 2014; Inst.promotora/financiadora: Laser Europe.

12. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; GRECCO, C.; MEDEIROS, A. I.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Pulmonary decontamination for photodynamic inactivation with extracorporeal illumination, 2014.

(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: The Moscone Center; Cidade: San Francisco; Evento: SPIE Photonics West Event; Inst.promotora/financiadora: SPIE.

13. LEITE, I. S.; GERALDE, M. C.; SALINA, A. C. G.; MEDEIROS, A. I.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. *Streptococcus pneumoniae* photodynamic inactivation with an infrared activated photosensitizer, 2014.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Escócia/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: The Caird Hall; Cidade: Dundee; Evento: The International Congress on Photodynamic Applications.

14. PANHOCA, V. H.; GERALDE, M. C.; CORREA, T. Q.; SOUZA, C. W. O.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial effect of photodynamic therapy on the *Streptococcus mutans* biofilm on orthodontic accessories (metallic surface), 2013.

(Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Federal de São Carlos; Cidade: São Carlos; Evento: IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar. Impactos da Biotecnologia na Medicina do Novo Milênio; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de São Carlos.

15. GERALDE, M. C.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; GRECCO, C.; MEDEIROS, A. I.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Descontaminação do sistema respiratório por inativação fotodinâmica: estudo in vivo, 2013.

(Seminário, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Federal de São Carlos; Cidade: São Carlos; Evento: IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar. Impactos da Biotecnologia na Medicina do Novo Milênio; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de São Carlos.

16. CORREA, T. Q.; GERALDE, M. C.; CARVALHO, M. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; SOUZA, C. W. O. Inativação fotodinâmica em Acanthamoeba polyphaga: análise por microscopia confocal, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Federal de São Carlos; Cidade: São Carlos; Evento: IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar. Impactos da Biotecnologia na Medicina do Novo Milênio; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de São Carlos.