

ICG e Inativação Fotodinâmica de *Streptococcus pneumoniae* no Infravermelho.

Ilaíali S. Leite¹, Mariana C. Geralde², Ana C. G. Salina³, Alexandra I. Medeiros⁴, Vanderlei S. Bagnato⁵, Natalia M. Inada⁶

1. Mestranda do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, Grupo de Óptica; *ilaiali.leite@gmail.com
2. Doutoranda do Programa de Pós-graduação de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, Grupo de Óptica
3. Mestranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Imunologia
4. Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Imunologia
5. Docente do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, Grupo de Óptica
6. Orientadora e Pesquisadora do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, Grupo de Óptica

Palavras Chave: Infravermelho, inativação fotodinâmica, *S. pneumoniae*

Introdução

A pneumonia, uma infecção de trato respiratório inferior, é a doença com maiores taxas de mortalidade infantil no mundo (1). Uma técnica que vem sendo utilizada para tratar diversas doenças é a terapia fotodinâmica, que consiste na atuação conjunta de três elementos: luz, uma substância fotoativa denominada fotossensibilizador e oxigênio molecular. Sua ação oxidativa sobre membranas celulares, membranas de organelas e diversas biomoléculas ocasiona a morte celular e de microrganismos. O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência da inativação fotodinâmica *in vitro* utilizando sistemas de iluminação emitindo no infravermelho, que apresenta maior penetração da luz em tecidos biológicos e indocianina verde (ICG - Indocianine Green) para fotossensibilizar o *Streptococcus pneumoniae*, uma das bactérias responsáveis pela pneumonia. Para avaliar a interação entre a terapia fotodinâmica e a ação do sistema imune, testes foram realizados com macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.

Resultados e Discussão

Três concentrações de indocianina verde foram testadas em suspensões bacterianas, contendo 10^7 bactérias por poço, preparadas em placas de 96 poços: 10, 5 and 1 μM . As placas foram incubadas por 20 minutos no escuro e depois submetidas à irradiação. Duas fontes de luz foram testadas: um equipamento a base de diodos emissores de luz (LEDs) com emissão em 850 nm (Biotable®, LAT-IFSC), e outro com lasers em 780 nm (Lasertable®, LAT-IFSC). Duas doses de luz foram padronizadas: 10 and 20 J/cm^2 . Uma placa espelho não foi irradiada, sendo mantida no escuro (controle). As placas foram mantidas por 4h no escuro em estufa antes da recuperação do número de unidades formadoras de colônia (UFC), efetuada por meio de diluições seriadas que foram plaqueadas em ágar-sangue, um meio que permite a identificação de colônias de *Streptococcus* spp. devido à hemólise apresentada. Os resultados mostram efeito citotóxico no escuro com 10 μM de ICG. Já a concentração de 5 μM não apresentou citotoxicidade no escuro e uma redução em torno de $5\log_{10}$ UFC após irradiado com a Lasertable®, nas duas doses de luz (figura 1). As reduções apresentadas pela menor concentração de ICG não ultrapassaram de $2\log_{10}$ em ambas as doses de luz aplicadas. Resultados semelhantes foram obtidos com a Biotable.

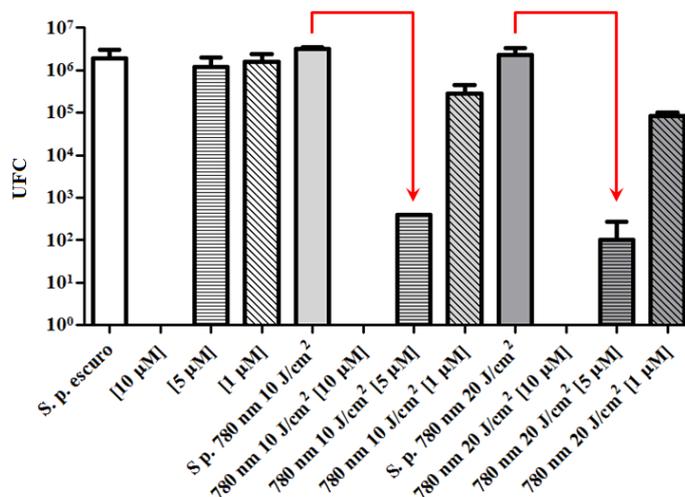


Figura 1. Gráfico representativo da inativação fotodinâmica de *S. pneumoniae* com Lasertable.

A segurança do protocolo de inativação microbiana foi avaliada utilizando-se a linhagem RAW 264.7 de macrófagos. Placas de 96 poços contendo 10^5 células/poço foram submetidas ao protocolo descrito para *S. pneumoniae* e a viabilidade celular foi estimada utilizando-se o ensaio de MTT. Resultados mostraram pouco impacto da terapia fotodinâmica sobre as células, com maior decréscimo no valor de viabilidade (24% de células inviáveis) sendo apresentado pela irradiação de 20 J/cm^2 com a Biotable®, na concentração de 10 μM .

Conclusões

Os experimentos realizados permitiram a determinação de um protocolo eficiente para a inativação fotodinâmica da bactéria *Streptococcus pneumoniae*. ICG à 5 μM demonstrou ser a concentração ótima para ambos equipamentos de irradiação (LED e Laser). O mesmo protocolo também se apresentou seguro quando testado com macrófagos, com insignificantes valores de citotoxicidade.

Agradecimentos

Capes e CEPOF (proc. 13/07276-1).

(1) Fact Sheet n. 331 "Pneumonia", Organização Mundial da Saúde, Novembro de 2013, < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>> (10 de Dezembro de 2013).