ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS19

CLAVANINA A BIOCONJUGADA COM NANOPARTÍCULAS DE Fe_3O_4 PARA ABLAÇÃO TÉRMICA DE BIOFILMES BACTERIANOS

K. L. RIBEIRO¹, I. A. M. FRÍAS¹, O. L. FRANCO^{2,3}, A. A. SOUZA JR⁴, O. N. SILVA³, A.
F. BAKUZIS⁴, M. D. L. OLIVEIRA^{1,5} e C. A. S. ANDRADE^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco.

² Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de
Brasília.

³ S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco.

⁴ Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás.

⁵ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: kalline_farmajp@hotmail.com

RESUMO – *O uso de cateteres venosos centrais (CVC) está altamente associado às infecções nosocomiais. A contaminação bacteriana desses dispositivos é frequente e pode resultar no desenvolvimento de comunidades microbianas, também conhecidas como biofilmes. Neste trabalho, foi realizada a modificação da superfície do CVC através da imobilização de nanopartículas Fe_3O_4 funcionalizadas com o peptídeo antimicrobiano clavanina A, como profilaxia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os CVCs revestidos demonstraram uma redução de até 70 a 90% do crescimento de bactérias gram-negativas quando comparado ao cateter controle (limpo). Além disso, a ablação fototérmica (PHAB) de cateteres revestidos já contaminados por biofilme bacteriano (CVC-BF) pode ser desencadeada opcionalmente para eliminar as formações de biofilme. Os CVC-BF cultivados durante 96 h após um tratamento fototérmico realizado durante 5 min a 80 °C resultaram na redução da viabilidade das bactérias ligadas em 71 a 88%.*

Palavras chave: *Peptídeos antimicrobianos; Clavanina A; cateter; biofilme; hipertermia.*

ABSTRACT - *The use of central venous catheters (CVC) is highly associated with nosocomial infections. Bacterial contamination of these devices is frequent and may result in the development of microbial communities, also known as biofilms. In this work, the CVC surface was modified by the immobilization of Fe_3O_4 nanoparticles functionalized with the antimicrobial peptide clavanin A, as antimicrobial*

prophylaxis for Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae. Coated CVCs demonstrated a reduction of up to 70-90% of Gram-negative bacteria growth when compared to the (clean) control catheter. In addition, photothermal ablation (PHAB) of coated catheters already contaminated with bacterial biofilm (CVC-BF) can optionally be triggered to eliminate biofilm formations. CVC-BF cultured for 96 h after a PHAB treatment carried out for 5 min at 80 ° C resulted in the reduction of the viability of the bound bacteria in 71 to 88%.

Keywords: antimicrobial peptides; clavanin A; catheter; biofilm; hyperthermia

1. INTRODUÇÃO

Os cateteres venosos centrais (CVCs) são habitualmente utilizados como acesso vascular e monitoramento da pressão venosa em unidades de diálise renal e terapia intensiva, assim como, em departamentos de oncologia. No entanto, seu uso pode causar complicações com aumento da morbidade e mortalidade, particularmente em crianças (RAMRITU et al., 2008; GILLIES et al., 2003). As infecções sanguíneas (IS) representam a complicação mais grave relacionada aos CVCs, gerando altos custos. Precauções importantes, como antisepsia da pele antes da inserção e remoção precoce do cateter são algumas das ações comumente relatadas para efetivamente reduzir a CVCs-IS (LAI et al., 2016).

CVCs-IS derivam da ligação bacteriana a uma superfície irregular que promove lentamente a formação de biofilmes. Antes do aparecimento alarmante de bactérias resistentes a medicamentos, CVCs impregnados com antibióticos (DAROUICHE et al., 1999) foram propostos para reduzir as taxas de colonização do cateter. Posteriormente, outras alternativas foram exploradas, como o uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs), como defensinas, cathelicidinas, cecropinas, clavaninas, entre outros (LÓPEZ-ABARRATEGUI et al., 2013). Além disso, autores relataram metodologias para remoção ativa de biofilme infeccioso com o uso de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 -NPs), outros NPs de metal ou óxido de metal e nanomateriais à base de carbono que demonstraram propriedades antibacterianas.

A hipertermia corresponde a um procedimento terapêutico relacionado ao aumento das temperaturas abaixo de 50°C, enquanto que os processos de temperatura acima de 50 °C são considerados ablação térmica. Os PAMs são pequenos peptídeos de massa molecular (menos de 50 resíduos de aminoácidos) que, em geral, apresentam alta estabilidade térmica (MENGS et al., 2010).

Neste trabalho, combinamos as propriedades antimicrobianas da clavanina A (clavA), um PAM derivado de tunicados marinhos, com nanopartículas de óxido de ferro fototérmicas para prolongar a vida útil dos CVCs e, quando desejado, ativar a ablação térmica para potencializar a inativação bacteriana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Síntese e modificação química das Fe_3O_4 Nps

Resumidamente, uma solução de NH_4OH 1,5 M foi lentamente adicionada sob

agitação a uma

solução FeSO_4 a 0,5 M e FeCl_3 a 0,1 M, até se obter uma solução escura (pH 8) e foi mantida sob agitação durante 12 h. As partículas magnéticas resultantes foram separadas magneticamente. Para modificação química, foram adicionados 0,01 g de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ a uma solução de Ácido dimercaptosuccínico (DMSA) 0,3 M e agitada à temperatura ambiente durante 24 h.

2.2. Imobilização do peptídeo nas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DMSA

Para imobilizar o peptídeo clavA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$, 0,01 g de Fe_3O_4 -DMSA foi ativada em uma solução EDC: NHS (0,4 M: 0,1 M) durante 10 min. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de uma solução de clavA 0,01 mg.mL⁻¹ e mantidos durante 10 h sob agitação à temperatura ambiente.

2.3. Modificação da superfície do cateter de silicone

O cateter foi seccionado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, submetido a um tratamento com plasma de oxigênio durante 5 min e depois imerso em uma solução de Aminopropiltriétoxissilano (APTES) 0,1 M durante a noite, para obter grupos amino primários expostos na superfície. Posteriormente, os segmentos silanizados foram enxaguados com etanol, secos com vapor de gás nitrogênio e em seguida, imersos em uma solução de glutaraldeído a 2,5% durante 10 min. Por fim, os cateteres foram transferidos para a solução de Fe_3O_4 -DMSA-clavA. O sistema foi incubado durante 24 h, depois enxaguado com água DI.

2.4. Análise morfológica

A estrutura das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ foi avaliada com microscopia eletrônica de transmissão (MET) operada a 80 kV. A morfologia da superfície do cateter foi analisada antes da infecção, durante a infecção e após a ablação térmica com microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.5. Teste da atividade antimicrobiana do cateter modificado com Fe_3O_4 -DMSA-clavA

Para avaliar a atividade antimicrobiana do cateter modificado contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, realizamos um ensaio de inibição de crescimento por microdiluição de caldo realizando o ensaio em placa de microtitulação, de acordo com o Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS, 2003). Todas as bactérias foram cultivadas a partir de estoques congelados em caldo Luria-Bertani (LB) a 37 ° C durante a noite. As culturas foram cultivadas, crescidas e ajustadas para uma concentração de aproximadamente 5×10^5 CFU.mL⁻¹, determinada por leituras OD₆₀₀.

Todos os segmentos do CVC modificados e não modificados (N = 3) foram desinfetados por submersão em solução de etanol a 70% durante 10 min. Em seguida, os segmentos foram enxaguados três vezes com caldo LB esterilizado e, posteriormente, cada segmento foi colocado em um tubo Eppendorf contendo 1 mL de caldo LB ajustado em concentração bacteriana de $\sim 5 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹. Todos os tubos foram colocados a 37 ° C a 50 RPM no agitador durante 6 h. Após a incubação, 100 µL de cultura bacteriana foram diluídos em série e dispostos para crescimento de CFU planctônico. Para contar as CFUs aderidas, cada segmento de cateter foi enxaguado três vezes com caldo de LB esterilizado e transferido

para um Eppendorf contendo 500 μL de PBS estéril e ajustado durante 10 minutos em banho ultrassônico de 100 W, 42 KHz. Finalmente, cada amostra foi mixada em alta velocidade por 10 s, diluída em série e por fim, quantificada.

2.6. Teste de ablação térmica do cateter modificado com Fe_3O_4 -DMSA-clavA

Para os ensaios de foto-hipertermia, todos os segmentos de CVC foram enxaguados três vezes em PBS estéril e expostos durante 5 minutos a um laser de 808 nm em diferentes saídas de energia para atingir diferentes temperaturas médias (50, 60, 70 e 80 ° C). Os experimentos fototérmicos usaram um laser de diodo com 808 nm de comprimento de onda, o modelo Laser iZi 808. A temperatura foi monitorada usando uma câmera térmica infravermelha, modelo SC 620. O procedimento de hipertermia consistiu em monitorar a temperatura com o laser desligado durante 1 minuto, 5 minutos de aquecimento e 2 minutos de resfriamento.

Posteriormente, os segmentos tratados com hipertermia foram colocados em tubos Eppendorf contendo 1 mL de LB estéril e incubados a 37 ° C num agitador a 50 RPM. O caldo foi atualizado a cada 24 h durante 4 dias, substituindo a metade do meio existente por LB estéril. As células planctônicas foram contadas tomando 100 μL de cultura bacteriana diária, que foram diluídas em série e em seguida foi realizada a contagem de CFUs. Todas as placas foram incubadas a 37 ° C durante a noite ou até formarem colônias visíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo da morfologia

A estratégia seguida para funcionalizar os segmentos CVC está ilustrada na Fig. 1.

Figura 1 – Ilustração da funcionalização de um segmento de cateter com plasma e APTS seguido de NPs Fe_3O_4 -DMSA-clavA ativados com glutaraldeído.

O segmento de cateter foi inicialmente tratado com plasma de ar para desenvolver uma superfície hidrofóbica que contribui para a auto-montagem de um filme de APTS. A mudança na morfologia da superfície do CVC com película APTS (Fig. 2a) após incubação na solução de glutaraldeído / Fe_3O_4 -DMSA-clavA (Fig. 2b) demonstra que a imobilização ocorreu com sucesso.

Figura 2 - Superfície do cateter com filme de APTS (a) e após a imobilização de NpsFe₃O₄-DMSA-clavA (b).

A Fig. 3 mostra a morfologia de um segmento de CVC modificado com Fe₃O₄-DMSA-clavA (Fig. 3a) depois de exposto a cultura bacteriana (Fig. 3b) e após tratamento com foto-hipertermia a 80 ° C durante 5 min (Fig. 3b). Inicialmente, o segmento é homogeneamente revestido e não são observadas aglomerações. Após semeado com cultura bacteriana, uma formação evidente de biofilmes pode ser observada em todo o segmento CVC. Após o tratamento de termo ablação, notamos grande redução do conteúdo de biofilme.

Figura 3. Superfície do cateter controle com Fe₃O₄-DMSA-clavA (a), biofilme aderente à superfície do cateter (b), termo ablação a 80 ° C durante 5 min.

3.2. Atividade antimicrobiana in vitro do cateter modificado

A atividade antimicrobiana do segmento de CVC modificado com Fe₃O₄-DMSA-clavA foi avaliada frente bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*). Os segmentos modificados e os segmentos de controle (limpos) foram testados para avaliar o número de bactérias aderidas em sua superfície e bactérias planctônicas em solução após 6 horas de incubação.

Na Fig. 4a, a adesão de *S. aureus* em ambas as diferentes superfícies é mostrada, enquanto a Fig. 4b mostra o número de bactérias planctônicas (CFU) que permanecem em solução. Em comparação com o CVC não revestido, a modificação resulta na redução da adesão bacteriana em 46,1% e também mostra diminuir o número de bactérias planctônicas em 17,8%. Além disso, o revestimento foi mais eficaz para bactérias Gram-negativas. Por exemplo, a adesão de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Fig. 4 c, e, g) foi reduzida em 69,8%, 89,1% e 86,8%, respectivamente, em comparação com os CVCs limpos.

Figure 4. Atividade antimicrobiana de CVC modificado com Fe_3O_4 -DMSA-clavA após 6 h em caldo LB. Aderência bacteriana na superfície do CVC e crescimento planctônico para as culturas de *S. aureus* (a, b), *E. coli* (c, d), *P. aeruginosa* (e, f) e *K. pneumoniae* (g, h).

A redução do crescimento planctônico foi encontrada em *E. coli*, *P. aeruginosa* (Fig. 4d e f) em 13,3%, 12,1%, respectivamente, mas no caso de *K. pneumoniae* (Fig. 4h), a redução foi de um modesto 4,3%. Esse comportamento está, possivelmente, relacionado ao grande crescimento de bactérias planctônicas em comparação com outras cepas bacterianas.

O mecanismo primário envolve a interação específica da clavA em relação às bicamadas lipídicas, por esse motivo, o revestimento é mais eficaz em bactérias Gram-negativas. A interação lipídeo / clavA promove a formação de poros na membrana bacteriana, inibindo o desenvolvimento de aglomerados de bactérias (GIOVANNA et al., 2011) e consequentemente, a formação de biofilme. Por outro lado, as Fe_3O_4 NPs são conhecidas por separar as macromoléculas presentes nas formações de biofilme na presença de peróxido de hidrogênio, trabalhando como catalisador de degradação de biofilme (QAYYUM e KHAN, 2016).

3.3. Fotoablação induzida em cateter modificado

Após 6 h de incubação em cada cultura bacteriana, os segmentos de CVC - incluindo um controle limpo e um CVC modificado com Fe_3O_4 -DMSA-clavA- foram submetidos por 5 min a diferentes temperaturas aplicadas pelo tratamento com fotoablação e posteriormente semeadas em meio fresco para estudar o crescimento de bactérias planctônicas. A Fig. 5 apresenta a avaliação diária das culturas bacterianas, sendo o caldo atualizado a cada 24 h. Os biofilmes com choque térmico apresentam uma sensibilidade aumentada global demonstrada pelas suas pequenas taxas de crescimento em relação ao controle. Em todos os casos (bactérias Gram-positivas ou negativas) pode-se verificar que uma maior temperatura de exposição resulta em um declínio extensivo do crescimento.

Figura 5. Crescimento planctônico de *S. aureus* (a), *E. coli* (b), *P. aeruginosa* (c) e *K. pneumoniae* (d) durante uma cultura de 96 h.

Por exemplo, após 96 h de incubação, as culturas semeadas com segmentos CVC tratados por fotoablação a 80 °C resultaram numa redução de 77%, 71%, 73% e 88% na viabilidade de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Com base nestas observações, confirmamos que as diferenças entre as imagens Fig. 3b e Fig. 3c são definitivamente a exclusão do biofilme alcançado através da exposição à ablação fototérmica. No entanto, deduzimos que, embora a termoablação reduza a área do biofilme, não reduz a viabilidade das bactérias remanescentes, já que as culturas ainda podem ser semeadas. No entanto, melhores resultados são obtidos após o tratamento dos segmentos com 80 °C.

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o CVC foi modificado pela imobilização de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com o PAM clavanina A. O revestimento proposto teve excelente desempenho inibindo a ligação de bactérias Gram-negativas (70-90%) e atividade moderada em bactérias Gram-positivas (46%). Além disso, a contagem de bactérias planctônicas diminuiu ligeiramente (5-20%). Estes resultados são interessantes, uma vez que o revestimento proposto previne a adesão bacteriana e, portanto, o risco de formação de biofilmes e possíveis infecções sanguíneas. Quando o cateter revestido já estava contaminado por biofilme bacteriano, a presença de nanopartículas de óxido de ferro permitiu desencadear aplicações de hipertermia fototérmica e ablação.

5. REFERÊNCIAS

- RAMRITU P., HALTON K., COOK D., WHITBY M., GRAVES N. Catheter-related bloodstream infections in intensive care units: a systematic review with meta-analysis, **Journal of Advanced Nursing** 62(1) (2008) 3-21.
- GILLIES D., O'RIORDAN E., CARR D., O'BRIEN I. , FROST J.,GUNNING R. Central venous catheter dressings: a systematic review, **Journal of Advanced Nursing** 44(6) (2003) 623-632.
- LAI N.M., N.A. LAI, E. O'RIORDAN, N. CHAIYAKUNAPRUK, J.E. TAYLOR, K. TAN, Skin antiseptics for reducing central venous catheter-related infections, **Cochrane Database of Systematic Reviews** (7) (2016).
- DAROUICHE R.O., I.I. RAAD , S.O. HEARD , J.I. THORNBLY , O.C. WENKER , A. GABRIELLI , J. BERG , N. KHANDORI , H. HANNA , R. HACHEM , R.L. HARRIS , G. MAYHALL A Comparison of Two Antimicrobial-Impregnated Central Venous Catheters, **New England Journal of Medicine** 340(1) (1999) 1-8.
- LÓPEZ-ABARRATEGUI C., V. FIGUEROA-ESPÍ, O. REYES-ACOSTA, E. REGUERA, A.J. OTERO-GONZALEZ, Magnetic Nanoparticles: New Players in Antimicrobial Peptide Therapeutics, **Current Protein & Peptide Science** 14(7) (2013) 595-606.
- MENG S., H. XU, F. WANG, Research Advances of Antimicrobial Peptides and Applications in Food Industry and Agriculture, **Current Protein and Peptide Science** 11(4) (2010) 264-273.
- GIOVANNA B., M. GIUSEPPANTONIO, B. FRANCA LISA, E. SEMIH, C. MARIO, Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits, **Current Medicinal Chemistry** 18(2) (2011) 256-279.
- QAYYUM S., A.U. KHAN, Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance, **MedChemComm** 7(8) (2016) 1479-1498.

6. AGRADECIMENTOS

INCT-BIOINSPIR, INCT-IF, CAPES, CNPq, FAGEP e FACEPE.