

Evidências do efeito da terapia fotodinâmica sobre a *Propionibacterium acnes*

Evidence of the effect of photodynamic therapy on *Propionibacterium acnes*

Rogério Rodrigo Ramos^{1,2}, Jeferson Leandro de Paiva³, Nagib Pezati Boer¹, Luis Fernando Ricci Boer⁴, Fernando Batigália⁵, José Maria Pereira de Godoy⁵

1. Docente do Departamento de Anatomia da Universidade Brasil, Fernandópolis, SP, Brasil. 2. Doutorado em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil. 3. Docente da Fundação Educacional de Fernandópolis, Fernandópolis, SP, Brasil. 4. Discente do curso de medicina pela Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP, Brasil. 5. Docente da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Resumo

Introdução: A *Propionibacterium acnes* é uma bactéria causadora da acne. Devido aos efeitos colaterais ou à falta de resposta ao tratamento da acne, foi proposta a terapia fotodinâmica como um tratamento alternativo para a acne. **Objetivo:** O objetivo foi evidenciar a ação fotodinâmica do LED vermelho 660 nm e do fotossensibilizador azul de metileno sobre *Propionibacterium acnes in vitro*. **Métodos:** Os ensaios foram constituídos por quatro grupos: 1. controle (sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador); 2. com aplicação de luz; 3. com fotossensibilizador e sem aplicação de luz; 4. com fotossensibilizador e com aplicação de luz. Os ensaios foram submetidos a aplicação de luz por 4 ciclos de 5 minutos com intervalos de 3 minutos. **Resultados:** Houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas médias dos grupos 1, 2 e 4, ainda que o grupo 3 não tenha apresentado significância estatística, mas houve redução detectada nas médias. **Conclusão:** A ação fotodinâmica é eficiente para a destruição do material biológico por irradiação a 660nm atribuída ao processo de fotossensibilização pela presença do fotossensibilizador.

Palavras-chave: Fármacos fotossensibilizantes. Fototerapia. Oxigênio singlete. Morte celular. *Propionibacterium acnes*.

Abstract

Introduction: *Propionibacterium acnes* is a bacterium that causes acne. Due to the side effects or the lack of response to acne treatment, photodynamic therapy was proposed as an alternative treatment for acne. **Objective:** To demonstrate the photodynamic action of the 660 nm red LED and the methylene blue photosensitizer on *Propionibacterium acnes in vitro*. **Methods:** Four groups were studied: 1. control (without light application and without photosensitizer); 2. with light application; 3. with photosensitizer and without light application; 4. with photosensitizer and light application. The assays were subjected to light application for 4 cycles of 5 minutes at 3 minute intervals. **Results:** There was a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in the means of groups 1, 2 and 4, although group 3 did not present statistical significance, but there was a reduction detected in the means. **Conclusion:** The photodynamic action is efficient for the destruction of the biological material by irradiation at 660nm attributed to the process of photosensitization by the presence of the photosensitizer.

Key words: Photosensitizing agents. Phototherapy. Singlet oxygen. Cell death. *Propionibacterium acnes*.

INTRODUÇÃO

A *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) é uma bactéria presente na microflora normal da pele e é uma das responsáveis pela acne. A acne é uma condição comum que afeta a unidade pilosebácea da pele, a qual é caracterizada pela presença de comedões abertos e fechados, pápulas, pústulas, nódulos, cistos e cicatrizes permanentes. A incidência ocorre, frequentemente, em jovens e adolescentes, podendo afetar diversas partes do corpo, sendo o rosto, a área mais atingida, prosseguindo na região dorsal e torácica anterior¹.

Para o tratamento da acne são usados medicamentos tópicos e orais. Mas há casos em que essas opções terapêuticas não podem ser usadas, seja por seus efeitos adversos, seja por contraindicações, principalmente, recidivas².

Visando à diminuição da utilização de fármacos, principalmente os efeitos colaterais e a resistência bacteriana aos antibióticos, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido apontada como um tratamento antimicrobiano alternativo de *P. acnes*. A PDT consiste na interação de luz visível de comprimento de onda adequado, de uma substância fotossensível marcadora em um meio biológico e de oxigênio encontrado nas células. Este processo fotoquímico produz substância citotóxica (radicais livres ou oxigênio singlete) aos micro-organismos, levando-os à morte celular³⁻⁵.

Diante do contexto apresentado, o objetivo do trabalho foi evidenciar o efeito da ação fotodinâmica do LED vermelho 660nm e fotossensibilizador azul de metileno sobre o *P. acnes in vitro*.

Correspondência: Rogério Rodrigo Ramos. Departamento de Anatomia da Universidade Brasil. Estrada projetada F1, S/N - Fazenda Santa Rita, Fernandópolis - SP, 15600-000. E-mail: rogerio_enfer@hotmail.com

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 11 Set 2017; Revisado em: 22 Maio 2018; Aceito em: 25 Maio 2018

MATERIAL E MÉTODO

Casuística e Local

Foi avaliada cepa de *P. acnes* ATCC (*American Type Culture Collection*) 6919, no laboratório de análises clínicas da Fundação Educacional de Fernandópolis (FEF), de novembro a dezembro de 2014.

Desenho do estudo

Foi avaliado, em laboratório de análises clínicas, cepa de *P. acnes* em estudo *in vitro* com delineamento inteiramente casualizado. O tratamento do *P. acnes* com cinco minutos por quatro ciclos com intervalo de três minutos utilizando método de irradiação com LED vermelho, 660nm, avaliado pelo contador de colônias mecânico, na clínica da FEF 2014.

Randomização

As suspensões de colônia de *P. acne* foram alocadas e distribuídas igualmente em todas as placas de Petri após cada ciclo.

Desenvolvimento

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por quatro grupos de tratamento, sendo: grupo 1 – grupo controle sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador, grupo 2 – com aplicação de luz, grupo 3 – com azul de metileno e sem aplicação de luz, grupo 4 – com azul de metileno e com aplicação de luz. O experimento foi conduzido em condições *in vitro* nos meses de novembro e dezembro de 2014.

Foram empregados tubos de ensaio com volume de 5mL, em que, inicialmente, foram depositados 1,1mL da suspensão bacteriana e 0,05mL de solução do fotossensibilizador (Fs) azul de metileno (AM). Os ensaios foram mantidos sob abrigo

da luz e 35oC por 15 minutos para o tempo de pré-irradiação (incorporação do Fs AM sobre *P. acnes*) e, posteriormente, submetidos à irradiação por quatro ciclos cinco minutos intervalados três minutos. As amostras foram irradiadas com LED vermelho com comprimento de onda 660nm, com intensidade de energia de 35mW. A cada ciclo foi removida uma alíquota de 0,05mL e transferida para uma placa Petri contendo TSA. A alíquota transferida foi uniformemente distribuída, com o auxílio de alça de drigalski e as placas foram incubadas a 35oC por 24 horas. Decorrido esse período, foi efetuada a contagem de unidade formadora de colônia (UFC) pelo contador de colônias mecânico modelo CP 608. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Análise dos dados

As 48 amostras colhidas foram analisadas quanto à distribuição mediante testes Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson, mostrando distribuição próxima da normalidade. O tratamento estatístico para comparação dos diferentes tempos terapêuticos dentro de um mesmo grupo se deu mediante teste não paramétrico one-way ANOVA com pós-teste de Tukey adotando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada grupo foi analisado isoladamente. Para a análise comparativa entre os grupos, foi utilizado teste two-way ANOVA para medidas não repetidas e pós-teste de Bonferroni para comparação de grupos. O intervalo de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a comparação das médias, obtidas das análises em triplicata das amostras, em relação aos diferentes grupos e aos diferentes tempos. A média está relacionada ao desvio-padrão, demonstrando o desvio provável de cada grupo em relação às amostras testadas. As legendas (a) e (b) representam os tempos dentro de um mesmo grupo que apresentaram diferença significante entre si.

Tabela 1. Comparação da média \pm desvio-padrão do número de colônias obtidas após os diferentes tempos experimentais.

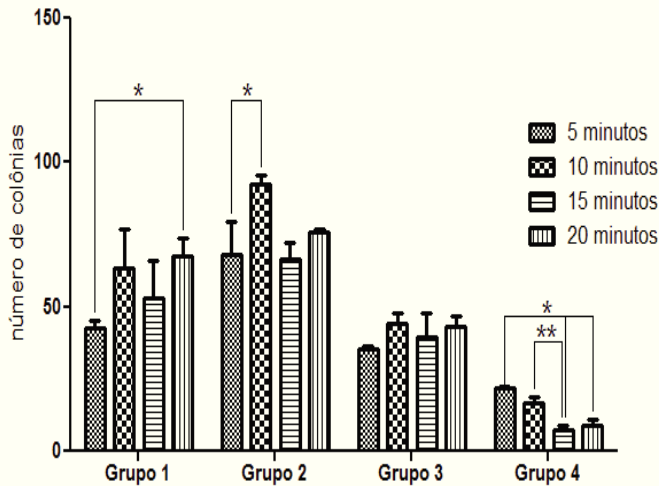
Grupos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	Valor de p
Grupo 1	42,67 \pm 4,51(a)	63,67 \pm 22,50	53,00 \pm 18,38	67,33 \pm 11,59(a)	0,028
Grupo 2	68,00 \pm 19,67(a)	92,67 \pm 5,51(a)	66,50 \pm 7,78	76,00 \pm 1,41	0,014
Grupo 3	35,33 \pm 1,53	44,00 \pm 5,66	39,50 \pm 12,02	43,00 \pm 6,56	0,480
Grupo 4	21,67 \pm 1,53(a)	16,50 \pm 3,54(b)	7,50 \pm 2,12(a,b)	9,00 \pm 2,83(a)	0,004

Grupo 1 - sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador (grupo controle), Grupo 2 - aplicação de luz sobre a bactéria, Grupo 3- fotossensibilizador sem irradiação de luz; e Grupo 4- fotossensibilizador com luz. As letras (a) e (b) representam a diferença entre os tempos experimentais dentro de um mesmo grupo.

A Figura 1 representa o número de colônias obtido para cada um dos quatro grupos, relacionando os tempos de tratamento dentro de um mesmo grupo. No Grupo 1, houve diferença significativa apenas entre os tempos de 5 e 20 minutos. No Grupo 2, a diferença se deu entre os tempos de 5 e 10 minutos.

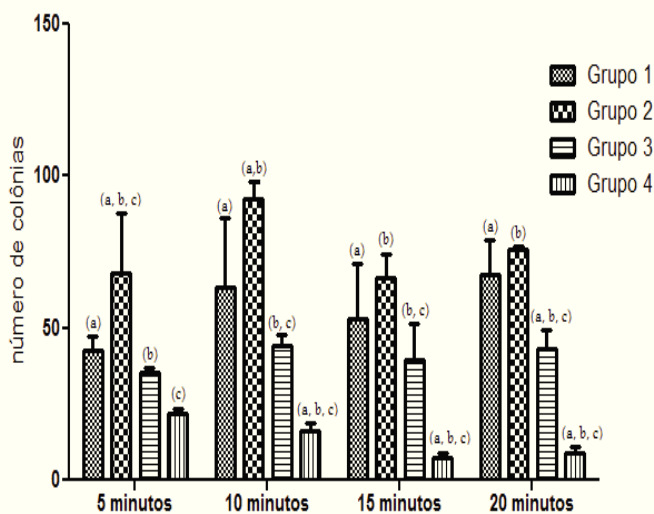
No Grupo 3, não houve diferença entre os diferentes tempos de tratamento. E, no Grupo 4, houve diferença entre o tempo de 5 minutos e os tempos de 15 e 20 minutos, bem como houve diferença entre o tempo de 10 minutos e o tempo de 15 minutos.

Figura 1. Análise dos diferentes tempos experimentais dentro de um mesmo grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número total de colônias e os tempos experimentais, representados pelas legendas (* e **), $p < 0,05$.



A Figura 2 representa a comparação entre os diferentes tempos de tratamento e os resultados obtidos no número de colônias de cada um dos quatro grupos. No tratamento de 5 minutos, houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 (a), entre os Grupos 2 e 3 (b), e entre 2 e 4 (c). No tratamento de 10 minutos, houve diferença entre o grupo 1 e os Grupos 2 e 4 (a), entre o grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b), e entre os Grupos 3 e 4 (c). No tempo de 15 minutos a diferença se deu entre os Grupos 1 e 4 (a), entre o Grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b), e entre os Grupos 3 e 4 (c). No tempo de 20 minutos houve diferença entre o Grupo 1 e os Grupos 3 e 4 (a), entre o Grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b) e entre os Grupos 3 e 4 isoladamente (c).

Figura 2. Relação entre o número total de colônias e os diferentes tempos amostrais para cada grupo. Na comparação dos grupos entre si para cada tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos representados pelas legendas (a), (b) e (c), $p < 0,05$.



DISCUSSÃO

O resultado mostra que a atividade fotodinâmica em *Propionibacterium acnes* está relacionada a uma adequada incorporação do fotossensibilizador, a qual pode ser maximizada pela irradiação da luz.

A análise comparativa entre os diferentes tempos de tratamento dentro de um mesmo grupo está representada na Tabela 1 e na Figura 1. Pode-se observar que o tratamento, realizado no Grupo 1, mostrou eficiência apenas no controle dos números de UFCs, visto que, com uma exposição de 5 minutos, apresentou número significativamente menor de colônias que a obtida em 20 minutos. Além disso, após 10 minutos de tratamento, o número de colônias pareceu se estabilizar, chegando aos 20 minutos de exposição sem diferença notória entre os tempos de 10, 15 e 20 minutos. Fato semelhante pode ser observado no tratamento proposto ao Grupo 3, em que não houve diferença entre os tempos de exposição, mas, com relativa diminuição aparente na exposição de 5 minutos. Comparativamente entre Grupos, exposto na Figura 2, o Grupo 1 e o Grupo 3 também não apresentaram diferenças significantes em relação à redução do número de colônias, seguindo um padrão de semelhança. Porém, após 20 minutos de tratamento, o Grupo 3 mostrou uma significativa redução em relação ao Grupo 1, sua terapia, então, poderia ser mais eficiente a um tratamento mais prolongado.

O tratamento proposto ao Grupo 2 mostrou que houve diferença entre a aplicação de 5 minutos e a de 10 minutos, em que o número de colônias se mostrou superior. Após 15 minutos, o número de colônias apresentou tendência à diminuição, mas não suficiente para demonstrar diferença significativa em relação ao primeiro tempo, de 5 minutos. Quando analisado em relação aos demais grupos, o Grupo 2 apresentou o maior número total de colônias obtidas em todos os tempos amostrais, sendo equiparado apenas pelo Grupo 1 nos tempos de 15 e 20 minutos (Figura 2). Pode-se inferir que, entre os tratamentos propostos esse grupo foi o que apresentou pouco efeito.

Já o tratamento, realizado no Grupo 4, apresentou diferenças significantes entre os diferentes tempos amostrais, com diminuição acentuada no número de colônias em relação ao mais longo período de exposição à fonte luminosa. Entre os primeiros 5 e 10 minutos essa diferença não foi aparente, porém revelada quando analisado o tempo de 5 minutos em relação aos de 15 e 20 minutos, mostrando eficiência no tratamento em um intervalo mais longo de tempo. Em relação aos outros três grupos, como observado no Figura 2, o Grupo 4 foi o que mostrou os melhores resultados, uma redução significativa do número de colônias frente às fototerapias de 10, 15 e 20 minutos.

No estudo de König, et al⁶, foi analisada a atividade da PDT, sem o uso de fotossensibilizadores contra *P. acnes*. Em seu trabalho, foi constatada a presença de endoporfirinas (Fs endógenos) na bactéria pelo uso de fluorescência. Mediante ao fato, os

autores descreveram que a PDT pode ser utilizado sem o uso de fotossensibilizadores para o tratamento de acne, desde que o comprimento de onda seja compatível com o Fs endógeno⁶. Porém, o tratamento utilizado somente a irradiação (Grupo 2) resultou em efeito antagônico, não houve redução ou inibição da bactéria e, sim, a proliferação de *P. acnes*. Os resultados mostram que apenas a exposição de *P. acnes* à luz em dose de comprimento de onda 660nm, com intensidade de energia de até 35mW, não tem efeito tóxico sobre a bactéria.

Já o tratamento do fotossensibilizador na ausência de luz (Grupo 3) apresentou ação bactericida, pois é observada a redução das UFCs da bactéria. Essa atividade é devido à incorporação do Fs sobre *P. acnes*, isso leva à otimização do processo oxidativo celular. Dessa forma, sabendo-se que o Fs pode encontrar-se tanto nas paredes celulares, como em organelas, desse modo, o efeito citotóxico pode ocorrer de forma generalizada, propagando-se tanto por ataque interno (meio intracelular) como externo (meio extracelular), o que justifica a redução de *P. acnes*. Liu et al⁷, explica que o fotossensibilizador apresenta caráter catiônico e por isso liga-se em ambientes com cargas opostas⁷, dessa maneira, acumula-se preferencialmente, em mitocôndria, pelo fato de o ambiente eletroquímico da matriz mitocondrial ser negativo⁸. Sendo assim, o Fs catiônico se liga à região polianiónica do DNA e isso leva à degradação oxidativa das bases via oxigênio singleto, o que viabiliza a morte celular⁹.

O resultado da ação fotodinâmica (Grupo 4) é observado

somente após a irradiação 660nm sobre *P. acnes*, em que ocorre uma inibição significativa no número de UFCs da bactéria. A eficiência observada pode ser atribuída não somente a fonte de irradiação, mas também ao efeito citotóxico do fotossensibilizador. Dessa forma, quando associados à luz com o Fs, a ação fotodinâmica se inicia por transferência de hidrogênios ou elétrons, reações radiculares ou por ataque eletrofílico do oxigênio singleto, levando à destruição do material biológico^{10,11}. Fator importante do fotossensibilizador azul de metileno, é que a banda de absorção de luz ocorre na região de comprimento de onda entre 620-660 nm. Essa característica do Fs garante a penetração da luz no material biológico, quando usado o comprimento de onda próximo a essa região¹². Portanto, o comprimento de onda 660 nm da luz LED foi eficiente para a fotoestimulação do Fs, pois o estudo mostra que a ação fotodinâmica da luz sobre *P. acnes* está relacionada a uma adequada incorporação do Fs, a qual pode ser notada a morte celular.

CONCLUSÃO

A estratégia catiônica adotada no fotossensibilizador viabiliza maior incorporação em menor tempo, o que maximiza o tratamento por exposição à irradiação, o que conclui que a ação fotodinâmica é eficaz no tratamento para as populações do micro-organismo contaminante.

REFERÊNCIAS

1. Al-Talib H, Al-khateeb A, Hameed A, Murugaiah C. Efficacy and safety of superficial chemical peeling in treatment of active acne vulgaris. *An Bras Dermatol*. 2017 Mar; 92(2): 212-216. PubMed PMID: 28538881.
2. Keyal U, Bhatta AK, Wang XL. Photodynamic therapy for the treatment of different severity of acne: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Jun; 14:191-199. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.04.005. PubMed PMID: 27090488.
3. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun; 48(6): 2173-2178. PubMed PMID: 15155218.
4. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jun; 49(6): 2329-2335. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005. PubMed PMID: 15917529.
5. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Marle JV. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May; 49(5):2026-2034. doi: 10.1128/AAC.49.5.2026-2034.2005. PubMed PMID: 15855528.
6. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol*. 2000 Nov; 46(7):1297-1303. PubMed PMID: 11075959.
7. Liu T, Li Y, Du Q, Sun J, Jiao Y, Yang G, et al. Adsorption of methylene blue from aqueous solution by graphene. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012 Feb; 90:197-203. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.019. PubMed PMID: 22036471.
8. Severino D, Junqueira HC, Gugliotti M, Gabrielli DS, Baptista MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol*. 2003 May; 77(5):459-468. PubMed PMID: 12812286.
9. Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Dec; 16(4):381-394. PubMed PMID: 11118846.
10. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF, et al. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomed Laser Surg*. 2011 Oct; 29(10):711-715. doi: 10.1089/pho.2010.2915. PubMed PMID: 21671755.
11. Weber G1, Charitat T, Baptista MS, Uchoa AF, Pavani C, Junqueira HC, et al. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membrane. *Soft Matter*. 2014 Jun; 10(24): 4241-4247. doi: 10.1039/c3sm52740a. PubMed PMID: 24871383.
12. Wainwright M. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dyes and Pigments*. [Internet]. 2007 Dec [acesso 2017 Jun 7]; 73(1):7-12. doi: https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.10.001. Disponível em: https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/phenothiazinium-photosensitisers-v-photobactericidal-activities-of-6p0k6JSEUa. Doi: 10.1016/j.dyepig.2005.10.001.

Como citar este artigo/How to cite this article:

Ramos RR, Paiva JL, Boer NP, Boer LFR, Batigália F, Godoy JMP. Evidências do efeito da terapia fotodinâmica sobre a *Propionibacterium acnes*. *J Health Biol Sci*. 2018 Jul-Ago; 6(3):269-272