

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Flávia Luna Lima

**“Estudo da ação da oxigenação hiperbárica em *Pseudomonas*
aeruginosa”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FLAVIA LUNA LIMA
Selma Giorgio
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio
Co-Orientadora: Dra. Luciana Maria de Hollanda

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L628e

Lima, Flávia Luna

Estudo da ação da oxigenação hiperbárica em
Pseudomonas aeruginosa / Flávia Luna Lima. – Campinas,
SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Selma Giorgio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Oxigenação hiperbárica. 2. Imipenem. 3.
Macrófagos. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Giorgio,
Selma, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Study of the effect of hyperbaric oxygenation in *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave em inglês: Hyperbaric oxygenation; Imipenem; Macrophages; *Pseudomonas aeruginosa*.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Selma Giorgio, Domingos da Silva Leite, Rodrigo Ramos Catharino, Liana Verinaud, Elsa Masae Mamizuka.

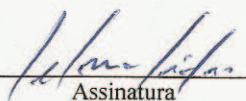
Data da defesa: 21/06/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 21 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Selma Giorgio (Orientador(a))


Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite


Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino


Assinatura

Profa. Dra. Liana Verinaud

Assinatura

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da Capes e da FAPESP (Processo 2009/01817-5).

“Um desistente nunca ganha e um vencedor nunca desiste.”

(Napolean Hill)

*Aos meus pais, Antonio e Neusa e ao meu noivo Clayton, que
sempre acreditaram e torceram por mim, com todo meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por permitir a conclusão desse trabalho e dessa etapa de minha vida.

À Profa. Dra. Selma Giorgio pela orientação, oportunidade, dedicação, seriedade, incentivo e confiança.

Aos meus pais, Neusa e Antonio, que são um exemplo de amor e dedicação e sempre me incentivaram e forneceram condições para que eu seguisse em frente.

Ao meu amigo e futuro esposo Clayton, que todos os dias me ouviu, me deu forças e colaborou com o meu sucesso. Obrigada amor.

Ao meu irmão, Fausto, que sempre me contagiou com sua alegria e me fez viver momentos mais felizes.

Aos amigos do laboratório de leishmaniose Larissa, Alexandra, Solange, Marina, Adriana, Ademar, Bárbara e Myrian pela amizade, apoio e ajuda, sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e seus alunos, em especial a Bruna, pela colaboração, paciência, prestatividade, orientação e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Marcello Lancellotti e Dra. Luciana Hollanda por sempre terem me recebido de portas abertas, e também pela orientação.

Aos funcionários do departamento de parasitologia, em especial Cirene, pela companhia e amizade, João e Nilson por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos professores Dr. Paulo Joazeiro e Dra. Silvy Maria-Engler pela colaboração.

Ao pessoal do laboratório de biotecnologia pelo carinho e diversão.

As meninas da república Vania, Valéria, Juliana, Liciane, Tati e Gabriela pela amizade, força e carinho.

As minhas grandes amigas Cecília e Michely, que mesmo à distância sempre estiveram presentes. Obrigada pela força, amizade e torcida.

Aos professores Domingos da Silva Leite e Rodrigo Ramos Catharino pela participação na banca prévia.

Mais uma vez à Deus, por colocar em meu caminho anjos que me ajudaram a vencer.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais patógenos oportunistas responsáveis pelas infecções nosocomiais. Essas infecções representam um grave problema de saúde para pessoas com feridas graves e queimaduras, sendo responsável por altas taxas de mortalidade nos pacientes. Os tecidos cronicamente lesados apresentam microáreas de hipóxia, pouco vascularizadas, que são extremamente difíceis de serem tratadas, diminuem e alteram os efeitos dos medicamentos propiciando que linhagens multiresistentes desse patógeno infectem e sobrevivam. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de tratamentos que sejam eficazes tanto no combate do patógeno, como na regeneração do tecido destruído. A terapia com oxigenação hiperbárica (HBO) promove a regeneração tecidual pela formação de novos vasos, apresenta propriedades bacteriostáticas e bactericidas e pode atuar de forma sinérgica com antibióticos. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da HBO no crescimento de *P. aeruginosa*, na ação de imipenem e em macrófagos e peles artificiais infectadas com esse patógeno. Nossos resultados mostraram que a exposição de seis cepas de *P. aeruginosa* a HBO (100% de O₂ a 3 ATA pressão) diminui o crescimento bacteriano, além de potencializar o efeito de imipenem/cilastatina no combate a esta bactéria. A exposição a HBO durante 90 minutos protegeu macrófagos peritoneais da lise causada pela infecção bacteriana. Quando peles artificiais infectadas com *P. aeruginosa* foram expostas a HBO a carga bacteriana destes tecidos diminuiu. Os nossos resultados evidenciam a importância do tratamento hiperbárico no controle de infecções causadas por este patógeno.

Palavras-chaves: HBO, oxigenação hiperbárica, imipenem, macrófagos, *Pseudomonas aeruginosa*, peles artificiais.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a major opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections. These infections represent a serious health problem for people with severe wounds and burns and are responsible for high mortality rates in these patients. The chronically injured tissues have small areas of hypoxia, these areas, low vascularization, are extremely difficult to treat, reduce and alter the effects of medicines providing that multiresistant strains of this pathogen to infect and survive in these places. Thus, it is essential to develop a treatment that is effective both in combating the pathogen, as in the regeneration of damaged tissue. Therapy with hyperbaric oxygen (HBO) promotes tissue regeneration by new vessel formation, has bacteriostatic and bactericidal properties and can act synergistically with antibiotics. The aim of this study was to evaluate the role of HBO on the growth of *P. aeruginosa*, in the imipenem action and infected macrophages and artificial skin infected with this pathogen. Our results show that exposure of six strains of *P. aeruginosa* to hyperbaric conditions (100% O₂ at 3 ATA pressure) reduces bacterial growth, and maximize the effect of imipenem/ cilastatina against this bacterium. Exposure to HBO for 90 minutes protected macrophages from lysis caused by bacterial infection. Artificial skins infected with *P. aeruginosa* and exposed to HBO showed a decrease in bacterial load. These results support the importance of hyperbaric oxygen therapy in control infections caused by this pathogen.

Key- words: HBO, hyperbaric oxygen, imipenem, macrophages, *Pseudomonas aeruginosa*, artificial skin.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Objetivos	5
3. Materiais e métodos.....	6
3.1 Linhagens de <i>P. aeruginosa</i>	6
3.2 Exposição a HBO.....	6
3.3 Ação da HBO com a bactéria crescida em sólido <u>com</u> e <u>sem</u> antibiótico.....	7
3.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	7
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	7
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	8
3.7 Infecção de macrófagos peritoneais com <i>P. aeruginosa</i>	8
3.8 Ensaio de toxicidade da HBO (MTT).....	9
3.9 Filme.....	10
3.10 Peles artificiais como modelo para infecção com <i>P. aeruginosa</i>	10
3.11 Histologia.....	11
3.12 Análise dos resultados.....	11
4. Resultados	12
4.1 Caracterização das cepas bacterianas quanto a sensibilidade/resistência.....	12
4.2 Concentrações de antibiótico utilizadas.....	17
4.3 Ação da HBO em <i>P. aeruginosa</i> crescida em meio sólido <u>com</u> e <u>sem</u> antibiótico.....	17
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24
4.5 Infecção de macrófagos peritoneais com <i>P. aeruginosa</i>	28
4.6 Peles artificiais como modelo para infecção com <i>P. aeruginosa</i>	33
5. Discussão.....	38
6. Conclusões.....	43
7. Referências bibliográficas.....	44
8. Anexos.....	48

1. Introdução

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não fermentador da glicose e não produtor de esporos pertencente à família Pseudomonadaceae. Habitante comum do solo e de outros ambientes naturais é caracterizado por uma imensa diversidade ecológica e talvez seja a espécie que ocupa a mais ampla variedade de nichos (Joklik, Willet et al. 1994; Tortora, Funk et al. 2005; Kulasekara e Lory 2004; Qarah, Cunha et al. 2008). Este microrganismo é extremamente adaptável e chega a utilizar mais de 80 compostos orgânicos para a sua proliferação, tolerando e sobrevivendo bem a grandes variações de temperatura e umidade (Gales, Reis et al. 2001).

P. aeruginosa raramente se torna causa de infecções em indivíduos saudáveis, assumindo importância em pessoas com algum comprometimento imunológico. Neste contexto, este patógeno é um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares (Gaynes e Edwards 2005; Fuentefria, Ferreira et al. 2008). As infecções hospitalares são uma grande preocupação para órgãos públicos de saúde e para as comissões internas de controle de infecção hospitalar. Bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, são patógenos extremamente importantes que causam infecções graves em diferentes partes do corpo humano e podem levar o paciente a morte (Gales, Menezes et al. 2003; Gales, Tognim et al. 2003; Mendes, Castanheira et al. 2006).

Dados da literatura médica e microbiológica e do programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program) mostram que *P. aeruginosa* foi a primeira causa de pneumonia associada à ventilação mecânica, segunda causa de pneumonia hospitalar, infecção urinária, infecção de feridas cirúrgicas e infecção de queimaduras e sétima causa de infecções da corrente

sanguínea. Além disso, durante as últimas quatro décadas a incidência deste patógeno foi responsável por 10% de todas as infecções nosocomiais (Hoban, Biedenbach et al. 2003; Figueiredo-Mendes, Sinto et al. 2005; Jones 2010). *P. aeruginosa* desempenha um papel importante como agente etiológico de infecções graves em pacientes com queimaduras. As queimaduras agudas causam ruptura na barreira protetora da pele e suprimem o sistema imunológico, tornando os pacientes altamente susceptíveis à infecção bacteriana. A colonização de queimaduras graves por *P. aeruginosa* e sua rápida proliferação dentro dos tecidos danificados freqüentemente levam a infecções disseminadas, resultando em bacteremia e choque séptico, responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade (Pruitt 1984; Church, Elsayed et al. 2006). O tratamento dessas infecções é dificultado pela resistência inata e adquirida de *P. aeruginosa* a muitos antimicrobianos (MacManus, Mason et al. 1985; Church, Elsayed et al. 2006). A resistência adquirida dessa bactéria se dá através de vários mecanismos, incluindo a produção de β -lactamases, expressão de bombas de efluxo e, mutações na parede celular que reduzem os canais de porina (Lambert 2002). A ceftazidima, o meropenem e o imipenem são os antibióticos mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Porém a administração destes antibióticos tem se tornado cada vez mais complicada devido à crescente ocorrência de cepas resistentes (Cacci 2007). Estima-se que pelo menos 50% das mortes em pacientes queimados são resultado de infecção, e infecções incuráveis tem se tornado uma frequente ocorrência em pacientes infectados com *P. aeruginosa* (Cryz 1984; Church, Elsayed et al. 2006). Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e profiláticas para o controle da infecção bacteriana em pacientes com queimaduras é necessário.

Os tecidos cronicamente lesados, como os apresentados pelas pessoas queimadas, apresentam microáreas de hipóxia. Estas áreas, pouco vascularizadas, são extremamente

difíceis de serem curadas e uma alternativa de tratamento importante a ser investigada é a HBO (Clark e Moon 1999; Moon e Camporesi 1999). A HBO é um procedimento terapêutico através do qual 100% de oxigênio é administrado a uma pressão superior a pressão atmosférica (1 ATA – atmosfera absoluta = 760 mm Hg), geralmente entre 2,5 a 3 ATA, levando ao estado de hiperóxia (Plafki, Peters et al. 2000).

O tratamento hiperbárico participa de múltiplos processos durante a cura de uma ferida, incluindo morte oxidativa de bactérias, re-epitelização e angiogênese (Heng, Harker et al. 2000; Sheikh, Gibson et al. 2000; Hopf, Gibson et al. 2005; Patel, Chivukula et al. 2005; Gordillo, Roy et al. 2008; Cimsit, Uzun et al. 2009; Niu, Yuan et al. 2011). Mais especificamente, a HBO eleva os níveis sistêmicos e locais de oxigênio necessários para a produção de ATP, síntese de proteínas e formação de novos vasos, funções estas que estariam alteradas devido à hipóxia tecidual (Clark e Moon 1999; Moon e Camporesi 1999; Zhang, Chang et al. 2008). As mudanças na tensão de oxigênio alteram a atividade de muitos agentes antimicrobianos, o que resulta em efeitos positivos na atividade dos mesmos contra as bactérias (Park, Muhvich et al. 1991). Estudos realizados com tobramicina, canamicina e estreptomicina demonstraram que tais drogas são mais eficazes na presença de elevadas concentrações de oxigênio (Brown, Silverberg et al. 1968; Greensmith 2004). O imipenem é um antibiótico importante no tratamento de infecções polimicrobianas, particularmente aquelas causadas por organismos resistentes (Clissold, Todd et al. 1987). Tal medicamento é uma forma de combate efetiva no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (Clissold, Todd et al. 1987) porém sua ação nunca foi avaliada em adição a terapia com HBO.

Estudos *in vitro* com macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *P. aeruginosa* realizados por Weislow e Pakman (1974) demonstraram que, o tratamento com

HBO aumentou o “*clearance*” de bactérias fagocitadas pelos macrófagos. No entanto, outro estudo realizado por Morrow e colaboradores, no qual utilizaram células RAW 264,7 e macrófagos alveolares revelou que a exposição de tais células a altas concentrações de oxigênio diminuem a fagocitose de *P. aeruginosa* (Morrow, Entezari-Zaher et al. 2007). Desta forma, podemos verificar que o efeito da HBO sobre *P. aeruginosa* e a atividade fagocítica de macrófagos ainda não é completamente entendido e diferentes resultados são encontrados na literatura.

Uma das limitações encontradas na pesquisa com HBO era o fato de não existirem modelos *in vitro* intimamente relacionados ao tecido humano que pudessem ser utilizados no desenvolvimento e avaliação de protocolos de tratamento (Dimitrijevič, Paranjape et al. 1999). Avanços na pesquisa ao longo dos últimos 20 anos permitiram o desenvolvimento de peles criadas em laboratório muito semelhantes à pele humana normal (Ghosh, Boyce et al. 1997; Chakrabarty, Dawson et al. 1999; Netzlaff, Lehr et al. 2005; MacNeil 2007; Brohem, Cardeal et al. 2011). Esse tecido equivalente a pele humana, também chamado de pele artificial, possibilitou o estudo do processo de invasão microbiana da pele, assim como, metodologias de combate ou diminuição da carga bacteriana de feridas cutâneas (Shepherd, Douglas et al. 2009). Modelos de infecção de peles artificiais com *P. aeruginosa* já foram utilizados por alguns autores para estudar o processo de invasão e colonização bacteriana da pele e o desenvolvimento de possíveis metodologias de controle da infecção (Bargues, Boyer et al. 2009; Shepherd, Douglas et al. 2009; Shepherd, Sarker et al. 2011), porém a abordagem terapêutica da HBO junto a esses modelos nunca foi avaliada.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação da HBO no crescimento de *P. aeruginosa*.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Estudar a morfologia celular bacteriana e o número de bactérias viáveis pós-tratamento com HBO e HBO + imipenem;
- 2) Avaliar os efeitos da HBO sobre macrófagos peritoneais, analisando a fagocitose, o número de bactérias viáveis e as alterações na morfologia das células;
- 3) Avaliar, a morfologia e a número de bactérias de peles artificiais infectadas com *P. aeruginosa*, pós-tratamento com HBO.

3. Materiais e métodos

3.1 Linhagens de *P. aeruginosa*

A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi fornecida pela Prof. Dra. Regina Lúcia Baldini (Instituto de Química- USP), a cepa FC01 (PaIMI) resistente e a linhagem 67eNM pertencem à coleção de culturas da Dra. Luciana Maria de Hollanda (Instituto de Biologia – UNICAMP), enquanto que as outras três linhagens, isolados clínicos de pacientes com infecção de traquéia, foram fornecidas pelo Hospital de Clínicas da Unicamp. As três linhagens, denominadas PaHC1, PaHC2 e PaHC3 (Pa = *P. aeruginosa*; HC = Hospital de Clínicas), são resistentes a imipenem.

3.2 Exposição a HBO

A exposição a HBO foi realizada em uma câmara hiperbárica modular (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist Inc., Inaheim, CA – USA) com 100% de oxigênio medicinal (White Martins, Campinas, SP, Brasil) a 3 ATA de pressão. Manguueiras circulando água quente no interior da câmara de HBO permitiram o aquecimento da mesma à temperatura de 37°C. Essas manguueiras foram ligadas a um circulador de água com sistema de aquecimento (PolyScience, série 9100, modelo 9112). A temperatura foi constantemente controlada através do termômetro da câmara. Para todos os experimentos a temperatura da câmara e estufa foi de 37°C. As culturas de bactérias e peles artificiais foram tratadas com HBO por 5 horas e as culturas de macrófagos por 90 minutos.

3.3 Ação da HBO com a bactéria crescida em meio sólido com ou sem antibiótico

As cepas bacterianas cresceram em 6 ml de meio Muller Hinton (MH) durante 18 horas a 37°C com agitação de 150 rpm. Um ml do inóculo pré-crescido foi adicionado em 30 ml de meio MH novo e incubado a 37°C durante 3 horas a 200 rpm para que fosse atingida a fase logarítmica. Alíquotas de 500µl foram distribuídas em placas de petri contendo meio MH ágar com ou sem imipenem/cilastatina 500mg (ABL medicamentos do Brasil). As concentrações de antibiótico utilizadas variaram de acordo com cada cepa de *P. aeruginosa*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após 5 horas na estufa ou na HBO, 100µl de cada amostra foi retirada para a contagem de UFC (subitem 3.4).

3.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Após 5 horas na HBO ou em estufa, amostras de 1 ml das culturas bacterianas foram homogeneizadas e adicionadas em microtubo estéril. Deste volume, 100 µl foram retirados e diluídos em microtubos contendo 900 µl de solução salina estéril. Foram feitas 8 diluições de razão 10 para posterior plaqueamento e contagem de UFC.

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima de imipenem (Sigma) e imipenem/cilastatina 500mg (ABL medicamentos do Brasil) foi realizada segundo as metodologias de microdiluição em caldo, proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009), e E-test. Para os testes com microdiluição foram testadas diluições de 0,6 µg/ml a 40µg/ml de antibiótico. Também foram feitas placas de meio MH ágar com

concentrações de 4µg/ml e 16µg/ml de imipenem/cilastatina. Os inóculos bacterianos e a leitura dos resultados foram realizados segundo as normas do CLSI (2009).

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises estruturais das bactérias tratadas ou não tratadas com HBO foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP em colaboração com o Porf. Dr. Paulo Pinto Joazeiro. Após 5 horas na HBO ou na estufa, com ou sem antimicrobianos, 1 ml de cultura bacteriana de cada placa foi transferido para microtubos e centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 3% de Glutaraldeído dissolvido em tampão cacodilato (0,067M de cacodilato; 1% de sucrose (pH 7.3) e estocado a 5°C). Os microtubos foram incubados por 12 horas a 4°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 3 minutos. O pellet foi novamente lavado em tampão cacodilato e fixado em tetróxido de ósmio. As amostras fixadas foram desidratadas em gradiente de alcoóis e óxido de polipropileno e embebidas em Epon 812. Os cortes semi-finos e ultra-finos com espessura de 0,5µm e 60nm, respectivamente, foram realizados em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT), colados em grids para microscopia eletrônica, corados com acetato de uranila e visualizados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Leo 906, série 9127) (Clark e Pakman 1971; Arrais-Silva, Collhone et al. 2005).

3.7 Infecção de macrófagos peritoneais com *P. aeruginosa*

Os macrófagos foram obtidos de camundongos Balb/c fêmeas, saudáveis, com 6 semanas de vida, através de lavagem peritoneal. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 25µg/ml de gentamicina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)

(Degrossoli, Bosetto et al. 2007). As culturas de células foram mantidas durante 24 horas em placas de 24 poços (contendo 2×10^5 macrófagos/poço) em estufa com 21% de O₂, 5% de CO₂ e N₂ balanceado, a 37°C (Degrossoli, Bosetto et al. 2007). O meio foi retirado, a cultura lavada com salina e um novo meio sem antibiótico e sem SFB adicionado. Os macrófagos foram infectados com a cepa ATCC de *P. aeruginosa*. Utilizamos proporções de 0,0002 bactérias:1macrófago, 0,002 bactérias:1macrófago, 0,2 bactérias:1macrófago, 2 bactérias:1macrófago e 20 bactérias:1macrófago na infecção. As células infectadas foram mantidas na estufa ou na HBO durante 90 minutos. Após este tempo retiramos alíquota de 100µl do sobrenadante para contagem das UFC. Em seguida o sobrenadante foi descartado, as culturas celulares lavadas três vezes com salina estéril e adicionado um novo meio com 200µg/ml de gentamicina para morte das bactérias não internalizadas. Após 30 minutos o meio com antibiótico foi retirado, as culturas celulares lavadas três vezes com salina estéril e adicionado salina com 0,1% de Triton X-100. As UFC das células lisadas foram avaliadas. Os poços com lamínulas foram fixados com metanol e corados com Giemsa para visualização ao microscópio óptico (Giorgio, Linares et al. 1998). Vinte campos foram contados por lamínula para avaliar o número de macrófagos íntegros observados em cada tratamento.

3.8 Ensaio de toxicidade da HBO (MTT)

Os macrófagos peritoneais foram expostos durante 90 minutos a HBO ou mantidos em estufa. Após os tratamentos as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Cell Growth Determination Kit MTT based, Sigma). O meio de cultura (RPMI 1640) de cada placa foi retirado e acrescentado 90µl de meio novo e 10µl de solução MTT. Em seguida as placas

foram protegidas da luz e incubadas durante 3 horas na estufa de CO₂ a 37°C, sendo homogeneizadas a cada hora. Após esse período, o meio contendo solução MTT foi descartado e acrescentado 100µl de MTT solvente. As placas foram mantidas durante 1 hora em temperatura ambiente e agitação constante. Em seguida, a absorbância foi lida no fluorímetro (BIO-TEK Synergy HT) em comprimentos de onda de 570nm e 690nm.

3.9 Filme

A cultura de macrófagos peritoneais foi infectada com a cepa ATCC de *P. aeruginosa* na proporção de 0,2 bactérias:1macrófago e observada por 90 minutos ao microscópio Zeiss AXIOVERT. A análise através deste microscópio nos permitiu a captura de fotos em curtos intervalos de tempo (10 em 10 segundos), possibilitando a criação do filme (Acesso: <http://www.youtube.com/watch?v=i4y7MWsTjQU>).

3.10 Peles artificiais como modelo para infecção com *P. aeruginosa*

Avaliamos o efeito da HBO em infecções de pele causadas por *P. aeruginosa* utilizando modelos organotípicos que mimetizam a pele humana (Brohem, Cardeal et al. 2011). As peles artificiais foram fornecidas pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). A infecção das peles artificiais foi realizada segundo Shepherd, Douglas et al. (2009), com algumas modificações. As peles artificiais foram incubadas com 4ml de meio DME sem SFB e sem antibiótico. As peles foram infectadas com 1 a 2 x10⁵ bactérias e permaneceram na estufa durante 16 horas. Após este período as peles foram lavadas três vezes com salina estéril e foi acrescentado novo meio. Após 5 horas na estufa ou HBO, foram avaliados os números de UFC do

sobrenadante e da pele lisada. As peles destinadas a histologia, foram fixadas com paraformaldeído 10%.

3.11 Histologia

As amostras de pele artificial foram lavadas com salina estéril duas vezes e então fixadas em paraformaldeído 10% por 3 horas. Após a fixação as amostras foram lavadas três vezes com PBS 0,05M, pH 7,4 desidratadas em gradientes de alcoóis, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 0,5 μ m foram realizados em micrótomo (Reichert-Jung, modelo 820). Após a montagem, as lâminas foram coradas com hematoxila e eosina e visualizadas em microscópio óptico (Nikon, eclipse 50i) (Arrais-Silva, Pinto et al. 2006).

3.12 Análise dos resultados

Todos os ensaios foram realizados em situações normobárica (21% de O₂, 5% de CO₂ a 1 ATA de pressão) e hiperbárica (100% de O₂ a 3 ATA de pressão), normobárica + imipenem e hiperbárica + imipenem. Pelo menos três experimentos de cada um dos itens descritos acima foram realizados separadamente e os resultados são expressos pela média $\pm$ SD. As cepas bacterianas foram analisadas individualmente e os valores foram comparados usando-se análise de variância (one-way ANOVA) com $p < 0,05$ e t-test two populations com $p < 0,05$, como teste *a posteriori*.

4. Resultados

4.1 Caracterização das cepas bacterianas quanto a sensibilidade/resistência

Primeiramente, caracterizamos as cepas bacterianas quanto à sensibilidade/resistência a imipenem utilizando o antibiótico da marca Sigma. A CIM de cada cepa foi determinada através de microdiluição em caldo e E-test, os dados da CLSI (Norma M100-S15, vol. 24, No.1) foram usados como referência (Figura 1). As cepas com CIM $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ de imipenem foram consideradas sensíveis, cepas com CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ foram consideradas resistentes, e cepas com CIM > 4 e < 16 foram consideradas intermediárias. O Quadro 1 mostra os resultados das CIMs para cada uma das cepas de acordo com o tipo de teste realizado.

Cepa	E-test	Microdiluição	Resultado
ATCC	1,5 $\mu\text{g/ml}$ SENSÍVEL	2,5 $\mu\text{g/ml}$ SENSÍVEL	SENSÍVEL
67eNM	0,19 $\mu\text{g/ml}$ SENSÍVEL	0,625 $\mu\text{g/ml}$ SENSÍVEL	SENSÍVEL
FC01	> 32 $\mu\text{l/ml}$ RESISTENTE	5 $\mu\text{g/ml}$ INTERMEDIÁRIA	INTERMEDIÁRIA
PaHC 1	> 32 $\mu\text{l/ml}$ RESISTENTE	10 $\mu\text{g/ml}$ INTERMEDIÁRIA	INTERMEDIÁRIA
PaHC 2	> 32 $\mu\text{l/ml}$ RESISTENTE	20 $\mu\text{g/ml}$ RESISTENTE	RESISTENTE
PaHC 3	> 32 $\mu\text{l/ml}$ RESISTENTE	20 $\mu\text{g/ml}$ RESISTENTE	RESISTENTE

Quadro 1: Resultados das CIMs de imipenem realizadas por E-test e por microdiluição para seis cepas de *P. aeruginosa*. Os resultados foram confirmados através de três experimentos independentes.

Os resultados para as cepas ATCC, 67eNM, PaHC2, PaHC3 foram concordantes quando analisamos os dois métodos (Quadro 1). O perfil de sensibilidade/resistência dessas cepas foram: sensível para cepa ATCC, sensível para cepa 67eNM, resistente para a cepa PaHC2 e resistente para a cepa PaHC3. Os resultados para as cepas FC01 e PAHC1 foram diferentes quando analisamos os dois métodos, o E-test indicou que as cepas eram resistentes e a microdiluição indicou que eram intermediárias. Também trabalhamos com o antibiótico da ABL medicamentos do Brasil, que contém em sua formulação, além de imipenem, cilastatina. A cilastatina é um inibidor enzimático específico que bloqueia o metabolismo do imipenem no rim e aumenta substancialmente a concentração de imipenem ativo no trato urinário, tem provável efeito nefroprotetor e é desprovida de atividade antimicrobiana (Ministério da Saúde, 2006). Devido a formulação diferente entre os antibióticos da Sigma e da ABL fizemos experimentos a fim de verificar a ação dos dois. O Quadro 2 mostra os dados com os antibióticos das duas marcas. Os resultados dos experimentos com o antibiótico da marca Sigma foram os mesmos quando comparados aos resultados com o antibiótico da marca ABL. As CIMs para cada cepa de *P. aeruginosa* foram:

- Cepa ATCC: 2,5 µg/ml;
- Cepa 67eNM: 0,625 µg/ml;
- Cepa FC01: 5 µg/ml;
- Cepa PaHC1: 10 µg/ml;
- Cepa PaHC2: 20 µg/ml;
- Cepa PaHC3: 20 µg/ml;

Cepa	CIM – SIGMA (imipenem)	CIM - ABL medicamentos (imipenem/ cilastatina)	Resultado
ATCC	2,5µg/ml SENSÍVEL	2,5µg/ml SENSÍVEL	SENSÍVEL
67eNM	0,625µg/ml SENSÍVEL	0,625µg/ml SENSÍVEL	SENSÍVEL
FC01	5 µg/ml INTERMEDIÁRIA	5 µg/ml INTERMEDIÁRIA	INTERMEDIÁRIA
PaHC 1	10 µg/ml INTERMEDIÁRIA	10 µg/ml INTERMEDIÁRIA	INTERMEDIÁRIA
PaHC 2	20 µg/ml RESISTENTE	20 µg/ml INTERMEDIÁRIA	RESISTENTE
PaHC 3	20 µg/ml RESISTENTE	20 µg/ml INTERMEDIÁRIA	RESISTENTE

Quadro 2: Comparação entre as CIMs com antibiótico da marca SIGMA e ABL. Os resultados são representativos de no mínimo três experimentos independentes.

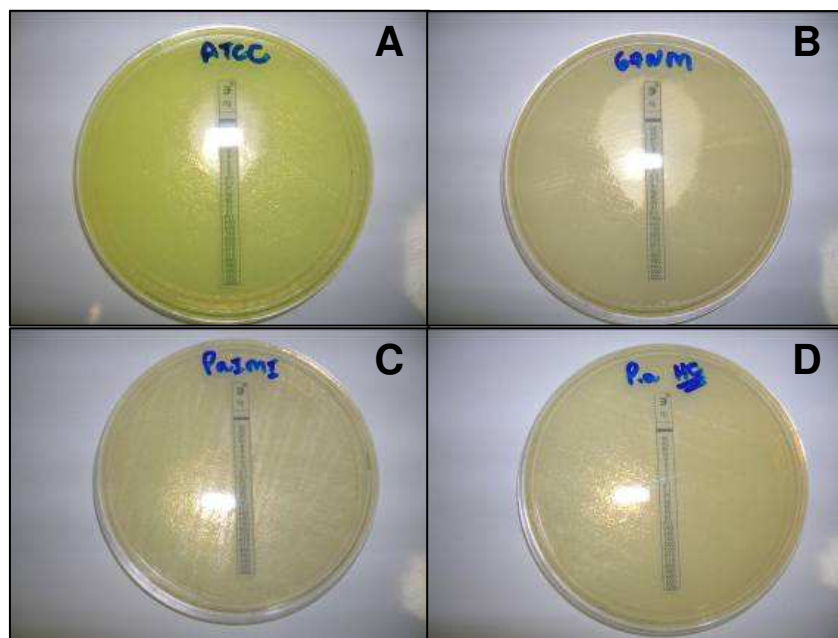


Figura 1: E-test de imipenem. Observar os halos de inibição para as cepas ATCC e 67eNM (A e B).

Os resultados dos experimentos realizados com meio MH ágar demonstraram nenhum crescimento das cepas ATCC e 67eNM, tanto na placa com 4µg/ml de imipenem/cilastina como na placa de 16µg/ml, confirmando a sensibilidade destas cepas ao antibiótico (Figura 2A e 2B). Para a cepa FC01 (PaIMI) houve crescimento na placa de 4µg/ml e não houve na placa de 16µg/ml, confirmando que esta cepa é intermediária (Figura 2C). As cepas PaHC1, PaHC2 e PaHC3 cresceram em ambas as concentrações de antibiótico, confirmando a resistência das duas últimas (Figura 2E e 2F). Embora a cepa PaHC1 tenha crescido na placa com 16µg/ml de imipenem/cilastatina, não consideramos esta cepa resistente, já que o crescimento foi mínimo e os resultados obtidos através de microdiluição (CIM), indicam-na como cepa intermediária (Figura 2D). Foi observado crescimento confluyente de todas as cepas quando inoculadas em placas contendo meio MH ágar sem antibiótico (dados não mostrados).

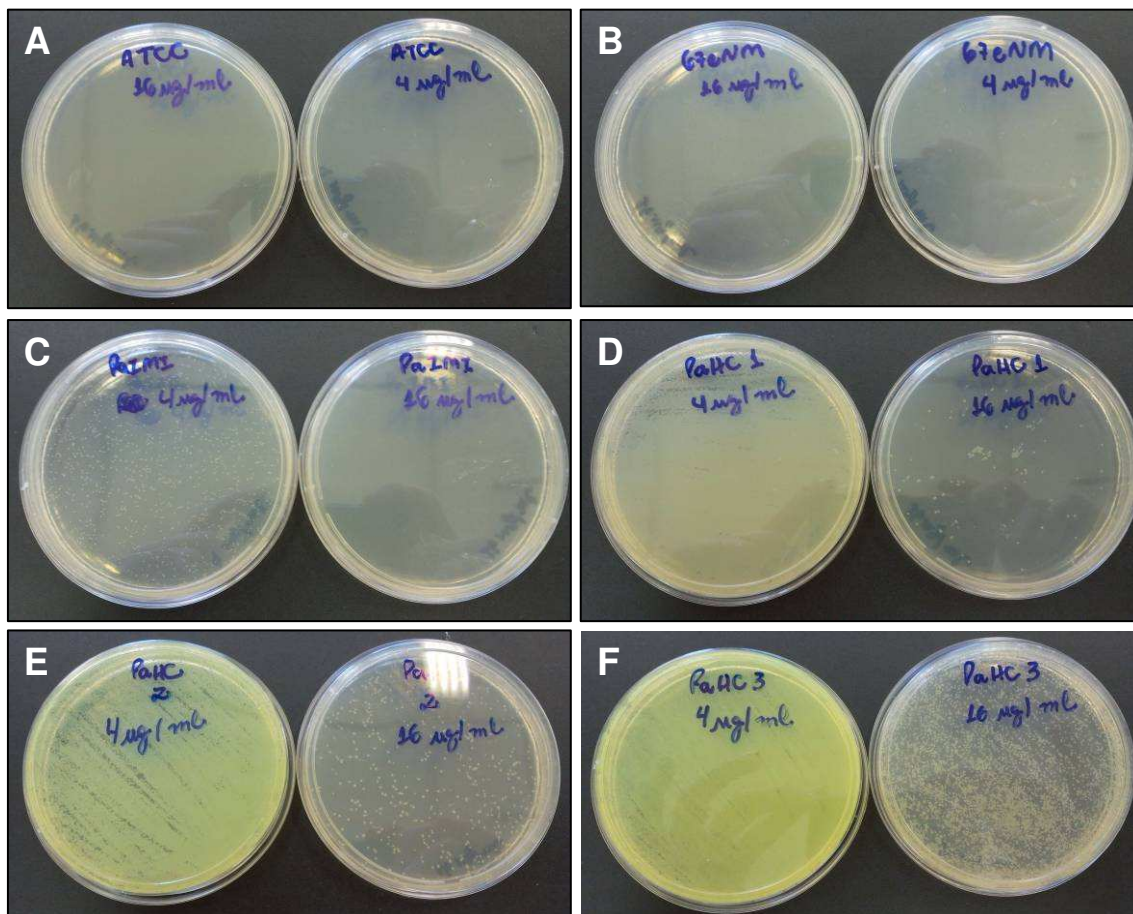


Figura 2: Crescimento de *P. aeruginosa* com diferentes concentrações de antibiótico. A) A cepa ATCC não cresceu em nenhuma das concentrações testadas; B) A cepa 67eNM não cresceu em nenhuma das concentrações testadas; C) Crescimento da cepa PaIMI na placa com 4 µg/ml de antibiótico; D) Crescimento da cepa PaHC1 em ambas concentrações de antibiótico; E) Crescimento da cepa PaHC2 em ambas concentrações de antibiótico; F) Crescimento da cepa PaHC1 em ambas concentrações de antibiótico;

4.2 Concentrações de antibiótico utilizadas

As concentrações de antibiótico utilizadas nos experimentos com HBO foram determinadas a partir da CIM de cada cepa bacteriana. Escolhemos concentrações sub-inibitórias, isto é, abaixo da CIM. Seguem abaixo as concentrações utilizadas para cada cepa:

- ATCC: 1,5 µg/ml;
- 67eNM: 0,2 µg/ml;
- PaIMI: 3 µg/ml;
- PaHC1: 8 µg/ml;
- PaHC2: 30 µg/ml;
- PaHC3: 40 µg/ml;

4.3 Ação da HBO em *P. aeruginosa* crescida em meio sólido com ou sem antibiótico

O próximo passo foi avaliar o efeito da HBO no crescimento de *P. aeruginosa*. Em relação a cepa ATCC observamos que a exposição a HBO reduziu 13 vezes o número de UFC quando comparado com as bactérias mantidas em estufa e 15 vezes quando comparado com as bactérias tratadas com imipenem/cilastatina (Figura 3). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 10 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 130 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 1.333 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 3). Esses dados revelam que a HBO tem efeito no controle do crescimento da cepa ATCC, além de potencializar a ação de imipenem/cilastatina.

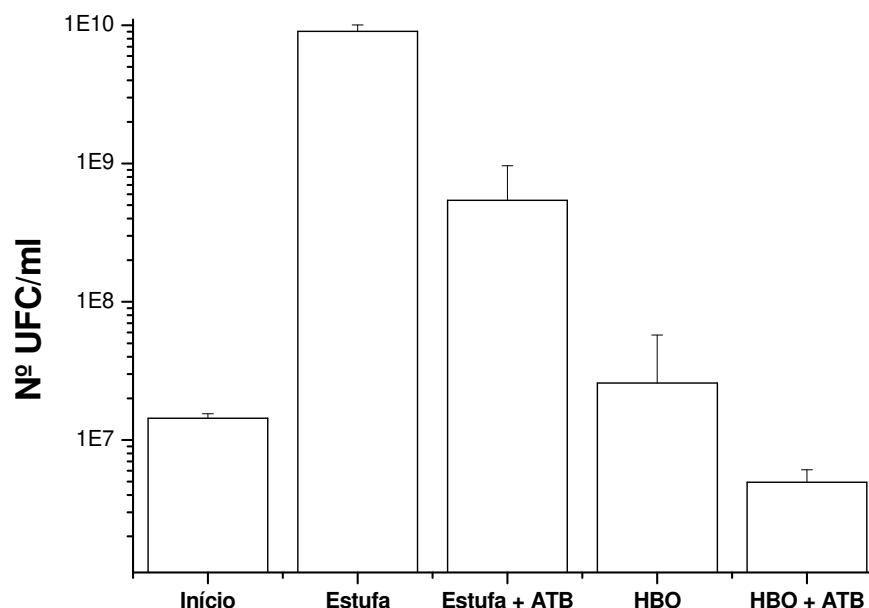


Figura 3: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa ATCC. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobárias; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

A exposição da cepa 67eNM a HBO reduziu 11 vezes o número de UFC quando comparado com as bactérias mantidas em estufa (Figura 4). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 22 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 15 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 249 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 4). Os dados demonstram que a exposição a HBO reduziu o crescimento da cepa 67eNM, além de potencializar o efeito de imipenem/cilastatina.

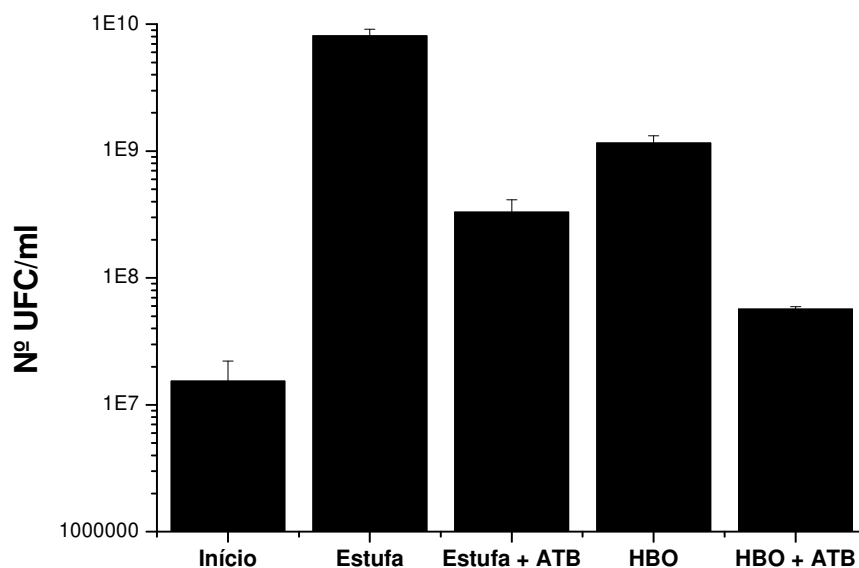


Figura 4: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa 67eNM. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobárias; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

A exposição da cepa FC01 reduziu 409 vezes o número de UFC quando comparado com as bactérias mantidas em estufa e 12 vezes quando comparado com as bactérias tratadas com imipenem/cilastatina (Figura 5). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 4 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 53 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 1.820 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 5).

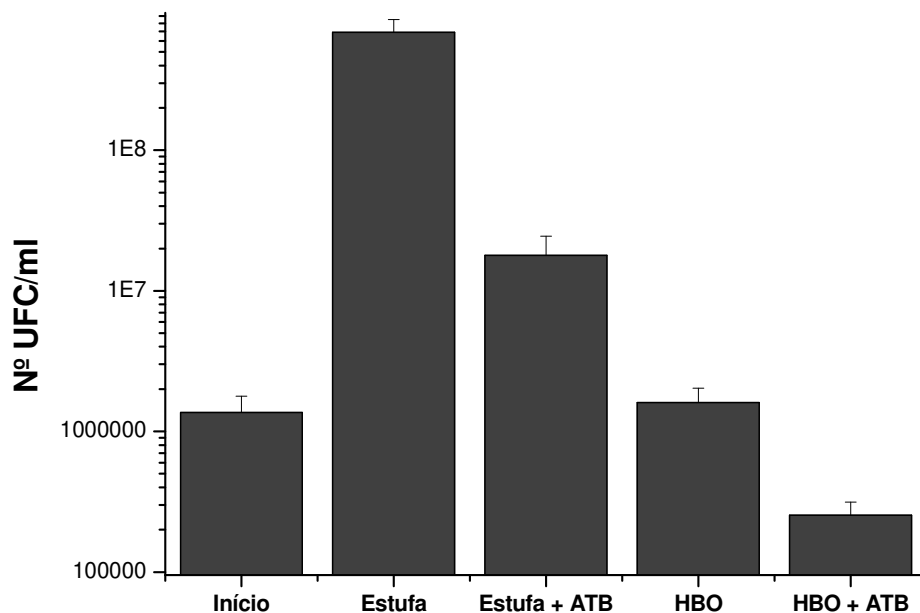


Figura 5: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa FC01. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobáricas; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

Em relação à cepa PaHC1 a exposição a HBO reduziu 83 vezes o número de UFC quando comparados com as bactérias mantidas em estufa e 7 vezes quando comparados com as bactérias tratadas com imipenem/cilastatina (Figura 6). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 3 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 20 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 241 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 6).

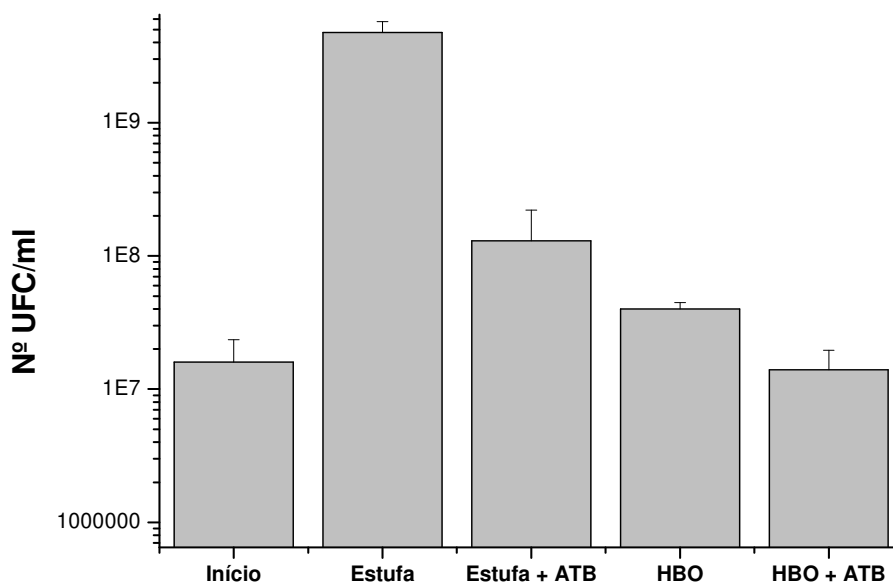


Figura 6: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa PaHC1. Número de UFC/ml da cepa PaHC1 após 5 horas em diferentes condições. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobárias; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

A exposição da cepa PaHC2 a HBO reduziu 43 vezes o número de UFC quando comparados com as bactérias mantidas em estufa e 5 vezes quando comparados com as bactérias tratadas com imipenem/cilastatina (Figura 7). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 2 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 10 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 90 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 7). Esses dados revelam que a HBO tem efeito no controle do crescimento da cepa ATCC, além de potencializar a ação de imipenem/cilastatina. Assim como para as cepas avaliadas anteriormente a HBO foi eficaz no controle do crescimento da cepa PaHC2 e embora a

diferença entre os tratamentos “HBO” e “HBO + antibiótico” tenha sido menor, a análise estatística revela que a ação conjunta dos tratamentos foi maior que a ação de cada tratamento separadamente.

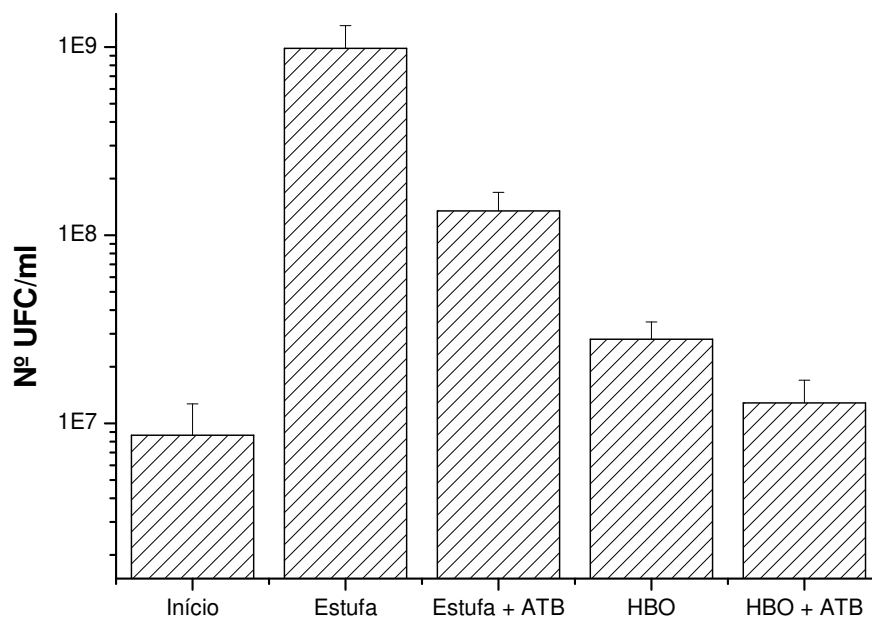


Figura 7: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa PaHC2. Número de UFC/ml da cepa PaHC1 após 5 horas em diferentes condições. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobárias; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

A exposição a HBO da cepa PaHC3 reduziu 60 vezes o número de UFC quando comparados com as bactérias mantidas em estufa e 16 vezes quando comparados com as bactérias tratadas com imipenem/cilastatina (Figura 8). As bactérias expostas ao tratamento conjunto apresentaram números de UFC 2 vezes menores que as bactérias expostas somente a HBO, 35 vezes menores do que as bactérias expostas somente ao antibiótico e 133 vezes menores quando comparados ao crescimento em estufa (Figura 8).

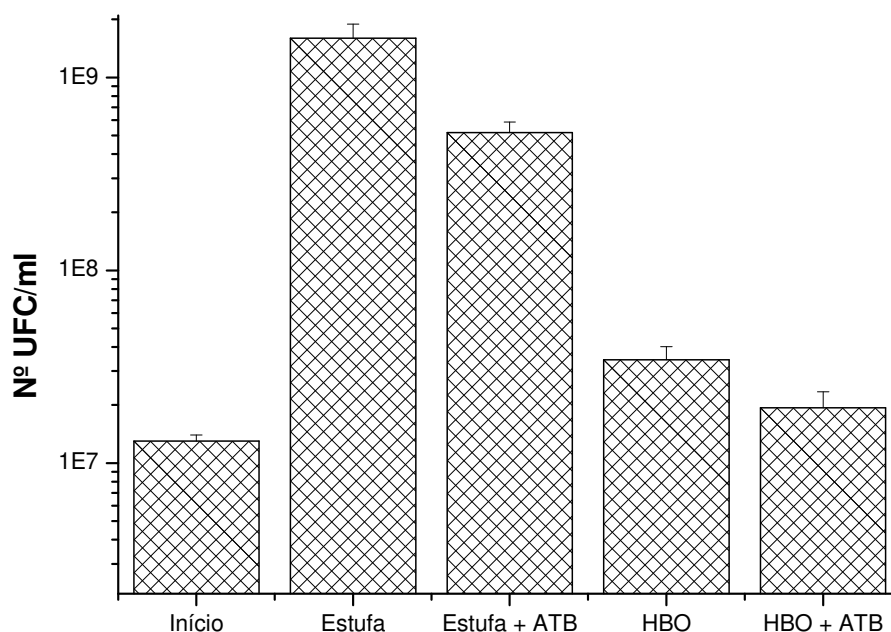


Figura 8: Efeito da HBO e HBO + antibiótico na cepa PaHC3. Número de UFC/ml da cepa PaHC1 após 5 horas em diferentes condições. Início: nº de UFC/ml antes da exposição a qualquer condição; Estufa: nº de UFC/ml das bactérias mantidas na estufa em condições normobárias; HBO: nº de UFC/ml das bactérias expostas a HBO; Estufa+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na estufa; HBO+ATB: nº de UFC/ml das bactérias crescidas em meio com antibiótico e mantidas na HBO. Os resultados representam média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two populations) $p < 0.05$.

Nossos resultados mostram que para as seis cepas avaliadas, o tratamento com HBO teve efeito significativo na redução do crescimento bacteriano. A ação da HBO sozinha foi mais eficaz do que a concentração de antibiótico utilizada para cinco das seis cepas testadas, só para a cepa 67eNM esta informação não é válida. Avaliando os eixos “Estufa” e “HBO” separadamente observamos que as cepas ATCC, FC01 e PaHC1 são mais sensíveis as ações do oxigênio e da pressão do que a cepa 67eNM. No entanto, quando a cepa 67eNM é exposta a ambos os tratamentos o número de UFC é bastante reduzido. A ação da HBO + antibiótico teve mais efeito na redução do número de UFC do que as ações individuais de cada tratamento para todas as cepas avaliadas.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise ultraestrutural das bactérias mantidas em estufa demonstrou morfologia preservada e organizada (Figura 9A). A análise das bactérias expostas a HBO mostrou que algumas bactérias apresentaram desorganização do conteúdo citoplasmático, verificado pelo acúmulo dos grânulos citoplasmáticos em regiões pontuais dentro da célula (Figura 9B, ver seta). As culturas bacterianas cultivadas na presença de imipenem/cilastatina apresentaram algumas células preservadas sendo que a maioria teve sua estrutura alterada. Podemos observar intensa desorganização, presença de células degradadas e desestruturadas (Figura 9C). O mesmo aconteceu com as bactérias cultivadas na presença de antibiótico e expostas a HBO (Figura 9D).

Em relação à cepa FC01 as células expostas a HBO apresentaram grânulos citoplasmáticos mais finos e desorganização do conteúdo citoplasmático (Figura 10B, ver setas). Nas bactérias mantidas em estufa, com ou sem antibiótico, podemos observar com mais frequência a presença de uma região delimitada mais clara, que é correspondente ao

material genético (Figuras 10A e 10C, ver setas). Entretanto, nas bactérias expostas a HBO ou HBO+imipenem muito raramente observamos a região que corresponde ao material genético (Figura 10B). As bactérias incubadas somente em estufa apresentaram quantidade maior de estruturas ligadas às suas paredes (Figura 10A, ver setas). As bactérias exposta a HBO apresentaram uma superfície muito mais lisa, indicando a perda dessas estruturas (Figura 10B). Nas culturas de bactérias crescidas com antibiótico observou-se predominantemente células degradadas e estruturalmente desorganizadas (Figura 10C).

Quando comparamos as bactérias tratadas com antibiótico e HBO+antibiótico, concluímos que as bactérias tratadas com HBO+antibiótico apresentam grânulos citoplasmáticos mais finos do que as bactérias tratadas somente com antibiótico, mais uma vez evidenciando que a HBO gera mudanças nesse aspecto morfológico (comparar Figuras 10C e 10D; 10E e 10F).

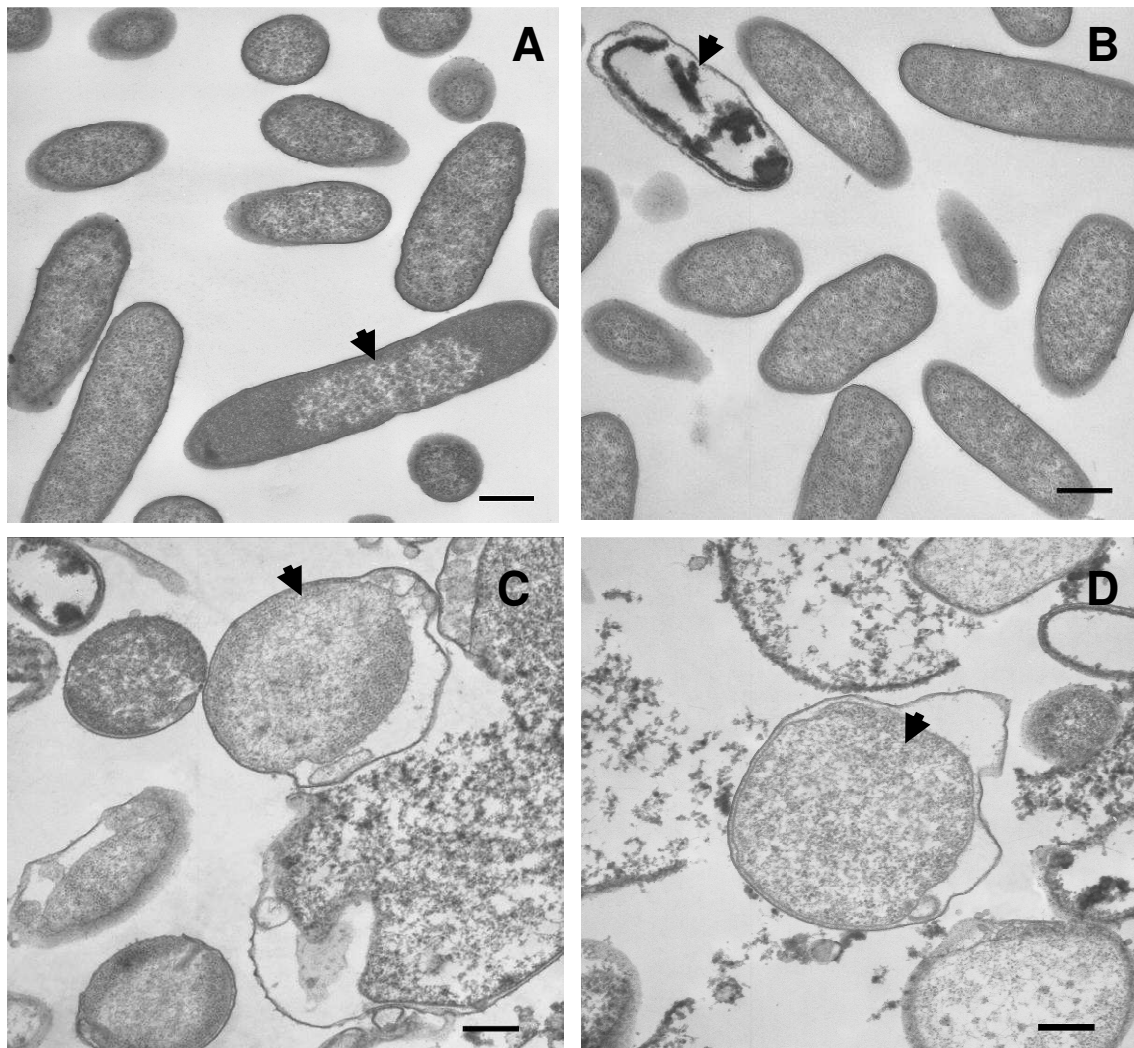


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão da cepa ATCC 27853 de PA. **A)** Bactérias mantidas na estufa; **B)** Bactérias expostas a HBO; **C)** Bactérias tratadas com antibiótico **D)** Bactérias tratadas com HBO + antibiótico; Aumento de 21560x; ---- 0,56µm.

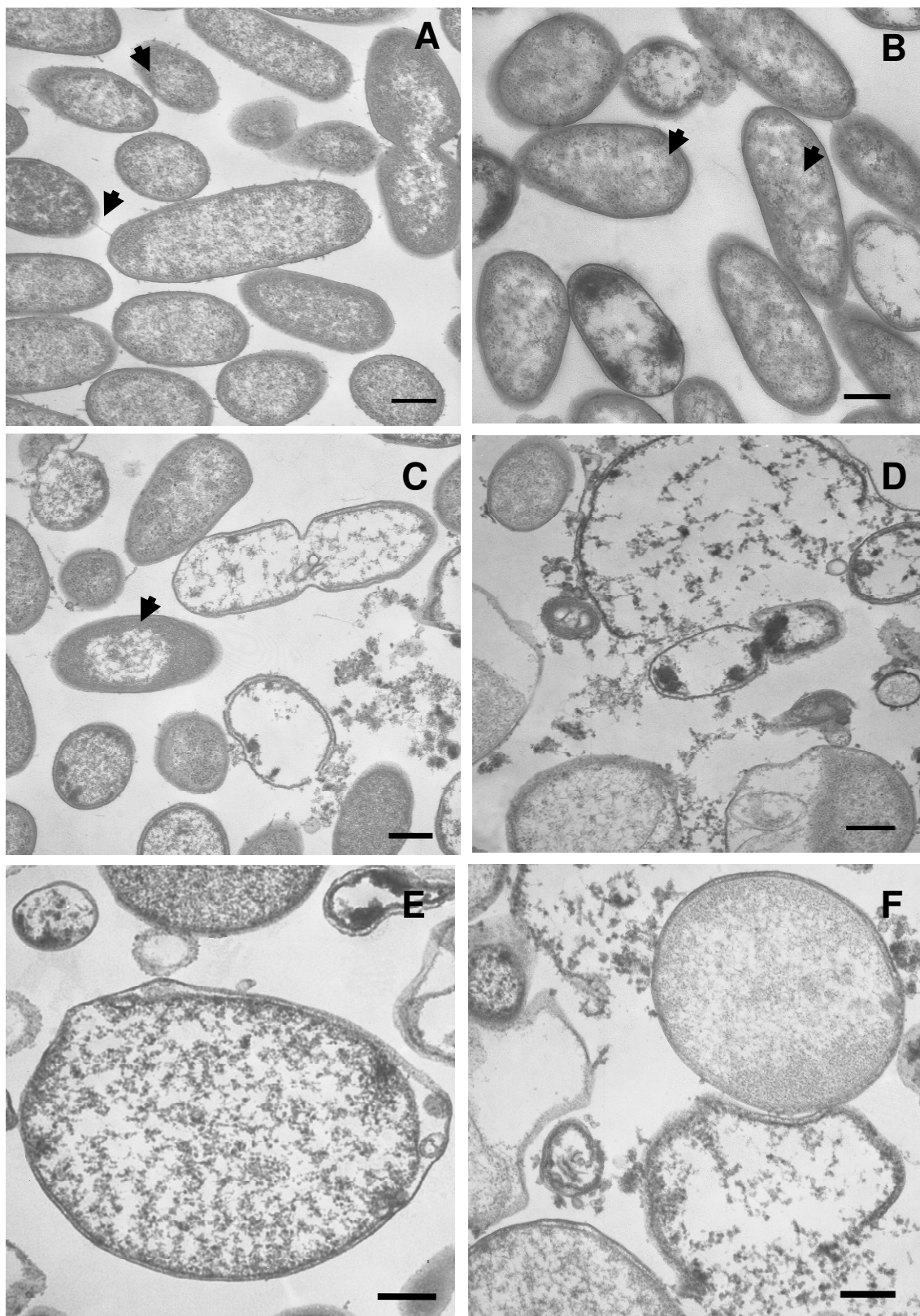


Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão da cepa FC01 de PA. **A)** Bactérias mantidas na estufa; **B)** Bactérias expostas a HBO; **C)** Bactérias tratadas com antibiótico **D)** Bactérias tratadas com HBO + antibiótico; Aumento de 21560x; ---- 0,56 μ m; **E)** Bactérias tratadas com ATB; **F)** Bactérias tratadas com HBO + antibiótico; Aumento de 27800x ---- 425nm.

4.5 Infecção de macrófagos peritoneais com *P. aeruginosa*

Para avaliar a ação da HBO na interação bactéria-células eucarióticas, realizamos ensaios de infecção com macrófagos peritoneais e *P. aeruginosa*. A contagem das bactérias do sobrenadante das culturas de macrófagos após 90 minutos em estufa ou HBO demonstrou que não houve diferença no número de bactérias das culturas submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 11A). Ao avaliar o número de bactérias intracelulares, culturas de macrófagos expostas a HBO apresentaram menos bactérias que culturas celulares mantidas em estufa, quando proporções maiores de bactérias (2 bactérias:1macrófago e 20 bactérias:1macrófago) foram utilizadas na infecção (Figura 11B).

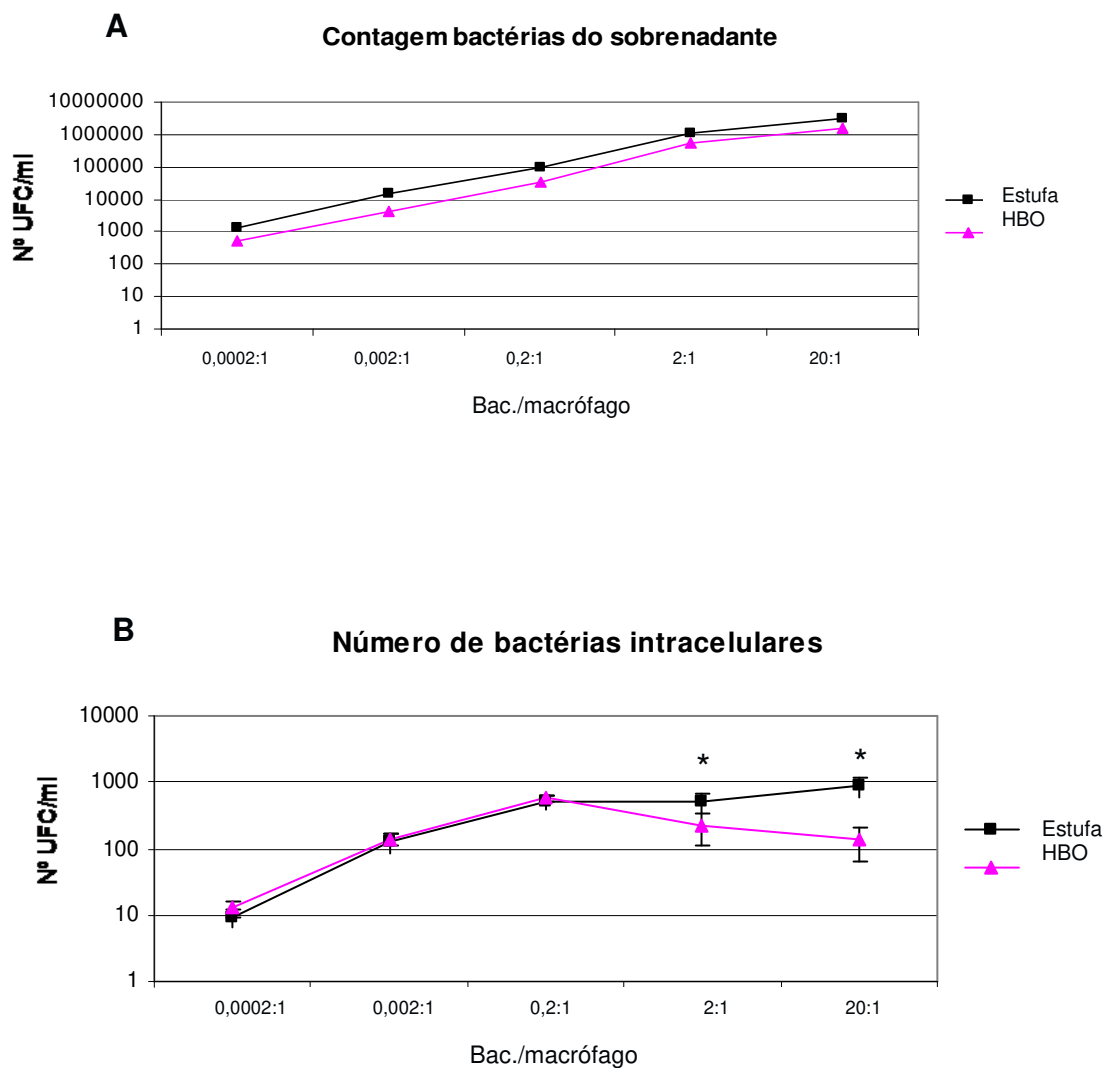


Figura 11: Infecção de macrófagos peritoneais com *P. aeruginosa* durante exposição a HBO (100% de O₂ a 3 ATA pressão) ou estufa. A) Contagem do número de bactérias presentes no sobrenadante das culturas expostas a HBO ou mantidas em estufa. B) Contagem do número de bactérias intracelulares das culturas de macrófagos expostas a HBO ou mantidas em estufa. Os resultados representam média $\pm$ SD de dois experimentos independentes. * Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two Populations) $p < 0.05$.

A visualização das lâminas ao microscópio óptico demonstrou que culturas mantidas em estufa apresentam diminuição do número de macrófagos íntegros à medida que maiores proporções de bactérias são utilizadas na infecção (Figuras 12 e 13). Quando culturas de macrófagos infectados com *P. aeruginosa* são expostas a HBO, um número muito maior de macrófagos íntegros é observado (Figuras 12 e 13). A contagem do número de células íntegras ao final de cada tratamento demonstrou que em culturas expostas a HBO o número de macrófagos íntegros foi em média 2,1 vezes maior que as culturas mantidas em estufa (Figura 14). Nossos resultados revelaram que 90 minutos de HBO protege os macrófagos da lise gerada pela infecção com *P. aeruginosa*. Também realizamos um filme para melhor avaliação da infecção e interação entre os macrófagos e bactérias. O filme nos permitiu observar em tempo real a lise dos macrófagos. É possível observar o surgimento repentino de bactérias fora das células; elas são liberadas do citoplasma do macrófago devido ao rompimento da membrana citoplasmática e conseqüente lise do mesmo (Acesso: <http://www.youtube.com/watch?v=i4y7MWsTjQU>).

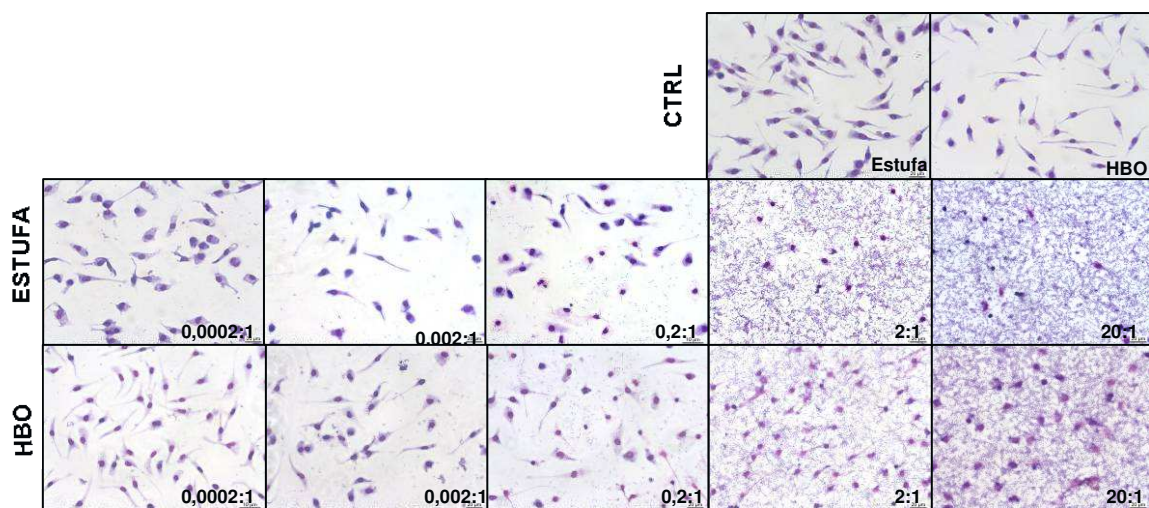


Figura 12: Infecção de macrófagos peritoneais com *P. aeruginosa* durante exposição a HBO (100% de O_2 a 3 ATA pressão) ou estufa. Visualização das lâminas ao microscópio óptico (400x). Observar a integridade das culturas controles (CTRL). Observar a diferença entre o número de macrófagos presentes nas lâminas mantidas em estufa e expostas a HBO.

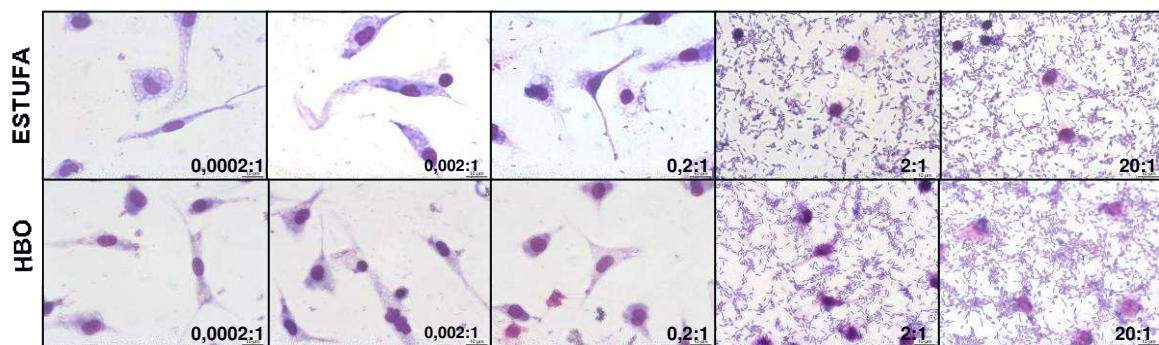


Figura 13: Infecção de macrófagos peritoneais com *P. aeruginosa* durante exposição a HBO (100% de O_2 a 3 ATA pressão) ou estufa. Visualização das lâminas ao microscópio óptico (1000x). Observar a diferença entre o número de macrófagos presentes nas lâminas mantidas em estufa e expostas a HBO.

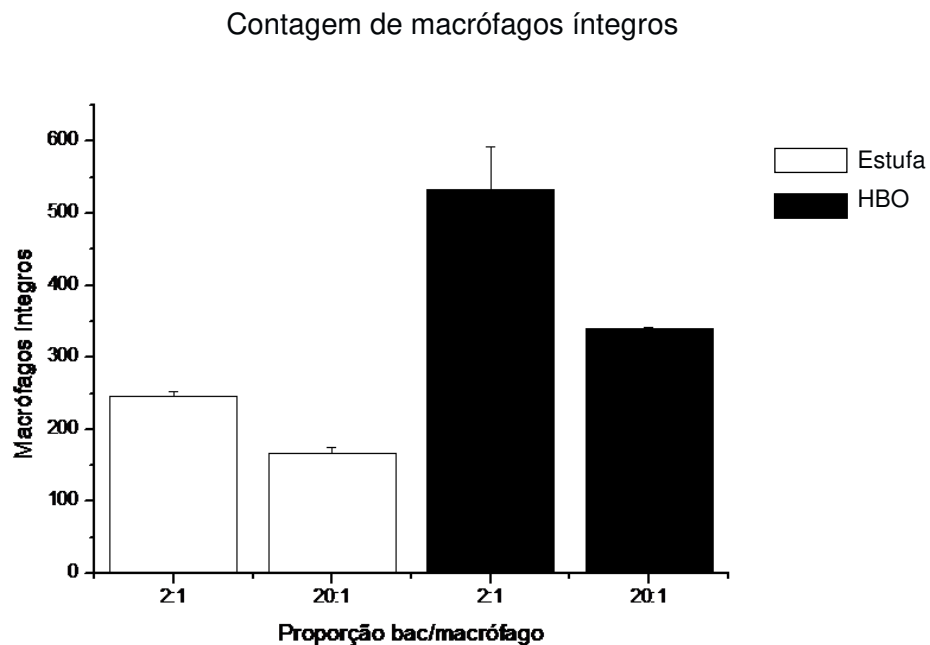


Figura 14: Contagem do número de macrófagos íntegros após infecção com *P. aeruginosa* por 1h30' na HBO ou estufa. * Diferença significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two Populations) $p < 0.05$.

A fim de avaliar a toxicidade da HBO em culturas de macrófagos peritoneais, realizamos ensaios de MTT. Os resultados desses ensaios mostraram que o controle positivo utilizado, tratamento com H_2O_2 , tem efeito tóxico nos macrófagos, e que a exposição de células a HBO não alterou a viabilidade das mesmas (Figura 15).

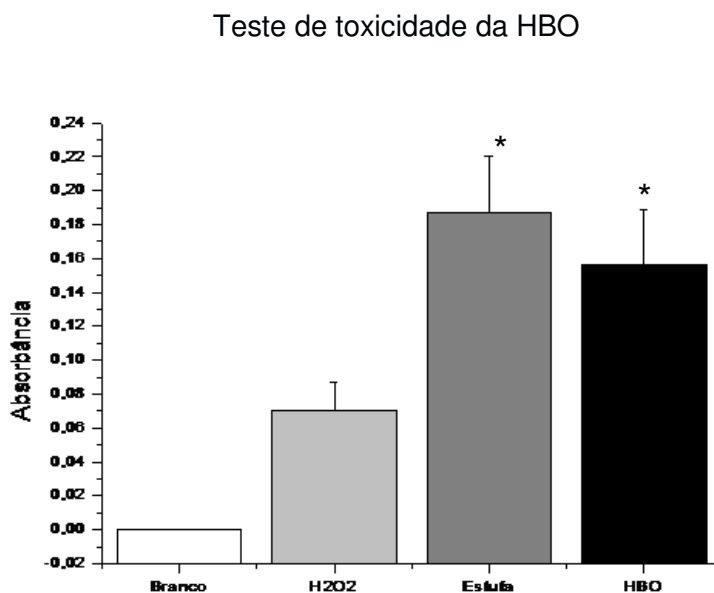


Figura 15: Teste de MTT dos macrófagos expostos por 1h30' na HBO ou mantidos na estufa. * Diferença não significativa entre as condições; teste estatístico ANOVA $p < 0.05$; t-Test (Two Populations) $p < 0.05$.

4.6 Peles artificiais como modelo para infecção com *P. aeruginosa*

Utilizamos um modelo biomimético de pele humana para avaliar o efeito da HBO no controle de infecções da pele causadas por *P. aeruginosa*. Nesses ensaios peles artificiais infectadas com *P. aeruginosa* foram tratadas durante 5 horas na HBO ou mantidas em estufa pelo mesmo tempo. A avaliação morfológica foi realizada pela histologia das peles artificiais. A histologia das peles artificiais controles, isto é, não infectadas, apresentou organização tecidual similar a pele humana, com presença de epiderme e derme diferenciadas (Figura 16A e B). As peles infectadas apresentaram intensa colonização de *P. aeruginosa*, assim como camadas dérmicas e epidérmicas menos

preservadas indicando que a infecção provoca desorganização do tecido (Figura 16C e D; setas indicam presença de *P. aeruginosa*).

Os resultados da contagem de UFC das peles artificiais não puderam ser confirmados pela análise histológica, pois a histologia das peles artificiais utilizadas nos experimentos revelou que as mesmas não estavam completamente diferenciadas (Figura 17). Como podemos observar na Figura 17, apenas a pele exposta a HBO apresentou camadas diferenciadas, enquanto que as outras apresentaram uma única camada.

Os resultados referentes à contagem de bactérias do sobrenadante das peles artificiais, não revelou diferenças entre as peles expostas ou não a HBO (Figura 18). O mesmo não aconteceu quando contamos as bactérias presentes no interior das peles. A contagem de bactérias presente no tecido cutâneo artificial revelou que o tratamento com HBO diminuiu a carga bacteriana das peles artificiais (Figura 18).

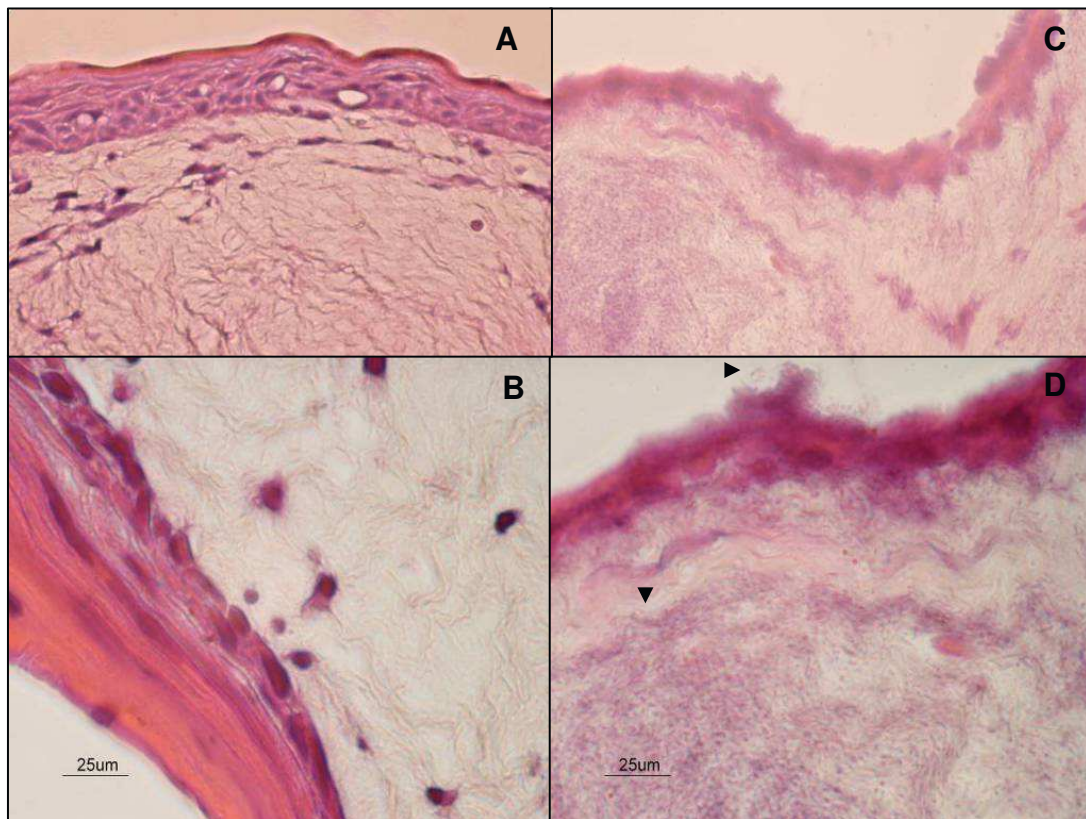


Figura 16: Histologia das peles artificiais. A) Morfologia de uma pele artificial controle (sem infecção). Observar a presença de epiderme e derme diferenciadas (400x). B) Pele artificial controle em maior aumento (1000x), observar a ausência de bactérias. C) Morfologia de uma pele artificial infectada. Observar a desorganização das camadas dérmicas e epidérmicas (400x). D) Pele artificial infectada em maior aumento (1000x, observar a intensa colonização de *P. aeruginosa* (setas).

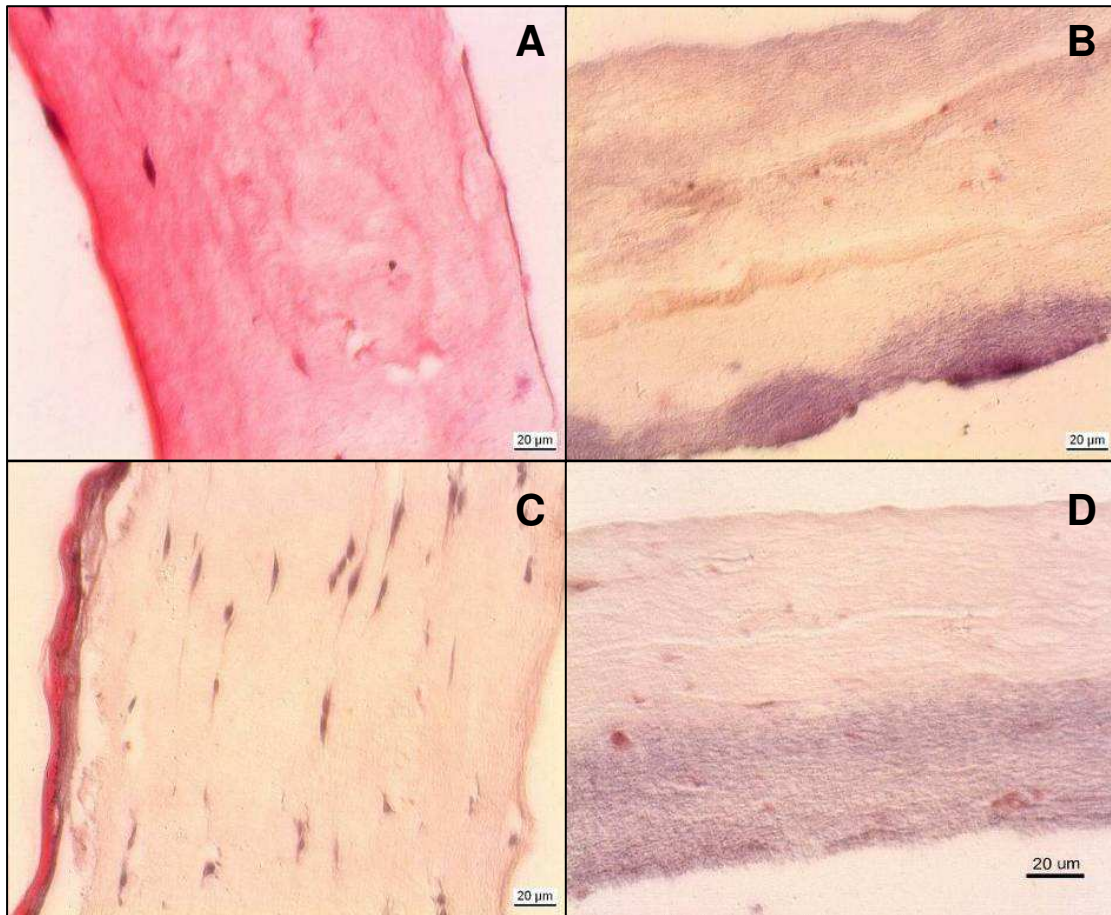


Figura 17: Histologia das peles artificiais (400x). A) Pele controle; B) Pele infectada; C) Pele exposta a 2 horas de HBO (100% O₂ a 3 ATA de pressão); D) Pele infectada, exposta a 2 horas de HBO (100% O₂ a 3 ATA de pressão).

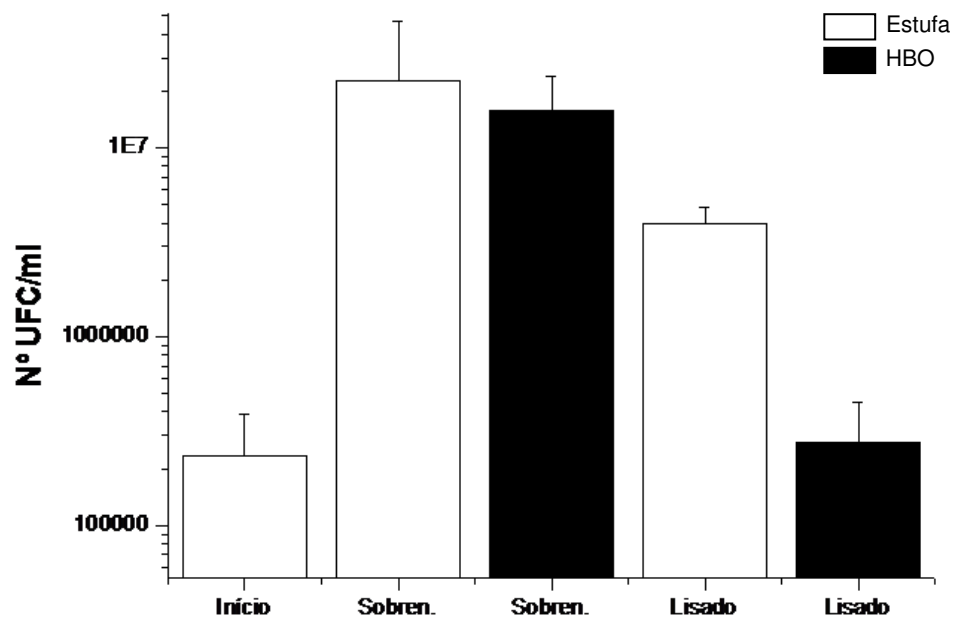


Figura 18: Número de UFC/ml a partir do sobrenadante e lisado das peles artificiais. Contagem após 5 horas de exposição a HBO (100% O₂ a 3 ATA de pressão) ou estufa a 37°C. Início: n° de UFC/ml antes da exposição; Diferença significativa entre HBO e estufa; Teste estatístico ANOVA $p < 0.05$.

5. Discussão

O principal objetivo de nosso trabalho foi avaliar a ação da HBO no crescimento de *P. aeruginosa*. Durante a caracterização das cepas quanto a sensibilidade ou resistência a imipenem/cilastatina nossos dados demonstraram discordância entre os resultados realizados por microdiluição e E-test para as cepas FC01 e PaHC1. Enquanto pelo E-test ambas as cepas foram consideradas resistentes, pela técnica de microdiluição elas foram consideradas intermediárias. A concordância entre os resultados dessas metodologias já foi avaliada anteriormente e devido à existência de trabalhos relatando baixas porcentagens de concordância (Martin-Mazuelos, Gutierrez et al. 1999; Koga-Ito, Lyon et al. 2008) consideramos como resultados definitivos aqueles obtidos através da microdiluição, que é o método de referência indicado pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Os resultados para cada cepa foram os seguintes: sensível para ATCC, sensível para 67eNM, intermediária para FC01, intermediária para PaHC1, resistente para PaHC2 e resistente para PaHC3.

Os dados desse trabalho também mostram que a exposição a 5 horas de HBO diminuiu o crescimento bacteriano de seis cepas de *P. aeruginosa*. Esses resultados corroboram com os dados publicados por vários autores (Brown, Silverberg et al. 1968; Pakman 1971; Bornside, Pakman et al. 1975; Park, Muhvich et al. 1991; Greensmith 2004). Por exemplo, Pakman (1971) demonstrou que a exposição de *P. aeruginosa* 268 a 3 ATA de oxigênio por 24 horas foi altamente bactericida, eliminando 85% das bactérias. Nossos resultados mostram que a exposição a HBO por período bem mais curto já foi capaz de reduzir substancialmente o crescimento de *P. aeruginosa*. Nós concluímos também que a ação da HBO potencializou o efeito de imipenem/cilastatina. As culturas de bactérias

expostas a ambos os tratamentos, apresentaram números reduzidos de UFC quando comparados as bactérias que receberam um único tratamento, isto é, HBO ou antibiótico. De fato, Greensmith (2004) notou que o efeito da tobramicina contra *P. aeruginosa* foi nitidamente dobrado com exposição a 2,5 ATA de oxigênio hiperbárico (Greensmith 2004). Brown, Silverberg et al. (1968) avaliaram o efeito do oxigênio em adição a três antimicrobianos: canamicina, estreptomicina e polimixina B; as culturas bacterianas foram expostas durante 2 ou 6 horas ao oxigênio em concentrações de 60 – 70% e os resultados demonstraram que a exposição a 6 horas de oxigênio aumentou os efeitos bactericidas de canamicina e estreptomicina (Brown, Silverberg et al. 1968). Nossos dados referentes à imipenem/cilastatina, droga que ainda não tinha sido testada em adição a terapia hiperbárica, corroboram com a descrição encontrada na literatura de que a HBO é capaz de aumentar o efeito de fármacos. Os mecanismos de ação do oxigênio hiperbárico nos diferentes fármacos testados não são conhecidos.

A análise ultraestrutural realizada nas cepas ATCC e FC01 de *P. aeruginosa* demonstrou que imipenem/cilastatina induz lise da parede celular e desestruturação da morfologia bacteriana. Na cepa FC01 a exposição a 5 horas de HBO causou diminuição e desorganização dos grânulos citoplasmáticos, ausência da área correspondente ao material genético e perda de estruturas ligadas à parede celular bacteriana. Clark e Pakman (1971) ao avaliarem a ultrestrutura de *P. aeruginosa* após 6 horas de HBO também notaram diminuição dos grânulos citoplasmáticos e ausência da região correspondente ao material genético. Esses autores atribuíram a granulação citoplasmática mais fina das bactérias expostas a HBO a alguma mudança no componente ribossomal das bactérias tratadas com HBO.

Em relação aos ensaios de infecção com macrófagos peritoneais e *P. aeruginosa* demonstramos que a exposição a 90 minutos de HBO diminui o número de bactérias intracelulares. Devido à existência de estudos prévios comprovando que condições de hiperóxia prejudica a fagocitose de *P. aeruginosa* e mini partículas de látex (O'Reilly, Hickman-Davis et al. 2003; Morrow, Entezari-Zaher et al. 2007; Phan, Entezari et al. 2011), sugerimos que o menor número de bactérias intracelulares nas culturas expostas a HBO é devido a atividade fagocítica prejudicada dos macrófagos e não ao aumento da eliminação das bactérias intracelulares. Além disso, outros estudos mostraram que culturas de macrófagos alveolares expostas a hiperóxia, assim como macrófagos alveolares isolados de camundongos expostos a hiperóxia apresentam comprometimento em diversas funções, como quimiotaxia, aderência, fagocitose e eliminação de patógenos (Raffin, Simon et al. 1980; Rister 1982; Suttorp and Simon 1983; Crowell, Hallin et al. 1995; Morrow, Entezari-Zaher et al. 2007). A organização do citoesqueleto de actina tem um papel fundamental na fagocitose. Desta forma, o processo fagocítico requer um rearranjo bem coordenado do citoesqueleto que é guiado pela polimerização da actina (Kuiper, Pluk et al. 2008). Estudos mostraram que a dificuldade fagocítica gerada em células expostas a hiperóxia é devido ao prejudicado remodelamento e desorganização do citoesquelto de actina, processos de suma importância para internalização da bactéria (O'Reilly, Hickman-Davis et al. 2003; Morrow, Entezari-Zaher et al. 2007; Phan, Entezari et al. 2011)

Um de nossos objetivos nesse trabalho foi analisar a morfologia e a carga bacteriana de peles artificiais infectadas com *P. aeruginosa*, pós-tratamento com HBO, para avaliar o potencial desse tratamento em pacientes comprometidos. Quando Dimitrijevic, Paranjape et al. (1999) avaliaram o efeito do tratamento hiperbárico em modelos equivalentes a pele humana com o tratamento diário durante 10 dias a 3 ATA de pressão por 90 minutos,

observaram aumento substancial na diferenciação de queratinócitos e epidermopoiesis de peles artificiais. Shepherd, Douglas et al. (2009) ao desenvolverem modelos para infecção de ferida cutânea com peles artificiais, notaram que quando *P. aeruginosa* foi inoculada nas culturas ocorreu perda da epiderme, de-queratinização da pele construída, assim como perda parcial da membrana basal. Em nossos experimentos, não pudemos confirmar essas observações nem provar uma possível diminuição da infecção e ou melhora do aspecto geral do tecido com o tratamento hiperbárico devido à incompleta diferenciação das peles artificiais utilizadas. A contagem do número de bactérias presentes nos sobrenadantes das peles artificiais não foi diferente entre as peles tratadas e não tratadas na HBO. Esse resultado pode ser explicado pelo tipo de meio utilizado nesses experimentos. A ação da HBO está relacionada à superfície de contato disponível para tratamento. Nos meios de cultura líquidos as células bacterianas estão dispersas em vários planos, não sendo atingidas pelo oxigênio e pela pressão na mesma proporção, protegendo bactérias localizadas em nível menos superficial. De fato, Bornside, Pakman et al. (1974) e Pennock (1966) já haviam notado uma atuação mais eficaz da HBO em meios de cultura sólidos quando comparados a meios líquidos e sugeriram que a menor difusão do oxigênio seria responsável pela ineficácia da HBO em meios líquidos. O número de bactérias presentes nas peles artificiais tratadas com HBO foi menor quando comparadas as peles não tratadas. Esse resultado mostra um efeito benéfico da HBO no controle de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Mesmo em um modelo composto por camadas de diversos tipos celulares, capazes de mimetizar a pele humana, o tratamento com 5 horas de HBO possibilitou a diminuição do crescimento bacteriano. O efeito do tratamento hiperbárico em modelos de infecção com peles artificiais nunca havia sido avaliado anteriormente. Nossos resultados reforçam que o tratamento com HBO contra infecções cutâneas causadas por *P. aeruginosa*

é uma interessante ferramenta a ser mais pesquisada no campo da microbiologia e imunologia.

6. Conclusões

Nossos resultados comprovam a ação positiva da HBO no controle do crescimento de seis cepas de *P. aeruginosa*. O tratamento por 5 horas a 100% de O₂ oxigênio e 3 ATA de pressão é capaz de desacelerar o crescimento bacteriano; são obtidos números muito menores de UFC em culturas de bactérias tratadas na HBO quando comparadas as bactérias que crescem em condições normobáricas.

A ação da HBO nitidamente potencializou o efeito de imipenem/cilastatina, antibiótico comumente utilizado no combate a infecções causadas por *P. aeruginosa* e nunca antes avaliado em conjunto com o tratamento hiperbárico. Nossos dados revelam que a HBO pode ser uma alternativa de tratamento a infecções causadas por *P. aeruginosa*, podendo ser utilizada sozinha ou em adição a imipenem/cilastatina. A medida que cepas resistentes a antibióticos, dentre eles imipenem/cilastatina, estão cada dia mais recorrentes, a possibilidade de uma estratégia terapêutica que possibilite melhor eficácia no combate a este tipo de infecção é extremamente importante, não só para o melhor combate ao patógeno, mas também para a prevenção da indução de resistência bacteriana.

7. Referência bibliográficas

- Andrade, D., V. C. Leopoldo, et al. (2006). "Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de terapia intensiva de hospital brasileiro de emergências". Rev Bras Ter Intensiva, 18(1):31-37.
- Arrais-Silva, W. W., M. C. Collhone, et al. (2005). "Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes." Parasitol Int 54(1): 1-7.
- Arrais-Silva, W. W., E. F. Pinto, et al. (2006). "Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice." Acta Trop 98(2): 130-136.
- Bargues, L., S. Boyer, et al. (2009). "[Incidence and microbiology of infectious complications with the use of artificial skin Integra in burns]." Ann Chir Plast Esthet 54(6): 533-539.
- Bornside, G. H., L. M. Pakman, et al. (1975). "Inhibition of pathogenic enteric bacteria by hyperbaric oxygen: enhanced antibacterial activity in the absence of carbon dioxide." Antimicrob Agents Chemother 7(5): 682-687.
- Brohem, C. A., L. B. Cardeal, et al. (2011). "Artificial skin in perspective: concepts and applications." Pigment Cell Melanoma Res 24(1): 35-50.
- Brown, O. R., R. G. Silverberg, et al. (1968). "Synergism between hyperoxia and antibiotics for *Pseudomonas aeruginosa*." Appl Microbiol 16(2): 260-262.
- Cacci, L. C. (2007). "Estudo epidemiológico-molecular das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao Imipenem em pacientes hospitalizados". 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Chakrabarty, K. H., R. A. Dawson, et al. (1999). "Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use." Br J Dermatol 141(5): 811-823.
- Church, D., S. Elsayed, et al. (2006). "Burn wound infections." Clin Microbiol Rev 19(2): 403-434.
- Cimsit, M., G. Uzun, et al. (2009). "Hyperbaric oxygen therapy as an anti-infective agent." Expert Rev Anti Infect Ther 7(8): 1015-1026.
- Clark, J. M. and L. M. Pakman (1971). "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by hyperbaric oxygen. II. Ultrastructural changes." Infect Immun 4(4): 488-491.
- Clark, L. A. and R. E. Moon (1999). "Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections." Respir Care Clin N Am 5(2): 203-219.
- Clissold, S. P., P. A. Todd, et al. (1987). "Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy." Drugs 33(3): 183-241.
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. (2009). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically". Approved standard-eighth edition, M07-A8, 29(2) replaces M07-A7, 26(2).
- Crowell, R. E., G. Hallin, et al. (1995). "Hyperoxic suppression of Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis by isolated murine pulmonary macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol 12(2): 190-195.
- Cryz, S. J., Jr. (1984). "*Pseudomonas aeruginosa* infections", p. 317-351. In R. Geormainier (ed.), *Bacterial vaccines*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

- Degrossoli, A., M. C. Bosetto, et al. (2007). "Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*." Immunol Lett 114(2): 119-125.
- Dimitrijevic, S. D., S. Paranjape, et al. (1999). "Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents." Wound Repair Regen 7(1): 53-64.
- Figueiredo-Mendes, C. M., S. Sinto, et al. (2005). "Pseudomonas aeruginosa clonal dissemination in Brazilian intensive care units." Enferm Infecc Microbiol Clin 23(7): 402-405.
- Fuentefria, D. B., A. E. Ferreira, et al. (2008). "[Pseudomonas aeruginosa: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water]." Rev Soc Bras Med Trop 41(5): 470-473.
- Gales, A. C., L. C. Menezes, et al. (2003). "Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase." J Antimicrob Chemother 52(4): 699-702.
- Gales, A. C., A. O. Reis, et al. (2001). "Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines." J Clin Microbiol 39(1): 183-190.
- Gales, A. C., M. C. Tognim, et al. (2003). "Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital." Diagn Microbiol Infect Dis 45(1): 77-79.
- Gaynes, R. and J. R. Edwards (2005). "Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli." Clin Infect Dis 41(6): 848-854.
- Ghosh, M. M., S. Boyce, et al. (1997). "A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites." Ann Plast Surg 39(4): 390-404.
- Giorgio, S., E. Linares, et al. (1998). "In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis." Infect Immun 66(2): 807-814.
- Gordillo, G. M., S. Roy, et al. (2008). "Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds." Clin Exp Pharmacol Physiol 35(8): 957-964.
- Greensmith, J. E. (2004). "Hyperbaric oxygen therapy in extremity trauma." J Am Acad Orthop Surg 12(6): 376-384.
- Heng, M. C., J. Harker, et al. (2000). "Angiogenesis in necrotic ulcers treated with hyperbaric oxygen." Ostomy Wound Manage 46(9): 18-28, 30-12.
- Hoban, D. J., D. J. Biedenbach, et al. (2003). "Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000)." Diagn Microbiol Infect Dis 45(4): 279-285.
- Hopf, H. W., J. J. Gibson, et al. (2005). "Hyperoxia and angiogenesis." Wound Repair Regen 13(6): 558-564.
- Joklik, W. K., H. P. Willet et al. (1994). "Pseudomonas". In: (Ed.). Zinsser Microbiología. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana. Pseudomonas, p.785-794
- Jones, R. N. (2010). "Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia." Clin Infect Dis 51 Suppl 1: S81-87.

- Koga-Ito, C. Y., J. P. Lyon, et al. (2008). "Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 50(1): 7-10.
- Kuiper, J. W., H. Pluk, et al. (2008). "Creatine kinase-mediated ATP supply fuels actin-based events in phagocytosis." PLoS Biol 6(3): e51.
- Kulasekara, B. e S. Lory. (2004). "The genome of *Pseudomonas aeruginosa*". Ramos, J.L. (ed.), *Pseudomonas*, Vol. 1. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 47-75.
- Lambert, P. A. (2002). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." J R Soc Med 95 Suppl 41: 22-26.
- MacManus, A. T., A. D. Mason Jr. et al. (1985). "Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center". Eur J Clin Microbiol 4:219-223.
- MacNeil, S. (2007). "Progress and opportunities for tissue-engineered skin." Nature 445(7130): 874-880.
- Martin-Mazuelos, E., M. J. Gutierrez, et al. (1999). "A comparative evaluation of Etest and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp." J Antimicrob Chemother 43(4): 477-481.
- Mendes R. E., M. Castanheira et al. (2006). "Metallo- β -lactamases". J Bras Patol Med Laboratorial 42:103-113, 2006.
- Ministério da saúde. (2006). "Relação nacional de medicamentos essenciais – Rename 2006". Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Técnica e multidisciplinar de atualização da relação nacional de medicamentos essenciais – Comare. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/imipenem_cilastatina.pdf> Acesso em: 10 de mar. de 2011.
- Moon, R. E. and E. M. Camporesi (1999). "Hyperbaric oxygen therapy: from the nineteenth to the twenty-first century." Respir Care Clin N Am 5(1): 1-5.
- Morrow, D. M., T. Entezari-Zaher, et al. (2007). "Antioxidants preserve macrophage phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during hyperoxia." Free Radic Biol Med 42(9): 1338-1349.
- Netzlaff, F., C. M. Lehr, et al. (2005). "The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport." Eur J Pharm Biopharm 60(2): 167-178.
- Niu, C. C., L. J. Yuan, et al. (2011). "Beneficial effects of hyperbaric oxygen on human degenerated intervertebral disk cells via suppression of IL-1 β and p38 MAPK signal." J Orthop Res 29(1): 14-19.
- O'Reilly, P. J., J. M. Hickman-Davis, et al. (2003). "Hyperoxia impairs antibacterial function of macrophages through effects on actin." Am J Respir Cell Mol Biol 28(4): 443-450.
- Pakman, L. M. (1971). "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by hyperbaric oxygen. I. Sulfonamide activity enhancement and reversal". Infect Immun 4(4):479-487.
- Park, M. K., K. H. Muhvich, et al. (1991). "Hyperoxia prolongs the aminoglycoside-induced postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother 35(4): 691-695.

- Patel, V., I. V. Chivukula, et al. (2005). "Oxygen: from the benefits of inducing VEGF expression to managing the risk of hyperbaric stress." Antioxid Redox Signal 7(9-10): 1377-1387.
- Pennock, C. A. (1966). "Effect of hyperbaric oxygen on the growth of aerobic organisms in deep culture." Lancet 1(7451): 1348-1350.
- Phan, B. D., M. Entezari, et al. (2011). "Hydrogen peroxide enhances phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* in hyperoxia." J Immunotoxicol 8(1): 3-9.
- Plafki, C., P. Peters, et al. (2000). "Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy." Aviat Space Environ Med 71(2): 119-124.
- Pruitt, B. A., Jr. (1984). "The diagnosis and treatment of infection in the burn patient." Burns Incl Therm Inj 11(2): 79-91.
- Qarah, S., A. B. Cunha et al. (2008). "*Pseudomonas aeruginosa* infections: Overview 2008". Disponível em: < <http://www.emedicine.com/med/topic1943.html>> Acesso em: 10 mar. de 2011.
- Raffin, T. A., L. M. Simon, et al. (1980). "Impairment of phagocytosis by moderate hyperoxia (40 to 60 per cent oxygen) in lung macrophages." Lab Invest 42(6): 622-626.
- Rister, M. (1982). "Effects of hyperoxia on phagocytosis." Blut 45(3): 157-166.
- Sheikh, A. Y., J. J. Gibson, et al. (2000). "Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model." Arch Surg 135(11): 1293-1297.
- Shepherd, J., I. Douglas, et al. (2009). "Development of three-dimensional tissue-engineered models of bacterial infected human skin wounds." Tissue Eng Part C Methods 15(3): 475-484.
- Shepherd, J., P. Sarker, et al. (2011). "Hyperbranched poly(NIPAM) polymers modified with antibiotics for the reduction of bacterial burden in infected human tissue engineered skin." Biomaterials 32(1): 258-267.
- Suttorp, N. and L. M. Simon (1983). "Decreased bactericidal function and impaired respiratory burst in lung macrophages after sustained in vitro hyperoxia." Am Rev Respir Dis 128(3): 486-490.
- Zhang, Q., Q. Chang, et al. (2008). "Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model." J Invest Dermatol 128(8): 2102-2112.

8. Anexos



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp

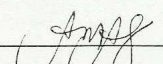
CERTIFICADO

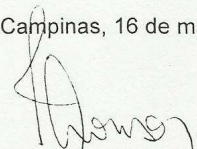
Certificamos que o Protocolo nº 1775-1, sobre "Estudo da eficácia da câmara hiperbárica (HBO) no tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* nos modelos *in vitro* e murino", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Flávia Luna Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 16 de março de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1775-1, entitled "Study of the effectiveness of Hyperbaric Chamber (HBO) in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in murine models", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/cee/>