

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Enfermagem

Gilmara Lopes Amorim

**AVALIAÇÃO DE UM MODELO DE FERIDA CUTÂNEA COM BIOFILME DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte, MG

2020

Gilmara Lopes Amorim

**AVALIAÇÃO DE UM MODELO DE FERIDA CUTÂNEA COM BIOFILME DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem. Área de Concentração: Saúde e Enfermagem. Linha de Pesquisa: Cuidar em Saúde e Enfermagem.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eline Lima Borges

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucíola da Silva Barcelos

Belo Horizonte, MG

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Amorim, Gilmara Lopes.

Avaliação de um modelo de ferida cutânea com biofilme de pseudomonas aeruginosa em camundongos [manuscrito] / Gilmara Lopes Amorim. - 2020.

132 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eline Lima Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Biofilmes. 2. Matriz Extracelular de Substâncias Poliméricas. 3. Cicatrização. 4. Infecções por Pseudomonas. 5. Pseudomonas aeruginosa. I. Borges, Eline Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Enfermagem. III. Título.

A realização deste estudo ocorreu por meio da parceria entre a Escola de Enfermagem, do Laboratório de Angiogênese e Células-tronco (Lancet), do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos do Instituto de Ciências Biológicas e do Centro de Microscopia, todos pertencentes à Universidade Federal de Minas.

Órgão de financiamento: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS – FAPEMIG, modalidade: “Edital 01/2015 - Demanda Universal” sob o processo de número CDS - APQ-00904-15.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eline Lima Borges

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucíola da Silva Barcelos

Belo Horizonte, MG

2020

Gilmara Lopes Amorim

**AValiação de um modelo de ferida cutânea com biofilme de
PSEUDOMONAS AERUGINOSA em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Eline Lima Borges - (Orientadora e Presidente da banca)

Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.^a Dr.^a Lucíola da Silva Barcelos - (Coorientadora)

Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.^a Dr.^a Adriana Cristina de Oliveira Iquiapasa - (Membro titular)

Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes - (Membro titular)

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Kinulpe Honorato-Sampaio - (Membro suplente)

Faculdade de Medicina da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri


Prof.^a Dr.^a Giovana Paula Rezende Simino (Membro suplente)

Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

2020

FOLHA DE APROVAÇÃO / ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENFERMAGEM
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DE NÚMERO 647 (SEISCENTOS E QUARENTA E SETE) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA GILMARA LOPES AMORIM PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM ENFERMAGEM.

Aos 29 (vinte e nove) dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 14:00 horas, realizou-se a sessão para apresentação e defesa da dissertação "CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE FERIDA CUTÂNEA COM BIOFILME DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM CAMUNDONGOS", da aluna **Gilmara Lopes Amorim**, candidata ao título de "Mestra em Enfermagem", linha de pesquisa "Cuidar em Saúde e Enfermagem". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Eline Lima Borges (orientadora), Luciola da Silva Barcelos (coorientadora), Antônio Carlos Martins Guedes e Adriana Cristina de Oliveira, sob a presidência da primeira. Aberto a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

(x) APROVADA.
() REPROVADA.

A Comissão examinadora recomendou a mudança do título para:

"AVALIAÇÃO DE UM MODELO DE FERIDA CUTÂNEA COM BIOFILME DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM CAMUNDONGOS"

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, **Andréia Nogueira Delfino**, Secretária do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de dezembro de 2020.

Prof. Dr. Eline Lima Borges _____
Orientadora (EEUFMG)

Prof. Dr. Luciola da Silva Barcelos _____
(coorientadora)

Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes _____
(Pac. Medicina/UFMG)

Prof. Dr. Adriana Cristina de Oliveira _____
(Doc. Enf/UFMG)

Prof. Dr. Kimulpe Honorato-Sampaio _____
(UFVJM)

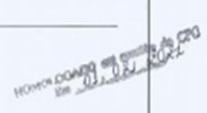
Andréia Nogueira Delfino _____
Secretária do Colegiado de Pós-Graduação


MUNICIPLAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

Instituições exigidas na Dissertação de Mestrado da Senhora GILMARA LOPES AMORIM.


As modificações foram as seguintes:

NOMES	ASSINATURAS
Prof. Dr. Eline Lima Borges	_____
Prof. Dr. Luciola da Silva Barcelos	_____
Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes	_____
Prof. Dr. Adriana Cristina de Oliveira	_____
Prof. Dr. Kimulpe Honorato-Sampaio	_____







Documento assinado eletronicamente por **Eline Lima Borges**, Membro, em 30/12/2020, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.




Documento assinado eletronicamente por **Adriana Cristina de Oliveira Iquiassá**, Professora do Magistério Superior, em 05/01/2021, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.




Documento assinado eletronicamente por **Luciola da Silva Barcelos**, Professora do Magistério Superior, em 28/01/2021, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Kimulpe Honorato Sampaio**, Usuário Externo, em 28/01/2021, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.




Documento assinado eletronicamente por **Andréia Nogueira Delfino**, Assistente em Administração, em 04/02/2021, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/pep/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_organizacao_externa=0, informando o código verificador 0498499 e o código CRC 58681059.

Referência: Processo nº 23071.215084/2020-08 SEI nº 0498499



Dedico este trabalho a “Dona Jô” (*in memoriam*) como carinhosamente era chamada minha amada mãezinha. Uma mulher destemida e à frente do seu tempo! Exemplo de força, coragem e companheirismo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, minha fortaleza e amparo de todas as horas. Sem ti eu nada seria! Obrigada por seu amor incondicional e por me sustentar diariamente nessa caminhada!

Aos meus pais, Sebastião Jaconi Amorim e Jorgina Lopes Moreira (*in memoriam*), por serem minha inspiração, meu exemplo de vida, de força e coragem! Sobretudo à minha mãe, uma mulher guerreira e que, com toda sua simplicidade, soube me instigar a buscar o melhor de mim em qualquer situação, circunstância ou lugar.

Ao meu filho João Moisés, um presente de Deus em minha vida! Obrigada por trazer tantas alegrias e por aflorar em mim um amor sem igual.

Ao meu marido Francisco Murilo por estar comigo nessa caminhada tornando os meus dias mais leves e mais felizes!

Aos meus amados irmãos Arnaldo, Antônia, Giselia e Jussara, meus melhores amigos e companheiros nesta jornada que se chama vida. Juntos seremos sempre mais fortes!

Aos meus sobrinhos e afilhado, André Carlos, Ana Luíza, Luiz Gustavo, Luiz Felipe, Maria Clara e Paulo Henrique, para os quais eu desejo ser, a cada dia, um exemplo de perseverança e de caráter.

À minha tia Jordina por sua dedicação e presença constante em minha vida!

Às minhas queridas amigas e companheiras de jornada, D. Silvia, Jaqueline, Lídia e Margarete, por acreditarem e me apoiarem continuamente! E, em especial, eu agradeço a “Margô” pelo auxílio e companheirismo diário dos últimos meses!

À minha querida professora e orientadora Eline Lima Borges, exemplo e inspiração diária. Obrigada pelos ensinamentos e por fazer despertar em mim o raciocínio clínico que deu origem a tudo isso. Pensar o cuidado de forma tão singular é mérito seu! Obrigada pela oportunidade de aprendizado, pelo incentivo, apoio, paciência e compreensão das dificuldades vivenciadas nessa caminhada. Obrigada por acreditar e não desistir de mim quando nem eu mesma conseguia acreditar que seria possível a conclusão dessa etapa.

À minha querida professora e coorientadora Lucíola da Silva Barcelos pela parceria, apoio e auxílio em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pelas oportunidades

de aprendizado e discussão ao longo desse período e, principalmente, por fazer despertar em mim o raciocínio crítico experimental. Eles foram essenciais para a condução deste projeto.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Angiogênese e Células-tronco do ICB/UFMG, especialmente a Mariana Barcelos e Elder Koldney por dividirem comigo as dúvidas, o aprendizado e as tarefas diárias dentro do laboratório. Obrigada pela presença atuante em cada fase da execução deste trabalho, sem o auxílio de vocês eu não teria chegado até aqui. Também quero destacar aqui os meus mais sinceros agradecimentos aos alunos da iniciação científica, Hedden, Laura, Vitória, Isabela e Juliane, que estiveram presentes em vários momentos dessa trajetória. Obrigada pela oportunidade de aprendizado!

Aos amigos, colegas e parceiros do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos da UFMG, especialmente ao professor Flaviano dos Santos Martins, pela doação e transferência da amostra de *P. aeruginosa* utilizada neste estudo; por ceder espaço no biotério para o alojamento dos animais utilizados nesta pesquisa e por compartilhar o uso de equipamentos tão necessários à execução deste trabalho.

Aos queridos professores Adriana Oliveira, Antônio Guedes, Kinulpe Honorato e Giovana Simino, que gentilmente aceitaram participar da minha banca de defesa. A contribuição de vocês é fundamental para a continuidade deste trabalho, para melhorias nos processos desta pesquisa, escrita e divulgação dos resultados obtidos.

Aos amigos e parceiros Ana Carolina Tyrone Silveira e Puebla Cassini Vieira pelo empenho e colaboração na elaboração do projeto inicial.

E por fim, quero agradecer à FAPEMIG pelo financiamento deste estudo. A execução deste projeto de trabalho não seria possível sem o apoio financeiro recebido.

Chegar até aqui é a concretização de um sonho que se faz realidade! Assim, é com muita alegria e gratidão que deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a todos vocês, que direta ou indiretamente contribuíram para que esta conquista fosse possível!

“Sou um só, mas sou um. Não posso realizar tudo, mas posso fazer alguma coisa. E, por ser incapaz de tudo, não vou recusar o pouco que posso fazer.”

Edward Everett Hale

RESUMO

AMORIM, G. L. Avaliação de um modelo de ferida cutânea com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos, 2020. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

Introdução: a complexidade dos biofilmes bacterianos e as limitações do seu manejo na prática clínica requerem o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo do comportamento dessas entidades em tecidos vivos e que possam amparar o gerenciamento desses microrganismos na prática clínica. Nessa perspectiva, o modelo experimental de ferida cutânea com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* torna-se um importante instrumento de identificação do biofilme e de avaliação de novas possibilidades terapêuticas para o processo de cicatrização de feridas crônicas. **Objetivo:** avaliar um modelo experimental de ferida cutânea excisional com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos. **Material e método:** trata-se de estudo pré-clínico, de natureza quantitativa e translacional. Utilizaram-se camundongos C57BL/6 saudáveis, com idade entre 8 e 12 semanas e peso entre 20 e 30g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados como controle (Pbs) e intervenção (Pa). O perfil de formação e indução do biofilme foi avaliado por meio da cinética de fechamento das feridas, cultura quantitativa das feridas e do fígado, quantificação de leucócitos no sangue periférico e avaliação das feridas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism versão 6.0 e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Consideraram-se significantes os valores de $p < 0,05$. **Resultados:** a carga bacteriana segura para indução da infecção com *P. aeruginosa* e sobrevivência dos animais foi 10^4 UFC/mL. A avaliação da cinética de fechamento e da área das feridas demonstrou que, no tempo de 5 e 7 dias, os animais do grupo Pa tiveram um retardo no processo de cicatrização, estatisticamente significativo, quando comparado ao grupo Pbs. Macroscopicamente, observou-se que as feridas do grupo Pa foram recobertas, de forma parcial ou em sua totalidade, por tecido necrótico de aspecto amarelo, úmido e espesso até o 10º dia dos experimentos. Houve maior variação ponderal nos animais do grupo Pa comparados ao grupo Pbs, sendo estatisticamente significativa no tempo de 5 dias, entretanto, apesar de ambos os grupos sofrerem perda ponderal acentuada, não houve diferença estatisticamente significativa. As diferenças observadas na cultura das feridas no tempo de 5 e 7 dias e a quantificação diferencial de basófilos no tempo de 3 dias foram estatisticamente significativas. As diferenças observadas na cultura do fígado, na quantificação global e diferencial dos demais leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) não foram significativas neste estudo. Na avaliação das feridas por TEM não foi possível identificar a presença de bactérias na forma planctônica ou do biofilme bacteriano. **Conclusão:** a carga bacteriana utilizada para indução da infecção nas feridas foi segura para garantir a sobrevivência dos animais e a colonização destas, confirmada pelo retardo do processo de cicatrização e ausência de infecção sistêmica nos animais do grupo intervenção. Entretanto, a avaliação por meio da TEM não detectou a presença do biofilme ou da *Pseudomonas* em sua forma planctônica nas feridas investigadas. Tal fato demonstra a necessidade de ajustes na técnica empregada para a TEM de modo a garantir a identificação do biofilme para validação do modelo de feridas infectadas proposto.

Descritores (Decs/Mesch: 2020): Biofilmes. Matriz Extracelular de Substâncias Poliméricas. *Pseudomonas aeruginosa*. Cicatrização. Infecções por *Pseudomonas*. Infecção dos Ferimentos. Enfermagem Baseada em Evidências.

ABSTRACTY

AMORIM, G.L. Evaluation of a model of skin wound with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in mice, 2020. Dissertation (Master's Degree in Nursing) - School of Nursing, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

Introduction: the complexity of bacterial biofilms and the limitations of handling them in clinical practice require the development of experimental models to study the behavior of these entities in living tissues that can support the management of these microorganisms in clinical practice. From this perspective, the experimental model involving skin wounds with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is an important tool to identify the biofilm and to evaluate new therapeutic possibilities for the chronic wound healing process. **Objective:** to evaluate an experimental model of excisional cutaneous wounds with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in mice. **Material and method:** this is a preclinical study of a quantitative and translational nature. Healthy C57BL/6 mice aged 8-12 weeks and weighing 20-30g were used. The animals were randomly assigned to two groups denominated as control (Pbs) and intervention (Pa). The biofilm formation and induction profile were evaluated by means of the wound closure kinetics, the quantitative culture of the wounds and liver, the quantification of leukocytes in the peripheral blood, and via wound evaluation using transmission electron microscopy (TEM). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software, version 6.0, and the results were expressed as the mean \pm standard error of the mean. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** the bacterial load safe for inducing infection with *P. aeruginosa* and for animal survival was 10^4 CFU/mL. The evaluation of the closing kinetics and of the area of the wounds showed that, at 5 and 7 days, the animals of the Pa group had a statistically significant delay in the healing process when compared to the Pbs group. Macroscopically, it was noted that the wounds of the Pa group were covered, partially or in whole, by necrotic tissue with a yellow, moist, and thick aspect until the 10th day of the experiments. There was a greater weight variation in Pa group animals compared to the Pbs group, being statistically significant at 5 days. The differences noted in the wound culture at 5 and 7 days and the differential quantification of basophils at 3 days were statistically significant. The differences seen in the liver culture, in the global and differential quantification of other leukocytes (neutrophils, eosinophils, lymphocytes, and monocytes), were not significant in this study. In the evaluation of the wounds via TEM, it was not possible to identify the presence of bacteria in the planktonic form or biofilm form. **Conclusion:** the bacterial load used to induce infection in the wounds was safe to ensure animal survival and wound colonization, as confirmed by the delay in the healing process and the absence of systemic infection in the animals in the intervention group. However, the evaluation using TEM did not detect the presence of the biofilm or of the *Pseudomonas* in the planktonic form in the investigated wounds. This demonstrates the need for adjustments in the technique that was used for TEM to ensure the identification of the biofilm to validate the proposed infected wound model.

Descriptors (Decs/Mesch: 2020): Biofilms. Extracellular Matrix of Polymeric Substances. *Pseudomonas aeruginosa*. Healing. *Pseudomonas* Infections. Wound Infection. Evidence-Based Nursing.

RESUMEN

AMORIM, G. L. Evaluación de un modelo de herida cutánea con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* en ratones, 2020. Tesis (Maestría en Enfermería) - Escuela de Enfermería, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

Introducción: la complejidad de los biofilms bacterianos y las limitaciones de su manejo en la práctica clínica demandan el desarrollo de modelos experimentales para el estudio del comportamiento de dichas entidades en tejidos vivos y que puedan amparar la gestión de esos microorganismos en la práctica clínica. Desde ese punto de vista, el modelo experimental de herida cutánea con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* se hace un importante instrumento de identificación del biofilm y de evaluación de nuevas posibilidades terapéuticas para el proceso de cicatrización de heridas crónicas. **Objetivo:** evaluar un modelo experimental de herida cutánea excisional con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* en ratones. **Material y método:** se trata de estudio preclínico, de naturaleza cuantitativa y translacional. Fueron utilizados ratones C57BL/6 sanos, con edad entre 8-12 semanas y peso entre 20-30g. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos denominados como control (Pbs) e intervención (Pa). El perfil de formación e inclusión del biofilm fue evaluado mediante la cinética de cierre de las heridas, cultivo cuantitativo de las heridas y del hígado, cuantificación de leucocitos en la sangre periférica y valoración de las heridas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se llevaron a cabo los análisis estadísticos por medio del *software* GraphPad Prism versión 6.0 y se expresaron los resultados como promedio \pm error estándar del promedio. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$. **Resultados:** la carga bacteriana segura para inducción de la infección con *P. aeruginosa* y supervivencia de los animales fue 10^4 UFC/mL. La evaluación de la cinética de cierre y del área de las heridas demostraron que, en el tiempo de 5 y 7 días, los animales del grupo Pa tuvieron un retardo en el proceso de cicatrización, estadísticamente significativo, cuando comparado con el grupo Pbs. Macroscópicamente, se observó que las heridas del grupo Pa fueron recubiertas, de modo parcial o en su totalidad, por tejido necrótico de aspecto amarillo, húmedo y espeso, hasta el 10.º día de los experimentos. Hubo mayor variación ponderal en los animales del grupo Pa comparados con el grupo Pbs, siendo estadísticamente significativo en el tiempo de 5 días. Las diferencias observadas en el cultivo de las heridas en el tiempo de 5 y 7 días y la cuantificación diferencial de basófilos en el tiempo de 3 días fueron estadísticamente significativas. Las diferencias observadas en el cultivo del hígado, la cuantificación global y diferencial de los demás leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) no fueron significativas en este estudio. En la evaluación de las heridas por TEM, no fue posible identificar la presencia de bacterias en forma planctónica o en forma de biofilm. **Conclusión:** la carga bacteriana utilizada para inducción de la infección en las heridas fue segura para garantizar la supervivencia de los animales y la colonización de las heridas, confirmada por el retardo del proceso de cicatrización y ausencia de infección sistémica en los animales del grupo intervención. Sin embargo, la evaluación mediante la TEM no detectó la presencia de biofilm o de la *Pseudomonas* en su forma planctónica en las heridas investigadas. Tal hecho demuestra la necesidad de ajustes en la técnica empleada para la TEM de modo a asegurar la identificación del biofilm para validación del modelo de heridas infectadas propuesto.

Descriptor (Decs/Mesch: 2020): Biofilms. Matriz Extracelular de Sustancias Poliméricas. *Pseudomonas aeruginosa*. Cicatrización. Infecciones por *Pseudomonas*. Infección de las Heridas. Enfermería Basada en Evidencias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Desenho esquemático das etapas de formação e desenvolvimento dos biofilmes. 2020.....	26
Quadro 1	- Estratégias usadas nas bases de dados para identificação e seleção de artigos.....	28
Quadro 2	- Síntese dos estudos <i>in vitro</i> selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca.....	30
Quadro 3	- Síntese dos estudos sobre biofilme <i>in vivo</i> no modelo animal selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca.....	34
Quadro 4	- Síntese dos estudos sobre biofilme <i>in vivo</i> em feridas de humanos selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca.....	42
Quadro 5	- Composição e distribuição do n amostral.....	49
Figura 2	- Desenho experimental seguimento de 21 dias para determinação da carga bacteriana e variáveis do modelo de infecção de feridas.....	53
Figura 3	- Desenho esquemático da confecção e posicionamento das feridas no dorso dos animais.....	55
Figura 4	- Desenho experimental do estudo.....	57
Quadro 6	- Quadro descrito das técnicas para indução de infecção nas feridas.....	66
Figura 5	- Considerações sobre o uso do filtro de celulose e da oclusão das feridas com filme transparente.....	67
Figura 6	- Curva de sobrevivência dos animais durante a etapa de determinação da carga bacteriana para infecção.....	68
Figura 7	- Cinética de fechamento das feridas na primeira etapa deste estudo.....	69
Quadro 7	- Quadro descrito do % de perdas na fase de determinação da carga bacteriana deste estudo.....	69
Figura 8	- Curva de sobrevivência no experimento de determinação da carga bacteriana.....	70
Figura 9	- Avaliação macroscópica das feridas: % de fechamento das feridas e variação ponderal na etapa 2 da determinação da carga	

	bacteriana.....	71
Figura 10	- Curva de sobrevivência na fase de validação do modelo de feridas infectadas.....	72
Quadro 8	- Quadro descrito do % de perdas na fase de validação do modelo de ferida infectada com <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Figura 11	- Avaliação macroscópica das feridas no seguimento para validação do modelo de feridas infectadas.....	73
Figura 12	- Desenho experimental e curva de sobrevivência dos animais.....	75
Quadro 9	- Avaliação do perfil de fechamento das feridas.....	76
Figura 13	- Avaliação da cinética de fechamento e da área das feridas.....	77
Figura 14	- Avaliação inter e intragrupos da cinética de fechamento e da área das feridas.....	78
Quadro 10	- Avaliação do peso bruto e da variação ponderal durante o seguimento experimental.....	79
Figura 15	- Avaliação do peso e da variação ponderal.....	80
Quadro 11	- Recuperação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas culturas das feridas.....	81
Figura 16	- Cultura das feridas e do tecido hepático.....	82
Quadro 12	- Recuperação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas culturas do fígado.....	83
Figura 17	- Quantificação global e classificação de leucócitos no sangue periférico.....	84
Figura 18	- Quantificação diferencial de leucócitos polimorfonucleares no sangue periférico.....	86
Figura 19	- Quantificação diferencial de leucócitos mononucleares no sangue periférico.....	87
Figura 20	- Imagens representativas das feridas por MET: ausência de biofilmes na área das feridas (2020)	88
Figura 21	- Imagens das feridas por MET: estruturas celulares características da pele correspondente a área das feridas (2020)	89
Figura 22	- Imagens das feridas por MET: deposição de fibras colágenas na área das feridas (2020)	90
Figura 23	- Imagens representativas das feridas por MET: células com grânulos eletrodensos (2020)	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	- American Type Culture Collection
Caldo BHI	- <i>Brain-heart Infusion Broth</i> – meio aquoso para cultura (geral)
CCF	- Controle com filtro
CEBIO	- Centro de Bioterismo
CEUA	- Comissão de Ética no uso de Animais
CM/UFGM	- Centro de Microscopia da UFGM
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSF	- Controle sem filtro
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNase	- Desoxirribonuclease I
eDNA	- Ácido desoxirribonucleico extracelular
EPS	- Substância polimérica extracelular
EPON	- Resina epóxi ou poliepóxido (polímero termorrígido)
FAPEMIG	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FRACS	- Amplificação ribossômica completa, clonagem e sequenciamento Sanger
ICB	- Instituto de Ciências biológicas
ICF	- Infectado com filtro
ISF	- Infectado sem filtro
Lancet	- Laboratório de angiogênese e células-tronco
LaBio	- Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
LPS	- Lipopolissacarídeo
M	- Molar
μL	- Microlitro
mL	- Mililitro
mm ²	- Milímetros quadrados
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MNN	- Mononucleares
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
n	- Amostra ou grupo amostral

nm	- Nanômero
NP	- Nanopartículas
PFGE	- Eletroforese em gel de campo pulsado
Pbs	- Grupo controle
Pbs vs Pa	- Avaliação intergrupos (Grupo Pbs comparado ao grupo Pa / representado por * / ** / *** / ****)
Pbs vs Pbs	- Avaliação intragrupo (Grupo Pbs comparado ao longo do tempo / representado por # / ## / ### ou ####)
Pa vs Pa	- Avaliação intragrupo (Grupo Pa comparado ao longo do tempo / representado por & / && / &&& / &&&&)
PBS	- Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
Pa	- Grupo infectado com <i>P. aeruginosa</i> ou Grupo Intervenção
PLGA	- Ácido láctico-co-glicólico
PNA	- Ácido nucléico peptídico
PMN	- Polimorfonucleares
PRADS	- Amplificação ribossomal parcial, eletroforese em gel de gradiente de densidade (DGGE) e sequenciamento Sanger (PRADS)
PRAPS	- Amplificação ribossomal parcial e pirosequenciamento (PRAPS)
PVP-I	- Polivinilpirrolidona-iodo 1%
RNA-Seq	- Sequenciamento de RNA
SEM	- Erro padrão da média
SLU	- Sistema de Limpeza Urbana
UFC/mL	- Unidade formadora de colônia por mililitro de solução
UFC/g	- Unidade formadora de colônia por grama de tecido
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
WUWHS	- World Union of Wound Healing Societies
$p < 0,05$	- * ou # ou & (significante)
$p < 0,01$	- ** ou ## ou && (muito significante)
$p < 0,001$	- *** ou ### ou &&& (extremamente significante)
$p < 0,0001$	- **** ou #### ou &&&& (extremamente significante)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	Panorama histórico do biofilme <i>in vitro</i>	29
3.2	Análise da produção do biofilme no modelo animal	34
3.3	Formação do biofilme em feridas de humano.....	42
4	MATERIAL E MÉTODO.....	48
4.1	Tipo de estudo e Campo de Estudo.....	48
4.2	Aspectos éticos	48
4.3	Animais.....	48
4.4	Amostra e cálculo amostral	49
4.5	Procedimentos e Delineamento Experimental	49
4.5.1	Ambientação e alojamento dos animais	49
4.5.2	Cultivo, repique bacteriano e preparação do inóculo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
4.5.3	Determinação da carga bacteriana	51
4.5.4	Procedimentos anestésico-cirúrgicos e indução do biofilme nas feridas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
4.5.5	Delineamento experimental	57
4.6	Avaliações realizadas.....	59
4.6.1	Sobrevida dos animais durante o seguimento experimental	59
4.6.2	Cinética de fechamento das feridas.....	59
4.6.3	Identificação da presença e dispersão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas feridas.....	60

4.6.4 Identificação da presença e dispersão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em nível sistêmico.....	60
4.6.5 Avaliação clínica dos animais	62
4.6.6 Perfil de formação do biofilme nas feridas.....	62
4.7 Análise estatística.....	65
5 RESULTADOS	66
5.1 Determinação da carga bacteriana: um estudo prévio	66
5.1.1 Etapa 1 da fase de determinação da carga bacteriana.....	66
5.1.2 Etapa 2: reavaliação da carga bacteriana e da técnica de indução de infecção das feridas	69
5.1.3 Experimento de validação da carga bacteriana e da técnica de indução de infecção das feridas.....	72
5.2 Resultados do delineamento experimental proposto.....	74
5.2.1 Avaliação da sobrevivência dos animais nos diferentes tempos experimentais	74
5.2.2 Cinética de fechamento das feridas.....	75
5.2.3 Acompanhamento clínico-ponderal	79
5.2.4 Cultura da pele correspondente à área das feridas e do tecido hepático	81
5.2.5 Quantificação global e diferencial de leucócitos	83
5.2.6 Avaliação por meio da microscopia eletrônica de transmissão.....	88
6 DISCUSSÃO.....	92
7 CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE A	127
ANEXO A.....	130
ANEXO B	131
ANEXO C.....	132

1 INTRODUÇÃO

As lesões ou feridas crônicas impõem um fardo econômico substancial para a saúde em todo o mundo (GRAY *et al.*, 2018) e apresentam altas taxas de incidência e prevalência na sociedade, principalmente na população mais idosa, pessoas institucionalizadas, pessoas com doenças crônico-degenerativas e mobilidade reduzida.

Estudos europeus, de caráter multicêntrico, identificaram que países como a Espanha, Alemanha e Portugal apresentam alta prevalência de feridas crônicas. Um estudo realizado na província de Barcelona (Espanha) avaliou 251 pessoas com feridas na atenção primária e identificou prevalência de 29% para feridas crônicas e, dentre estas, identificou-se que as úlceras por pressão representavam 13% de todas as feridas crônicas na população estudada (FERRER-SOLÀ *et al.*, 2009). Outro estudo realizado na Alemanha avaliou uma coorte de 1000 pacientes com úlceras crônicas de perna. Nessa pesquisa, as úlceras decorrentes de estase venosa representaram 51,3% de todas as feridas crônicas, as úlceras mistas 12,9% e as úlceras arteriais 11%. O tempo médio de existência das feridas foi de 41 meses, enquanto o tamanho médio foi de aproximadamente 44 cm² (JOCKENHÖFER *et al.*, 2016). Em Portugal, pesquisadores avaliaram 770 pacientes institucionalizados em unidades de cuidados continuados. A prevalência de pacientes com feridas nesse grupo foi de 17,5% (135 pacientes). Do total de feridas identificadas, 82% eram feridas crônicas e, dentre estas, as lesões por pressão (estágios 1, 2, 3 e 4) representavam 80% das feridas crônicas com duração média de aproximadamente 5,5 meses (75%) e 10 meses (25%) (FURTADO *et al.*, 2020).

No Brasil, essa situação é um pouco mais complexa. Estima-se que as lesões de pele ocorram em 3% da população, sendo que a incidência e a prevalência são maiores na população que vive com diabetes mellitus, vasculopatias periféricas e outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Entretanto, acredita-se que esses dados não refletem a situação real do país considerando que não existem bases de dados com estatísticas sobre a prevalência de lesões de pele na população e o subregistro destas é uma descontente realidade em todo o território brasileiro (RIBEIRO, 2019).

Uma pesquisa realizada em uma Unidade Básica de Saúde da cidade do Rio de Janeiro identificou 30 usuários com feridas crônicas frequentes no setor de curativos. A amostra foi composta, majoritariamente, por pacientes idosos (66,7%) com idade média de 65,3 anos e

adultos (33,3%) com idade entre 40 e 59 anos. Verificou-se que 56,7% dos pacientes apresentavam lesões vasculares, 63,3% deles manifestavam sinais clínicos ou laboratoriais de infecção ou colonização e o tempo de duração das feridas foi superior a 2 anos em 49,9% dos casos (RIBEIRO, 2019).

Um estudo realizado na região urbana do Piauí avaliou 339 idosos na atenção básica. Os autores estimaram a prevalência das lesões crônicas em 11,8% (IC95%; 8,6-15,3) e identificaram predominância da lesão por pressão com prevalência de 5,0%, seguida pela úlcera diabética, 3,2%, e úlcera vasculogênica, 2,9%. Além disso, esses pesquisadores observaram que 35% dos pacientes com lesões crônicas apresentavam mais de uma lesão, com média de 1,4 ferida por idoso. Esses autores observaram ainda que a maioria das lesões por pressão e das lesões diabéticas apresentava tamanho entre 8,1cm² e 24 cm² e tempo de evolução até 12 meses, enquanto as lesões vasculogênica crônicas atingiam tamanho superior a 24 cm² e apresentavam tempo de evolução acima de 48 meses (VIEIRA; ARAÚJO, 2018).

Outro estudo realizado na zona da Mata mineira estimou a prevalência de lesões crônicas em 0,164% (1,64/1.000 habitantes). Essa pesquisa foi composta por uma amostra de 104 pacientes vinculados as 25 equipes de Estratégia de Saúde da Família do município. Os autores descrevem que os participantes tinham idade média de 67 anos, o tempo médio de existência das lesões era de 2 anos com área média das feridas de 33 cm². Quanto à etiologia, eles observaram que 50% das lesões crônicas eram de origem venosa, 13,5% lesão por pressão e 6,7% úlceras mistas (BORGES; NASCIMENTO FILHO; PIRES JÚNIOR, 2018).

Uma revisão sistemática com meta-análise, envolvendo 9 estudos e 185 feridas crônicas, identificou que a prevalência de biofilmes bacterianos em feridas crônicas humanas é de, aproximadamente, 78,2% (MALONE *et al.*, 2017). As lesões cutâneas crônicas colonizadas ou infectadas com biofilmes bacterianos são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo devido à resistência dos biofilmes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos convencionais (BURMOLLE *et al.*, 2010; HOIBY *et al.*, 2014). Apesar dos avanços no entendimento da formação e desenvolvimento de biofilmes, o manejo clínico desses microrganismos mantém-se extremamente limitado (BJARNSHOLT *et al.*, 2017; MISIC; GARDNER; GRICE, 2014), o que, por sua vez, afeta o cuidado de enfermagem e a assistência em saúde prestados às pessoas com ferida cutânea crônica com esse tipo de comprometimento.

Os biofilmes bacterianos estão associados em pelo menos 65% de todas as infecções humanas e são mais prevalentes em infecções relacionadas a dispositivos médicos, doenças crônicas e em superfícies corporais, por exemplo, a pele e tecidos moles, como o pulmão, a bexiga e o coração (BURMOLLE *et al.*, 2010; HOIBY *et al.*, 2014). Estima-se que os biofilmes estejam presentes em, aproximadamente, 80% das feridas crônicas e que sejam os responsáveis pela cronicidade das mesmas (PHILLIPS *et al.*, 2010), podendo ser encontrados na superfície do leito da ferida, suspensos no exsudato, dentro ou aderidos ao esfacelo, dentro do tecido necrótico mais profundo ou, ainda, associados a diferentes tipos de coberturas, também conhecidas por curativos, amplamente utilizadas no tratamento das feridas cutâneas (PERCIVAL *et al.*, 2017).

Todavia, há muita controvérsia sobre as condições de identificação do biofilme em feridas cutâneas. Sabe-se que o biofilme é de natureza microscópica, sendo bastante complicada sua avaliação clínica a olho nu. Em diferentes condições de saúde e doença humana, o biofilme, quando deixado a prosperar, pode mostrar evidências em um nível macroscópico, por exemplo, a placa oral, contudo essa imagem é menos clara quando se trata de feridas crônicas (BJARNSHOLT *et al.*, 2017).

Na prática clínica, adotaram-se alguns critérios empíricos de observação do biofilme a olho nu. Esses sinais clínicos incluem a presença de uma película brilhante, translúcida e viscosa na superfície da ferida que não cicatriza (LENSELINK; ANDRIESSEN, 2011; HURLOW; BOWLER, 2012; METCALF; BOWLER; HURLOW, 2014), a presença de esfacelo (tecido necrótico frouxo e fluído) e material gelatinoso que se reconstrói rapidamente após seu rompimento e remoção, em contraste com o esfacelo e outros tecidos desvitalizados que demoram mais para se recompor (HURLOW; BOWLER, 2009; 2012; PHILLIPS *et al.*, 2010).

Nesse mesmo sentido, a *World Union of Wound Healing Societies* (WUWHS, 2016) estabelece que as feridas crônicas que não apresentam melhora da cicatrização servem como abrigo potencial de biofilmes e que, na prática clínica, é preciso olhar de maneira diferenciada para essas feridas que não cicatrizam, que não respondem aos agentes antimicrobianos e ao tratamento padrão para a cicatrização de feridas. A WUWHS (2016) salienta ainda que nos casos em que as infecções crônicas de feridas que não respondem adequadamente aos agentes antimicrobianos, ao tratamento padrão ou, ainda, nos casos de indivíduos que alternam períodos de infecção latente com episódios de infecção aguda, deverá ser levantada e

explorada a suspeita de biofilme. Nessas situações, os tratamentos propostos devem ser direcionados para a ruptura efetiva dos biofilmes ou para impedir sua formação e recomposição no leito das feridas.

Ressalta-se que o potencial patogênico do biofilme bacteriano está associado com a produção e secreção de toxinas capazes de promover um microambiente hipóxico e inflamatório persistente na ferida (TRAN *et al.*, 2009; WOLCOTT; DOWD, 2011), redução ou inibição de fagocitose pelas células do sistema imunológico e resistência antimicrobiana (COOPER *et al.*, 2014).

Além disso, a matriz de substância polimérica extracelular é considerada o principal fator de patogenicidade dos biofilmes. Esse arcabouço mucoide confere proteção aos microrganismos presentes nessa matriz, tornando os agentes antimicrobianos atuais (tópicos ou sistêmicos) pouco eficazes no tratamento das infecções causadas pelo biofilme bacteriano (ZHAO *et al.*, 2010). Acredita-se que a expressão desse revestimento proteico, formado pela matriz de substância polimérica extracelular, é um fenótipo distinto desses microrganismos, sendo este o mecanismo responsável pela sobrevivência e resistência desses microrganismos às moléculas antibacterianas e células do sistema imune mobilizadas pelo hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002; BURMOLLE *et al.*, 2010; HOIBY *et al.*, 2014).

Os principais mecanismos de virulência específicos de biofilmes incluem a sua ação, como reservatório de células patogênicas para inoculação na circulação sanguínea, a liberação de quantidade excessiva de endotoxinas pelas células que compõem o biofilme, danos aos tecidos causados pela reação excessiva de componentes do sistema imunológico ao biofilme e a disponibilização pelo biofilme de um nicho ecológico para a evolução de organismos resistentes a antibióticos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Tais fatores demonstram que a importância clínica do estudo dos biofilmes reside na capacidade dos pesquisadores de explicar as características de infecções relacionadas a dispositivos médicos, de doenças e infecções crônicas da pele, de mucosas e tecidos moles, além de planejar estratégias para combater a natureza refratária do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A virulência dos biofilmes também é associada ao tipo de patógeno envolvido em sua formação. Destaca-se, dentre os principais microrganismos bacterianos formadores de biofilmes, a *Pseudomonas aeruginosa*. Os biofilmes de *P. aeruginosa* são comunidades desenvolvidas com células bacterianas individuais embutidas em uma matriz polissacarídica

extracelular; eles são inerentemente resistentes ao tratamento antimicrobiano e seu padrão de desenvolvimento envolve a fixação inicial a uma superfície sólida e a formação de microcolônias nessa superfície (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Essa espécie de bactéria tem sido frequentemente observada em doenças pulmonares crônicas, como a fibrose cística (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999), e em feridas crônicas, como as úlceras da perna decorrentes do diabetes, por exemplo (GOLDUFSKY *et al.*, 2015). Sabe-se que, em pessoas com diabetes mellitus, essa bactéria estabelece infecção potente e persistente, secreta endotoxinas e fatores solúveis que provocam danos graves aos tecidos e inibem o processo de cicatrização de feridas (GOLDUFSKY *et al.*, 2015).

Um ponto interessante no estudo dos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* reside no fato de que a persistência do biofilme nos tecidos resulta em atração de mais células fagocitárias cuja atividade conjunta pode resultar em danos colaterais aos tecidos do hospedeiro (SCHNEIDER, 2007). É importante salientar que a virulência dessa bactéria é controlada por uma rede de sinalização altamente complexa e em grande parte não totalmente compreendida. Elas são naturalmente resistentes a diferentes tipos de antimicrobianos e sua patogenicidade está relacionada à expressão de apêndices extracelulares (flagelo e pili), sistemas de secreção tipo III e tipo IV, produção de alginato, síntese de lipopolissacarídeo (LPS) e síntese de exocompostos secretados como proteases (por exemplo, elastases A e B) e outras enzimas, toxinas (LPS, piocianina, pioverdina), fenazinas, ramnolipídios, cianeto de hidrogênio (HCN) e moléculas de detecção de quórum, por exemplo, a quinolona (COSTERTON; STEWART; GREENBERG., 1999; ALLESEN-HOLM *et al.*, 2006; ALVAREZ-ORTEGA; HARWOOD, 2007).

Além desses fatores fenotípicos que dificultam o manejo clínico do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, as principais limitações para o manejo oportuno e seguro dos biofilmes no contexto do cuidado de enfermagem aos pacientes com ferida cutânea crônica, destacam-se a falta de acesso a serviços de diagnóstico específicos, limitada mão de obra especializada, ineficácia dos antimicrobianos disponíveis para tratamento, falta de conhecimento e inabilidade técnica para o manejo dos biofilmes nas feridas cutâneas.

Desse modo, ao considerar a complexidade envolvida no gerenciamento do biofilme em feridas crônicas em humanos (PERCIVAL *et al.*, 2017), a alta prevalência do biofilme em feridas cutâneas (PHILLIPS *et al.*, 2010; BJARNSHOLT, 2017) e o crescente interesse da comunidade científica em estabelecer e conhecer os efeitos terapêuticos dos compostos que

tenham como objetivo inibir a formação de biofilmes bacterianos ou mesmo de desfazê-los (KROM; OSKAM, 2014), faz-se necessário, portanto, replicar a experiência da prática clínica de forma experimental e controlada para definir os melhores parâmetros de identificação e avaliação de biofilmes bacterianos com base em evidências científicas que sejam capazes de amparar o manejo e o gerenciamento do biofilme no cotidiano da assistência de enfermagem. Isto é, o conhecimento atual da prática clínica sustentará o desenvolvimento da pesquisa básica a fim de gerar novos conhecimentos e, estes, por sua vez, de maneira translacional, irão amparar as mudanças de condutas no tratamento de pacientes com feridas cutâneas colonizadas ou infectadas com biofilme, independentemente da sua etiologia.

Os estudos em humanos e os estudos experimentais *in vitro/in vivo* são importantes instrumentos de avaliação e de geração do conhecimento sobre o biofilme, contudo não foram suficientes para elucidar todas as lacunas sobre o gerenciamento e o manejo desses microrganismos na prática clínica. A presença de biofilmes em feridas crônicas humanas é sub-representada, visto que os estudos dessa temática relatam amostras muito pequenas (MALONE *et al.*, 2017), com vieses metodológicos e éticos, além de serem economicamente inviáveis ao se considerar o contingente amostral ideal e as implicações financeiras que envolvem a assistência integral no tratamento de feridas crônicas.

O uso de sistemas *in vitro* permitiu avanços significativos na compreensão de como os agentes antibiofilmes funcionam e servem de premissa para a realização de estudos clínicos *in vivo* mais robustos, como os ensaios pré-clínicos e os ensaios clínicos controlados. Nessa perspectiva, os estudos *in vivo* (experimentais) têm sido recomendados como uma alternativa para preencher a lacuna da bancada à cabeceira do leito, fornecendo uma base poderosa para auxiliar nas alterações nas decisões clínicas (SCHULTZ *et al.*, 2017).

Considerando essa perspectiva, o presente estudo torna-se um importante instrumento para o entendimento da formação de biofilme, sua identificação e influência no processo de cicatrização de feridas, que inclui melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de inflamação, angiogênese, reparo tecidual e modulação da resposta imune dos organismos acometidos por essas entidades. Consequentemente, o conhecimento gerado irá subsidiar o desenvolvimento de futuras pesquisas a respeito do manejo clínico do biofilme.

Para a execução deste projeto de pesquisa, a escolha pelo modelo de ferida cutânea com biofilme *in vivo* tornou-se uma proposta economicamente viável quando comparada aos

custos de um estudo clínico dessa dimensão. Alguns pesquisadores (YANG *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2010) assinalam o modelo experimental de ferida cutânea com biofilme como adequado e preciso para a identificação da estrutura morfológica do biofilme, para o estudo do comportamento dos biofilmes em feridas cutâneas e como uma alternativa para a avaliação dos efeitos de agentes antimicrobianos em biofilmes, principalmente nas comunidades bacterianas maduras ou bem estruturadas. Infere-se que o uso do modelo experimental em camundongos tem como principais vantagens a possibilidade de induzir e acompanhar a formação de biofilme em área pré-determinada pelo pesquisador; maior controle das variáveis em questão e condições de reprodutibilidade (CANESSO *et al.*, 2014).

Com o intuito de avançar no estudo dos biofilmes bacterianos e no conhecimento das implicações fisiopatológicas destes nas feridas cutâneas *in vivo*, esta pesquisa propõe a avaliação de um modelo experimental de ferida cutânea com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos. Considerando que os estudos em modelo animal são fontes de geração de evidências científicas que possibilitam a translação e a tradução do conhecimento experimental produzido para a realização de uma prática clínica mais assertiva e segura às pessoas com feridas cutâneas crônicas, acredita-se que o modelo experimental norteará o desenvolvimento de estudos comparativos para avaliar intervenções que resultem na redução e eliminação de biofilmes, gerando, conseqüentemente, melhorias para o manejo clínico e o gerenciamento do biofilme em lesões cutâneas crônicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar um modelo experimental de ferida cutânea excisional com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos.

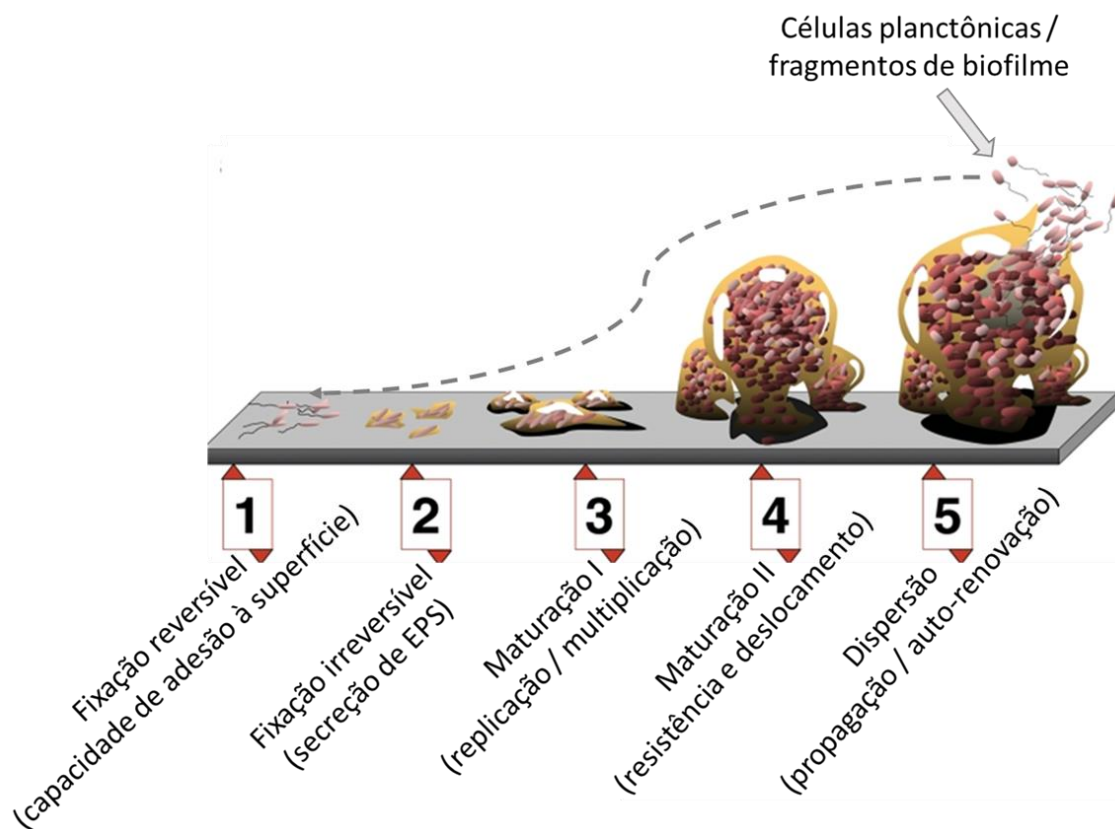
2.2 Objetivos específicos

- Elaborar um modelo experimental de ferida cutânea excisional com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar o perfil temporal de fechamento das feridas com biofilme;
- Avaliar a presença do biofilme nas feridas cutâneas após a indução da infecção das feridas com *P. aeruginosa*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os biofilmes são conhecidos como uma comunidade estruturada de células bacterianas encerradas em uma matriz polimérica autoproduzida, constituída por uma ou mais espécies de microrganismos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MONROE, 2007). Os biofilmes bacterianos apresentam desenvolvimento altamente complexo, podem ser encontrados em superfícies vivas ou inertes e são envoltos por uma matriz de substância polimérica extracelular (SPE), principal responsável pelos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e inibição do sistema imunológico (COOPER *et al.*, 2014). Essa matriz de EPS é composta por polissacarídeos, ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico extracelular (eDNA), proteínas e íons metálicos (BURMOLLE *et al.*, 2010; STREMPPEL *et al.*, 2013; HOIBY *et al.*, 2014). O desenho esquemático das diferentes fases de formação e desenvolvimento dos biofilmes bacterianos foi ilustrado na (Figura 1).

Figura 1 - Desenho esquemático das etapas de formação e desenvolvimento dos biofilmes (2020)



Fonte: compilado e adaptado de Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* v. 5, n. 11, p. e307, 2007. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307.

A formação e o desenvolvimento dos biofilmes envolvem cinco etapas com características distintas e dinâmicas em cada um desses estágios. No estágio 1, ocorre a fixação inicial ou reversível. Nessa fase, as células planctônicas apresentam capacidade de adesão a uma superfície viva ou inerte. No estágio 2 ou fase de fixação irreversível, as células aderidas iniciam a produção e secreção de uma substância polimérica extracelular que lhes confere maior aderência e capacidade de agrupamento celular. No estágio 3, denominado como fase de maturação I, ocorre a replicação e a multiplicação dos microrganismos com formação de microcolônias ou nichos bacterianos. No estágio 4 ou fase de maturação II, essas microcolônias formadas adquirem capacidade de resistência antimicrobiana e deslocamento. O último estágio de desenvolvimento dos biofilmes, estágio 5 ou fase de dispersão, é marcado pela ruptura ou descolamento do biofilme maduro em forma de células planctônicas ou agregados celulares que vão garantir a propagação e a autorrenovação dessa forma de vida. Acredita-se que as células destacadas podem colonizar ou infectar novos ambientes (superfícies ou tecidos vivos) e retornar ao modo planctônico de crescimento ou iniciar a formação de novos biofilmes (STOODLEY *et al.*, 2002; MONROE, 2007).

Os biofilmes microbianos têm se tornado cada vez mais reconhecidos como causa da cronicidade de feridas (STOFFEL; KOHLER RIEDI; HADJ ROMDHANE, 2020). A discussão a respeito da influência do biofilme no atraso da cicatrização das feridas tornou-se frequente no século XXI, inclusive com surgimento de proposta sobre a avaliação e identificação clínica do biofilme (METCALF, BOWLER, HURLLOW, 2014; HURLLOW, BOWLER, 2012) e os tratamentos tópicos para a sua erradicação e impedimento de sua recomposição (PERCIVAL *et al.*, 2017; PERCIVAL, 2018). Nas feridas cônicas há coabitação de muitas espécies bacterianas que cooperam para promover a própria sobrevivência e a natureza crônica da inflamação e infecção (DOWD *et al.*, 2008). Poucos estudos realizaram pesquisas extensas sobre as populações de bactérias presentes em diferentes tipos de biofilmes de feridas crônicas (DOWD *et al.*, 2008).

O *Center for Disease and Prevention* e o *National Institutes of Health* estimam que 65% a 80% das infecções humanas são causadas por biofilmes (POTERA, 1999; JAMAL *et al.*, 2018), considerando que estes são constituídos por um conglomerado polimérico extracelular, geralmente composto de DNA extracelular, proteínas e polissacarídeos, que ajudam as bactérias a sobreviver no hospedeiro (RAMOS-GALLARDO, 2016).

Para a compreensão do conhecimento gerado sobre o biofilme e sua relação com o processo de cicatrização de ferida cutânea, consultaram-se diferentes bases de dados, nos meses de setembro e outubro de 2020, utilizando descritores controlados e não controlados. Esses últimos foram necessários para aumentar a possibilidade de identificação de publicações indexadas sobre o tema. As bases de dados consultadas foram EMBASE, Scopus, *The Cochrane Library Collaboration do Reino Unido (COCHRANE)*, *Cummulative Index to Nursing and Allied Health Literature (CNAHL)*, *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line (MEDLINE)* por meio da PubMed, além da ScienceDirect que é uma página web operada pela editora anglo-holandesa Elsevier. As estratégias de buscas apresentaram pequenas variações em relação à utilização dos descritores e dos operadores booleanos para ampliar a possibilidade de identificação e seleção de artigos.

Muitos artigos estavam presentes nas duas estratégias de buscas e em mais de uma base. Os estudos identificados passaram pelo processo de análise, que inicialmente envolveu a leitura de título e resumo, e aqueles selecionados foram submetidos à leitura na íntegra que resultou na seleção de 23 artigos (Quadro 1).

Quadro 1 - Estratégias usadas nas bases de dados para identificação e seleção de artigos (2020)

Estratégia	Base	Artigos	
		Identificado	Selecionado
Bacterial biofilm AND Wounds and injuries OR (leg ulcer OR diabetic foot, OR varicose ulcer OR pressure injury OR induced surgical wound OR excisional wound) AND NOT (Dental Plaque OR (Dentis\$))	ScienceDirect	0	0
	CNAHL	15	7
	EMBASE	0	0
	MEDLINE	1.742	1
	Scopus	240	8
	COCHRANE	0	0
Biofilm OR (bacterial biofilm OR extracel matrix) AND Wounds and injuries OR (leg ulcer OR diabetic foot, OR varicose ulcer OR pressure injury OR induced surgical wound OR excisional wound) AND (In Vitro Techniques OR Models Animal OR Clinical Protocols) AND NOT Dental Plaque OR Dentis\$	ScienceDirect	0	0
	CNAHL	3.897	5
	EMBASE	0	0
	MEDLINE	1.742	2
	Scopus	0	0
	COCHRANE	0	0
Total			23

Fonte: elaborado pela autora.

Os 23 estudos selecionados (APÊNDICE A) foram publicados no período de 2008 a 2020 e contemplaram modelo de biofilme *in vitro* (04), biofilme *in vivo* no modelo animal (12) envolvendo rato, camundongo e coelho e estudos de biofilme em feridas agudas ou crônicas em humanos (07). As temáticas sobre a criação de modelo de biofilme, análise da presença e composição do biofilme, fatores predisponentes para a sua formação e avaliação de produtos, incluindo coberturas para ruptura do biofilme, estavam presentes nesses estudos.

Os modelos *in vitro* apresentam limitações, com destaque para sua falha em reproduzir o ambiente do hospedeiro. Esse fato levou a um rápido desenvolvimento de múltiplos modelos *in vivo* que também têm suas limitações quando implica no uso de animais, sendo as questões éticas a principal barreira. Isso explica parcialmente por que os modelos substitutos de não mamíferos, *in vitro* e *in vivo*, ainda são amplamente usados e continuam a revelar informações importantes sobre a fisiologia do biofilme e tratamentos promissores para infecções relacionadas aos mesmos (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Os estudos selecionados permitiram elaborar a revisão de literatura referente a três tópicos: “Panorama histórico do biofilme *in vitro*”, “Análise da produção do biofilme no modelo animal” e “Formação do biofilme em feridas de humanos”.

3.1 Panorama histórico do biofilme *in vitro*

As publicações apresentam um crescente corpo de evidências sugerindo que biofilmes bacterianos representam um importante pilar na patogênese de feridas crônicas (GURJALA *et al.*, 2011). Tal fato está amparado em pesquisas cuja maioria é *in vitro* ou *in vivo* no modelo animal e poucas pesquisas clínicas em humanos.

Na busca realizada nas bases de dados, selecionaram-se quatro artigos cujo biofilme foi analisado no modelo *in vitro* (Quadro 2).

Os estudos utilizaram o modelo *in vitro* para avaliação do efeito de tratamentos no biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *P. mirabilis*. Os tratamentos avaliados envolveram produtos e tecnologias como a terapia de pressão negativa, própolis, enzimas, além do uso de nanopartículas para disponibilização da prata.

Quadro 2 - Síntese dos estudos *in vitro* selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca (2020)

Ano	Autoria	Título	Proposta
2012	Ngo <i>et al.</i>	The effect of topical negative pressure on wound biofilms using an <i>in vitro</i> wound model.	Modelo de biofilme com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> foi desenvolvido para simular biofilmes de feridas. Curativo de pressão negativa tópico foi aplicado ao modelo e os efeitos do tratamento tópico curativo de pressão negativa nos biofilmes da ferida <i>in vitro</i> foram examinados usando técnicas de contagem microbiológica quantitativa e estudos de imagem.
2016	Ghaseminezhad <i>et al.</i>	Ag/Fe ₃ O ₄ nanocomposites penetrate and eradicate <i>S. aureus</i> biofilm in an <i>in vitro</i> chronic wound model	Apresentação da combinação de nanopartículas de Ag com Fe ₃ O ₄ na produção de nanocompósitos (NCs) de Ag / Fe ₃ O ₄ para contornar problemas de penetração tecidual limitada e alta citotoxicidade da prata no tratamento de infecções de feridas, pois elas penetram e erradicam biofilmes na aplicação de um campo magnético.
2019	Kwiecińska-Piróg <i>et al.</i>	The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by <i>Proteus Mirabilis</i> strains isolated from chronic wounds infections.	Investigação das propriedades antibacterianas do extrato etanólico de própolis (EEP) contra cepas de <i>P. mirabilis</i> isoladas de infecções crônicas de feridas e comparação de sua atividade biocida com antissépticos selecionados.
2020	Pirlar <i>et al.</i>	Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms in the wound-like medium.	Avaliação da eficácia da tripsina, β-glucosidase, e enzimas DNase I na degradação de biofilmes de duas espécies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em um meio semelhante ao de uma ferida.

Fonte: elaborado pela autora.

Os modelos de biofilme *in vitro* estão classificados em fechados, abertos e microcosmos. Os modelos fechados ou estáticos são limitados, por exemplo, o modelo de biofilme de colônia e placas de microtitulação. Os modelos de sistemas abertos ou dinâmicos têm princípio semelhante ao de culturas contínuas, geralmente permitem o controle de parâmetros ambientais, como forças de cisalhamento, e por isso têm sido amplamente utilizados para estudar a resistência física e química de biofilmes. Entretanto, frequentemente, exigem habilidades técnicas e equipamentos especializados (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Os modelos de biofilme microcosmos incluem mais parâmetros ambientais e levam em consideração a complexidade e heterogeneidade dos ambientes naturais. Portanto, são mais sofisticados em imitar as condições *in situ*. Repetidas vezes, incluem várias espécies bacterianas e utilizam material do ambiente estudado, por exemplo, cobertura de superfícies abióticas com células humanas para simular uma situação *in vivo*. Ressalta-se que

teoricamente os sistemas abertos e fechados podem ser transformados em microcosmos (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Existem vários produtos tópicos, com ação antimicrobiana, disponíveis para o tratamento de feridas, cuja eficácia tem sido demonstrada rotineiramente com microrganismos planctônicos. Vale ressaltar que, até o momento, não existe um valor de referência para amparar a eficácia antimicrobiana de produtos para tratamento de feridas em modelos de biofilme. Além disso, os dados para avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos em modelos de biofilme apresentam variados métodos de teste (STOFFEL *et al.*, 2020).

No estudo que avaliou o efeito da terapia de pressão negativa no modelo de biofilme com *P. aeruginosa*, o tratamento tópico foi aplicado sobre o biofilme da ferida *in vitro* e o resultado foi examinado por meio da técnica de contagem microbiológica quantitativa e estudos de imagem com a microscopia confocal de varredura a laser. As características arquitetônicas do biofilme examinadas incluíram: (1) Espessura média: a distância (mm) entre o topo de um biofilme e o substrato em que o biofilme reside; (2) Coeficiente de rugosidade: é uma medida adimensional da variação na espessura da superfície de um biofilme. Isso reflete a heterogeneidade topográfica do biofilme; (3) Área de superfície: proporção de volume, calculada como a proporção da área de superfície total do biofilme no campo de vista dividida pela biomassa total (volume bacteriano); (4) Distância de difusão média; (5) Distância de difusão máxima. Distâncias de difusão médias e máximas são usadas como uma medida das distâncias ao longo das quais, substâncias, incluindo nutrientes e outros substratos, têm que se difundir nos vazios ao redor de um biofilme para alcançar as bactérias que estão alojadas dentro da estrutura organizada do biofilme (NGO *et al.*, 2012).

As avaliações descritas demonstraram uma pequena redução, mas estatisticamente significativa, das bactérias do biofilme em 2 semanas de tratamento tópico com terapia de pressão negativa. Quando isso foi combinado com espuma impregnada com prata, a redução foi muito mais significativa e observável dentro de 24 horas. Microscopicamente, também foi constatado que a terapia de pressão negativa tópica comprimiu a arquitetura do biofilme com uma redução na espessura e distância de difusão (NGO *et al.*, 2012).

Os profissionais da prática clínica têm utilizado diversas coberturas com prata para o controle da colonização crítica ou infecção da ferida. Consequentemente, com a utilização de coberturas com prata, busca-se manejar os biofilmes bacterianos, uma vez que são causa

comum de persistência de feridas crônicas e continuam a ser um problema não resolvido na microbiologia da infecção devido à sua tolerância aos antibióticos (GHASEMINEZHADA *et al.*, 2016).

Por isso, estudos sobre nanopartículas de prata têm chamado a atenção como uma alternativa aos antibióticos para o tratamento de infecções de feridas, mas seu uso é desafiado pela penetração tecidual limitada e alta citotoxicidade. A combinação de nanopartículas de prata com óxido de ferro (Fe_3O_4) na produção de nanocompósitos de $\text{Ag}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ pode contornar esses problemas, visto que eles penetram e erradicam biofilmes na aplicação sobre um campo magnético. A atividade antibacteriana desse nanocompósito foi avaliada e confirmada contra um modelo de biofilme de *S. aureus* de ferida crônica *in vitro* e a citotoxicidade avaliada em fibroblastos humanos. As nanopartículas de prata podem ser consideradas uma via potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções crônicas de feridas (GHASEMINEZHADA *et al.*, 2016).

Modelo *in vitro* com outras bactérias foi usado para avaliar a eficácia de soluções sobre o biofilme. Nesse grupo, encontra-se o estudo que avaliou a atividade do extrato etanólico de própolis perante a formação de biofilme por *Proteus Mirabilis*. O biofilme *in vitro* foi formado a partir de seis cepas de *Proteus Mirabilis* isoladas das feridas com infecção crônica de pacientes, além de uma cepa de referência de *Proteus Mirabilis* (ATCC 29906). Concentrações de 25-100 mg/mL do extrato etanólico de própolis inibiram a formação de biofilme *Proteus mirabilis* e concentrações de 25-50 mg / mL agiram no biofilme já formado (KWIECIŃSKA-PIRÓG, 2019). O estudo apresenta uma forte limitação que é a ausência da descrição dos métodos utilizados para a obtenção dos achados citados.

Outra linha de pesquisa é a busca de estratégias para debelar o biofilme por meio da destruição da substância polimérica extracelular autoproduzida em biofilmes e envolve as bactérias que compõem o mesmo. Essa dinâmica resulta em uma alta tolerância das bactérias do biofilme a antibióticos, fato que predispõe à cronicidade da infecção e complica a cicatrização de feridas (PIRLAR *et al.*, 2020).

A eficácia das enzimas tripsina, β -glucosidase e desoxirribonuclease I (DNase) na degradação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no meio semelhante a uma ferida foi confirmada, juntamente com a redução da concentração mínima dos antibióticos meropenem e amicacina para a erradicação do biofilme (PIRLAR *et al.*, 2020). As três

enzimas pertencem a diferentes classes que têm como alvo os principais componentes do biofilme (MANN, WOZNIAK, 2012). A mistura de tripsina e DNase I deve ser avaliada nas feridas da prática clínica como agente antibiofilme para espécies de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

A maioria dos antibióticos não consegue remover biofilmes em infecções crônicas e a ruptura da substância polimérica extracelular é uma das possibilidades para a erradicação desses microrganismos. Portanto, a degradação dessa estrutura por meio da ação de enzimas pode resultar na melhora da cicatrização de feridas crônicas (PIRLAR *et al.*, 2020).

Diversos modelos de biofilme foram usados para avaliação de vários produtos comerciais contendo agentes antimicrobianos tópicos comumente usados no tratamento de ferida pelos profissionais da prática clínica (GHASEMINEZHADA *et al.*, 2016; STOFFEL *et al.*, 2020; PIRLAR *et al.*, 2020). Um estudo investigou a ação do iodo, prata, polihexametileno-biguanida, octenidina, ácido hipocloroso, cloreto de benzalcônio e um produto à base de surfactante contendo poloxamer 188 em cinco diferentes modelos de biofilme *in vitro* de complexidade variada. Os patógenos bacterianos que compuseram o modelo foram *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Os fungos patogênicos como *Candida albicans* e *Candida auris* também foram avaliados. Um modelo de biofilme bacteriano multiespécie também foi utilizado para avaliar os produtos. Além disso, *C. albicans* foi usado em combinação com *S. aureus* e *P. aeruginosa* em uma versão do modelo de biofilme polimicrobiano (STOFFEL *et al.*, 2020).

No referido estudo, observaram-se diferenças estatisticamente significativas no desempenho antimicrobiano entre os tratamentos em cada modelo. A alteração das condições de crescimento microbiano ou combinação de organismos resultou em diferenças significativas de desempenho para alguns tratamentos (STOFFEL *et al.*, 2020)

Muitos esforços têm sido feitos para trasladar os resultados de infecções relacionadas ao biofilme *in vitro* em modelos animais que permitem abordar os desafios diagnósticos e terapêuticos. Entretanto, faz-se necessário avaliar de forma criteriosa a translação do conhecimento gerado com as pesquisas de bancada, em que são utilizados modelos de mamíferos que estão mais próximos dos humanos, para a beira do leito (LEBEAUX *et al.*, 2013).

3.2 Análise da produção do biofilme no modelo animal

Sabe-se que a presença de biofilmes em feridas crônicas humanas é subnotificada (MALONE *et al.*, 2017) e, por isso a validação de modelo *in vivo*, incluindo aqueles que envolvem animais, é essencial para entendimento do mecanismo de formação do biofilme e avaliação de produtos utilizados na prevenção e manejo do mesmo. Os ensaios pré-clínicos controlados (*in vivo*) são poderosos instrumentos de avaliação e de geração do conhecimento sobre o biofilme e têm sido uma alternativa para preencher as lacunas do conhecimento existentes entre a bancada e a cabeceira do leito, auxiliando nas decisões clínicas (SCHULTZ *et al.*, 2017).

Os modelos de biofilme *in vivo* são elaborados a partir de feridas traumáticas em animais e incluem lesões cutâneas do tipo abrasões de pele, queimaduras, lacerações, feridas cirúrgicas e excisionais ou fraturas expostas, desenvolvidos em suínos, coelhos, ratos e camundongos. Nesses modelos, os microrganismos mais comumente estudados e associados à infecção de feridas são *S. aureus* e *P. aeruginosa* (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Na busca realizada nas bases de dados, selecionaram-se 12 estudos sobre biofilme *in vivo*, incluindo desde a proposta de validação de modelo de ferida crônica com biofilme em animais até avaliação da eficácia de produtos e de terapias alternativas para eliminação de biofilme (Quadro 3).

Quadro 3 - Síntese dos estudos sobre biofilme *in vivo* no modelo animal selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca (2020)

Ano	Autoria	Síntese
2010	Zhao <i>et al.</i>	Criação de um modelo reprodutível de ferida crônica em camundongos diabéticos pela aplicação de biofilme bacteriano formado a partir da inoculação das feridas cirúrgicas com <i>P. aeruginosa</i> (modelo de transferência de biofilme); avaliação da formação e desenvolvimento do biofilme em feridas por meio de culturas quantitativas e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados apontaram formação do biofilme em 24 após inoculação das feridas com <i>P. aeruginosa</i> .
2011	Gurjala <i>et al.</i>	Criação e validação de modelo experimental quantitativo de biofilme formado a partir da inoculação de <i>Staphylococcus aureus</i> em feridas traumáticas em orelha de coelho. Epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura e contagem bacteriana em série revelaram que <i>S. aureus</i> forma rapidamente biofilme maduro em feridas dentro de 24 horas após a inoculação das feridas. O fenótipo do biofilme cria uma resposta inflamatória característica, sustentada e de baixo grau, e prejudica a migração epitelial e o crescimento do tecido de granulação.
2014	Seth <i>et al.</i>	Avaliação do impacto de cobertura antimicrobiana [AQUACEL Ag+ Hydrofiber Dressing, ConvaTec Ltda] em feridas em orelha de coelho infectadas por biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

continua...

Ano	Autoria	Síntese
2016	Kanno <i>et al.</i>	Avaliação da solução de PVP-I a 1% contra solução salina para determinar redução da contagem de bactérias nas feridas abertas criadas nas costas dos ratos inoculadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Análise histológica e a contagem de bactéria. Espécimes visualizados em microscópio de fluorescência.
2016	Karna <i>et al.</i>	Avaliação das mudanças transcriptômicas de feridas em orelhas de coelho à medida que se opõem à infecção <i>P. Aeruginosa</i> . Usado o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) para gerar transcriptomas e identificar novas espécies de RNAs pequenos ou não codificantes. As feridas cujos transcriptomas de RNA-Seq foram analisados também foram caracterizadas quanto à contagem bacteriana, morfologia do biofilme e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), monócitos e macrófagos.
2018	Guoqi <i>et al.</i>	Avaliação do efeito da pressão negativa na motilidade de <i>P. aeruginosa</i> [in vitro] e o efeito de terapia de pressão negativa em fatores de virulência e biofilmes de orelha de coelho [in vivo]. A estrutura do biofilme foi estudada com microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Contagens de bactérias viáveis e parâmetros histológicos de cicatrização de feridas foram medidos.
2019	Davis <i>et al.</i>	Efeito da cobertura de fibra gelificante com prata usando modelo de biofilme de ferida espessura parcial em porco inoculada com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27312. Microscópio foi usado para coleta de imagens digitais. Agregados bacterianos no biofilme da ferida foram detectados com base na sobreposição de um sinal específico da espécie (vermelho) e DNA (azul).
2019	Brandenburg <i>et al.</i>	Criação de modelo de biofilme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em queimadura feita no rato com análise das características do biofilme. Sangue e tecido foram coletados para hemograma completo, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), expressão do gene do biofilme, histologia, microscopia eletrônica de varredura e atividade da mieloperoxidase na escara de queimadura.
2019	Hasan <i>et al.</i>	Feridas com biofilme <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) em camundongos diabéticos. Nanopartículas (NP) de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) como polímero formador de NP e polietilenimina / diazeniodiolato (PEI / NONOate) com capacidade de se ligar à matriz de biofilme são desenvolvidas para facilitar a entrega de óxido nítrico (ON) à ferida infectada por biofilme MRSA.
2020	Kim <i>et al.</i>	Análise da hipótese que altos níveis de estresse oxidativo (OS) levam ao desenvolvimento de feridas crônicas, promovendo a colonização de bactérias formadoras de biofilme sobre bactérias comensais / benéficas no modelo de camundongo diabético para feridas crônicas onde biofilmes patogênicos se desenvolvem naturalmente após a indução de alta OS imediatamente após o ferimento. continua...
2020	Stoffel <i>et al.</i>	Produtos comerciais contendo os agentes antimicrobianos tópicos comumente usados: iodo, prata, polihexametileno biguanida, octenidina, ácido hipocloroso, cloreto de benzalcônio e um tópico à base de surfactante contendo poloxamer 188. Continua... Cinco diferentes modelos de biofilme in vitro de complexidade variada foram usados, incorporando vários patógenos bacterianos: <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> e <i>Enterobacter</i> . Os fungos patógenos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida auris</i> e alguns produtos foram avaliados no modelo <i>in vivo</i> (camundongo) de biofilme.

Fonte: elaborado pela autora.

Considerando que feridas crônicas dos pacientes diabéticos são caracterizadas por altos níveis de estresse oxidativo e frequentemente são colonizadas por bactérias formadoras de biofilme, os pesquisadores realizaram estudo no modelo de ratos para feridas crônicas. O estudo visou elucidar a hipótese que altos níveis de estresse oxidativo levam ao desenvolvimento de feridas

crônicas, promovendo a colonização de bactérias formadoras de biofilme sobre bactérias comensais / benéficas (KIM et al., 2020).

Os resultados confirmaram que feridas crônicas, com altos níveis de estresse oxidativo, tinham baixa diversidade bacteriana e foram colonizadas por várias bactérias formadoras de biofilme clinicamente relevantes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium frankenforstense* e *Acinetobacter* sp. Houve tendências populacionais únicas, por exemplo, *P. aeruginosa* associada ao desenvolvimento agressivo de biofilme, enquanto *Staphylococcus xylosus* estava presente apenas logo após a confecção do ferimento. Esses achados confirmaram que altos níveis de estresse oxidativo na ferida alteraram significativamente o microbioma da ferida bacteriana, diminuindo a diversidade e promovendo a colonização de bactérias da microbiota da pele para formar biofilme (KIM et al., 2020).

Em contraste, as feridas em cicatrização foram colonizadas por um microbioma bacteriano diverso e dinâmico que nunca desenvolveu biofilmes, embora bactérias formadoras de biofilme estivessem presentes. Várias espécies clinicamente relevantes que estão presentes em feridas crônicas humanas, como *Cutibacterium acnes*, *Achromobacter* sp., *Delftia* sp. e *Escherichia coli*, estavam fortemente associadas à cicatrização de feridas (KIM et al., 2020).

As bactérias citadas podem servir como bioindicadores de cicatrização e participar ativamente dos processos de cicatrização de feridas e impedir que bactérias patogênicas colonizem a ferida. O modelo de ferida crônica utilizado fornece o microambiente correto que possibilitará o estudo de interações bacterianas que levam à cicatrização de feridas ou desenvolvimento de feridas crônicas (KIM et al., 2020).

Dos 12 estudos sobre biofilme *in vivo*, 3 apresentaram propostas de validação de modelo de biofilme em camundongos diabéticos, ratos e em coelhos brancos da Nova Zelândia. Os modelos envolveram *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na indução da formação do biofilme.

O modelo de ferida crônica em camundongos diabéticos teve formação de biofilme induzido por *Pseudomonas aeruginosa*. A análise histológica mostrou extensa infiltração de células inflamatórias, tecido necrótico e hiperplasia epidérmica adjacente. Culturas quantitativas e microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que a maioria das bactérias estava na crosta acima do leito da ferida, e não no tecido da ferida (ZHAO et al., 2010).

Outro estudo apresenta modelo de infecção de biofilme *in vivo* desenvolvido em queimadura por escaldadura feita em ratos Sprague-Dawley. É considerado valioso para testar novos agentes antibiofilmes para tratamento de queimaduras (BRANDENBURG *et al.*, 2019).

Imediatamente após a realização de queimadura nos ratos, 100 µl de *Pseudomonas aeruginosa* em solução salina tamponada com fosfato foram espalhados sobre a superfície da ferida. Infecções de biofilme robustas ocorreram em $\sim 1 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC)/g de tecido queimado em 7 dias. Expressão de genes de alginato de *P. aeruginosa* e outros fatores de virulências na área de queimadura indicaram a formação de biofilme maduro dentro da escara (tecido necrótico). A infecção por *P. aeruginosa* causou respostas imunes locais e sistêmicas demonstradas por alterações na contagem de neutrófilos sistêmicos, histologia e atividade de mieloperoxidase. A microscopia eletrônica de varredura mostrou *P. aeruginosa* enredada em uma matriz extracelular na superfície da queimadura a 500-600 µm de profundidade (BRANDENBURG *et al.*, 2019).

O modelo de biofilme em coelho foi indispensável para a realização de uma série de estudos piloto manipulando e testando as variáveis, por exemplo, localização, tamanho e número de feridas por orelha, profundidade da ferida, tempo de inoculação da bactéria, tempo de tratamento com antibiótico, tipo de cobertura absorvente, tempo de trocas de curativos e duração do período de cicatrização de ferida (GURJALA *et al.*, 2011).

O modelo do coelho utilizou *Staphylococcus aureus* cepa UAMS-1, marcada com proteína verde fluorescente. Os resultados foram avaliados com a epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura que revelaram que *S. aureus*, dentro de 24 horas após inoculação rapidamente tomou a forma de biofilme maduro em feridas. A persistência da viabilidade do biofilme ao longo do tempo foi confirmada pela contagem bacteriana e imagem confocal de varredura a laser. A análise histológica, por meio dos marcadores inflamatórios, confirmou que o fenótipo do biofilme cria uma inflamação característica, sustentada, de baixo grau de resposta, e que o biofilme prejudica o crescimento de tecido de granulação e a migração epitelial ao longo do tempo, constatando a importância de biofilmes bacterianos na patogênese de feridas crônicas (GURJALA *et al.*, 2011).

O modelo validado de biofilme em coelho foi utilizado posteriormente para avaliar o impacto de uma cobertura de hidrofibra com prata impregnada com cloreto de benzetônio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Aquacel® Ag+ Hydrofiber Dressing®) em feridas

infectadas por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Análises confirmatórias foram realizadas para medir o impacto do tratamento em *P. aeruginosa in vitro* e em feridas polibacterianas *in vivo* formadas por *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* no modelo de biofilme em coelho. Análise histológica, contagem de bactérias e microscopia eletrônica de varredura foram usadas para avaliação dos resultados. A cobertura avaliada diminuiu consistentemente a contagem de bactérias de *P. aeruginosa* e polibacterianas ($p < 0,05$), além da melhoria na cicatrização de feridas comparada com os controles ($p < 0,05$) (SETH *et al.*, 2014).

Pode-se considerar que o estudo citado apresenta evidência quantificável e consistente *in vivo* do impacto de uma cobertura antimicrobiana tópica contra o biofilme estabelecido da ferida. Entretanto, requer estudos clínicos com a referida cobertura na avaliação da efetividade no tratamento de feridas em humanos.

A cobertura hidrofibra com prata utilizada no estudo anterior foi comparada com cobertura de fibra gelificante com prata em um modelo de biofilme de ferida porcina. Feridas profundas de espessura parcial foram realizadas e inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27312 e cobertas com filme de poliuretano para promover a formação de biofilme. A seguir, as feridas foram divididas em grupos conforme tratamento recebido: i-cobertura de fibra gelificante com prata (Exufiber® Ag+; Mölnlycke Health Care), cobertura de fibra gelificante sem prata (não disponível comercialmente), cobertura de hidrofibra com prata impregnada com cloreto de benzetônio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Aquacel® Ag+ Hydrofiber Dressing®), sendo comparadas ao grupo não tratado. Os resultados foram amparados em avaliações microbiológicas e histológicas do biofilme (DAVIS *et al.*, 2019).

O tratamento com cobertura de fibra gelificante com prata resultou em redução significativa do biofilme de *P. aeruginosa* quando comparado a todos os outros grupos de tratamento, além disso, resultou no descolamento do biofilme da ferida (DAVIS *et al.*, 2019).

Pesquisa posterior avaliou a eficácia de cinco coberturas de fibra gelificante contendo prata contra biofilmes de uma única espécie e multiespécies usando modelos de teste *in vitro* validados internamente e acreditados por órgão responsável. Neste estudo, utilizaram-se biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* de uma e de multiespécies. Em modelos *in vitro* de uma única espécie, todas as cinco coberturas antimicrobianas foram eficazes na erradicação das bactérias do biofilme *Staphylococcus*

aureus e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, apenas uma cobertura (tecnologia de hidrofibra com combinação de antibiofilme / tecnologia antimicrobiana) foi capaz de erradicar o biofilme de espécie única de *Candida albicans* mais tolerante. A mesma cobertura foi capaz de erradicar biofilmes de multiespécies de forma que nenhum organismo viável fosse recuperado (SULEMAN *et al.*, 2020).

Pesquisas sobre coberturas de hidrofibra trouxeram implicações clínicas importantes, especialmente para feridas criticamente colonizadas por bactérias gram-negativas formadoras de biofilme, considerando que essas coberturas são utilizadas pelos profissionais, inclusive brasileiros, para o tratamento de pacientes com feridas, acompanhados nos serviços de saúde.

Outro estudo apresentou a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em uma cobertura biológica disponível comercialmente no Brasil (Biobrane®), classificada como substituto cutâneo biossintético (BRANDENBURG *et al.*, 2015); formada por membrana bilaminada, constituída por rede de náilon preenchida com colágeno porcino tipo I (análogo dérmico) e recoberta por fina lâmina de silicone (análogo epidérmico); possui pequenos poros que permitem a drenagem do exsudado, sendo considerado um substituto semipermeável para tratamento de queimaduras; possibilita que fibroblastos e capilares invadam a ferida e possam reparar o defeito dérmico (FERREIRA *et al.*, 2011).

As células bacterianas e a matriz de biofilme aderente à cobertura biológica foram visualizadas por meio da microscopia eletônica de varredura, confirmando que o D-/L-triptofano inibiu a formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre a cobertura de maneira dependente da dose e não foi diretamente citotóxico para ceratinócitos humanos, embora houvesse alguma redução do metabolismo celular ou atividade enzimática. Na segunda fase da pesquisa, o biofilme formado na cobertura biológica foi transferido para as feridas confeccionadas nos camundongos, confirmando que o D-/L-triptofano não prejudicou a cicatrização de feridas. Inclusive, houve melhora quando a cobertura com biofilmes de *P. aeruginosa* tratada com D-/L-triptofano foi comparada com coberturas não tratadas (BRANDENBURG *et al.*, 2015).

A capacidade do triptofano de inibir formação de biofilme bacteriano, juntamente com sua falta de toxicidade, faz com que esse componente seja útil no desenvolvimento de produtos ou até mesmo venha a integrar coberturas já existentes. O interessante é que esse arsenal possa

ser utilizado no tratamento de feridas crônicas que não cicatrizam com o intuito de inibir a formação de biofilme e promover a cicatrização.

O efeito da solução de polivinilpirrolidona-iodo 1% (PVP-I) foi avaliado contra solução salina na redução da contagem bacteriana na superfície da ferida e tecido ao redor e implicações na cura da ferida. Neste estudo, as feridas foram criadas nas costas dos ratos Sprague Dawley e inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa*. As feridas foram mantidas cobertas, sendo irrigadas diariamente com PVP-I 1% por meio de seringa com ponta de pulverização. Os resultados foram avaliados com análise histológica e contagem bacteriana e os espécimes visualizados por microscopia de fluorescência. Houve contagem bacteriana reduzida na superfície da ferida e área ao redor em comparação com a irrigação salina (KANNO *et al.*, 2016).

Os autores do estudo citado constataram dificuldade em avaliar a fixação bacteriana e a formação do biofilme por observação macroscópica apenas porque a superfície das feridas apresentava aparência semelhante. Os resultados indicaram que a irrigação com PVP-I 1% foi uma maneira eficaz de reduzir a contagem bacteriana na superfície da ferida e a impossibilidade de identificação macroscópica do biofilme (KANNO *et al.*, 2016).

A terapia de pressão negativa, utilizada na prática clínica no tratamento de feridas crônicas, foi empregada em estudo *in vitro* e *in vivo* envolvendo ferida em orelha de coelho para avaliação do seu efeito na motilidade de *P. aeruginosa*, em fatores de virulência e estrutura do biofilme (GUOQI *et al.*, 2018).

Em comparação com o grupo controle, o tratamento com terapia de pressão negativa resultou em redução significativa na expressão de todos os fatores de virulência testados, incluindo exotoxina A, ramnolípídeo e elastase ($p = 0,01$), além de melhores parâmetros histológicos ($p = 0,01$), diminuição da contagem de bactérias ($p = 0,05$), redução significativa dos componentes do biofilme (DNA extracelular) ($p = 0,01$) verificada por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (GUOQI *et al.*, 2018).

O tratamento com terapia de pressão negativa confirmou que a tecnologia é eficaz para reduzir os fatores de virulência e os componentes do biofilme, o que pode explicar o aumento da cicatrização de feridas na prática clínica.

Os achados reforçam a importância de não apenas avaliar produtos antimicrobianos para tratamento de feridas em modelos de biofilme *in vitro*, mas também de usar diferentes modelos, incluindo *in vivo*, para obter uma compreensão abrangente da eficácia dos produtos. O estudo citado apresenta algumas limitações, por exemplo, não envolver o uso da microscopia eletrônica para avaliação do biofilme.

O modelo *in vivo* camundongos diabéticos foi utilizado para avaliar a capacidade do óxido nítrico (NO) na dispersão do biofilme. Para um tratamento eficaz de feridas infectadas por biofilme *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* (MRSA), o óxido nítrico precisa ser fornecido à matriz do biofilme de uma maneira sustentável devido a sua meia-vida curta e distância de difusão limitada (HASAN *et al.*, 2019).

No estudo, nanopartículas (NP) do copolímero poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) dopadas com polietilenimina / diazeniumdiolate (PEI / NONOate) (PLGA-PEI / NO NP) que tem capacidade de se ligar à matriz de biofilme foram utilizadas para facilitar a entrega de óxido nítrico à ferida infectada por biofilme. Uma das avaliações envolveu a microscopia eletrônica confocal. Nanopartículas PLGA-PEI / óxido nítrico aceleraram a cura de feridas infectadas por biofilme em camundongos diabéticos, além de ter reduzido a carga bacteriana e dispersado completamente o biofilme. Os resultados sugerem que as nanopartículas liberadoras de óxido nítrico que se ligam a biofilme representam um sistema de entrega de óxido nítrico promissor para o tratamento de feridas crônicas infectadas por biofilme (HASAN *et al.*, 2019).

Para avaliação do biofilme, alguns estudos utilizaram outras estratégias, além da microscopia eletrônica, por exemplo, avaliação da expressão gênica do genoma (transcriptoma de RNA-Seq). Estudo realizado no modelo de ferida excisional de orelha de coelho de espessura dérmica total analisou alterações transcriptômicas de biofilme *P aeruginosa*. Utilizou-se o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) para gerar transcriptomas porque quantifica as transcrições de forma eficaz e precisa, pode delinear os limites da transcrição e identifica novas espécies de RNA pequenos ou não codificantes. Constatou-se que à medida que a infecção ativa se intensifica a contagem de RNAs não codificantes permanece super-representada entre os genes regulados negativamente. Entretanto, após 5 e 9 dias, essas contagens nas feridas dos controles diminuíram, ao passo que aumentaram nas feridas infectadas com biofilme e com problemas de cicatrização. Esses achados sugerem uma mudança sequencial e coordenada nos níveis de transcritos de várias classes principais de

RNAs não codificantes em células de feridas caracterizando a transição da fase inflamatória para a fase de proliferação e cura (KARNA *et al.*, 2016).

3.3 Formação do biofilme em feridas de humano

As buscas nas bases de dados permitiram selecionar seis artigos a respeito de estudos de biofilme realizados com amostras de feridas de humanos (Quadro 4).

Quadro 4 - Síntese dos estudos sobre biofilme *in vivo* em feridas de humanos selecionados nas bases de dados por meio de estratégia de busca (2020)

Ano	Autoria	Síntese
2008	Dowd <i>et al.</i>	Descrição da utilização da amplificação ribossomal parcial e pirosequenciamento (PRAPS) para observar o nível da diversidade microbiana em feridas crônicas, combinado com mais dois métodos moleculares tradicionais; amplificação ribossômica completa, clonagem e sequenciamento Sanger (FRACS) e parcial amplificação ribossomal, eletroforese em gel de gradiente de densidade (DGGE) e sequenciamento Sanger (PRADS). Foram utilizadas para pesquisar as principais bactérias que formam biofilmes patogênicos de três tipos de feridas crônicas: úlceras de pé diabético, úlceras venosas e lesões por pressão.
2011	Han <i>et al.</i>	Descrição abrangente das características microbianas de 15 feridas crônicas, pela amostra de tecido. Usado pirosequenciamento de alto rendimento e microscopia de epifluorescência.
2014	Akers <i>et al.</i>	Caso-controle. Fatores de risco para formação de biofilme. Avaliação da produção de biofilmes bacterianos como um fator de risco potencial para infecções persistentes nas feridas de militares. As relações entre as cepas bacterianas de cada espécie individual foram avaliadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).
2016	Ramos-Gallardo	Descrição de um caso de ferida crônica em paciente queimado. Atenção especial é dada à relação biofilme-ferida crônica. Ao remover o tecido de granulação foi possível diminuir a quantidade de biofilme, melhorar a condição e fazer novo procedimento para fechar a ferida, como enxerto de pele. O estudo contou apenas com avaliação clínica.
2018	Bay <i>et al.</i>	Avaliação da composição e distribuição bacteriana em feridas epidérmicas agudas feitas em pele de pessoas saudáveis. A biópsia das feridas foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser.
2019	Mori <i>et al.</i>	Estudo transversal para examinar a proporção de remoção de biofilme por desbridamento ultrassônico em lesões por pressão [Estudo 1] e estudo de coorte retrospectivo para examinar a eficácia do sistema de tratamento de feridas com base em biofilme (BWCS) para a cura de feridas crônicas [Estudo 2].

Fonte: elaborado pela autora.

O primeiro estudo selecionado a respeito da temática em humanos foi publicado em 2008 e os pesquisadores utilizaram a amplificação ribossômica parcial e pirosequenciamento para identificar a diversidade microbiana em feridas crônicas, combinado com dois métodos moleculares mais tradicionais: *i*-amplificação ribossômica completa, clonagem e

sequenciamento Sanger; *ii*- amplificação ribossomal parcial, eletroforese em gel de gradiente de densidade e sequenciamento Sanger. A avaliação forneceu dados abrangentes das populações microbianas que, geralmente, estão presentes em biofilmes de três tipos de tipos de feridas crônicas mais prevalentes nos usuários dos serviços de saúde: úlceras venosas, úlceras do pé diabético e lesões por pressão (DOWD *et al.*, 2008). Entretanto, a microscopia eletrônica não foi utilizada para confirmação do biofilme.

No referido estudo, grandes populações específicas de bactérias foram evidenciadas nos três tipos de feridas analisadas, incluindo *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Peptoniphilus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Finogoldia* e *Serratia* spp. Cada um dos tipos de feridas revelou diferenças marcantes nas populações bacterianas. Os resultados das análises moleculares também foram comparados aos obtidos usando diagnósticos tradicionais baseados em cultura. Apenas em um tipo de ferida os métodos de cultura identificaram corretamente a população bacteriana primária, indicando a necessidade de métodos diagnósticos aprimorados (DOWD *et al.*, 2008).

O estudo traz a limitação da não utilização da microscopia eletrônica, considerando que biofilme não pode ser identificado em culturas tradicionais e a microscopia óptica e eletrônica são necessárias para fazer o diagnóstico (RAMOS-GALLARDO, 2016). Entretanto, os autores da pesquisa nomearam de biofilme, mesmo sem a comprovação por microscopia eletrônica.

Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo por meio de análises moleculares com eletroforese em gel de gradiente desnaturante e de sequência na análise de 27 amostras de feridas crônicas e revelaram diversas comunidades polimicrobianas, incluindo bactérias estritamente anaeróbias, não reveladas por cultura tradicional (JAMES, *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que, na pele normal de um adulto, os níveis bacterianos estimados são de até 2 milhões de bactérias por centímetro quadrado. A variedade de microrganismos isolados das superfícies da pele é altamente dependente das técnicas de cultura utilizadas e das características do hospedeiro, por exemplo, idade, sexo, etnia e região anatômica. População bacteriana comumente isolada inclui espécies de *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* e *Acinetobacter* (RAMOS-GALLARDO, 2016).

Novas técnicas têm sido empregadas para o diagnóstico das bactérias. A PNA FISH é uma delas, que combina a simplicidade dos procedimentos de coloração tradicionais com o desempenho exclusivo das sondas ácido nucleico peptídico (PNA) para fornecer um diagnóstico rápido e preciso de doenças infecciosas (PRUDENT *et al.*, 2018).

A descrição de forma abrangente das características microbianas de feridas crônicas requer técnicas investigativas apuradas, uma vez que feridas crônicas contêm comunidades polimicrobianas complexas de organismos sésseis que foram subestimados devido às limitações da tecnologia de cultura padrão (HAN *et al.*, 2011).

Esse dado foi confirmado pelo estudo conduzido com amostras de tecido obtidas de 15 pacientes com feridas crônicas. Culturas bacteriológicas padrão permitiram identificar uma média de três espécies bacterianas comuns para as feridas. Entretanto, o pirosequenciamento de alto rendimento revelou aumento da diversidade bacteriana chegando a uma média de 17 gêneros em cada ferida. Encontraram-se proporções aumentadas de anaeróbios, bastonetes Gram-negativos e cocos Gram-positivos em feridas crônicas, além de populações significativamente menores de *Propionibacterium* em comparação com a pele normal. Por meio da microscopia de epifluorescência, as bactérias da ferida foram visualizadas em biofilmes altamente orgânicos, confluentes, espessos e aninhados ou como células bacterianas individuais dispersas (HAN *et al.*, 2011).

O processo de cicatrização das feridas crônicas, especialmente as úlceras venosas, lesões por pressão e úlceras de pé diabético, geralmente evolui para um estado de cronicidade (BJARNSHOLT, *et al.*, 2008). Há autores que explicam que essa situação, pelo menos em parte, é causada pela erradicação ineficiente de patógenos infecciosos e oportunistas (KIM *et al.*, 2020).

Pesquisadores analisaram seções de feridas crônicas por hibridização fluorescente *in situ* e encontraram microcolônias distintas, análogas às estruturas basais de biofilmes bacterianos. Biofilmes *in vitro* de *P. aeruginosa* produzem um mecanismo que oferece proteção contra a atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) suscitando a hipótese de que a presença de *P. aeruginosa* em biofilmes e a falta de eliminação concomitante por esses leucócitos são as principais causas de erradicação ineficiente por tratamento com antibióticos e atividade antimicrobiana do sistema imune inato, respectivamente (BJARNSHOLT *et al.*, 2008)

Pesquisa publicada em 2008 sobre biofilme em feridas de humanos é citada em diversos estudos. Ela foi realizada com amostra de 77 feridas crônicas, incluindo lesão por pressão, úlcera venosa e por *diabetes mellitus* nos pés, e contou com uma amostra de 16 feridas agudas. O biofilme foi identificado por meio das microscopias de luz e eletrônica de varredura nas análises de 50 feridas crônicas e 16 agudas, sendo que o biofilme foi identificado em 30 (60%) feridas crônicas e 1 (6%) aguda (JAMES, *et al.*, 2008).

No referido estudo houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a prevalência de biofilme bacteriano em feridas crônicas em relação a feridas agudas, achado que fornece evidências de que os biofilmes podem ser abundantes em feridas crônicas (JAMES, *et al.*, 2008).

A produção de biofilmes bacterianos como um fator de risco potencial para infecções persistentes foi investigada com militares que tinham feridas. Os 35 casos (representando 25 pacientes com feridas, com isolados bacterianos do mesmo organismo coletados com 14 dias de intervalo) foram comparados aos 69 controles (60 pacientes com feridas com isolados bacterianos não recorrentes), que foram combinados por organismo e doença infecciosa (AKERS *et al.*, 2014).

As relações entre as cepas bacterianas de cada espécie individual foram avaliadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). No total, 235 isolados bacterianos foram testados para a formação de biofilme na análise caso-controle. A formação de biofilme foi significativamente associada à persistência de infecção e resistência a múltiplas drogas, requisitos de transfusão de concentrado de hemácias nas primeiras 24 horas, visitas à sala de operação antes e na data da infecção diagnóstico, localização anatômica da ferida infectada e a ocorrência de infecções polimicrobianas foram também fatores de risco significativos para infecções persistentes. O estudo apresenta o poder estatístico da análise limitado em razão do pequeno tamanho da amostra, impossibilitando uma análise multivariada (AKERS *et al.*, 2014).

A composição e distribuição bacteriana também foram avaliadas na fase aguda de feridas epidérmicas padronizadas e na pele não ferida por meio de um estudo de tecnologia molecular *in situ* comparada à cultura convencional. Nesse estudo, 28 bolhas de sucção foram feitas nas nádegas de 26 voluntários saudáveis. Quatro feridas foram biopsiadas imediatamente após

confeção e as 24 restantes foram tratadas diariamente com água deionizada estéril e coberta com cobertura retentora de umidade (BAY *et al.*, 2018).

No dia 4 pós-ferimento, os esfregaços foram obtidos para a cultura das feridas e pele adjacente, e as feridas, incluindo pele adjacente, foram extirpadas. As seções de tecido foram coradas com ácido nucleico de peptídeo (PNA), sondas de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) e avaliadas por microscopia confocal de varredura a laser. Agregados bacterianos eram mais comuns ($p = 0,0084$) e maiores ($p = 0,0083$) nas bordas da epiderme das feridas agudas do que na pele adjacente, indicando início do estabelecimento de um biofilme (BAY *et al.*, 2018).

Para a identificação do biofilme, tem-se a proposta da utilização do wound blotting, desenvolvido recentemente para visualizar o biofilme de forma não invasiva e rápida. Ele pode direcionar o desbridamento ultrassônico, já disponível para a remoção do biofilme (MORI *et al.*, 2019).

Estudo foi realizado com objetivo de investigar a eficácia do "sistema de tratamento de feridas com base em biofilme (BWCS)". A mediana da proporção de remoção de biofilme foi de 38,9% para lesões por pressão tratadas com tratamento padrão e 65,2% para aquelas tratadas com desbridamento ultrassônico ($p = 0,009$). A proporção de cicatrização de feridas em 90 dias foi significativamente maior em feridas tratadas com BWCS do que naquelas tratadas com o cuidado padrão ($p = 0,001$). Diante dos achados, o BWCS, pode ser uma estratégia terapêutica promissora para visualizar biofilmes que não são acompanhados por tecido necrótico e promover a cicatrização em feridas crônicas (MORI *et al.*, 2019).

A necessidade de confirmar a presença de biofilme na ferida foi identificada no relato de caso de ferida crônica em paciente queimado com suspeita de biofilme que demandou atenção especial na relação biofilme-ferida crônica. Ao remover o tecido de granulação foi possível diminuir a quantidade de biofilme, melhorar a condição e fazer outro procedimento para fechar a ferida, como enxerto de pele. O estudo envolveu apenas avaliação clínica da ferida, incluindo a suspeita de biofilme (RAMOS-GALLARDO, 2016).

Diante do apresentado, dados os efeitos prejudiciais do biofilme na cicatrização de feridas, modelos de biofilme *in vitro* rigorosos são cada vez mais necessários para investigar a eficácia dos produtos antimicrobianos, incluindo as coberturas antimicrobianas. É também importante a utilização de modelos de biofilme *in vivo* (animal) bem estabelecidos, de

complexidade crescente, para a diferenciação no desempenho de coberturas com tecnologia antibiofilme/antimicrobiana combinada com aqueles com propriedades antimicrobianas isoladas, considerando as limitações de estudos clínicos para a realização dessa avaliação.

Os resultados obtidos com a revisão sinalizam a necessidade de desenvolvimento de estudos para avaliação de ferramentas de diagnóstico molecular, que possam ser usadas na prática clínica para identificar as composições da comunidade bacterianas presentes nos biofilmes patogênicos de feridas crônicas e nas infecções. É importante considerar que os biofilmes microbianos têm sido reconhecidos como causa da cronicidade de feridas, mas não existe um valor de referência alvo para a eficácia antimicrobiana de produtos para tratamento de feridas em modelos de biofilme.

Além disso, os dados sobre a atividade antimicrobiana de produtos em modelos de biofilme estão diversificados por muitos métodos de teste em uma variedade de estudos. Existem vários produtos antimicrobianos tópicos de tratamento de feridas disponíveis para uso, no entanto sua eficácia tem sido demonstrada rotineiramente com microrganismos planctônicos ou, ainda, os estudos discursam sobre a eficácia do produto com base apenas em resultado de culturas e, com isso, não avaliam ou não descrevem a técnica utilizada para a comprovação física e ultraestrutural do biofilme nas feridas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo e Campo de Estudo

Trata-se de estudo pré-clínico, de natureza translacional e quantitativa. Os procedimentos experimentais desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Angiogênese e Células-tronco do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos do Departamento de Microbiologia, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e no Centro de Microscopia da UFMG.

4.2 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o nº de protocolo 87/2015 (ANEXO B).

4.3 Animais

Para execução deste projeto, utilizaram-se camundongos saudáveis, isogênicos, machos, da linhagem C57BL/6, com idade de aproximadamente 8 a 12 semanas e peso corporal entre 20 e 30 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para a realização dos procedimentos experimentais, consideraram-se os parâmetros de bem-estar animal conforme recomendações da Orientação Técnica nº 12, do ano de 2018, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 Amostra e cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado a partir da análise de um intervalo de confiança de 95% para média (nível de significância de 5%) e 80% de chance de detecção de diferença entre as médias, ou seja, poder estatístico do teste de 80% (ENG, 2003). A fórmula $[N = (4\sigma^2 (Z_{crit} + Z_{pwr})^2) / D^2]$ tem como referência a média e o desvio padrão de experimentos anteriores: parâmetro analisado - ferida excisional; média 1 (1132); média 2 (921,8); diferença esperada entre médias (18,57); desvio padrão 1 (126,1); desvio padrão 2 (115,9); DP em % (11,9); DP em decimais (0,12); critério de significância (95%); Zcrit (1,95); poder estatístico (85%); Zpwr (1,036), $Z_{crit} + Z_{pwr}^2$ (8,916); diferença esperada (0,19 % em decimais); sendo considerado um n amostral de 8 animais para cada grupo experimental.

Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aplicados em dois grupos experimentais: grupo controle e grupo infectado, sendo avaliados nos tempos de 0, 3, 5, 7 e 10 dias, totalizando, assim, um n amostral de 64 animais. Considerou-se uma porcentagem de 20% de erro e reposição de perda amostral sobre o n, contabilizando 13 animais. A amostra total foi composta por 78 animais (Quadro 5).

Quadro 5 - Composição e distribuição do n amostral (2020)

GRUPOS	0 dia	3 DIAS (N)	5 DIAS (N)	7 DIAS(N)	10 DIAS(N)	TOTAL
Controle (PBS)	0	7	8	7	7	29
Infectado (PA)	0	9	9	9	8	35
Perdas (C+I)	0	1	5	6	2	14
SUBTOTAL	0	17	22	22	17	78

Fonte: dados da pesquisa, 2019-2020.

4.5 Procedimentos e Delineamento Experimental

4.5.1 Ambientação e alojamento dos animais

Os animais provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG foram alojados no biotério do Laboratório de Angiogênese e Células-tronco (LanCet) para o procedimento de vermifugação.

Após o período de vermifugação, os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LaBIO) - Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG até o término dos procedimentos experimentais e eutanásia dos mesmos.

Os animais foram submetidos a um período de 5 dias de ambientação e adaptação no biotério do LaBIO. Eles foram mantidos em uma sala exclusiva para o alojamento de animais em experimentação, sob condições controladas de temperatura (22-24°C), luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), em gaiolas individuais do tipo mini-isoladores com dimensão aproximada de 25 cm³, apropriadas para camundongos. Os animais tiveram livre acesso à ração e água e os mini-isoladores, em material policarbonato, foram autoclavados no início e ao fim de cada grupo experimental; além disso, foi promovida a limpeza concorrente das gaiolas por até duas vezes na semana durante o período experimental para evitar o acúmulo de amônia no ambiente. Os animais foram acondicionados e mantidos individualmente nesses mini-isoladores, em rack ventilado (modelo duplo com 112 mini-isoladores, série Ventilife, fabricante Alesco) exclusivo para os animais em experimentação.

Também foram oferecidos dispositivos para suporte comportamental e ambiental, por exemplo, gaiola forrada com maravalha, livre acesso à ração e água e o uso de brinquedos devidamente higienizados para interação com o ambiente e redução do estresse provocado pelo isolamento durante todo o período experimental conforme recomendações preconizadas pelo CONCEA (2018).

4.5.2 Cultivo, repique bacteriano e preparação do inóculo de *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria utilizada em todos os experimentos realizados foi a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 25853®, amostra (alíquota) cedida pelo Professor Flaviano dos Santos Martins, coordenador do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO C).

A amostra de *P. aeruginosa* (ATCC 25853) recebida foi propagada em 5,0 mL do meio Caldo Cérebro-coração (Caldo BHI - Brain-heart Infusion Broth, fabricante Acumedia) e cultivada em estufa microbiológica por 24h (overnight), em temperatura de 37°C (DHALL *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2010). Ao término desse tempo de crescimento, a solução do caldo BHI

contendo as bactérias foi levada à centrífuga por 10 minutos, em temperatura de 4°C e com velocidade de 9.500 rpm; em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 5,0 mL de PBS estéril.

Promoveu-se a diluição seriada dessa solução bacteriana para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido. Essa contagem das UFCs permitiu o preparo de uma solução estoque contendo carga bacteriana de $3,4 \times 10^9$ UFC/mL.

A solução estoque foi preparada em solução de glicerol a 80% estéril. As alíquotas foram preparadas em criotubos (com capacidade de 2,0 mL) contendo 800µL do caldo de *Pseudomonas* com $3,4 \times 10^9$ UFC/mL e 200µL de glicerol a 80% estéril. Essas alíquotas foram imediatamente conservadas em freezer -20°C e utilizadas em todos os demais experimentos deste estudo.

O preparo do inóculo para a infecção das feridas foi realizado a partir dessa solução estoque contendo $3,4 \times 10^9$ UFC/mL e considerando a técnica de diluição seriada, de forma que os 10µL de solução aplicados em cada uma das 4 feridas dos animais do grupo intervenção (Pa) contivesse uma carga bacteriana de 10^4 UFC/mL. Nos animais do grupo controle, aplicaram-se 10µL de PBS estéril, considerado como veículo de propagação, em cada uma das 4 feridas confeccionadas no dorso desses animais.

4.5.3 Determinação da carga bacteriana

A determinação da carga bacteriana utilizada neste estudo foi realizada em três etapas descritas a seguir.

Na primeira etapa, realizou-se um estudo piloto que teve como finalidade ajustar as variáveis que envolvem a indução e a formação do biofilme bacteriano em feridas cutâneas, por exemplo, a carga bacteriana a ser implementada para a infecção das feridas e a curva de sobrevivência dos animais após a confecção e indução da infecção nas feridas. Além disso, testou-se o uso de cobertura oclusiva com filme de poliuretano e do filtro de celulose como suporte para a formação do biofilme no leito das feridas ao longo dos diferentes tempos experimentais. Para a execução desses testes, fizeram-se 4 feridas na região central do dorso dos animais com um punch cirúrgico de 5mm. Realizou-se a excisão de toda a extensão da

pele, incluindo a epiderme, derme, hipoderme até o panículo carnoso (CANESSO *et al.*, 2014).

Os animais dessa fase do estudo foram alocados aleatoriamente em dois grupos denominados grupo controle (n=3) e grupo infectado (n= 18), totalizando 21 animais. Dentro dessa distribuição, os animais foram alocados em diferentes subgrupos:

- Controle sem filtro e sem filme transparente (n= 1);
- Controle sem filtro e com filme transparente (n= 1);
- Controle com filtro e com filme transparente (n= 1);
- Infectados com carga bacteriana de 10^8 (n= 6);
- Infectados com carga bacteriana de 10^6 (n= 2);
- Infectados com carga bacteriana de 10^5 (n= 8);
- Infectados com carga bacteriana de 10^4 (n= 2).

Nos animais do grupo controle, aplicou-se um placebo (10 μ L de PBS estéril) diretamente sobre cada uma das quatro lesões confeccionadas no dorso desses animais. O grupo infectado foi dividido em 4 subgrupos em função das diferentes cargas bacterianas a serem aplicadas e das diferentes técnicas de indução da infecção (A, B, C e D).

Os testes foram realizados a partir de diferentes soluções bacterianas obtidas por meio da técnica de diluição seriada da amostra de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25583), nas seguintes quantidades: 10^8 , 10^6 , 10^5 e 10^4 , conforme descrito por Zhao *et al.* (2010), Davis *et al.* (2019), Brandenburg *et al.* (2019), Akers *et al.* (2014) e Mori *et al.* (2019), denominadas aqui como carga bacteriana para indução da infecção ou colonização bacteriana das feridas.

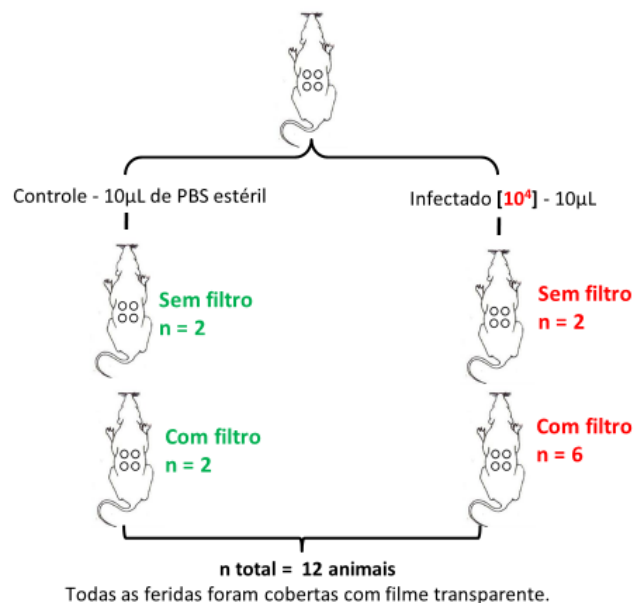
Na segunda etapa dessa fase, utilizaram-se 10 μ L de PBS estéril como placebo nos animais dos grupos controle (grupos 1 e 2) e 10 μ L de solução bacteriana de carga 10^4 para indução da infecção nos animais do grupo infectado (grupos 3 e 4). Nos animais dos grupos controles, aplicaram-se 10 μ L de solução salina (PBS) diretamente sobre a lesão (grupo 1) ou sobre o filtro aplicado nas feridas (grupo 2). Nos animais do grupo infectado, a infecção foi induzida com 10 μ L de solução bacteriana (PBS + bactéria) aplicada diretamente sobre as feridas (grupo 3) ou sobre o filtro aplicado nas feridas (grupo 4). Nessa fase, todos os animais do grupo controle e do infectado tiveram as feridas ocluídas com filme transparente e a indução

da infecção foi avaliada no tempo de 24h, 48h e 72h. O tempo de seguimento dos animais foi de 21 dias.

Nesse momento, os animais foram divididos em quatro grupos, como descrito e ilustrado a seguir (Figura 2):

- Grupo 1 - controle sem filtro e com filme transparente (n= 2);
- Grupo 2 - controle com filtro e com filme transparente (n= 2);
- Grupo 3 - infectado sem filtro e com filme transparente (n= 2);
- Grupo 4 - infectado com filtro e com filme transparente (n= 6).

Figura 2 - Desenho experimental (etapa 2) do seguimento de 21 dias para determinação da carga bacteriana e variáveis do modelo de infecção de feridas (2019)



Fonte: dados da pesquisa.

Nessa etapa, o filme transparente foi utilizado com 4 finalidades distintas: fixar o filtro de celulose nas primeiras 72 horas do estudo; servir como superfície de apoio e propagação da bactéria no leito das feridas; evitar a formação de crosta no leito das feridas; e bloquear a dispersão da *Pseudomonas* no microambiente. Em virtude dos resultados obtidos na primeira etapa dessa avaliação, a carga bacteriana de 10⁴ foi selecionada com os objetivos de reavaliar a técnica (D) de indução da infecção, simular a colonização crítica em feridas da pele humana,

assim como reavaliar o uso do filtro de celulose no processo de indução, formação e fixação do biofilme no leito das feridas.

Na terceira etapa da determinação da carga bacteriana para indução de infecção nas feridas, os animais compuseram duas rodadas de experimento com seguimento de três dias. Mantiveram-se as denominações de grupo controle e grupo infectado, variando apenas a carga bacteriana empregada para a indução da infecção, 10^4 e 10^5 , respectivamente. O principal objetivo dessa etapa foi reavaliar a taxa de mortalidade obtida anteriormente para o grupo infectado com filtro e com filme transparente, considerando agora as cargas bacterianas de 10^4 e 10^5 , conceituadas na literatura como carga bacteriana de colonização crítica e de infecção, respectivamente. Manteve-se o uso do filme transparente para oclusão das feridas em todos os grupos avaliados. O tempo total de seguimento experimental dessa fase foi de 3 dias e a amostra total de 26 camundongos da linhagem C57BL/6, machos, isogênicos, saudáveis e com idade entre 8 e 12 semanas.

Nessa fase, utilizaram-se 10 μ L de PBS estéril como placebo nos animais dos grupos controle (grupos 1 e 2) e para indução da infecção nos animais do grupo infectado foram aplicados 10 μ L de solução bacteriana com carga de 10^4 (para os grupos 3 e 4) e carga de 10^5 (para os grupos 5 e 6) em cada uma das quatro feridas confeccionadas no dorso dos animais. Nos animais dos grupos controles, aplicaram-se 10 μ L de solução salina (PBS) diretamente sobre a lesão (grupo 1) ou sobre o filtro aplicado nas feridas (grupo 2). Nos animais do grupo infectado, a infecção foi induzida com 10 μ L de solução bacteriana (PBS + bactéria) aplicada diretamente sobre as feridas (grupos 3 e 5) ou sobre o filtro aplicado nas feridas (grupos 4 e 6). Nessa fase, todos os animais do grupo controle e do infectado tiveram as feridas ocluídas com filme transparente e a indução da infecção foi avaliada no tempo de 24h, 48h e 72h. O tempo total de seguimento dos animais foi de 3 dias.

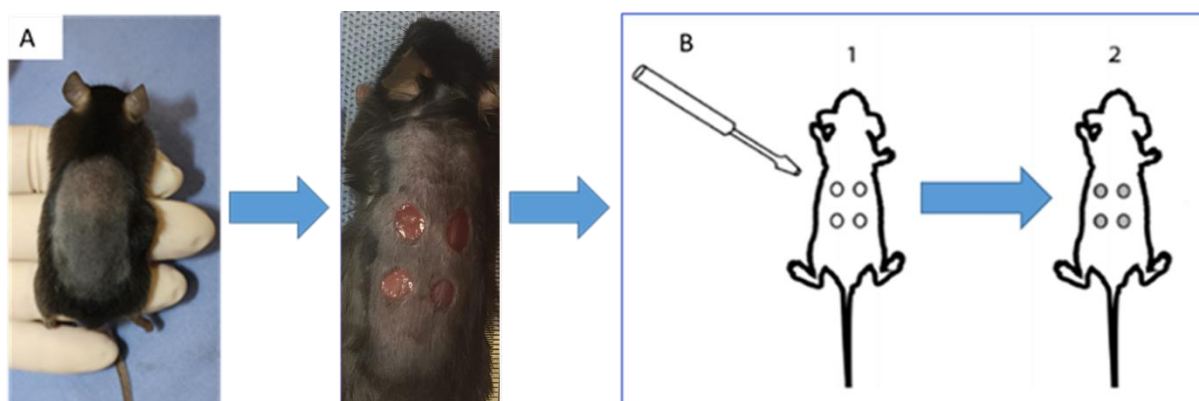
4.5.4 Procedimentos anestésico-cirúrgicos e indução do biofilme nas feridas com *Pseudomonas aeruginosa*

Para a confecção das feridas cutâneas excisionais, os animais foram anestesiados com as substâncias xilazina 2% (fabricante Syntec), na dose de 10 mg/kg, e cetamina 10% (fabricante Syntec), na dose de 100 mg/Kg, preparadas em solução salina tamponada de fosfato

(*Phosphate-buffered saline* – PBS) estéril e administradas por via intraperitoneal utilizando uma agulha calibre 22G (0,70x25mm, fabricante BD); em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia dos pelos e assepsia da pele em região dorsal.

A tricotomia foi realizada com um mini-tricotomizador, da marca *Wall*, modelo portátil, e a assepsia da pele com solução alcoólica a 70%. Após esses procedimentos, confeccionaram-se quatro feridas na região média do dorso desses camundongos, com o auxílio de um *punch* cirúrgico (*punch* para biópsia) de 5mm de diâmetro (CANESSO *et al.*, 2014). Esse procedimento consistiu na retirada de toda a extensão do tecido cutâneo, incluindo epiderme, derme, hipoderme e panículo carnosos. As feridas foram confeccionadas com uma distância mínima de 0,5 cm e máxima de 1,0 cm entre elas, tanto na posição horizontal como na posição vertical (Figura 3).

Figura 3 - Desenho esquemático da confecção e posicionamento das feridas no dorso dos animais (2019)



Fonte: em A, arquivo pessoal da pesquisadora; em B, imagem adaptada de Galiano *et al.*, 2004.

A indução do biofilme nas feridas foi realizada pela aplicação de um filtro (membrana) de celulose estéril com espessura e porosidade de 0,2µm, medindo 5mm de diâmetro, sobre cada uma das feridas confeccionadas no dorso dos animais; em seguida, aplicaram-se 10µl da suspensão bacteriana contendo 10^4 UFC/mL nos animais do grupo intervenção e 10µl de PBS sobre cada um dos 4 filtros aplicados sobre as lesões para os animais do grupo controle.

Logo após a aplicação dos filtros e da suspensão bacteriana sobre as feridas de cada animal, aplicou-se uma cobertura secundária com filme transparente adesivo (fabricante 3M) nas dimensões de 3cm de comprimento por 15cm de largura, a fim de cobrir as 4 feridas do dorso dos animais e dar duas voltas ao redor do corpo do animal (AMORIM, 2016) para garantir a

permanência dos filtros sobre as feridas por 24 horas e também contribuir para a manutenção do microambiente para o crescimento bacteriano da *P. aeruginosa* no leito das feridas.

Após 24h da aplicação do inóculo de *P. aeruginosa* nas feridas, removeram-se o filme transparente e os filtros aplicados sobre as mesmas. A cobertura com filme transparente foi recolocada após a retirada dos filtros e mantida até o término de cada tempo experimental. Ressalta-se que essa cobertura foi trocada nos dias 3, 5 e 7, conforme cada tempo experimental.

Ao término da confecção e infecção das feridas, os animais permaneceram em ambiente livre de ruídos, sob manta térmica aquecida a 37°C até o término do período de recuperação anestésica; após esse tempo, eles foram acondicionados novamente em gaiolas individuais, conforme descrito anteriormente.

Ao final de cada tempo experimental (3, 5, 7 e 10 dias), realizou-se a biópsia da pele para remoção do tecido correspondente à área das feridas com o auxílio de um *punch* cirúrgico de 6mm de diâmetro (CANESSO *et al.*, 2014) e considerando as adaptações pertinentes para este estudo. O dia zero (0) foi representado pelo fragmento de tecido removido no momento da confecção da ferida.

Ao término da realização das biópsias das feridas e coleta dos tecidos para as avaliações propostas, os animais foram eutanasiados com uma sobredose de anestésico Xilazina 2% (fabricante Syntec), na dose de 30 mg/kg, e Cetamina 10% (fabricante Syntec), na dose de 300 mg/kg, ambas preparadas em solução PBS estéril e administrada por via intraperitoneal utilizando uma agulha calibre 22G (0,70x25mm, fabricante BD). Após a administração da sobredose de anestésico recomendada, realizou-se a técnica de deslocamento cervical, visto que esta proporciona morte rápida, indolor e não necessita de aparelhagem ou medicamentos de alto custo, segundo recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG e Resolução Normativa do CONCEA de nº 37, de 2018.

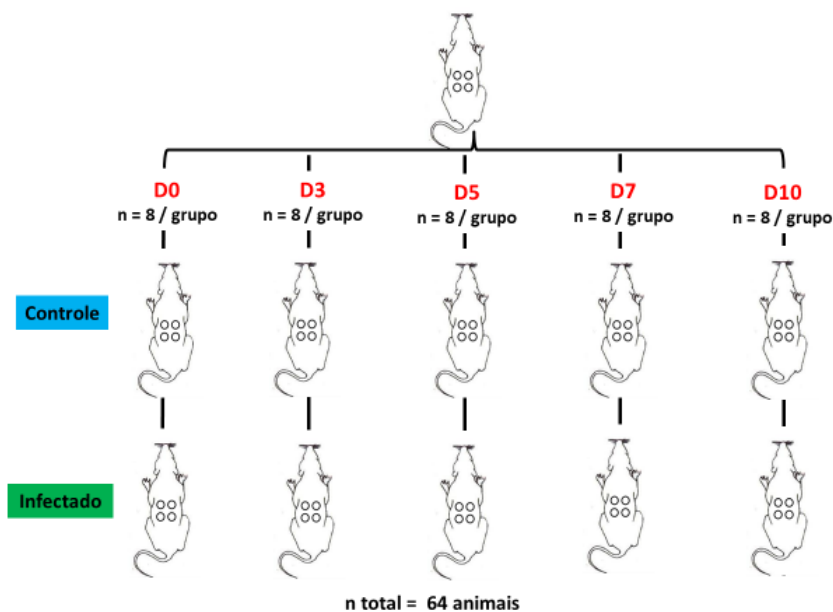
Os dejetos e as carcaças foram descartados em sacos plástico brancos, devidamente identificados, com capacidade e resistência específicas para esse fim. As carcaças foram acondicionadas em freezer com temperatura de -20°C até passarem pelo procedimento de autoclavagem e esses resíduos serem recolhidos pelo Serviço de Gerenciamento de Resíduos da UFMG, que está em consonância com as recomendações do Sistema de Limpeza Urbana (SLU) do município de Belo Horizonte/MG.

4.5.5 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de estudo denominados Grupo Controle (Pbs) e Grupo Intervenção (Pa). O seguimento temporal dos dois grupos ocorreu em cinco tempos distintos (Figura 4).

Considerou-se como D0 (dia 0/basal) o momento da realização das feridas, sendo representado pelo tecido removido no momento da confecção da ferida e os demais tempos, como D3 (seguimento de três dias), D5 (seguimento de 5 dias), D7 (seguimento de 7 dias) e D10 (seguimento de 10 dias), após a confecção das feridas. O tempo máximo de seguimento foi de 10 dias e o tempo mínimo de 3 dias para os dois grupos do estudo. Acreditou-se que esses tempos experimentais são importantes marcadores de acompanhamento da indução e formação do biofilme no processo de cicatrização de feridas.

Figura 4 - Desenho experimental do estudo (2019-2020)



Fonte: dados da pesquisa.

Confeccionaram-se quatro feridas cutâneas no dorso de cada um dos animais que compunham o grupo controle e o grupo intervenção. Nos animais do grupo controle, aplicaram-se 10µl PBS (veículo), enquanto os animais do grupo infectado foram desafiados para a infecção/colonização e formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* com 10µl da suspensão bacteriana contendo 10^4 UFC/mL. Em ambos os grupos, as respectivas soluções

foram aplicadas sobre os filtros de celulose colocados sobre as quatro feridas, conforme adaptação do modelo de feridas infectadas com biofilme descrito por Zhao *et al.* (2010).

Imediatamente após a aplicação dos filtros sobre as feridas e a indução com o veículo (PBS estéril) ou com a solução bacteriana, realizou-se a fixação dos filtros sobre as feridas com uma tira de filme de poliuretano transparente medindo 3,0 cm de comprimento por 15 cm de largura visando garantir que os filtros mantivessem contato permanente com o leito das feridas durante as primeiras 24 horas do experimento. O filme de poliuretano foi aplicado de forma a cobrir as quatro feridas da região dorsal a fim de permitir o envolvimento de toda a região dorso-ventral dos animais.

Ao término das primeiras 24 horas, os filtros foram removidos das feridas e estas novamente ocluídas com o filme transparente. A troca dessa cobertura ocorreu nos dias 3, 5, 7 e 10 de cada tempo experimental para a mensuração e avaliação das feridas; em seguida, reaplicou-se o filme transparente. Salienta-se que os animais foram devidamente anestesiados para a realização segura e humanitária dos procedimentos experimentais em todas as marcações temporais do delineamento experimental, ou seja, nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 10.

Os procedimentos experimentais realizados em cada marcação temporal foram, respectivamente:

- Dia 0: aplicação da anestesia, tricotomia dos pelos, mensurado peso, coleta de sangue, confecção das feridas, mensuração da área das feridas, registro fotográfico, aplicação dos filtros sobre as lesões, indução do biofilme / infecção das feridas, aplicação do filme transparente, recuperação anestésica;
- Dia 1 (24h): anestesia, remoção do filme transparente e dos filtros, avaliação macroscópica das feridas, aplicação do filme transparente e recuperação anestésica;
- Dia 3: aplicação da anestesia, coleta de sangue, remoção do filme transparente, mensuração da área das feridas, registro fotográfico, avaliação macroscópica das feridas, aplicação do filme transparente, recuperação anestésica para os animais dos grupos de 5, 7 e 10 dias, técnicas de eutanásia já descritas anteriormente para os animais do grupo de 3 dias;
- Dia 5: aplicação da anestesia, coleta de sangue, remoção do filme transparente, mensuração da área das feridas, registro fotográfico, avaliação macroscópica das feridas, aplicação do filme transparente, recuperação anestésica para os animais dos

grupos de 7 e 10 dias, técnicas de eutanásia já descritas anteriormente para os animais do grupo de 5 dias;

- Dia 7: aplicação da anestesia, coleta de sangue, remoção do filme transparente, mensuração da área das feridas, registro fotográfico, avaliação macroscópica das feridas, aplicação do filme transparente, recuperação anestésica para os animais do grupo de 10 dias, técnicas de eutanásia já descritas anteriormente para os animais do grupo de 7 dias;
- Dia 10: aplicação da anestesia, coleta de sangue, remoção do filme transparente, mensuração da área das feridas, registro fotográfico, avaliação macroscópica das feridas, aplicação do filme transparente e técnicas de eutanásia já descritas anteriormente para os animais do grupo de 10 dias.

Ressalta-se que os dois grupos experimentais foram acompanhados paralelamente nos cinco tempos distintos e que essas mesmas condições foram realizadas para o grupo controle, exceto pelo procedimento de infecção das feridas com a solução de *P. aeruginosa*. Nesses animais, aplicou-se um veículo (PBS estéril) para mimetizar e simular a infecção das feridas. Ao término de todos os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados de acordo com recomendações do CONCEA (2018) e CEUA/UFMG já descritas anteriormente.

4.6 Avaliações realizadas

4.6.1 Sobrevida dos animais durante o seguimento experimental

A avaliação da sobrevida dos animais foi realizada por meio do método de Kaplan-Meier. Esse método é utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo e ilustrar graficamente a sobrevida ao longo do tempo.

4.6.2 Cinética de fechamento das feridas

O perfil de fechamento das feridas foi realizado por meio do registro fotográfico e da mensuração da área das feridas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 após a confecção cirúrgica das feridas.

Para o registro fotográfico, utilizou-se câmera Microscópio Digital Portátil USB, 2.0, com capacidade de aumento até 800x (USB Microscope Microview).

A mensuração da área da ferida foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (marca Insize), com sensibilidade mínima de 0,01mm e máxima de 200 mm. Os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida, utilizando-se a seguinte fórmula: $[100 - (\text{área atual da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$, conforme descrito por Canesso e colaboradores (2014). Para fins de cálculo, utilizou-se a área média \pm erro padrão da média das feridas em todos os tempos experimentais.

4.6.3 Identificação da presença e dispersão de *Pseudomonas aeruginosa* nas feridas

A contraprova da presença de *P. aeruginosa* no leito das feridas foi realizada por meio da técnica de cultivo do macerado dos tecidos correspondentes à área das feridas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10.

A pele correspondente à área das feridas foi pesada e normalizada para 100mg de tecido por 2000 μ L (2 mL) de PBS. O macerado das feridas foi diluído por meio da técnica de diluição seriada na proporção de 1:1.000 em solução tampão de fosfato estéril (phosphate buffer solution - PBS); em seguida, plaquearam-se 100 μ l dessa solução em placas de Petri contendo ágar cetrímide, um meio de cultivo de microrganismos seletivo para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras biológicas de origem animal (BROWN; LOWBURY, 1965; BIODIAGNOSTICS, 2009). Posteriormente, essas placas foram incubadas por 24h em temperatura de 37°C com a finalidade de garantir a amplificação e o crescimento das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média representando o número de UFC/g de tecido.

4.6.4 Identificação da presença e dispersão de *Pseudomonas aeruginosa* em nível sistêmico

Para a avaliação de sinais clínicos de septicemia nos animais, utilizaram-se as técnicas de cultivo do macerado do tecido hepático nos tempos de 3, 5 e 7 dias, após a indução da

infecção nas feridas, e a contagem total e diferencial de leucócitos nos dias 0, 3, 5, 7 e 10, após a indução de infecção local nas feridas.

O tecido foi pesado e normalizado para 100mg de tecido para 1000 μ L (1mL) de PBS. O macerado do fígado foi diluído por meio da técnica de diluição seriada na proporção de 1:1.000 em solução tampão de fosfato estéril (phosphate buffer solution - PBS); em seguida, plaquearam-se 100 μ L dessa solução em placas de Petri contendo ágar cetrimide, um meio de cultivo de microrganismos seletivo para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras biológicas de origem animal (BROWN; LOWBURY, 1965; BOKAR DIAGNOSTICS, 2009). Posteriormente, essas placas foram incubadas por 24h em temperatura de 37°C com a finalidade de garantir a amplificação e o crescimento das unidades formadoras de colônia (UFC).

A contagem de leucócitos foi avaliada por meio da coleta de sangue na cauda do camundongo, sendo considerados 5 μ L de sangue para a contagem total de leucócitos e 5 μ L para o esfregaço em lâmina de vidro para a contagem diferencial das células.

A contagem total de leucócitos foi realizada a partir de uma diluição de 1:10, sendo 5 μ L de sangue e 45 μ L de solução de Turkey aplicados em câmara de Neubauer para contagem das células em microscópio óptico.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada a partir da coloração do esfregaço sanguíneo com KIT Panótico rápido (fabricante Laborclin). As lâminas foram mergulhadas por 5 segundos na solução 1, 5 segundos na solução 2 e 5 segundos na solução 3, respectivamente; em seguida, realizou-se o enxague das mesmas em água destilada por 5 segundos.

Salienta-se que o KIT Panótico rápido é composto por três soluções denominadas 1, 2 e 3, sendo que a solução 1 é um fixador do tecido sanguíneo, a solução 2 age de forma semelhante à eosina e cora as estruturas ácidas do tecido, enquanto a solução 3 é mais semelhante à hematoxilina e cora, portanto, as estruturas básicas do tecido. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico considerando o aumento de 100x e imersão em óleo. Nessa etapa, utilizou-se o aplicativo Haematoly Counter® para auxílio na contagem diferencial das células do sistema sanguíneo.

Os resultados obtidos, UFC/g de tecido e nº de leucócitos/mL de sangue, foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.6.5 Avaliação clínica dos animais

O acompanhamento clínico dos animais foi realizado por meio da inspeção clínica diária, mensuração do peso corporal e avaliação macroscópica das feridas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10.

Para a inspeção clínica, considerou-se o nível de atividade do animal como ativo ou hipoativo com a finalidade de detectar a capacidade de interação com o ambiente, de alimentação e de hidratação.

Para a avaliação do peso, utilizou-se uma balança digital semi-analítica (marca Bel) com capacidade para 0,001g, 310g. O peso corporal foi mensurado e descrito em gramas (g) nos dias 0, 3, 5, 7 e 10, antes do procedimento anestésico.

Para a avaliação macroscópica das feridas, levou-se em consideração alguns aspectos clínicos das feridas já descritos na literatura. Observaram-se a presença de odor e coloração do tecido necrótico, a presença de uma película brilhante, translúcida e viscosa na superfície das feridas (LENSELINK; ANDRIESSEN, 2011; HURLOW; BOWLER, 2012; METCALF; BOWLER; HURLOW, 2014), a presença de tecido necrótico frouxo e fluído (esfacelo) ou a presença de tecido desvitalizado de aspecto gelatinoso (HURLOW; BOWLER, 2009; 2012; PHILLIPS et al., 2010).

4.6.6 Perfil de formação do biofilme nas feridas

O perfil de formação e a identificação do biofilme nas feridas foram avaliados por meio da inspeção das feridas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), modelo Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV. A preparação das amostras seguiu o protocolo de preparação de amostras biológicas já amplamente utilizado pelo centro de Microscopia da UFMG (CM/UFMG).

Após a biópsia da pele correspondente à área das feridas, esse tecido foi imediatamente pré-fixado por imersão em solução Karnovsky modificada (paraformaldeído a 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M / pH entre 7,2-7,4), por 72h. Após 72h nessa solução, o tecido da ferida foi recortado em fragmentos de 1mm (aproximadamente). Esses fragmentos foram transferidos para *eppendorfs* contendo uma solução tamponada de fosfato (Tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2-7,4) e mantidas sob refrigeração entre 4 e 8°C nessa solução até entrega dessas amostras ao CM/UFMG para sequência do processamento de amostras biológicas.

Ressalta-se que ambas as soluções da etapa de pré-fixação foram fornecidas pelo CM/UFMG e que o tecido das feridas foi fragmentado considerando duas regiões específicas: área de borda e área de centro. As etapas de pré-fixação e a fragmentação do tecido foram realizadas pela própria pesquisadora e os fragmentos correspondentes a cada região acondicionados em *eppendorfs* contendo solução de tampão fosfato 0,1 M, identificados como região de borda e região de centro e encaminhados ao CM/UFMG para continuidade do processo de preparação de amostras biológicas para MET.

As próximas etapas de fixação, desidratação e inclusão em resina foram realizadas pelo CM/UFMG, conforme protocolo já estabelecido desse serviço.

Dando continuidade ao processo, as amostras foram lavadas com tampão 0,1 M durante 10 minutos, por 3x consecutivas; em seguida, estas foram colocadas na solução de tetróxido de ósmio (OsO_4 2% + $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1,5% por 2 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas novamente com água durante 10 minutos por 5x consecutivas. Na sequência, as amostras foram submersas em solução aquosa de acetado de uranila 2% com 13,3% de sacarose, a 4°C overnight, sob agitação; em seguida, as amostras foram novamente lavadas em água durante 5 minutos por 3x consecutivas.

A desidratação dos fragmentos foi realizada a partir de soluções com concentração crescente de álcool (35% 2x por 10', 50% 2x por 10', 70% 2x por 10', 85% 2x por 10', 95% 2x por 10', 100% 3x por 10') e acetona 100% 2x por 10'. Essa etapa tem como objetivo garantir a resistência ao vácuo e permitir a inclusão em resina.

A inclusão em resina do tipo epóxi (EPON), um polímero termorrígido, foi realizada em seis etapas distintas. Na primeira fase, as amostras foram submersas durante 2 horas em solução de acetona 100% e resina EPON na proporção de 2:1, respectivamente. Na segunda etapa da inclusão, as amostras foram submersas em solução de acetona 100% e resina EPON na

proporção de 1:1 por 2 horas. Em um terceiro momento, as amostras foram submetidas a uma solução de solução de acetona 100% e resina EPON na proporção de 1:2 por 12h (overnight).

Posteriormente, os fragmentos do tecido foram incluídos em resina EPON pura durante 3 horas em repouso, considerando o posicionamento transversal do fragmento que permite a avaliação das estruturas da pele, tendo como referência a epiderme como a parte mais superficial da pele e a hipoderme como a estrutura de maior profundidade na organização da pele.

Após esse período, as amostras foram levadas à estufa a 40°C por 1 hora e depois em estufa a 60°C por 48 horas para secagem dos blocos. Essa etapa de inclusão em resina tem como objetivos tornar as amostras biológicas resistentes ao feixe de elétrons e permitir a ultramicrotomia das amostras.

Após a preparação e montagem dos blocos em resina, realizou-se o corte das amostras na espessura de 200 a 300nm. Esses cortes foram coletados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina para auxiliar na seleção da região de maior interesse nas amostras por meio da avaliação de imagem bidimensional do tecido seccionado fornecida pelo CM/UFMG. Após a seleção da região de maior interesse investigativo, as amostras passaram pela etapa de ultramicrotomia, que corresponde ao corte do tecido na espessura de 50-60nm e deposição desse fragmento em tela de cobre (telas de cobre 100, 200 ou 300 mesh, sem filme); em seguida, realizou-se a contrastação positiva com citrato de chumbo. O fluxograma do processo de preparação das amostras pode ser consultado no Anexo C deste documento.

Diretrizes recentes sobre biofilmes apontam o uso da microscopia eletrônica, como a microscopia de transmissão, de varredura e microscopia confocal de varredura, como técnica confiável de diagnóstico desses microrganismos (WEI et al., 2019).

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada como a técnica “padrão-ouro” para a detecção de biofilmes em superfícies bióticas e teve como finalidade permitir a detecção da presença do biofilme e/ou da bactéria (*Pseudomonas aeruginosa*) utilizada para indução da formação do biofilme. Os resultados foram expressos como biofilme presente ou biofilme ausente.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.0 e os resultados representados como média \pm erro padrão da média. Consideraram-se significativos os valores de $p < 0.05$.

A avaliação da sobrevida dos animais foi realizada por meio do método de Kaplan-Meier, considerando o teste de Log-rank (Mantel-Cox) utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Para comparações entre dois grupos ao longo tempo, utilizou-se o teste de variância ANOVA bidirecional (*Two-way* ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas Tukey's com a finalidade de verificar a interação entre as variáveis dependentes no tempo.

Para comparações entre três ou mais grupos, o teste de variância ANOVA unidirecional (*one-way* ANOVA) foi usado, seguido do teste de comparações múltiplas Tukey's com a finalidade de verificar a interação entre as variáveis independentes no tempo.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da carga bacteriana: um estudo prévio

5.1.1 Etapa 1 da fase de determinação a carga bacteriana

A determinação da carga bacteriana utilizada neste estudo foi realizada a partir de um estudo prévio conforme descrito no item 4.5.3.

Os testes para determinação da carga bacteriana foram realizados a partir de diferentes suspensões bacterianas obtidas por meio da técnica de diluição seriada da amostra de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25583) nas seguintes quantidades: 10^8 , 10^6 , 10^5 e 10^4 (Quadro 6).

Quadro 6 – Descrição das técnicas para indução de infecção nas feridas (2018-2019)

Técnica de infecção	Descrição do método aplicado	Carga bacteriana (n)	Uso do Filtro vs Oclusão das feridas	Resultados obtidos
Técnica A	Aplicação de 10 μ L de PBS nos controles e 10 μ L de solução bacteriana (PBS + bactéria) diretamente sobre as feridas imediatamente à confecção das mesmas. OBS.: oclusão com filme transparente foi aplicada por 24h.	Controles (n=3)	1 animal: - / - 1 animal: - / + 1 animal: + / +	Não houve mortes nos animais controle.
		10^5 / (n= 2)	1 animal: - / - 1 animal: - / +	Houve 100% de morte para os animais com carga bacteriana de 10^5 no 10 $^{\circ}$ dia após a infecção.
		10^8 / (n= 2)	1 animal: - / - 1 animal: - / +	Houve 50% de morte nos animais com carga de 10^8 com 24h de indução da infecção. Sobreviveu 1 animal sem filtro e sem oclusão (-/ -).
Técnica B	Foram aplicados 10 μ L de solução bacteriana (PBS + bactéria) sobre o filtro e incubados por 24h em estufa microbiológica a 37°C. Os filtros incubados por 24h foram aplicados sobre as feridas imediatamente após a sua confecção. OBS.: oclusão com filme transparente foi aplicada por 24h a 72h.	10^4 (n= 2)	1 animal: - / + 1 animal: + / +	Houve 100% de morte nas primeiras 72h após a infecção das feridas para as três cargas bacterianas aplicadas, independente do uso do filtro ou da oclusão das feridas.
		10^5 (n= 2)	1 animal: - / + 1 animal: + / +	
		10^6 (n= 2)	1 animal: - / + 1 animal: + / +	

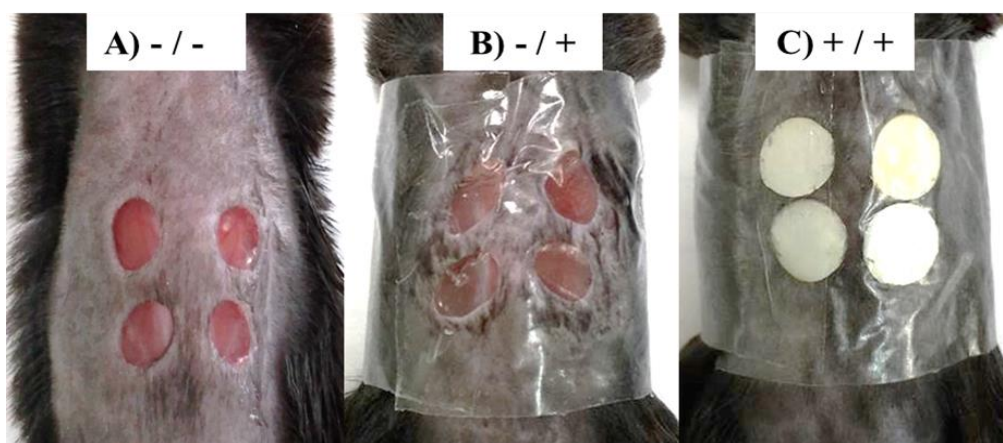
Continua...

Técnica de infecção	Descrição do método aplicado	Carga bacteriana (n)	Uso do Filtro vs Oclusão das feridas	Resultados obtidos
Técnica C	Foram plaqueados 100µL de solução bacteriana (PBS + bactéria) sobre uma placa de petri contendo ágar BHI estéril, quatro filtros sobre a placa com a bactéria e incubados por 24h em estufa microbiológica a 37°C. Após esse período, os filtros foram retirados da placa e aplicados sobre as feridas imediatamente após a sua confecção. OBS.: oclusão com filme transparente foi aplicada por 24h a 72h.	10 ⁵ (n= 2) 10 ⁸ (n= 2)	1 animal: - / + 1 animal: + / + 1 animal: - / + 1 animal: + / +	Houve 100% de morte nas primeiras 72h após a infecção das feridas independente do uso do filtro ou da oclusão.
Técnica D	Foram aplicados 10µL de solução bacteriana (PBS + bactéria) sobre o filtro e, em seguida, o filtro foi colocado diretamente sobre as feridas imediatamente após a sua confecção no dorso dos animais. OBS.: oclusão com filme transparente foi aplicada por 24h a 72h.	10 ⁵ (n= 2) 10 ⁸ (n= 2)	1 animal: - / + 1 animal: + / + 1 animal: - / + 1 animal: + / +	Nas primeiras 72h após a infecção das feridas, houve 100% de morte para o grupo com carga bacteriana de 10 ⁸ ; 50% de morte para o grupo com carga bacteriana de 10 ⁵ . Com 72h essa técnica atingiu 75% de perda total em relação à amostra inicial e chegou a 100% de morte no 5º dia de experimento.

Fonte: dados da pesquisa.

A aplicação do filtro de celulose e do filme de poliuretano transparente utilizado para oclusão das feridas foi ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Considerações sobre o uso do filtro de celulose e da oclusão das feridas com filme transparente (2018-2019)

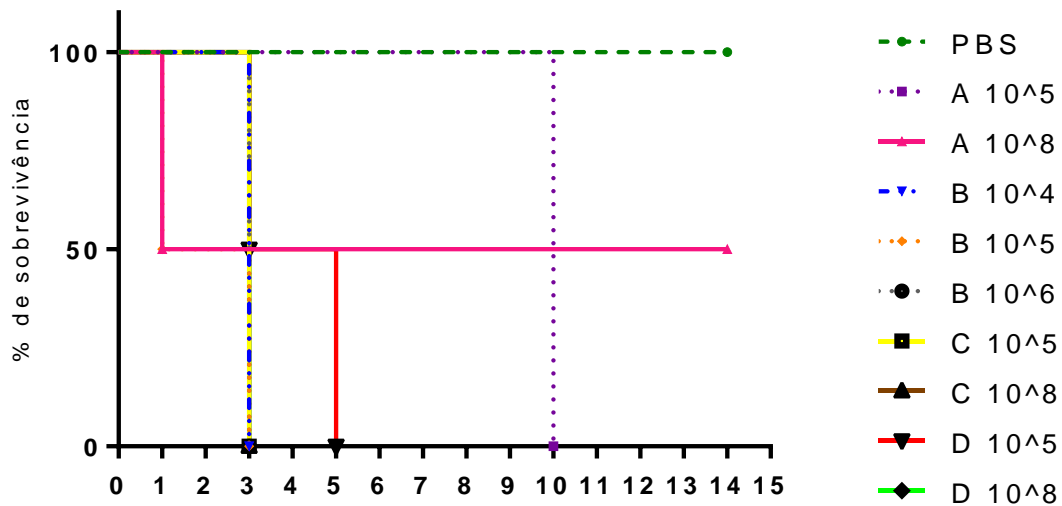


Legenda: em A Ferida sem filtro e sem oclusão; em B ferida sem filtro de celulose e ocluída com filme transparente; em C feridas com filtro de celulose e oclusão com filme transparente.

Fonte: imagens e dados da pesquisa.

Ocorreu alta taxa de mortalidade dos animais (Quadro 6) conforme curva de sobrevivência (Figura 6). Destaca-se que não houve perdas no grupo controle, como esperado. Entre os 18 animais alocados para o grupo intervenção (teste das diferentes técnicas de infecção associadas às diferentes cargas bacterianas), houve 95% de perdas. A sobrevivência de 5% no grupo intervenção se refere ao animal alocado para a técnica A com carga bacteriana de 10^8 , sem filtro de celulose e sem a oclusão das feridas com filme transparente. Os animais sobreviventes foram acompanhados até 28 dias após a confecção e infecção das feridas.

Figura 6 - Curva de sobrevivência dos animais durante a etapa de determinação da carga bacteriana para infecção (2018-2019)



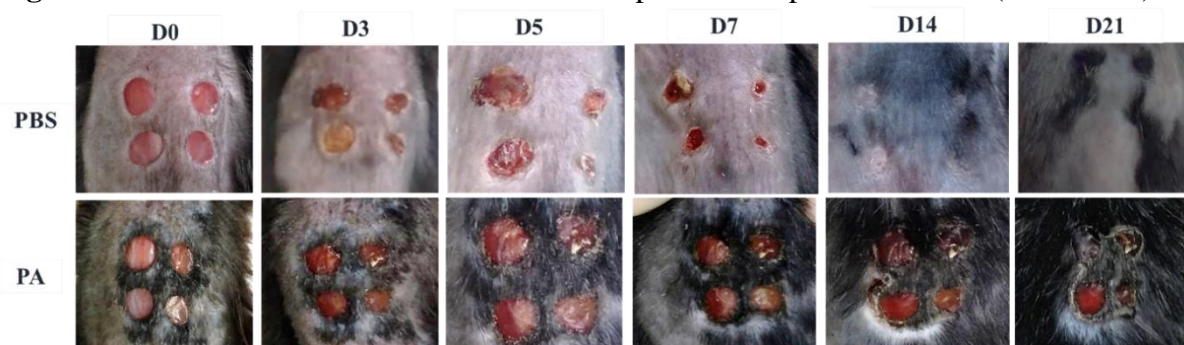
Dias após a confecção e indução de infecção nas feridas

Fonte: dados da pesquisa.

A inspeção clínica e macroscópica dos animais demonstrou que houve crescimento bacteriano em 24 horas após a indução da infecção nos animais do grupo intervenção. No intervalo entre 24 e 72 horas após a indução de infecção nas feridas, observou-se que os filtros de celulose aplicados sobre as feridas apresentavam coloração esverdeada sugerindo que houve crescimento da carga de *Pseudomonas aeruginosa* aplicada. Esses animais do grupo intervenção apresentaram-se debilitados, em posição curvada, com tremor intenso, hipotivos (baixa mobilidade) e em condições de pouca higiene (presença de urina e fezes espalhadas em toda forração [maravalha] do microisolador). Após a morte, percebeu-se um odor intenso e fétido nesses animais.

Constatou-se, também, que a oclusão das feridas com filme transparente, além de garantir a fixação dos filtros de celulose sobre as feridas, tem a capacidade de impedir ou reduzir a formação de crosta sobre as feridas como foi observado nos animais que não tiveram suas feridas ocluídas com filme transparente. A evolução do processo de cicatrização nessa etapa foi exemplificada e demonstrada pela Figura 7.

Figura 7 - Cinética de fechamento das feridas na primeira etapa deste estudo (2018-2019)



Legenda: PBS: identificação dos animais do grupo controle. PA: identificação dos animais alocados no grupo intervenção. D0 ao D21 refere-se aos dias pontuais para as avaliações.

Fonte: dados e imagens da pesquisa.

5.1.2 Etapa 2: reavaliação da carga bacteriana e da técnica de indução de infecção das feridas

O percentual de perdas (morte dos animais em experimento) na segunda etapa dessa fase foi resumido no Quadro 7 e a sobrevivência dos animais ilustrada na Figura 8, respectivamente. Identificou-se que apesar da alta mortalidade nas primeiras 24 horas deste estudo (Dia 1) não houve diferença estatística na análise da sobrevivência desses animais ao longo dos dias.

Quadro 7 – Quadro descritivo do % de perdas na segunda etapa de determinação da carga bacteriana desse estudo (2019)

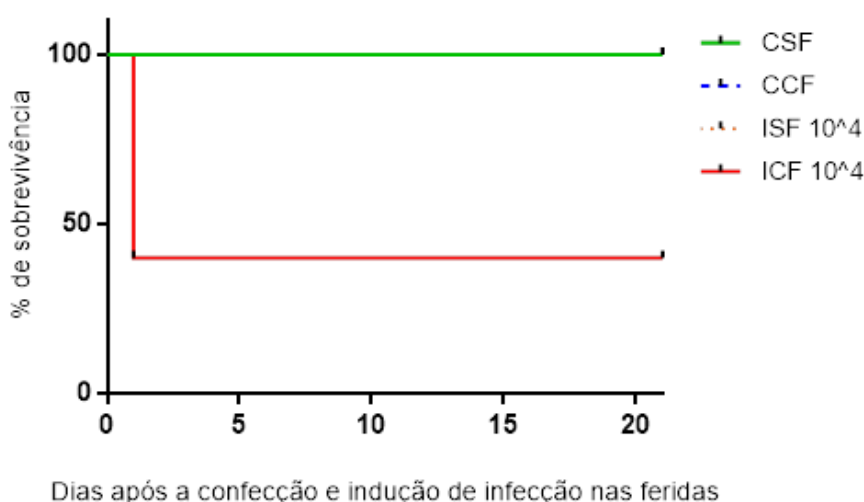
Grupos / % morte	Amostra inicial (D0)	24h (D1)	48h (D2)	72h (D3)	14 dias (D14)	21 dias (D21)	Amostra final (D3)
1 - Controle sem filtro	n = 2	0 %	0%	0%	0%	0%	n = 2
2 - Controle com filtro	n = 2	0 %	0%	0%	0%	0%	n = 2
3 - Infectado sem filtro	n = 2	0 %	0%	0%	0%	0%	n = 2
4 - Infectado com filtro	n = 6	50%	0%	0%	0%	0%	n = 3

Fonte: dados da pesquisa.

Os animais dos grupos controles (CCF) tiveram menor percentual de cicatrização quando comparados com os animais controles do grupo CSF. Os dois grupos controles tiveram maior percentual de cicatrização quando comparados aos dois grupos de animais infectados com carga bacteriana de 10^4 .

Os animais dos grupos infectados (ISF 10^4 e ICF 10^4) apresentaram menor taxa de cicatrização ao longo de todo o seguimento experimental. O percentual de cicatrização do grupo ICF 10^4 foi inferior aos grupos controles ao longo de todo o seguimento experimental. Além disso, ao comparar os dois grupos infectados, verificou-se que o ISF 10^4 pontuou menor taxa de cicatrização entre os dias 3 e 5 desse experimento. A partir daí ele conseguiu se recuperar e ultrapassou o percentual de cicatrização do grupo ICF 10^4 .

Figura 8 - Curva de sobrevivência no experimento de determinação da carga bacteriana (2019)

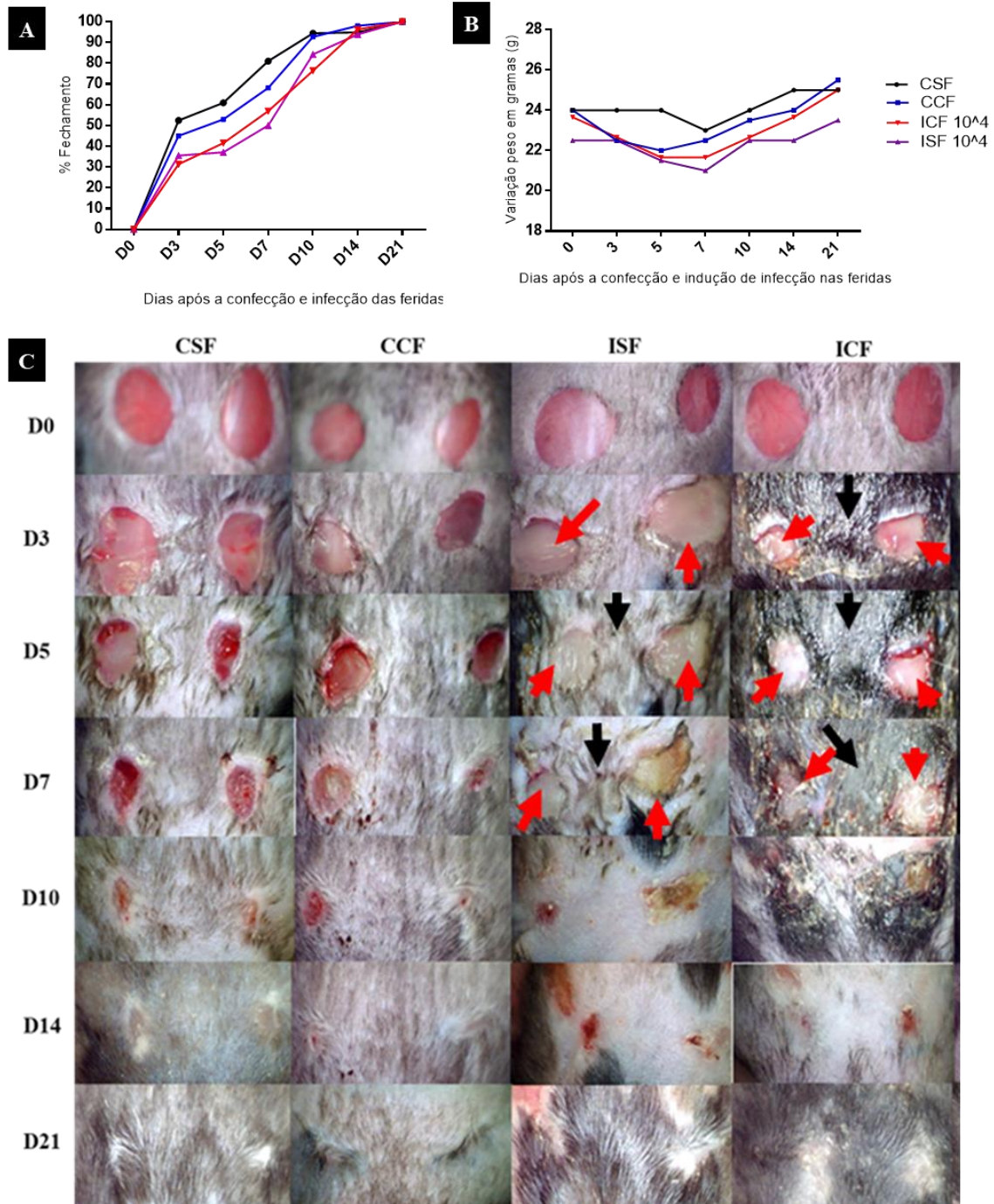


Fonte: dados da pesquisa.

Após o 10º dia do seguimento experimental, o percentual de cicatrização das feridas dos animais alocados nos grupos infectados foi, aproximadamente, 15% menor em relação aos grupos controles conforme ilustrado na Figura 9(A).

Nesse período, a avaliação macroscópica das feridas dos animais dos grupos infectados (ISF e ICF 10^4) apresentou maior quantidade de exsudato de aspecto amarelo-esverdeado, maior percentual de tecido necrótico de aspecto úmido, amarelado e bem aderido ao leito das lesões, principalmente no intervalo entre 3 e 7 dias.

Figura 9 - Avaliação macroscópica das feridas, do % de fechamento das feridas e da variação ponderal na etapa 2 da determinação da carga bacteriana (2019)



Legenda: em **A**, observa-se o % de fechamento das feridas; em **B**, avalia-se a perda ou o ganho ponderal em relação ao dia 0; em **C** é possível observar as características macroscópicas das feridas. A seta preta indica presença de exsudato que pode ser observado por meio do aspecto úmido e brilhante da pele e dos pelos. A seta vermelha indica o esfacelo recobrendo o leito das feridas.

Fonte: dados e imagens da pesquisa.

Além de apresentarem os piores escores de cicatrização nessa fase, esses dois grupos cursaram com maior variação de perda ponderal, principalmente entre o 3º e o 7º dia de

seguimento experimental. A partir do 7º dia, observou-se uma tendência de recuperação ponderal e resolução das feridas nos 4 grupos testados.

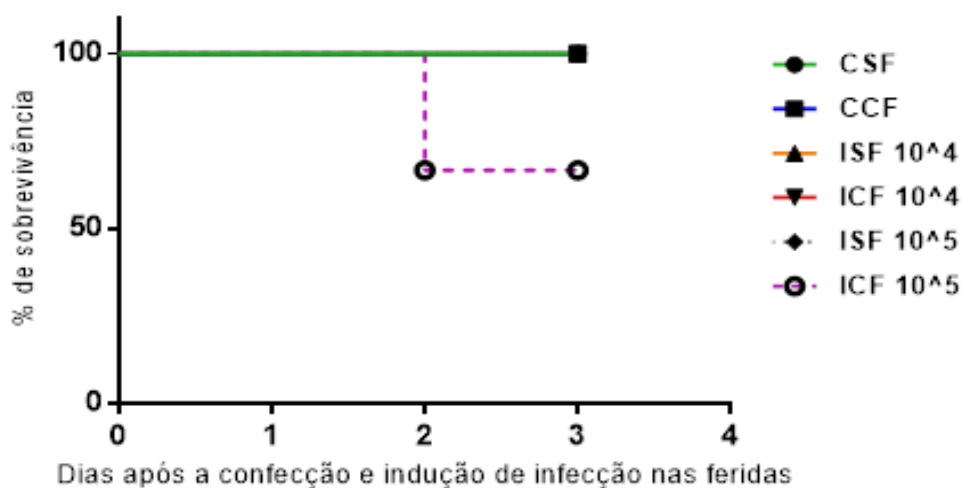
Ressalta-se que, apesar desses resultados apresentarem uma tendência significativa, nesse momento da pesquisa não foram realizadas análises estatísticas por se tratar de estudo prévio cujo n amostral para os testes demandados foi muito reduzido, o que comprometeria a análise estatística. Esses resultados conduziram para a terceira etapa cujo objetivo foi validar o modelo de feridas infectadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.3 Experimento de validação da carga bacteriana e da técnica de indução de infecção das feridas

O principal objetivo dessa etapa foi validar a técnica de infecção das feridas com cargas bacterianas de 10^4 e 10^5 , respectivamente. O tempo total de seguimento experimental dessa fase foi de 3 dias e a amostra total de 26 animais.

Nessa fase, todos os animais do grupo controle e do infectado tiveram as feridas ocluídas com filme transparente e a avaliação macroscópica das feridas foi realizada no tempo de 24h, 48h e 72h. O percentual de mortalidade (%) e a curva de sobrevivência dos animais foram representados na Figura 10 e no Quadro 8, respectivamente.

Figura 10 - Curva de sobrevivência na fase de validação do modelo de feridas infectadas (2019)



Fonte: dados da pesquisa.

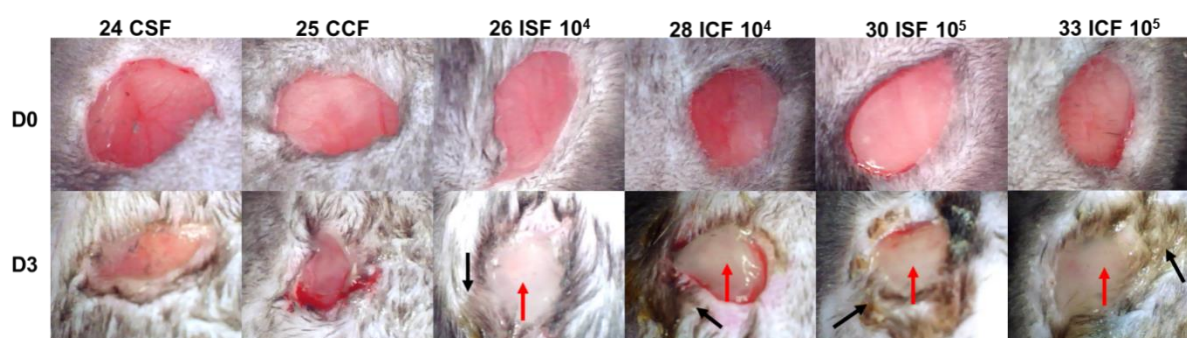
Quadro 8 - Quadro descrito do % de perdas na fase de validação do modelo de ferida infectada com *Pseudomonas aeruginosa* (2019)

Grupos / % morte	Amostra (n) inicial (D0)	24h (D1)	48h (D2)	72h (D3)	Amostra final (D3)
1 - Controle sem filtro	4	0 %	0%	0%	n = 4
2 - Controle com filtro	4	0 %	0%	0%	n = 4
3 - Infectado sem filtro- 10 ⁴	5	0 %	0%	0%	n = 5
4 - Infectado com filtro- 10 ⁴	7	0%	0%	0%	n = 7
5 - Infectado sem filtro - 10 ⁵	3	0%	0%	0%	n = 3
6 - Infectado com filtro - 10 ⁵	3	0%	33,3%	0%	n = 2

Fonte: dados da pesquisa.

O acompanhamento da cinética de fechamento das feridas demonstrou que, no seguimento de 3 dias, o percentual (%) de cicatrização foi semelhante entre todos os grupos com uma discreta redução nos grupos infectados com filtro e com filme transparente (grupos 4 e 6), sem diferença estatisticamente significativa. A média do percentual de cicatrização se manteve próxima de 40% para todos os grupos avaliados. A avaliação macroscópica das feridas dos grupos infectados com filtro (4 e 6) e dos grupos infectados sem filtro (3 e 5) apresentou maior quantidade de exsudato e de esfacelo, de aspecto úmido e coloração amarelo-esverdeado ao longo do seguimento experimental (Figura 11), além da presença de odor fétido em ambos os grupos.

Figura 11 - Avaliação macroscópica das feridas no seguimento para validação do modelo de feridas infectadas (2019-2020)



Legenda: seta preta indica presença de exsudato e seta vermelha indica a presença de esfacelo (tecido necrótico).

Fonte: dados e imagens da pesquisa.

A avaliação macroscópica das feridas demonstrou que todos os grupos atingiram em média 40% de cicatrização no tempo de 3 dias. Nesse intervalo já foi possível observar a presença de

esfacelo de aspecto úmido e amarelado recobrimdo os leitos das feridas nos animais dos quatro grupos infectados. Também foi observado que os animais cuja técnica de infecção utilizou o filtro de celulose apresentaram esfacelo mais espesso.

Em relação ao acompanhamento do peso corporal desses animais, constatou-se maior perda ponderal no grupo de animais infectados com filtro (grupos 4 e 6), confirmando os dados encontrados no seguimento de 21 dias.

Nessa fase do estudo, realizou-se a cultura da pele com a finalidade de verificar a presença da *Pseudomonas aeruginosa* nas feridas e de padronizar os tempos para realização das culturas. O plaqueamento e cultura das feridas dos animais infectados apresentaram recuperação de microrganismos na amostra pura e nas diluições testadas (10^{-1} até 10^{-7}), no tecido a fresco e após congelamento do tecido (pele) em freezer -20°C por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias.

A partir desses resultados, deu-se início à reprodução desse modelo de feridas considerando o n amostral previsto para esta pesquisa e em busca da determinação do perfil de formação do biofilme em feridas excisionais.

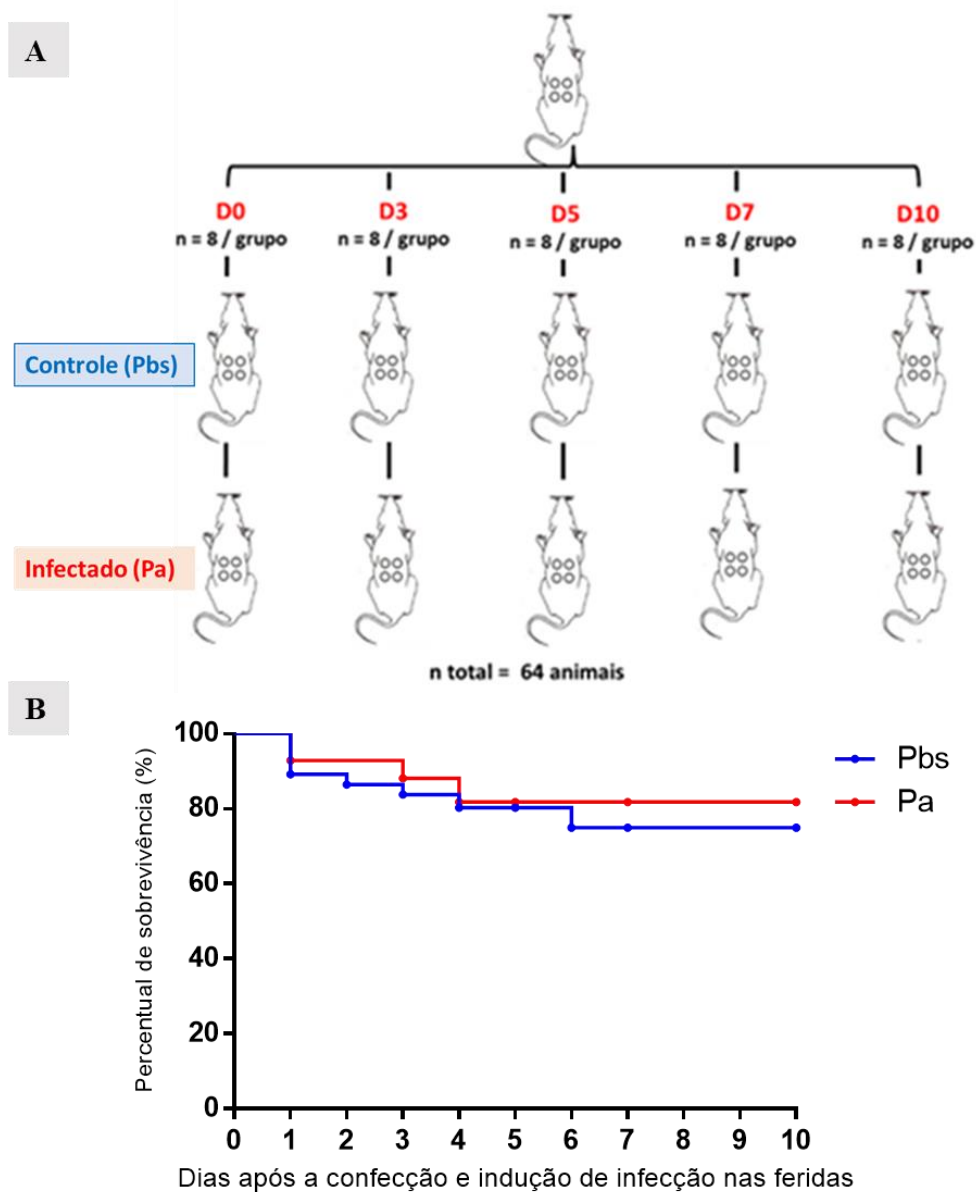
5.2 Resultados do delineamento experimental proposto

5.2.1 Avaliação da sobrevida dos animais nos diferentes tempos experimentais

A avaliação da sobrevida dos animais após a confecção das feridas e indução da infecção não detectou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos testados. O desenho experimental empregado nessa fase e a curva de sobrevivência dos animais foram ilustrados nas Figuras 12 (A) e (B), respectivamente.

Em ambos os grupos houve perdas, totalizando 8 mortes no grupo Pbs ($n_i = 37$ animais) e 7 mortes no grupo Pa ($n_i = 42$ animais) durante todo o seguimento experimental. Esses números, quando comparados ao n inicial (n_i) empregado para cada grupo, equivalem a um percentual de mortalidade de 21,62% no grupo Pbs, enquanto no grupo Pa esse percentual atingiu 16,67%.

Figura 12 - Desenho experimental e curva de sobrevivência dos animais (2019)



Fonte: dados da pesquisa.

5.2.2 Cinética de fechamento das feridas

O Quadro 9 descreve os percentuais médios do perfil de fechamento das feridas e a área média das feridas nos tempos 0, 3, 5, 7 e 10 dias, nos grupos controle (Pbs) e intervenção (Pa).

Na avaliação da cinética de fechamento das feridas intergrupos (Pbs vs Pa), percebeu-se que as feridas do grupo Pa apresentaram menor percentual de cicatrização quando comparado ao grupo Pbs, como ilustrado nas Figuras 12 (A) e 13(A).

No tempo de 5 dias, a avaliação intergrupos mostrou que a taxa média de cicatrização foi de 43,40% ($\pm 2,61$ SEM) no grupo Pa contra 64,64% ($\pm 1,75$ SEM) do grupo Pbs, enquanto no tempo de 7 dias essa taxa chegou a 62,48% ($\pm 1,67$ SEM) no grupo Pa contra 73,96% ($\pm 1,51$ SEM) do grupo Pbs, conforme descrito no Quadro 9. Os resultados para os demais tempos (0, 3 e 10 dias) não foram estatisticamente significativos.

Quadro 9 - Avaliação do perfil de fechamento das feridas (2020)

Tempo	Perfil de fechamento das feridas									
	Pbs					Pa				
	Cicatrização (%)		Área (mm ²)			Cicatrização (%)		Área (mm ²)		
	Média	SEM	Média	SEM	n	Média	SEM	Média	SEM	n
0	0,0	0,0	18,80	0,38	116	0,0	0,0	18,35	0,28	140
3	37,81	2,12	11,51	0,37	113	34,40	1,74	12,06	0,36	136
5	64,64	1,75	7,36	0,29	85	43,40	2,61	12,13	0,39	103
7	73,96	1,51	5,01	0,29	56	62,48	1,67	7,67	0,35	62
10	91,82	0,76	1,79	0,16	28	88,03	1,22	2,47	0,24	31

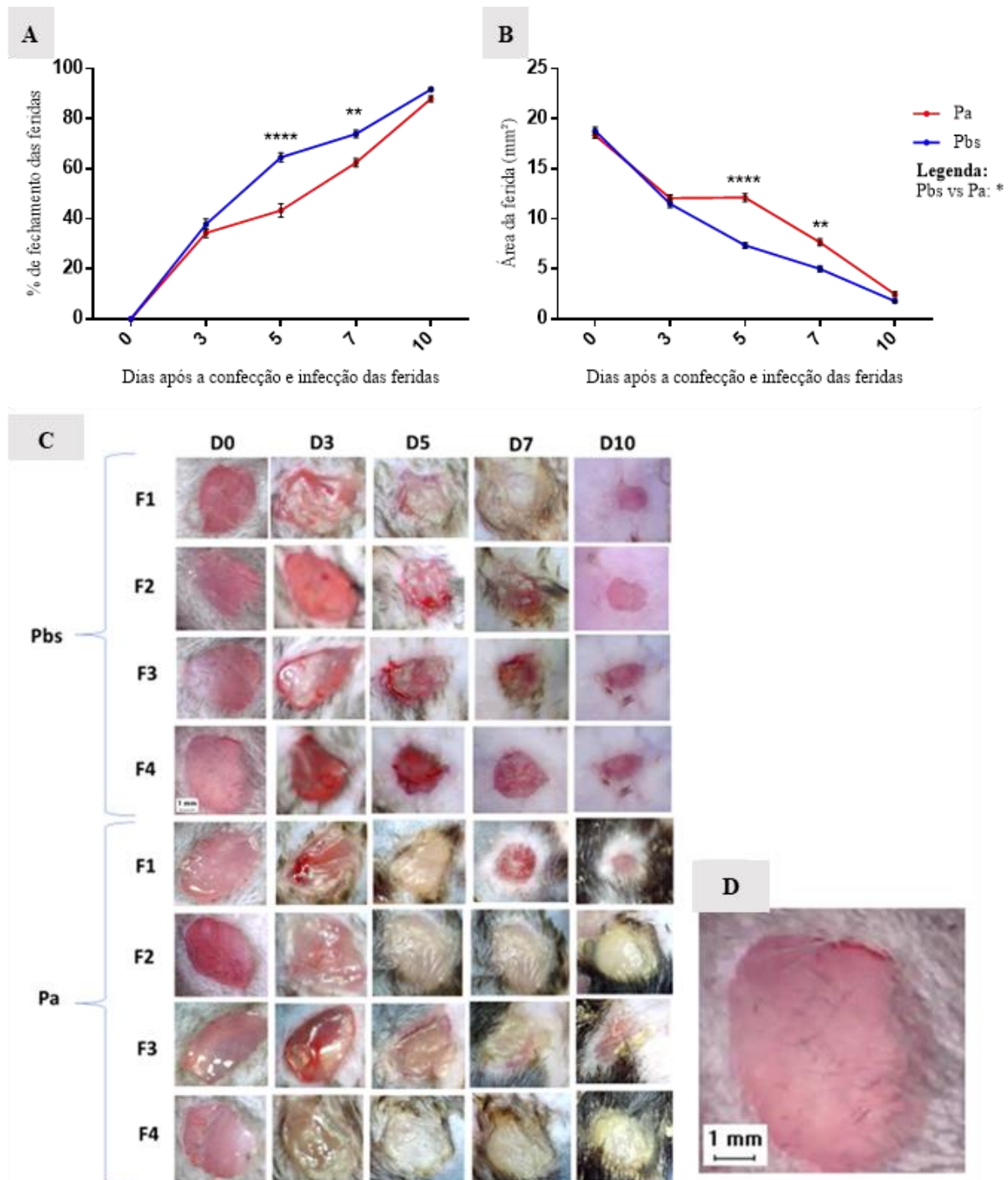
Legenda: os dados foram descritos considerando a média \pm erro padrão da média (SEM). O *n* amostral refere-se ao número de feridas avaliadas na amostra.

Fonte: dados da pesquisa.

Neste estudo, a avaliação da área das feridas (mm²) foi inversamente proporcional ao percentual de fechamento das feridas. Na comparação intergrupos (Pbs vs Pa), identificaram-se diferenças estatisticamente significativas nos tempos de 5 e 7 dias após a indução da infecção das feridas, como ilustrado nas Figuras 13 (A e B) e 14 (A e B). Os resultados para os demais tempos (0, 3 e 10 dias) não foram estatisticamente significativos.

No tempo de 5 dias, a área média das feridas foi de 12,13mm² ($\pm 0,39$ SEM) no grupo Pa e de 7,36mm² ($\pm 0,29$ SEM) no grupo Pbs no tempo de 5 dias, enquanto no tempo de 7 dias esses valores atingiram as médias de 7,67mm² ($\pm 0,35$ SEM) no grupo Pa contra 5,01mm² ($\pm 0,29$ SEM) no grupo Pbs. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Pbs vs Pa) no tempo de 5 e de 7 com valor de $p < 0,05$. Nos demais tempos experimentais não houve diferenças estatísticas significativas.

Figura 13 - Avaliação da cinética de fechamento e da área das feridas (2019-2020)



Legenda: em A e B, a avaliação intergrupo (Pbs vs Pa) foi representada pelo símbolo * ; em C, avaliação macroscópica das feridas; em D, ampliação da imagem calibrada para regra de 1mm. Os resultados foram representados como média \pm SEM e os valores de P foram descritos como: $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

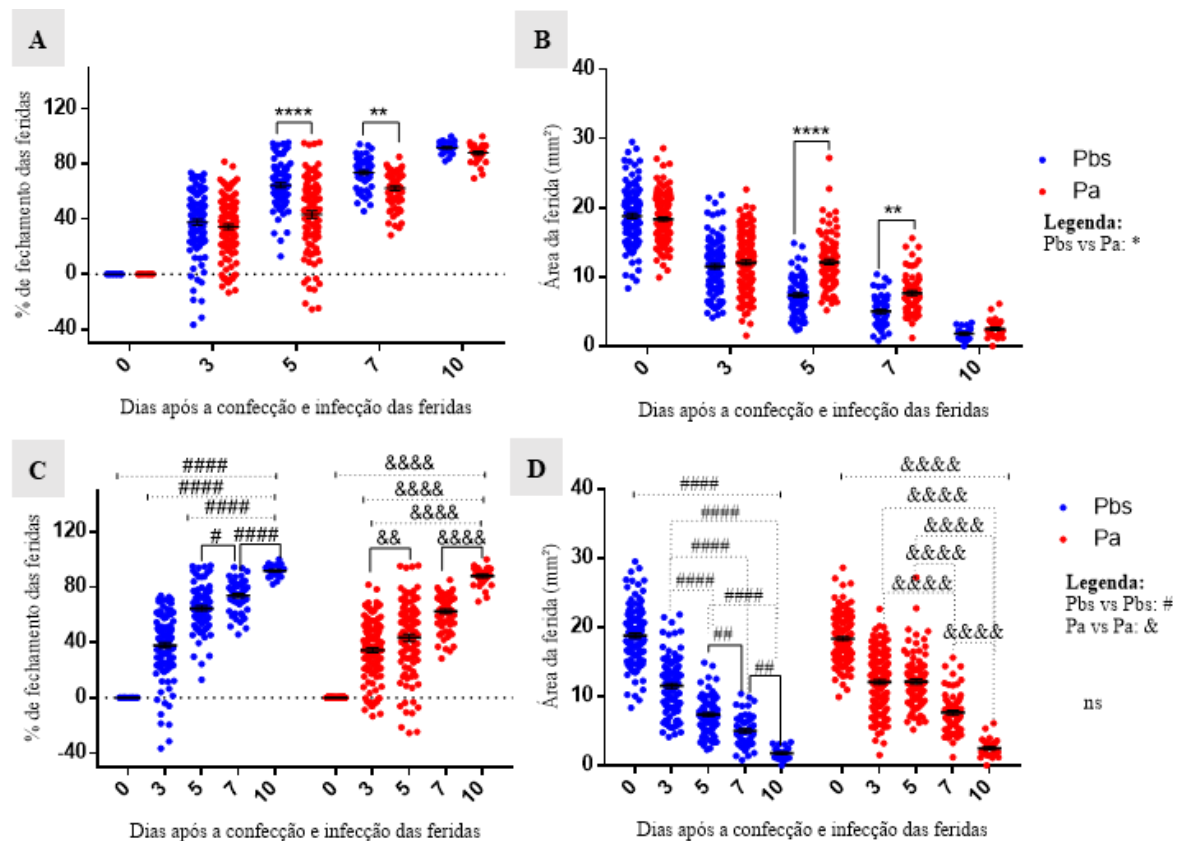
Fonte: dados e arquivos da pesquisa.

A avaliação macroscópica das feridas demonstrou que os animais do grupo Pa seguem um padrão de cicatrização mais irregular quando comparados aos do grupo Pbs que apresenta

uma tendência mais regular. As feridas dos animais do grupo Pa apresentaram menor percentual de fechamento de cicatrização das feridas e maior área das feridas quando comparados ao grupo Pbs, principalmente nos tempos de 5 e 7 dias, conforme demonstrado nas Figuras 13(A), 13(C) e 14(A). Nessa avaliação, verificou-se que as feridas do grupo Pa estavam recobertas por tecido necrótico amarelado, de aspecto mais espesso e bem aderido, principalmente nos tempos de 5 e 7 dias. Nos tempos de 3 e 10 dias, apesar do leito das feridas estarem recobertos por tecido necrótico amarelo de aspecto brilhante e úmido, em quase 100% da área das feridas, não foi observada significância estatística nesses dois pontos do seguimento experimental.

A avaliação da cinética de fechamento e da área das feridas na comparação intragrupos (Pbs vs Pbs) e (Pa vs Pa) foi ilustrada nas Figuras 14 (C) e (D), respectivamente.

Figura 14 - Avaliação inter e intragrupos da cinética de fechamento e área das feridas (2020)



Legenda: em A e B, a avaliação intergrupos (Pbs vs Pa) foi representada pelo símbolo *; em C e D, a avaliação intragrupos (Pbs vs Pbs) foi representada pelos símbolos # e (Pa vs Pa) &. Os resultados foram representados como média \pm SEM e os valores de P descritos como $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

Na análise cinética de fechamento das feridas do grupo Pbs, os intervalos de tempo D0-D3, D0-D5, D0-D7, D0-D10, D3-D5, D3-D7, D3-D10, D5-D10 e D7-D10 foram considerados estatisticamente significativos com valor de $p < 0,0001$. O intervalo de D5-D7 dias apresentou valor de $p < 0,05$. No grupo Pa, os intervalos de tempo D0-D3, D0-D5, D0-D7, D0-D10, D3-D7, D3-D10, D5-D10 e D7-D10 obtiveram valor de $p < 0,0001$, exceto o intervalo de D3-D5 que obteve valor de $p < 0,001$, conforme ilustrado na Figura 13(C).

Na avaliação da área das feridas, os intervalos de tempo D0-D3, D0-D5, D0-D7, D0-D10, D3-D5, D3-D7, D3-D10 e D5-D10 foram estatisticamente significativos com valor de $p < 0,0001$. Os intervalos de tempo de D5-D7 e D7-D10 do grupo Pbs apresentaram diferença estatisticamente significativa com valor de $p < 0,01$. No grupo Pa, todos os intervalos de tempo (D0-D3, D0-D5, D0-D7, D0-D10, D3-D7, D3-D10, D5-D7, D5-D10 e D7-D10) foram estatisticamente significativos com valor de $p < 0,0001$, exceto o intervalo de D3-D5 dias que não apresentou diferença estatística conforme ilustrado na Figura 13(D).

5.2.3 Acompanhamento clínico-ponderal

No acompanhamento clínico-ponderal ao longo do seguimento experimental, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Pbs e Pa conforme demonstrado no Quadro 10 e na Figura 15(A).

Quadro 10 - Avaliação do peso bruto e da variação ponderal durante o seguimento experimental (2020)

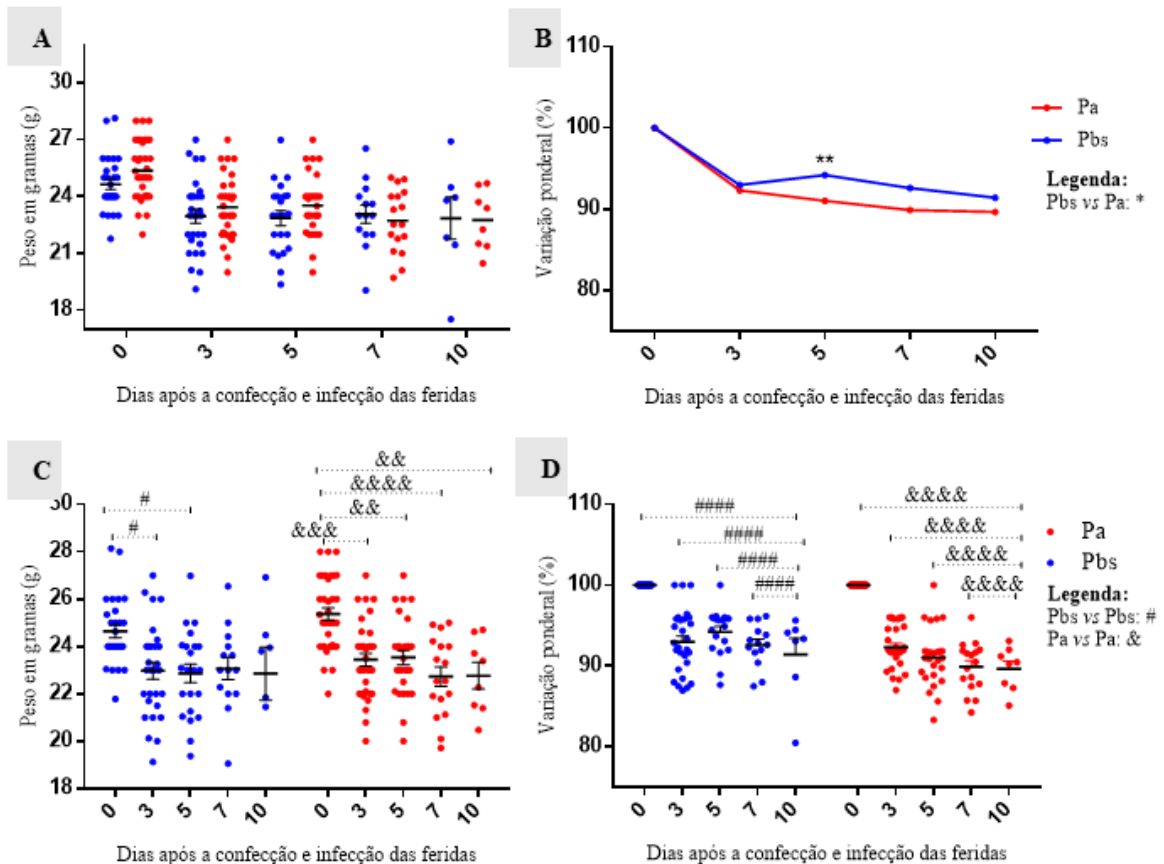
Tempo	Variação ponderal									
	Pbs					Pa				
	Peso (g)		% Variação			Peso (g)		% Variação		
	Média	SEM	Média	SEM	n	Média	SEM	Média	SEM	n
0	24,65	0,28	100,0	0,00	29	25,37	0,26	100,00	0,00	35
3	22,98	0,36	92,98	0,74	28	23,45	0,27	92,32	0,50	28
5	22,86	0,39	94,20	0,69	18	23,53	0,30	91,04	0,71	26
7	23,07	0,47	92,61	0,71	14	22,73	0,40	89,89	0,74	17
10	22,86	1,12	91,40	2,00	7	22,77	0,56	89,67	0,95	8

Legenda: os dados foram descritos considerando a média \pm erro padrão da média (SEM). O n amostral refere-se ao número de animais em cada seguimento temporal.

Fonte: dados da pesquisa.

No teste para múltiplas comparações intragrupo Pbs vs Pbs, observou-se diferença estatística significativa no intervalo de tempo de 0-3 e 0-5 dias com valor de $p < 0,05$, enquanto a comparação intragrupo Pa vs Pa identificou diferenças significativas nos intervalos de tempo de 0-3 com $p < 0,001$, de 0-5 e de 0-10 com valor de $p < 0,01$ e o intervalo de 0-7 com valor de $p < 0,0001$ conforme ilustrado na Figura 15(C).

Figura 15 - Avaliação do peso e da variação ponderal (2019-2020)



Legenda: em A e B, Pbs vs Pa foi representado por *; em C e D, Pbs vs Pbs foi representado por # e Pa vs Pa por &. Os valores de P foram descritos como $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

A avaliação ponderal permitiu observar que ocorreu perda de peso em ambos os grupos, de forma mais acentuada até o 3º dia do seguimento experimental. Entretanto, apesar das diferenças observadas, detectou-se significância estatística somente no tempo de 5 dias com valor de $p < 0,01$. A diferença entre o percentual médio de perda ponderal foi de 9% ($\pm 0,71$ SEM) de perda ponderal no grupo Pa contra 6% ($\pm 0,69$ SEM) de perda no grupo Pbs conforme descrito no Quadro 10 e ilustrado na Figura 15(B).

No teste para múltiplas comparações intragrupos (Pbs vs Pbs) e (Pa vs Pa), observou-se variação ponderal com diferenças estatisticamente significativas nos intervalos de tempo de D0-D3, D0-D5, D0-D7 e D0-D10, todos com valores de $p < 0,0001$ para ambos os grupos conforme demonstrado na Figura 15(D).

5.2.4 Cultura da pele correspondente à área das feridas e cultura do tecido hepático

Os resultados relativos à cultura da pele foram ilustrados no Quadro 11 e Figura 16 (A). As técnicas de plaqueamento e cultura da pele empregadas neste estudo permitiram a recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* no tecido correspondente à área das feridas nos tempos de 3, 5, 7 e 10 dias. Também foi observada uma baixa recuperação desses microrganismos para o grupo Pbs nos tempos de 5, 7 e 10 dias quando comparados ao grupo Pa conforme ilustrado no Quadro 11.

Quadro 11 - Recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* na cultura das feridas (2019-2020)

Tempo	Cultura das feridas (UFC/g)					
	Pbs			Pa		
	Média	SEM	n	Média	SEM	n
0	0	0	11	0	0	18
3	0	0	6	677.427	285.032	7
5	14.000	6.175	6	3.885.714	1.070.698	7
7	2,500	1.893	4	4.550.000	1.611.455	8
10	2.400	1.470	5	128.000	71.814	5

Legenda: os dados foram descritos considerando a média \pm erro padrão da média (SEM). O n amostral refere-se ao número de animais em cada seguimento temporal.

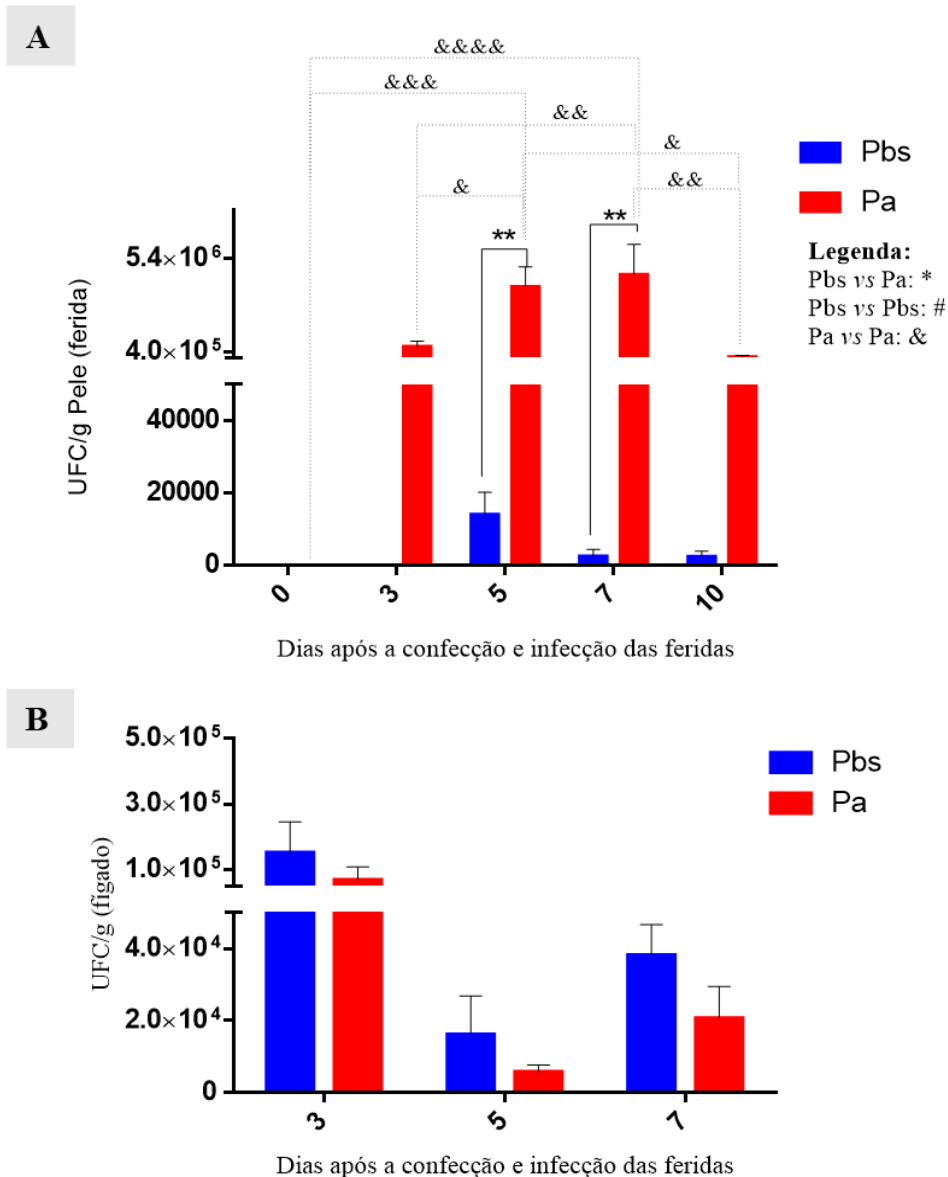
Fonte: dados da pesquisa.

Na avaliação intergrupo (Pbs vs Pa), identificou-se recuperação de *P. aeruginosa* nos tempos de 5 e 7 dias. Esses dados foram estatisticamente significativos e apresentaram valores de $p < 0,01$ conforme ilustrado na Figura 16 (A).

Na avaliação intragrupo (Pa vs Pa), o teste de múltiplas comparações demonstrou diferenças estatisticamente significativas para os intervalos de tempo D0-D5 com valor de $p < 0,001$; D0-D7 com valor de $p < 0,0001$; D3-D5 e D5-D10 com valores de $p < 0,05$; D3-D7 e D7-D10 com valores de $p < 0,01$, respectivamente. Entretanto, na avaliação Pbs vs Pbs não foram

observadas diferenças estatisticamente significantes para essa análise. Esses resultados podem ser observados no Quadro 11 e na Figura 16(A).

Figura 16 - Cultura das feridas e do tecido hepático (2019-2020)



Legenda: em A, a cultura da pele correspondente à área das feridas; em B, cultura do tecido hepático. As avaliações considerando Pbs vs Pa foram representadas no gráfico por *, Pbs vs Pbs por # e Pa vs Pa por &. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM e os valores de p foram representados com p < 0,05: * ou # ou &, p < 0,01: ** ou ## ou &&, p < 0,001: *** ou ### ou &&& e p < 0,0001: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos com a cultura do tecido hepático foram ilustrados na Figura 16 (B) e descritos no Quadro 12, respectivamente. Ressalta-se que na avaliação intergrupo (Pbs vs Pa)

e intragrupo (Pa vs Pa e Pbs vs Pbs) da cultura do tecido hepático não foram observadas diferenças com significância estatística.

Quadro 12 - Recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* nas culturas do fígado (2019-2020)

Tempo	Cultura das feridas (UFC/g de tecido)					
	Pbs			Pa		
	Média	SEM	n	Média	SEM	n
3	150.000	95.743	4	67.000	40.785	6
5	16.000	10.863	4	5.667	2.028	6
7	38.000	8.610	6	20.500	8.995	4

Legenda: os dados foram descritos considerando a média \pm erro padrão da média (SEM). O *n* amostral refere-se ao número de animais em cada seguimento temporal.

Fonte: dados da pesquisa.

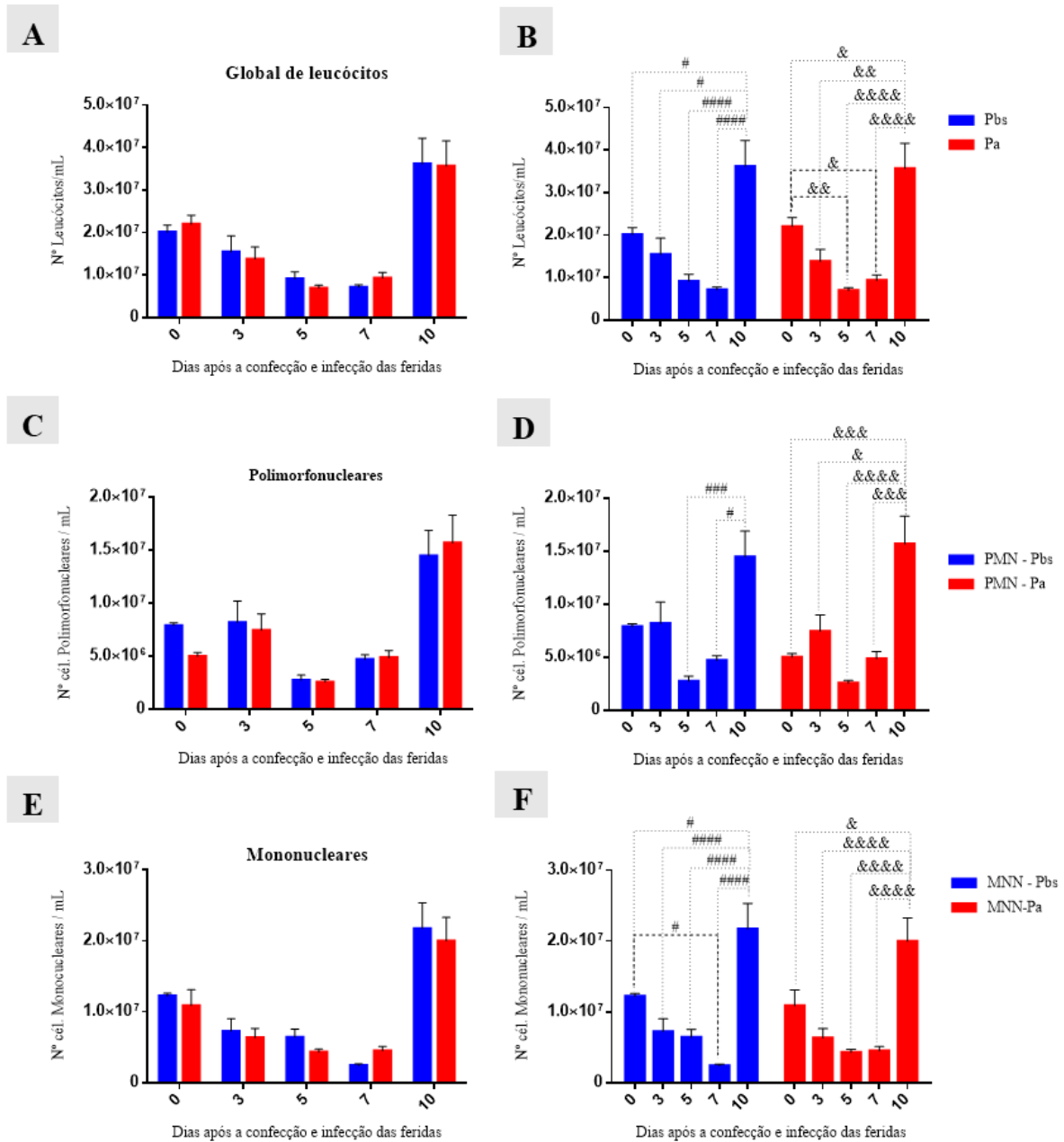
5.2.5 Quantificação global e diferencial de leucócitos

5.2.5.1 Avaliação global de leucócitos e classificação granulocítica dos leucócitos

Os resultados obtidos com a quantificação e a classificação granulocítica dos leucócitos foram demonstrados na Figura 17 (A-F).

A análise da quantificação global de leucócitos intergrupos (Pbs vs Pa) não apresentou diferenças estatisticamente significativas conforme apresentado do na Figura 17(A). A mesma situação foi observada na quantificação dos leucócitos polimorfonucleares, Figura 17(C), e de mononucleares, Figura 17(E).

A análise da quantificação global de leucócitos intragrupos (Pbs vs Pbs) e (Pa vs Pa) demonstrou que ambos os grupos apresentaram diferenças significativas ao longo dos dias. Na avaliação do grupo Pbs vs Pbs, constataram-se diferenças significativas nos intervalos de tempo de D0-D10, D3-D10, D5-D10 e de D7-D10, com valores de $p < 0,05$. Na avaliação do grupo Pa vs Pa, também foram observadas diferenças estatísticas significativas nos intervalos de tempo de D0-D5, D3-D10, D0-D7, D0-D10, D5-D10 e D7-D10, com valores de $p < 0,05$, conforme ilustrado na Figura 17(B).

Figura 17 - Quantificação e classificação de leucócitos no sangue periférico (2020)

Legenda: em A e B, avaliação global de leucócitos; em C e D, avaliação das células polimorfonucleares; em E e F: avaliação das células mononucleares. As avaliações considerando Pbs vs Pa foram representadas no gráfico por *, Pbs vs Pbs por # e Pa vs Pa por &. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM e os valores de p foram representados com $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

Na avaliação das células PMN, a comparação intragrupo (Pbs vs Pbs) foi estatisticamente significativa nos intervalos de tempo de D0-D3 e D0-D7 com valores de $p < 0,05$, enquanto na comparação (Pa vs Pa) foram observadas diferenças com significância estatística para os

intervalos de tempo de D0-D5, D0-D7, D0-D10, D3-D7 e D5-D7, com valores de $p < 0,05$, conforme demonstrado na Figura 17(D).

Na avaliação das células MNN, a comparação intragrupo (Pbs vs Pbs) também foi estatisticamente significativa nos intervalos de tempo D0-D3 e D0-D7, com valores de $p < 0,05$, enquanto na comparação (Pa vs Pa) foi detectada significância estatística nos intervalos de tempo D0-D7, D0-D10, D3-D7 e D5-D7, com valores de $p < 0,05$, conforme apresentado na Figura 17(F).

5.2.5.2 Avaliação diferencial de leucócitos

A avaliação diferencial de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares foi demonstrada nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

A quantificação de basófilos no grupo Pa apresentou uma redução do número de células no dia 3 quando comparado ao grupo Pbs, com diferença estatística e valor de $p < 0,05$, conforme demonstrado na Figura 18 (E).

As diferenças intergrupos na quantificação dos neutrófilos e dos eosinófilos não foram estatisticamente significantes, porém, observou-se um pico de neutrófilos no 10º dia, enquanto para os eosinófilos esse pico ocorreu no 3º dia após o trauma cirúrgico e indução da infecção, como mostrado nas Figuras 18 (A) e (C).

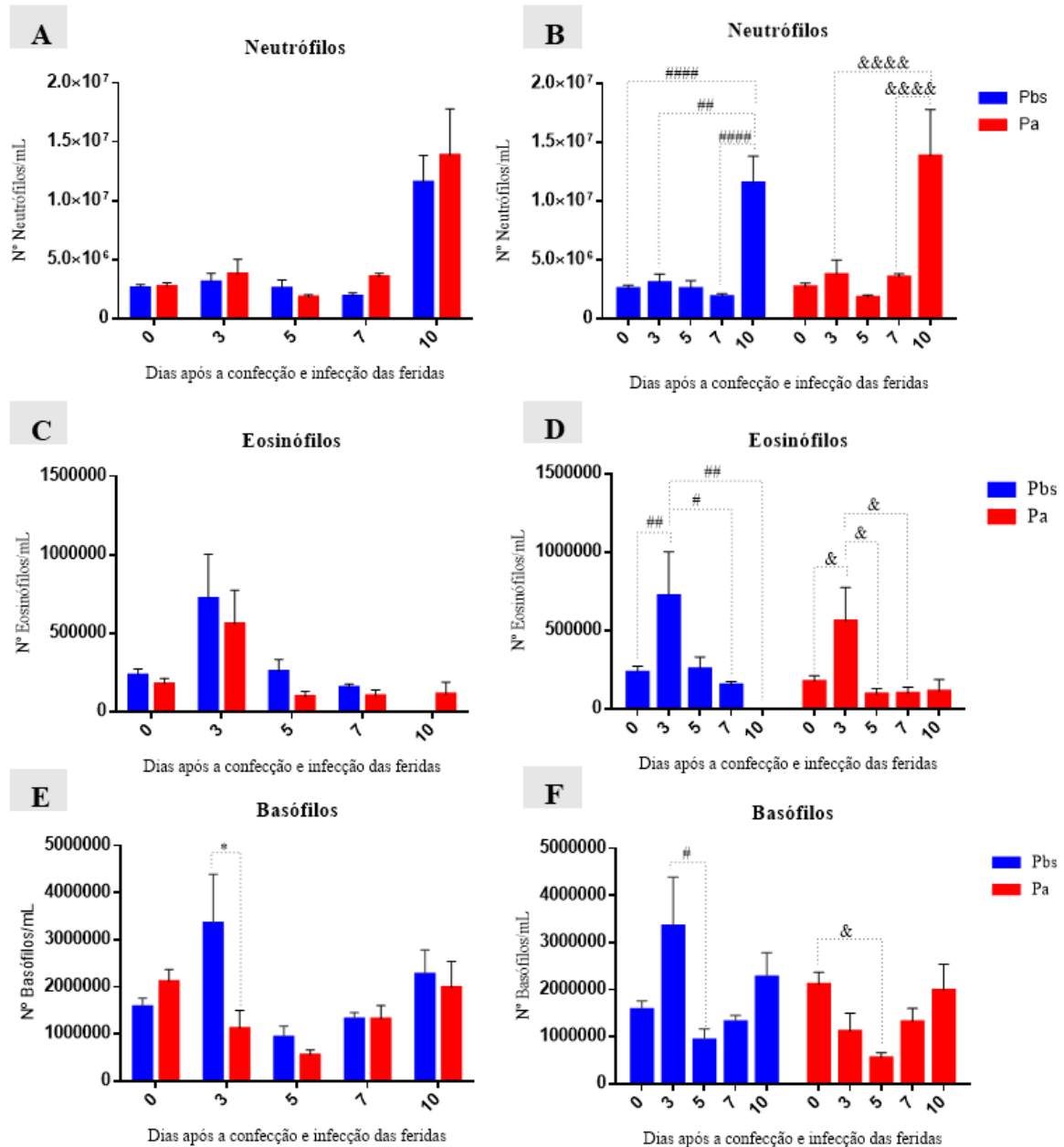
Apesar de não ter significância estatística, em ambos os grupos, constatou-se que os basófilos sofreram uma redução acentuada no 5º dia, mas conseguiram uma recuperação próxima ao nível basal no 10º do experimento.

Na comparação intragrupos Pbs vs Pbs, a quantificação dessas células apresentou diferenças significativas para o intervalo de tempo D3-D5, enquanto Pa vs Pa demonstrou diferenças significativas apenas no intervalo de tempo D0-D5, com valor de $p < 0,05$, para os dois grupos avaliados, Figura 18(D).

A avaliação diferencial das células mononucleares foi demonstrada na Figura 19. Na comparação intergrupos (Pbs vs Pa), a quantificação dos linfócitos e monócitos não

apresentou diferenças com significância estatística conforme ilustrado nas Figuras 19 (A) e (C).

Figura 18 - Quantificação diferencial de leucócitos polimorfonucleares no sangue periférico (2019-2020)

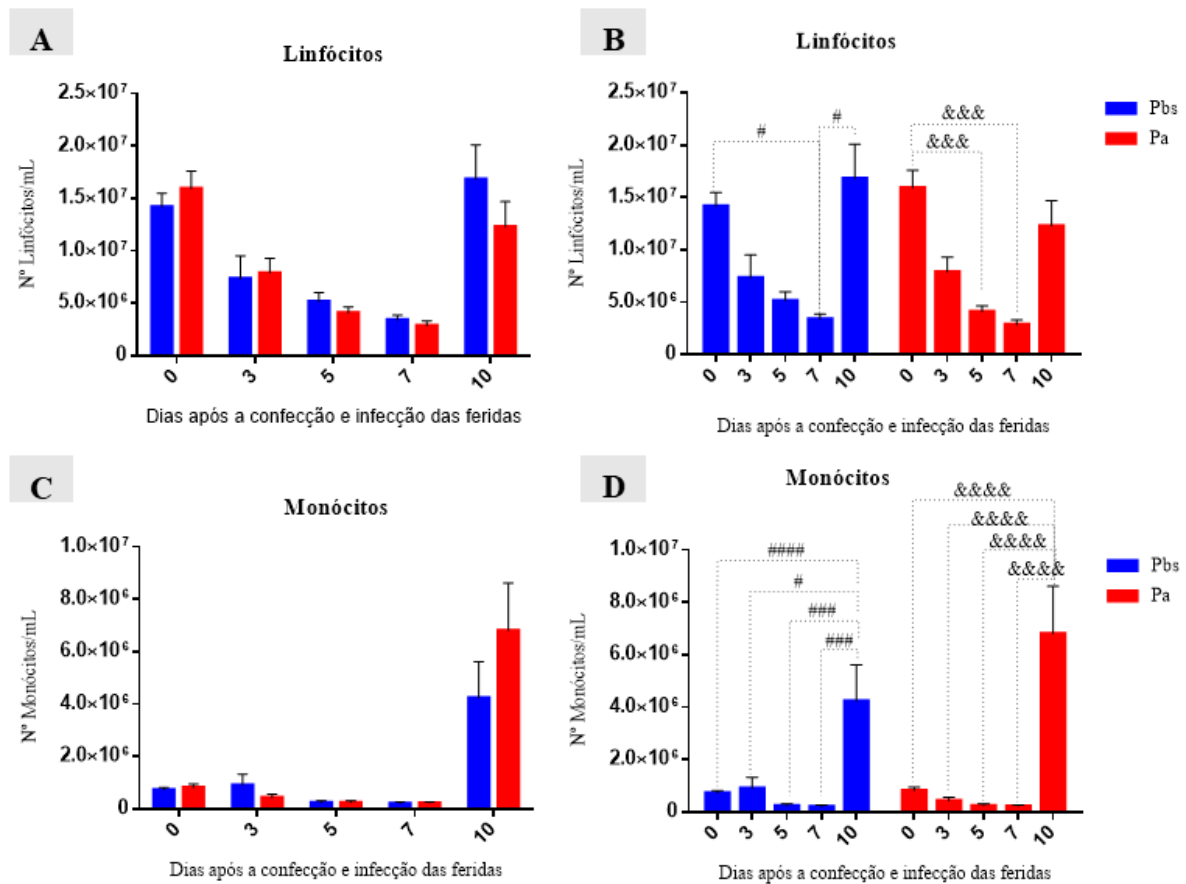


Legenda: em A e B, avaliação global de leucócitos; em C e D, avaliação das células polimorfonucleares; em E e F, avaliação das células mononucleares. As avaliações considerando Pbs vs Pa foram representadas no gráfico por *, Pbs vs Pbs por # e Pa vs Pa por &. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM e os valores de p foram representados com $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

Os linfócitos apresentaram uma redução importante no número de células circulantes nos dias 3, 5 e 7 quando comparado ao D0, entretanto essas células retomam os valores próximos ao basal, em ambos os grupos avaliados, no 10º dia do experimento. Por outro lado, a comparação dos linfócitos intragrupo (Pbs vs Pbs) apresentou diferenças significativas para os intervalos de tempo de D0-D7 e D7-D10, enquanto Pa vs Pa apresentou diferenças significativas apenas nos intervalos de tempo D0-D5 e D0-D7, com valores de $p < 0,05$, conforme ilustrado nas Figuras 19 (A) e (B).

Figura 19 - Quantificação diferencial de leucócitos mononucleares no sangue periférico (2020)



Legenda: em A e B, representação dos linfócitos; em C e D, representação dos monócitos. As avaliações considerando Pbs vs Pa foram representadas no gráfico por *, Pbs vs Pbs por # e Pa vs Pa por &. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM e os valores de p foram representados com $p < 0,05$: * ou # ou &, $p < 0,01$: ** ou ## ou &&, $p < 0,001$: *** ou ### ou &&& e $p < 0,0001$: **** ou #### ou &&&&.

Fonte: dados da pesquisa.

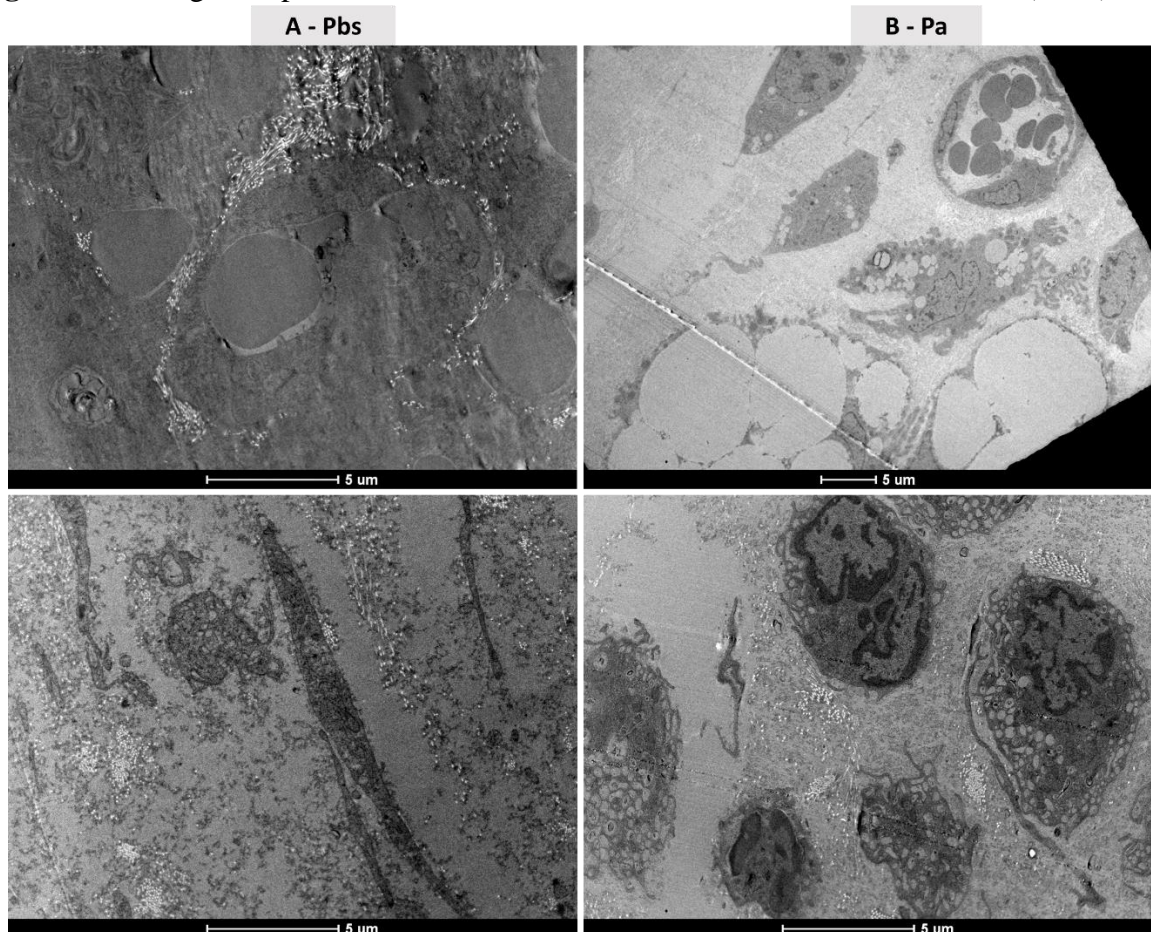
Nesse mesmo sentido, na comparação intergrupos, identificou-se que, em ambos os grupos, houve um pico de monócitos no 10º após o ferimento e indução da infecção, porém sem significância estatística. Embora, na avaliação intragrupo (Pbs vs Pbs) e (Pa vs Pa) dessas

células, observaram-se diferenças significativas para os intervalos de tempo de D0-D10, D3-D10, D5-D10 e D7-D10, ambos com valores de $p < 0,05$, conforme ilustrado nas Figuras 19 (C) e (D).

5.2.6 Avaliação por meio da microscopia eletrônica de transmissão

Na avaliação das feridas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), não foi possível identificar a presença de biofilme bacteriano ou de *Pseudomonas aeruginosa* em sua forma planctônica conforme ilustrado na Figura 20.

Figura 20 – Imagens representativas da ausência de biofilmes na área das feridas (2020)

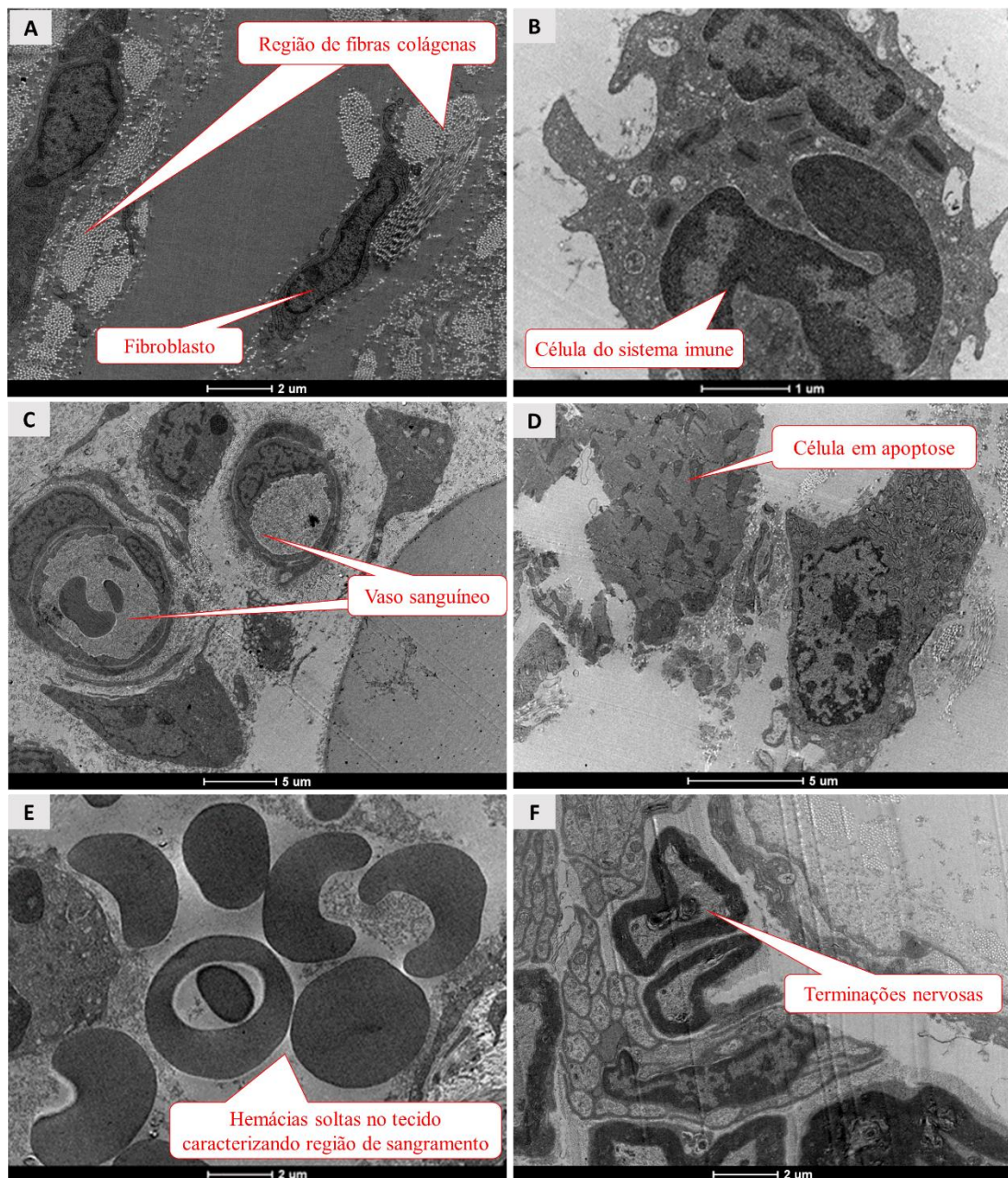


Legenda: em A, Grupo Pbs (controle). Em B, Grupo Pa (infectado com *P. aeruginosa*). Em ambos os grupos não foi observado presença de biofilme ou células bacterianas na área das feridas. Barra de escala: 5µm.

Fonte: imagens da pesquisa. Painel elaborado pela autora.

Por outro lado, a MET permitiu identificar algumas estruturas celulares características e bem delimitadas no tecido correspondente a área das feridas, como por exemplo, a presença de fibras colágenas, células do sistema imune, presença de nervos, vasos sanguíneos e células em processo de apoptose (Figura 21).

Figura 21 - Imagens das feridas por MET: estruturas celulares características da pele correspondente a área das feridas (2020)

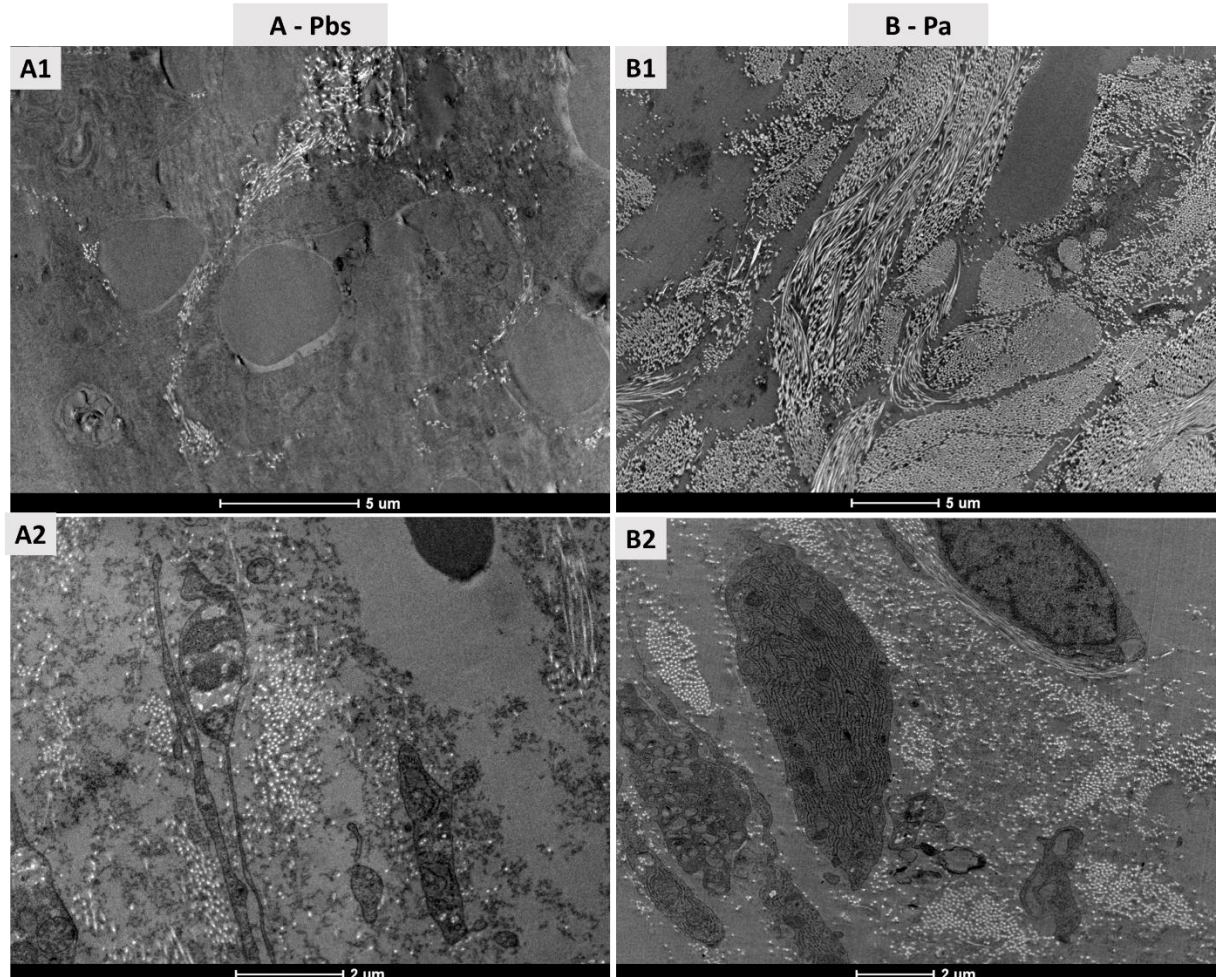


Legenda: estruturas identificadas nas imagens pela ponta das setas. Barra de escala: em A, E e F: 2μm; em B: 1μm; em C e D: 5μm, respectivamente.

Fonte: imagens da pesquisa. Painel elaborado pela autora.

Dentre essas características observadas, destaca-se que a deposição de fibras colágenas foi mais proeminente no grupo Pa quando compara do ao grupo Pbs (Figura 22).

Figura 22 - Imagens das feridas por MET: deposição de fibras colágenas na área das feridas (2020)



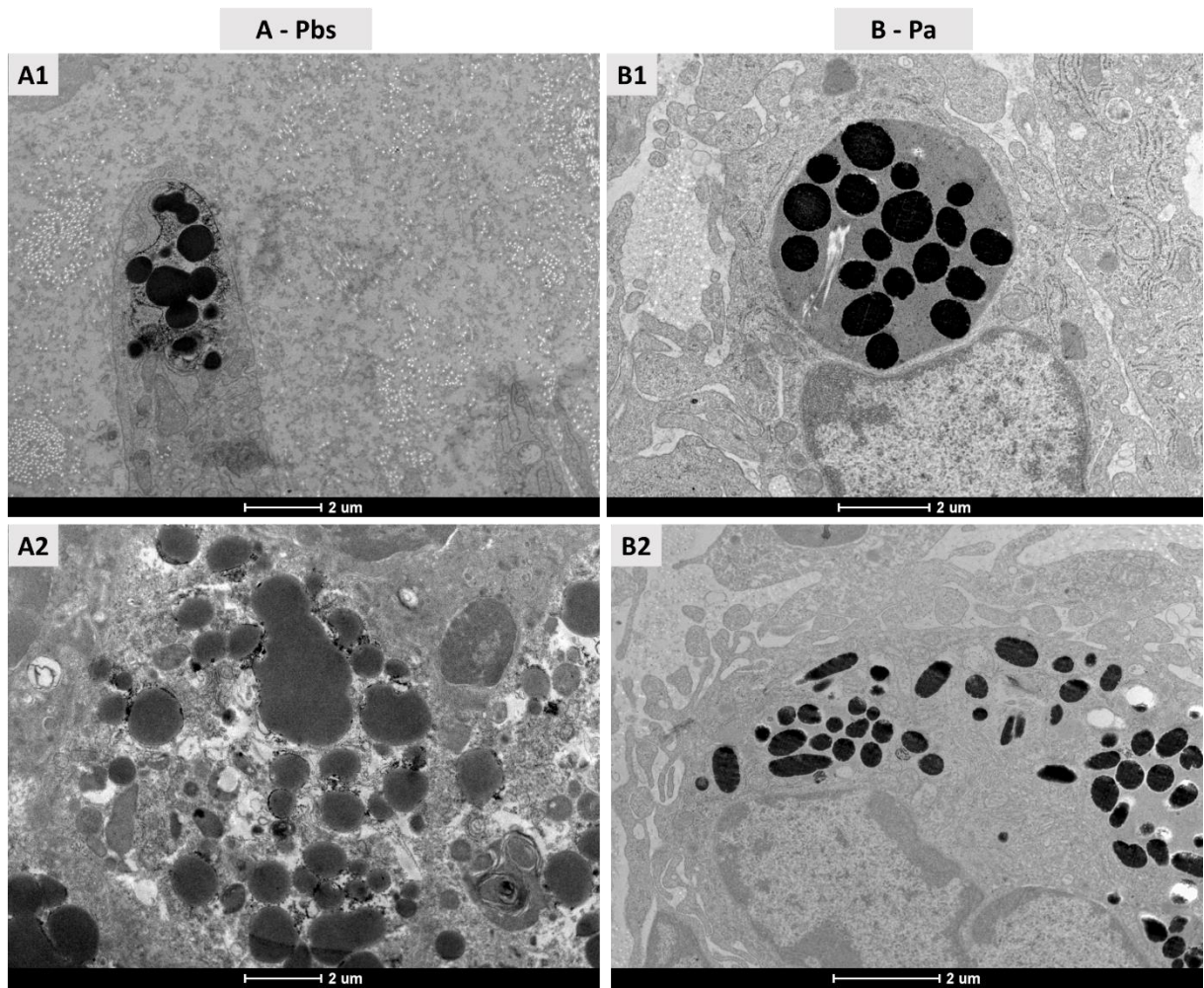
Legenda: em A, Grupo Pbs (controle), baixa presença de colágeno disperso no tecido; em B Grupo Pa (infectado). Nas imagens acima, o colágeno é visualizado como pontos brancos e brilhantes dispersos no tecido. Barra de escala: A1 e B1: 5 μ m; A2 e B2: 2 μ m, respectivamente.

Fonte: imagens da pesquisa.

A MET permitiu identificar diferentes células como presença de fibroblastos, eosinófilos e neutrófilos contendo grânulos eletrodensos dispersos no citoplasma e células vacuolizadas com grânulos eletrodensos bem delimitados dentro da estrutura dos vacúolos em ambos os grupos avaliados (Figura 22).

Não foram realizados testes para identificação desses grânulos pois esse não era o alvo deste estudo, entretanto, acredita-se que esses grânulos sejam substâncias sintetizadas pelas células como resposta ao processo de inflamação decorrente do processo cirúrgico e indução da infecção com *P. aeruginosa* na região das feridas.

Figura 23 - Imagens das feridas por MET: células com grânulos eletrodensos (2020)



Legenda: em A, Grupo Pbs (controle), células contendo grânulos eletrodensos; em B Grupo Pa (infectado), células contendo grânulos eletrodensos. Barra de escala: 2μm.

Fonte: imagens da pesquisa. Painel elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avançar na discussão sobre a indução, formação, identificação e manejo do biofilme em feridas cutâneas excisionais no modelo *in vivo*. Nesse contexto, os modelos experimentais de feridas cutâneas com biofilme *in vivo* compreendem estratégias cruciais para o avanço dessa temática. Esses modelos permitem diversas frentes de investigação e englobam as questões relacionadas à identificação dos biofilmes, o desenvolvimento de novos produtos ou mesmo o teste de eficácia de produtos já disponíveis no mercado com a finalidade de combater o biofilme. Por fim, incorporam as ações de prevenção, monitoramento e gerenciamento desses organismos na prática clínica.

Assim, nos testes preliminares deste estudo, ao tentar reproduzir um dos modelos descritos na literatura, para o teste de um produto cuja finalidade visa romper as estruturas do biofilme, observou-se alta mortalidade dos animais. Tal situação obrigou os pesquisadores a interromperem temporariamente o estudo com o intuito de investigar o que de fato havia ocorrido. Ao buscar outros modelos semelhantes na literatura, identificou-se uma variedade muito grande de propostas, cada uma com diferentes variáveis que poderiam impactar nos resultados, alterando os desfechos esperados. Esses achados permitiram repensar algumas estratégias que conduziram para a padronização de um modelo de feridas colonizadas ou infectadas por biofilmes que fosse viável e reprodutível, permitindo desde a identificação do biofilme até as mais diferentes situações de investigação em torno dessa temática.

Nesse sentido, a primeira fase desta pesquisa permitiu estabelecer a carga bacteriana capaz de induzir a colonização e infecção das feridas e, que ao mesmo tempo, fosse suficientemente segura para garantir a sobrevivência dos animais.

Nessa etapa do estudo, empregou-se o modelo de feridas múltiplas, confeccionadas no dorso dos animais, medindo aproximadamente 5mm de diâmetro e com espessura total da pele, descrito por Canesso *et al.* (2014). Esse modelo de ferida foi associado a diferentes cargas bacterianas já descritas na literatura por outros autores que trabalham essa mesma temática (ZHAO *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2019; BRANDENBURG *et al.*, 2019; MORI *et al.*, 2019; AKERS *et al.*, 2014). As cargas bacterianas selecionadas para indução da infecção e formação do biofilme foram aplicadas em alíquotas de uma suspensão bacteriana fresca contendo 10^8 , 10^6 , 10^5 e 10^4 .

Essas cargas bacterianas também foram associadas a quatro diferentes técnicas de indução da infecção das feridas com *P. aeruginosa* denominadas neste estudo técnicas A, B, C e D. Optou-se pela averiguação do impacto da oclusão das feridas com filme de poliuretano transparente na indução da formação do biofilme, sendo realizadas as trocas (remoção / reaplicação) nos dias 1, 3, 5 e 7 do seguimento experimental.

O mecanismo de repique bacteriano e preparo do inóculo para indução da infecção também foi descrito por diferentes autores (STOFFEL *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2019; BRANDENBURG *et al.*, 2019; MORI *et al.*, 2019) e, em vários aspectos, foram observadas semelhanças em relação aos procedimentos técnicos empregados neste trabalho.

Alguns autores utilizaram uma cepa de *S. aureus* (linhagem Xen29) para indução da infecção. A cultura e o preparo do inóculo para infecção das feridas foram realizados por meio da técnica de diluição seriada na proporção de 1:10, em PBS estéril e incubada por 60min a ± 35 ($\pm 2C$); em seguida, essas bactérias foram lavadas com PBS por 3 vezes e ressuspensas até uma concentração final de 10^8 UFC/mL. Posteriormente, confeccionaram-se feridas de 1cm de diâmetro e espessura total no dorso dos animais (ratos atípicos - sem pelagem). Essas feridas foram semeadas com 10 μ L da suspensão com carga bacteriana 10^8 UFC/mL e cobertas com o filme de poliuretano transparente por 24 horas para permitir a formação do biofilme (STOFFEL *et al.*, 2019). Esses autores, apesar de utilizarem uma carga bacteriana semelhante às concentrações bacterianas utilizadas em outros estudos, aplicaram um tempo de cultivo e preparo do inóculo para infecção das feridas de 60 minutos, o que difere muito do tempo de cultivo e preparo do inóculo de 24 horas empregados neste e em outros estudos (ZHAO *et al.*, 2010;) que avaliaram culturas de feridas para identificação de biofilmes.

O estudo de Zhao *et al.* (2010) trabalhou a indução de biofilme de *P. aeruginosa* em ratos diabéticos. Esses autores consideraram o modelo de ferida excisional única, confeccionada na região dorsal do animal, medindo 6mm de diâmetro e de espessura total da pele. Eles testaram uma alíquota de suspensão bacteriana fresca contendo em torno de 10^8 UFC/mL após 24h de incubação dessa suspensão bacteriana. A segunda carga testada por esses autores continha em torno de 10^9 UFC/mL após 72h de incubação da solução bacteriana.

Brandenburg e colaboradores (2019) também consideraram um modelo de ferida tipificada como “queimadura por escaldadura” em ratos Sprague-Dawley. Esse modelo de criação de feridas por escaldadura com espessura de 500-600 μ m de profundidade foi associado a uma

carga bacteriana em torno de 10^9 UFC/g de tecido. Imediatamente após a realização das queimaduras na região dorsal desses ratos, aplicaram-se 100µl de uma suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* sobre a superfície das feridas e, segundo esses autores, no tempo de 7 dias, foi possível observar um aumento robusto da infecção.

Dentro dessa mesma temática, Davis *et al.* (2019) utilizaram um modelo de ferida porcina, de espessura parcial profunda, na zona paravertebral e torácica, medindo 10mm×7mm×1,0mm. Neste estudo, os autores realizaram 52 feridas de espessura parcial no dorso desses animais; em seguida, estas foram desafiadas com uma alíquota de 25µL de suspensão bacteriana contendo 10^6 UFC/mL de *Pseudomonas*. Uma alíquota de 25µL foi depositado no centro de cada ferida, sendo ligeiramente esfregada e espalhada sobre a superfície das feridas. Nesse modelo, as feridas também foram ocluídas com filme de poliuretano transparente por 24h, para garantir que o biofilme pudesse se estabelecer, e a troca da cobertura realizada a cada 48h para aplicação do tratamento utilizado por esses autores.

Salienta-se que, para este estudo, a técnica A foi classificada como modelo de indução pontual (aplicação direta da suspensão bacteriana no leito das feridas) para formação do biofilme (DAVIS *et al.*, 2019), enquanto a técnica D replicou esse modelo de indução pontual associando-o ao filtro de celulose, um componente utilizado como suporte de amplificação e adesão das bactérias no leito das feridas, já amplamente utilizado nos modelos de transferência de biofilme (ZHAO *et al.*, 2010). As técnicas B e C foram caracterizadas como modelos de transferência de biofilme para o leito das feridas e tinham como objetivo simular a ruptura do biofilme maduro, com conseqüente contaminação de outros sítios da ferida considerando a natureza refratária dos biofilmes, como discutido por outros estudiosos desse assunto (DONLAN; COSTERTON, 2002; ZHAO *et al.*, 2010).

A alta taxa de mortalidade dos camundongos observada nessa fase do estudo permitiu perceber que a carga bacteriana estava fortemente associada à técnica empregada para indução da infecção. Os resultados obtidos nesta etapa permitem inferir que os modelos de transferência de biofilmes não foram seguros para garantir a sobrevivência dos animais após a indução de infecção das feridas com *P. aeruginosa*. Entretanto, de forma contrária aos resultados obtidos por este estudo, alguns autores relatam que a técnica de inoculação da carga bacteriana no momento de confecção das feridas apresentou alta taxa mortalidade e induziu o aumento da área das feridas em relação à medida da ferida inicial (HOCHWALT *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010).

Para esta pesquisa, compreende-se que o aumento da área das feridas representava um dos componentes do retardo do processo de cicatrização. Os resultados mostraram que a maior taxa de mortalidade ocorreu para as técnicas B e C utilizadas para a indução da infecção. Desse modo, os modelos de indução pontual da infecção empregados para este estudo, apesar de terem apresentado uma alta taxa de mortalidade no primeiro momento, apresentaram-se mais propensos a causar colonização/infecção das feridas, visto que os animais alocados nessas técnicas (A e D) sobreviveram por mais tempo, de forma a garantir a sobrevivência dentro das marcações temporais (tempo de 3, 5, 7 e 10 dias) adotadas para este estudo. Para além disso, os estudos avaliados na composição deste trabalho mostraram que o delineamento temporal adotado coincide com o delineamento temporal empregado em outros estudos que têm em seu desfecho principal a indução e a formação dos biofilmes ou o tratamento desses organismos (DAVIS *et al.*, 2019, ZHAO *et al.*, 2010; BRANDENBURG *et al.*, 2019).

A avaliação clínica dos animais ao longo dos dias experimentais demonstrou redução da mobilidade, prostração, dificuldade para se alimentar e hidratar, formação de crosta nos animais que não tiveram as feridas ocluídas com filme transparente, pelagem arrepiada e sem brilho, principalmente para aqueles animais que foram alocados para avaliação das técnicas B, C e D, respectivamente. Entretanto, essas observações não foram passíveis de ser comparadas com a literatura, pois, em vários estudos consultados, os autores não relatam e não descrevem o acompanhamento dessas condições clínicas.

As feridas dos animais que foram alocados para a técnica A não foram ocluídas com filme transparente, sobrevivendo apenas um animal com carga de 10^8 . Esse animal apresentou formação de crosta espessa sobre as feridas e contração acentuada do tecido, fugindo aos objetivos deste estudo, por isso a não oclusão das feridas foi desconsiderada para a continuidade desta pesquisa.

Nas técnicas B e C, todas as feridas foram ocluídas por 24h e, independentemente da carga bacteriana aplicada, todos os animais morreram nas primeiras 72h. Esse achado confirmou que a técnica de transferência de biofilme para as feridas não era suficientemente segura para garantir a sobrevivência dos animais, uma vez que a incubação dos filtros por 24h, além de aumentar exponencialmente a carga bacteriana, impediu a quantificação exata da carga bacteriana aplicada nos animais, o que pode ter favorecido a morte dos mesmos. Com isso, surgiu a seguinte questão: o efeito da oclusão das feridas poderia agravar esse crescimento

exponencial da *Pseudomonas aeruginosa* de forma a aumentar a taxa de mortalidade dos animais?

Além disso, ao avaliar os efeitos da técnica D na curva de sobrevivência dos animais, observou-se que, apesar de apresentar uma alta mortalidade para as cargas bacterianas testadas, essa técnica mostrou que 50% dos animais com carga bacteriana de 10^5 UFC/mL sobreviveram até o décimo dia do experimento. Esse achado sugere que, dentre as técnicas testadas, essa técnica de indução (D) era a mais favorável para o modelo de feridas infectadas proposto.

A partir desses resultados e da hipótese levantada, realizou-se uma segunda etapa experimental para confirmação e ajuste da carga bacteriana, do uso do filtro de celulose e da oclusão com filme transparente no contexto da indução da infecção das feridas.

A segunda fase desta investigação considerou um seguimento experimental de 3 dias, visto que o maior percentual de mortalidade ocorreu nas primeiras 72h e o modelo de feridas proposto neste estudo, em geral, atinge 100% de cicatrização em torno do 14º dia. Na comparação da sobrevivência entre os grupos experimentais testados, identificou-se que houve baixa taxa de mortalidade quando a carga empregada para indução da infecção foi aplicada em alíquotas de 10µL contendo 10^4 ou 10^5 UFC/mL dessas suspensões, aplicadas diretamente sobre os filtros de celulose aderidos à superfície das feridas. A fixação dos filtros e a respectiva oclusão das feridas foram realizadas com o filme de poliuretano transparente, que foi mantido por 24h.

Como esperado, além de garantir a visualização e observação da evolução das feridas durante todo o seguimento experimental, a oclusão das feridas com filme transparente impediu a formação de crosta sobre as mesmas e minimizou a necessidade de trocas do curativo durante os experimentos, exceto para os pontos de avaliação e mensuração, necessários ao delineamento experimental desta pesquisa.

A oclusão das feridas nos modelos animais também foi utilizada em outros estudos. De forma semelhante à técnica de oclusão adotada para este trabalho, alguns autores descrevem o uso do filme de poliuretano transparente (marca 3M) para oclusão das feridas por 24 horas com a finalidade de permitir o estabelecimento de biofilmes de *P. aeruginosa* antes de aplicarem os tratamentos propostos (ZHAO *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2019). Ressalta-se que neste estudo não foi aplicado tratamento, já que o objetivo principal era padronizar o modelo de feridas excisional com biofilme bacteriano.

Nesta pesquisa, a oclusão das feridas com filme transparente apresentou algumas desvantagens, pois, em alguns animais, no processo de remoção do curativo, constatou-se a ocorrência de sangramento e/ou rompimento/remoção mecânica do esfacelo (tecido necrótico) formado no leito das feridas. Além disso, observou-se que as trocas realizadas em intervalos menores que 3 dias ou executadas de maneira irregular podem induzir o surgimento de irritação e dermatite da pele ao redor das feridas.

Ressalta-se que cada troca de curativo compreende a remoção do filme transparente aplicado sobre as feridas e a aplicação de uma nova cobertura sobre as feridas. Nesse contexto, o desenho experimental empregado para este estudo mostrou que, ao todo, foram realizadas cinco trocas dessa cobertura (aplicação + remoção) e, destas, uma ocorreu 24h após a indução da infecção, três ocorreram com 48h e uma troca (remoção do dia 10) com 72h. Esse padrão de troca pode ser um viés de confusão para o estudo da indução e formação do biofilme em feridas excisionais, considerando que houve perda de pequenos fragmentos de esfacelo do leito das feridas nos momentos de remoção dessa cobertura.

Sabe-se que, na prática clínica, o intervalo entre as trocas de curativos é um ponto crucial no processo de tratamento de feridas, entretanto, nos modelos experimentais de feridas, essa questão tem sido pouco discutida e carece de mais investigação para elucidar qual é o impacto da troca de curativo/cobertura no processo de tratamento das feridas experimentais e, principalmente, para este estudo, qual é o impacto da troca da cobertura no processo de indução e formação do biofilme?

A comparação desses dados e aspectos observados no modelo de feridas excisionais utilizado neste estudo não encontrou respaldo na literatura consultada, visto que os diferentes autores consultados sobre o uso de modelos de feridas em animais não fazem referência a esse tipo de cuidado. Vale salientar que essa preocupação sobre o cuidado é rotineira na prática clínica e, nas últimas décadas, observa-se uma preocupação crescente dos profissionais dos serviços de saúde (SMANIOTTO *et al.*, 2012) e dos próprios fabricantes de insumos para o tratamento de ferida (MORRIS, 2006; GIANINO; MILLER; GILMORE, 2018) com os aspectos que englobam o uso de coberturas primárias e secundárias, como os adesivos médicos e, em particular, o filme de poliuretano transparente que é extremamente versátil em suas aplicações.

Para além da capacidade de fixação dessas coberturas, na prática clínica, o tratamento de feridas crônicas, independente da etiologia, envolve uma série de cuidados como o desbridamento dos tecidos desvitalizados (esfacelo e/ou tecido necrótico), o equilíbrio da umidade (controle do exsudato), controle da dor e redução da carga bacteriana patogênica (SINGH *et al.*, 2008; PERCIVAL *et al.*, 2012; DAVIS *et al.*, 2008; PASTAR *et al.*, 2012). Assim como são avaliados outros parâmetros, como o tempo máximo de uso dessas coberturas especiais, tempo indicado para trocas, praticidade de aplicação desses produtos, redução ou alívio da dor, custos do produto e da mão de obra especializada, por exemplo.

Por outro lado, essa preocupação parece ser inexistente entre os parâmetros avaliativos da pesquisa experimental em animais. Tal situação induz a pensar que os modelos animais empregados pelos autores no contexto do tratamento de feridas *in vivo* não conseguiram simular experimentalmente as condições clínicas e comportamentais observadas nos pacientes com feridas crônicas ou, então, esses parâmetros, por não ser o foco de investigação desses autores, não foram julgados como pertinentes ao processo de cicatrização. Ou ainda, indo um pouco mais, além dos aspectos técnicos envolvidos nesse processo, questiona-se o papel da enfermagem na produção desses modelos experimentais de feridas, visto que esta é a principal categoria profissional envolvida no processo de tratamento de feridas e, ao mesmo tempo, tão ausente na pesquisa básica dentro dessa temática.

Acredita-se que a escassez de informação sobre padronização do intervalo de troca de curativos, técnica de aplicação e remoção dos adesivos e das coberturas, entre outros requisitos que envolvem o tratamento de feridas nos modelos experimentais de feridas, pode ter relação com a ausência da enfermagem nesse campo de pesquisa. Isso não significa que as demais categorias envolvidas nessa abordagem de pesquisa não se preocupam com esse tipo de questão, mas pode traduzir que essa abordagem não faz parte do escopo de prioridades dessas categorias profissionais como faz para a enfermagem.

Ressalta-se, que dentre os 23 estudos envolvidos na revisão de literatura realizada, apenas 1 (GURJALA *et al.*, 2011), que trabalhou o modelo de feridas infectadas em orelha de coelhos, apresentou preocupação com esse tipo de informação e, de forma mais sistematizada, descreveu essa preocupação como variáveis do estudo. Essas variáveis foram denominadas como localização, tamanho e número de feridas por orelha, profundidade da ferida, tempo de inoculação da bactéria, tempo de tratamento com antibiótico, tipo de cobertura absorvente,

tempo de trocas de curativos e duração do período de cicatrização de ferida (GURJALA *et al.*, 2011).

Outro ponto de observação neste estudo em questão foi que o uso do filme transparente impediu a formação de crosta no leito das lesões e serviu de barreira de contenção da dispersão de *P. aeruginosa* no ambiente e, apesar de ter provocado sangramento e rompimento do esfacelo em alguns animais, seu uso foi mantido em função da necessidade de fixação dos filtros de celulose sobre as feridas nas primeiras 24h do estudo para facilitar a propagação da bactéria no interior das feridas; a necessidade de manutenção de um ambiente propício ao crescimento dos microrganismos; e a *expertise* dos pesquisadores para o manuseio dessa cobertura. Entretanto, vale ressaltar que esses dados sugerem a necessidade de treinamento específico dos pesquisadores a serem envolvidos nos projetos de pesquisas que abordem o uso desse produto no acompanhamento de feridas cutâneas, seja na prática clínica ou na pesquisa básica, considerando que a aplicação de forma inapropriada ou errônea pode se tornar um viés de confusão.

Os resultados obtidos até essa fase da pesquisa mostraram que o modelo de ferida infectada proposto com carga bacteriana de 10^4 foi capaz de retardar o processo de cicatrização, visto que os animais do grupo infectado apresentaram os piores escores de cicatrização, perda ponderal e tiveram resultado positivo da cultura das feridas que conseguiu recuperar a bactéria *Pseudomonas* spp. em todos os tempos do seguimento experimental.

Esses dados permitiram concluir que o modelo de indução da infecção em feridas proposto por esses pesquisadores estava funcionando e, por sua vez, direcionou para uma terceira fase deste estudo que compreendeu a replicação do modelo de feridas infectadas para indução do biofilme e a capacidade de recuperação da bactéria empregada para a indução da infecção das feridas na cultura da pele e do fígado nas marcações temporais previstas no delineamento temporal do estudo. Esse momento também foi utilizado para a padronização dos tempos para realização das culturas.

Os resultados obtidos nessa fase demonstraram que o plaqueamento e a cultura das feridas dos animais infectados apresentaram recuperação de microrganismos na amostra pura e nas diluições testadas (10^{-1} até 10^{-7}) no tecido a fresco e após congelamento do tecido (pele) em freezer -20°C por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias.

Quanto ao plaqueamento e cultura do fígado (tecido a fresco), não foi observado crescimento de colônias bacterianas para as duas cargas bacterianas testadas, sugerindo que a técnica de indução da colonização/infecção de feridas não é capaz de provocar infecção sistêmica (septicemia) para as duas cargas bacterianas testadas. Apenas duas amostras apresentaram crescimento bacteriano, sendo uma do grupo controle e uma do grupo infectado com carga de 10^5 , sugerindo a possibilidade de contaminação durante o processamento e plaqueamento das amostras. Nos demais grupos, a cultura do fígado não apresentou crescimento bacteriano, sugerindo que não ocorreu septicemia para as duas cargas bacterianas testadas.

A partir desses resultados, deu-se início à reprodução desse modelo de feridas considerando o n amostral previsto para este estudo e em busca da determinação do perfil de formação do biofilme em feridas excisionais.

Salienta-se que a cultura das feridas foi capaz de recuperar microrganismos em quantidade que variam de $4,0 \times 10^5$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/g de tecido com diferença estatisticamente significativa nos dias 5 e 7 do seguimento experimental. Também foram recuperados microrganismos nos dias 5, 7 e 10 do grupo Pbs com quantidade mais expressiva no dia 5, entretanto, na comparação intragrupo (Pbs vs Pbs ao longo dos dias), essa diferença não foi estatisticamente significativa como observado para o grupo Pa. No grupo Pa, identificaram-se diferenças estatisticamente significativas em seis intervalos de tempo diferentes, ao longo do delineamento experimental empregado.

Tais fatos sugerem que o modelo de infecção por *Pseudomonas*, considerando a carga de infecção de 10^4 UFC/g de tecido é funcional, apresentou diferença mais expressiva nos tempos de 5 e 7 dias após os procedimentos de confecção e indução da infecção nas feridas. Os resultados da cultura da pele permitem inferir que o grupo Pbs consegue debelar a infecção a partir do 7º dia, uma vez que se identificou uma redução importante da carga bacteriana nesse período, enquanto o grupo Pa manteve o crescimento dessas bactérias até o dia 7 e apresentou redução da carga bacteriana no 10º dia da infecção. Esses achados são corroborados pelo estudo de Brandenburg *et al.* (2019) que, no tempo de 7 dias, detectou níveis de infecção com carga bacteriana de aproximadamente 1×10^9 UFC/g de tecido, proveniente de feridas decorrentes de escaldadura da pele (queimadura da pele).

De forma semelhante, o estudo de Zhao (2010) demonstrou que a cultura da crosta, da área da ferida e da pele ao redor da ferida foi capaz de recuperar os microrganismos. Esses autores

afirmam que a cultura das crostas recuperou microrganismos com carga entre $2-6,5 \times 10^7$ UFC/g de tecido, enquanto a cultura da área corresponde à ferida, e a pele ao redor da ferida recuperou microrganismos na proporção de $10^3 - 10^5$ UFC/g de tecido do grupo infectado com *Pseudomonas* (PAO1) no tempo de 28 dias. Além disso, esses mesmos autores descrevem a recuperação de microrganismos nos animais do grupo controle na crosta com carga de 10^4 e na área das feridas e na pele ao redor com carga entre 10^3-10^5 . Estes salientam, ainda, que as bactérias recuperadas foram identificadas como uma combinação de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em ambos os grupos (controle e PAO1).

Os resultados expressos por esse grupo de pesquisadores (ZHAO *et al.*, 2010) corroboram com os resultados observados neste estudo em questão, no qual foram recuperados microrganismos tanto no grupo Pbs quanto no grupo Pa. Vale a pena ressaltar que nesta pesquisa foi adotado um meio seletivo para o crescimento de *P. aeruginosa*, sendo observadas as características como coloração amarelo-esverdeada e aspecto mucoide das colônias observadas durante a quantificação dessas UFCs para avaliação da espécie de microrganismo que cresceu na placa. A avaliação das placas de cultura não demonstrou sinais de crescimento de outros microrganismos além da *Pseudomonas* utilizada para indução da infecção. Ressalta-se que, neste trabalho, não foram empregados outros métodos de isolamento e identificação bioquímica desses microrganismos, o que, na análise dos resultados, permitiria comparações mais refinadas com outros estudos que utilizaram esse tipo de metodologia.

Os resultados obtidos na cinética de fechamento das feridas demonstraram que o grupo Pa apresentou os menores escores de cicatrização durante todo o período experimental quando comparado ao grupo Pbs, o que pode ser confirmado no recorte temporal de 5 e 7 dias.

As comparações intragrupo mostraram que tanto o grupo Pbs quanto o grupo Pa apresentaram diferenças significativas no acompanhamento da evolução da taxa de cicatrização e, conseqüentemente, da redução da área das feridas ao longo do seguimento experimental. Para o grupo Pbs, esses resultados eram esperados e comprovam que o modelo de feridas excisional adotado é funcional e fortemente reprodutível. A avaliação desses resultados para o grupo Pa demonstrou que a carga bacteriana aplicada para indução da infecção é funcional em todos os pontos de comparação do seguimento, pois os escores de cicatrização em cada uma das marcações temporais avaliadas dentro desse grupo foi estatisticamente significante com valores de $p < 0,05$.

O grupo Pa apresentou um percentual de cicatrização 21% menor em relação ao grupo Pbs no dia 5 e 12 % menor no dia 7, respectivamente. Diferenças semelhantes foram observadas para o tamanho das feridas nesse período, em que as feridas do grupo Pa apresentaram uma área média de 12,1cm contra 7,4cm do grupo Pbs, no tempo de 5 dias, e 7,7cm contra 5,0cm, no tempo de 7 dias, respectivamente.

De forma bastante semelhante, um grupo de estudiosos induziu a infecção de um modelo de ferida cutânea no dorso de camundongos C57Bl6/J saudáveis (linhagem idêntica à utilizada neste estudo) usando biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e também observou retardo no processo de cicatrização. Eles relataram que as lacunas epiteliais em feridas colonizadas por biofilmes bacterianos eram significativamente maiores do que os seus homólogos no grupo controle (lacuna epitelial do 7º dia: *S. aureus*: 2,4 vs. 0,5 mm, $p < 0,01$; *S. epidermidis*: 2,0 vs. 0,5 mm, $p < 0,01$), respectivamente (SCHIERLE et al., 2009).

Um estudo realizado em camundongos diabéticos apresentou que 64% das feridas infectadas com biofilmes de *P. aeruginosa* cicatrizaram com 6 semanas e atingiram a cicatrização completa com 8 semanas, enquanto nos animais do grupo controle a cicatrização completa ocorreu em torno de 4 semanas. Esses autores salientam ainda que as crostas das feridas que não cicatrizaram continham alta carga bacteriana, em torno de 100 vezes maior que as contagens isoladas no leito das feridas (ZHAO et al., 2012).

No presente estudo, o retardo no processo de cicatrização das feridas do grupo Pa no período de 5 e 7 dias também coincidiu com o aumento da carga bacteriana observado para esse mesmo período na avaliação da cultura das feridas realizada. Ao avaliar o percentual de epitelização de feridas porcinas, de espessura parcial, Davis et al. (2019) identificaram que não havia diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectados em nenhum dos tempos avaliados. Eles descrevem apenas uma ligeira tendência de maior taxa de epitelização no dia 3, porém sem significância estatística, e afirmam que todos os grupos apresentaram epitelização completa das feridas no dia 5. Tal fato foi relacionado à espessura parcial das feridas, porém os autores não mostram esses dados na publicação dos resultados.

Um estudo realizado por Mori et al. (2019) avaliou o efeito de um sistema de tratamento de feridas com base em biofilme (BWCS), denominado “manchas de feridas”, combinado com o desbridamento ultrassônico em feridas crônicas de humanos. Esses autores verificaram que quanto maior a proporção de remoção dos biofilmes, maior é o percentual de cicatrização das

feridas. Nesse estudo, a mediana da proporção de remoção do biofilme foi de 38,9% (intervalo interquartil, 12,9-68,0%) para lesões por pressão tratadas com cuidados padrão e 65,2% (41,1-78,8%) para lesões tratadas com desbridamento ultrassônico ($p = 0,009$). A proporção de cicatrização de feridas, no prazo de 90 dias, foi significativamente mais elevada em feridas tratadas com desbridamento ultrassônico do que aquelas tratadas com cuidados padrão ($p = 0,001$).

O aumento da carga bacteriana é considerado uma das causas de cronicidade das lesões cutâneas, principalmente quando ocorre a formação dos biofilmes (DOWD *et al.*, 2008; PHILLIPS *et al.*, 2010; HURLOW, BOWLER, 2012; METCALF *et al.*, 2014; STOFFEL *et al.*, 2020; PIRLAR *et al.*, 2020). Na prática clínica, o atraso no processo de cicatrização das feridas com colonização crítica ou infecção é também percebido nos pacientes com feridas de diversas etiologias (DOWD *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2008; BJARNSHOLT *et al.*, 2008; GOLDUFSKY *et al.*, 2015), situação que pode ser agravada pela erradicação ineficiente de patógenos infecciosos e oportunistas (KIM *et al.*, 2020) como os biofilmes bacterianos.

Nas últimas décadas, a composição da microbiota da pele (normal e com feridas) tem sido um alvo contínuo de investigações clínicas e experimentais. Nessa perspectiva, a microbiota da pele normal e a microbiota das feridas relacionada à sua classificação e etiologia vêm sendo discutidas por diferentes autores. A discussão da microbiota da pele normal em indivíduos saudáveis foi realizada por alguns autores, como Gao *et al.* (2007), Dowd *et al.* (2008) e Bay *et al.* (2018). Alguns autores se dedicaram à discussão da microbiota das feridas, segundo a classificação em feridas crônicas (DOWD *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2008; GOLDUFSKY *et al.*, 2015), e às feridas agudas (JAMES *et al.*, 2008; BAY *et al.*, 2018), por exemplo, enquanto a microbiota das feridas relacionada à etiologia das lesões foi investigada por diversos pesquisadores. Dentre os autores que trabalham essa linha de pesquisa, destacam-se as úlceras venosas (BJARNSHOLT *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2008), lesões por pressão (BJARNSHOLT *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2008) e úlceras de pé diabético (BJARNSHOLT *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2008; GOLDUFSKY *et al.*, 2015).

A microbiota da pele normal, entre indivíduos saudáveis, foi avaliada a partir de métodos moleculares (GAO *et al.*, 2007; DOWD *et al.*, 2008). Os autores afirmam que as bactérias da microbiota normal da pele comumente encontradas foram *Propionibacteria*, *Corynebacteria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp. (GAO *et al.*, 2007) e alta prevalência de *Metilophilus* spp. (DOWD *et al.*, 2008). Eles concluem que a microbiota normal da pele é altamente

diversificada entre os indivíduos, havendo apenas algumas poucas bactérias comuns entre os mesmos.

Alguns autores corroboram a hipótese de que as populações bacterianas presentes no leito das feridas são fortemente associadas à etiologia das lesões (JAMES *et al.*, 2008; BOWLER *et al.*, 1999; DOWD *et al.*, 2008).

A pesquisa de James e colaboradores (2008) sobre biofilme em feridas de humanos, citada em diversos estudos, contou com amostra de 77 feridas crônicas e 16 feridas agudas. Dentre as feridas crônicas, incluíram-se lesões por pressão, úlceras venosas e úlceras nos pés decorrentes do *diabetes mellitus*. Neste estudo, o biofilme foi identificado em 30 (60%) das feridas crônicas e 1 (6%) das feridas agudas empregando a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para a prevalência de biofilme bacteriano em feridas crônicas, em relação a feridas agudas.

Outro estudo avaliou as úlceras de perna decorrentes de estase venosa e os autores observaram que os organismos aeróbios representavam 49% das populações bacterianas presentes nesse tipo de ferida (BOWLER *et al.*, 1999), enquanto um segundo estudo realizado dentro dessa perspectiva ressaltou que os organismos aeróbios foram associados a 62% das populações bacterianas presentes nas lesões por pressão, 30% nas úlceras decorrentes do *Diabetes mellitus* e a 1,6% nas úlceras da perna decorrentes de estase venosa (DOWD *et al.*, 2008).

Esses achados fornecem evidências de que os biofilmes são abundantes em feridas crônicas (JAMES *et al.*, 2008; DOWD *et al.*, 2008) e sugerem que feridas colonizadas ou infectadas com biofilmes bacterianos possuem uma diversidade fisiológica e funcional dentro do arcabouço do biofilme, o que pode impactar na fisiopatologia das úlceras de diferentes etiologias. Os achados vêm alertar os profissionais da prática clínica para o gerenciamento sistemático do biofilme relacionado às diferentes etiologias das úlceras. As feridas desafiadas por biofilme de *P. aeruginosa* em camundongos diabéticos cicatrizaram com 2 a 4 semanas mais tarde do que as feridas não desafiadas de controle e mostraram 99% das bactérias do biofilme vivendo nas crostas que cobrem as feridas (ZHAO *et al.*, 2012).

Dowd e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo interessante dentro dessa perspectiva. Eles combinaram métodos moleculares (PRAPS, FRACS e PRADS) com métodos de cultura tradicionais (Gram, meios não selectivos, meios seletivos, meios

diferenciais e testes bioquímicos) para identificação dos principais microrganismos associados às feridas crônicas. Eles identificaram que *Staphylococcus spp.* e *Pseudomonas spp.* foram os organismos predominantes nesse tipo de feridas e concluíram que essa relação se deve, principalmente, à capacidade dessas bactérias de ser frequentemente isoladas em feridas crônicas e facilmente propagadas pelos métodos de cultura tradicionais nos ambientes de laboratórios. Outras espécies como *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter* e *Escherichia spp.* também foram fortemente associadas às feridas crônicas, entretanto *Acinetobacter* e *Escherichia spp.*, apesar de apresentarem cultura positiva, não foram identificadas por meio dos métodos moleculares empregados por esses autores (DOWD *et al.*, 2008).

Esses autores, de forma bastante específica, corroboram com a escolha da *Pseudomonas aeruginosa* para indução da infecção no modelo de feridas adotado na pesquisa. Essa bactéria destaca-se como um dos principais microrganismos bacterianos formadores de biofilmes e tem sido frequentemente observada em feridas crônicas como as úlceras da perna decorrentes do diabetes mellitus, por exemplo, estabelecendo infecção potente e persistente, secretando endotoxinas e fatores solúveis que provocam danos graves aos tecidos e inibem o processo de cicatrização de feridas (GOLDUFSKY *et al.*, 2015). Essas ações contribuem para a atração de mais células fagocitárias cuja atividade conjunta pode resultar em danos colaterais aos tecidos do hospedeiro (SCHNEIDER, 2007). Nessa perspectiva, alguns autores ressaltam que a virulência da *P. aeruginosa* é controlada por uma rede de sinalização altamente complexa envolvendo desde a resistência natural aos antimicrobianos à expressão de apêndices extracelulares (flagelo e pili), sistemas de secreção tipo III e tipo IV, produção de alginato, síntese de lipopolissacarídeo (LPS) e a síntese de exocompostos secretados, como proteases (por exemplo, elastases A e B), toxinas (LPS, piocianina, pioverdina), fenazinas, ramnolipídios, cianeto de hidrogênio (HCN) e quinolona, uma molécula de detecção de quórum (ALLESEN-HOLM *et al.*, 2006; ALVAREZ-ORTEGA; HARWOOD, 2007).

A virulência dos biofilmes está associada ao tipo de microrganismo envolvido em sua formação (GOLDUFSKY *et al.*, 2015). Incluem-se como principais mecanismos de virulência a ação como reservatório de células patogênicas para inoculação na circulação sanguínea, a liberação de quantidade excessiva de endotoxinas pelas células que as compõem, danos aos tecidos causados pela reação excessiva de componentes do sistema imunológico ao biofilme.

Além da disponibilização pelo biofilme de um nicho ecológico para a evolução de organismos resistentes a antibióticos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Nesse sentido, para a avaliação clínica do biofilme em feridas, alguns autores defendem a presença de critérios como a presença de uma película brilhante, translúcida e viscosa na superfície da ferida que não cicatriza (LENSELINK; ANDRIESSEN, 2011; HURLOW; BOWLER, 2012; METCALF; BOWLER; HURLOW, 2014), a presença de esfacelo (tecido necrótico frouxo e fluído) e material gelatinoso que se reconstrói rapidamente após seu rompimento e remoção, em contraste com o esfacelo de outros tecidos desvitalizados que demoram mais para se recompor (HURLOW; BOWLER, 2009; 2012; PHILLIPS *et al.*, 2010). Tais critérios foram considerados no presente estudo como ferramenta auxiliar na avaliação das características macroscópica das feridas. Entretanto, vale ressaltar que essa avaliação se realizada de forma isolada não é capaz de determinar a presença ou sequer a localização do biofilme nas feridas.

Em relação à variação do peso corporal ao longo dos dias, observou-se diferença significativa entre os grupos Pbs e Pa no tempo de 5 dias. Tal fato permite inferir que o trauma anestésico-cirúrgico em conjunto com alta carga bacteriana pode interferir no processo de cicatrização e recuperação ponderal, contribuindo para a cronicidade da ferida. Neste estudo, a diferença observada entre o percentual médio de perda ponderal foi de 9% ($\pm 0,71$ SEM) de perda de peso no grupo Pa contra 6% ($\pm 0,69$ SEM) no grupo Pbs, no 5º dia do seguimento experimental. Nos demais tempos avaliados, não houve diferenças significativas entre os grupos.

Um estudo no modelo de feridas infectadas em ratos diabéticos demonstrou que a perda ponderal média, no dia 28 do seguimento experimental, foi $10,1 \pm 4,1\%$ para o grupo controle e $14,3 \pm 2,1\%$ para o grupo infectado com biofilmes de *Pseudomonas*, embora essa diferença de peso não tenha sido estatisticamente significativa. Esses autores descrevem que os animais eram saudáveis e não apresentaram sinais de infecção sistêmica durante o estudo (ZHAO *et al.*, 2010). Em outro estudo, publicado dois anos mais tarde, por esses mesmos autores, constatou-se que os camundongos diabéticos com feridas desafiadas por biofilme de PAO1 infectados tiveram menor peso médio (com diferença estatística significativa) quando comparados aos animais do grupo controle. Apesar da variação do peso ter sido mais acentuada nos animais do grupo controle, não houve diferenças significativas entre os grupos. Na quarta semana, os animais do grupo infectado apresentaram 9,2% de variação ponderal

contra 7,7% dos animais do grupo controle, enquanto, na semana 8, os animais do grupo infectado atingiram 12,3% ponderal (ZHAO *et al.*, 2012).

O estudo de ZHAO *et al.* (2012) associou o aumento da área das feridas e a perda de peso acentuada quando as feridas foram inoculadas com uma alta carga bacteriana imediatamente após sua confecção, utilizando o modelo de indução de infecção por transferência de biofilmes. Entretanto, nesta pesquisa, identificou-se que o modelo de indução da infecção pontual foi menos agressivo para os animais cursando com menor taxa de mortalidade quando comparado ao modelo de transferência de biofilme empregado pelos referidos autores.

Além da deficiência nutricional, incluindo carência de vitaminas e proteínas, que dificulta a cicatrização de feridas, especialmente as crônicas, devido ao comprometimento do sistema imune e diminuição da qualidade e da síntese de tecido de reparação, é importante destacar a infecção. Esta faz parte do grupo de fatores gerais que permeiam e interferem no processo de cicatrização (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Dentre os fatores gerais mais associados à cicatrização de feridas, têm-se a infecção, caracterizada pela contagem bacteriana $> 10^5$ UFC/g de tecido ou pela presença de estreptococo B-hemolítico; a idade; o excesso de atividade do paciente, considerando que o repouso é essencial para o processo de cicatrização; oxigenação e perfusão dos tecidos; diabetes devido ao maior risco de isquemia tecidual; traumatismos; uso de medicamentos com destaque para os corticosteroides, quimioterápicos e radioterápicos; e o estado imunológico que resulta na deficiência de leucócitos, retardo da fagocitose e da apoptose celular durante o reparo tecidual das feridas (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Neste estudo, além da variação ponderal, verificou-se que os animais do grupo Pa apresentaram-se mais hipoativos e debilitados em relação aos animais do grupo Pbs, alterações identificadas pela ocorrência de posição curvada, com tremor intenso, baixa mobilidade, comportamento de higiene deficiente (presença de urina e fezes espalhadas em toda forração [maravalha] do microisolador) e presença de odor forte às trocas do curativo transparente.

Esses dados amparam a hipótese de que pacientes que apresentam infecção em ferida crônica podem cursar com perda ponderal persistente, uma vez que há aumento do metabolismo e relatos de inapetência. Entretanto, essa hipótese não está esclarecida e requer mais estudos para ser comprovada. E, como forma de implementar a investigação a esse respeito, sugere-se

que a avaliação sistemática da variação ponderal seja incluída nos processos de anamnese e cuidado dos pacientes com feridas crônicas, considerando que esses componentes estão diretamente relacionados ao processo de cicatrização e poderão ser associados aos exames laboratoriais mais comumente solicitados (albumina sérica, glicose sanguínea, hemograma completo) durante o controle e acompanhamento clínico dos pacientes inseridos nos serviços de saúde.

Alguns autores descrevem a cicatrização de feridas como um processo dinâmico e altamente regulamentado por mecanismos celulares, humorais e moleculares que começam logo após o ferimento e pode, esquematicamente, ser dividida em quatro etapas denominadas fase de resposta vascular, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; REINKE; SORG, 2012).

A resposta vascular engloba as fases de hemostasia e coagulação, ocorre imediatamente após a ferida e é completada em algumas horas. Sua principal função é dar início à cascata de coagulação, promovendo a formação do coágulo sanguíneo, considerado como uma matriz provisória, que auxiliará na migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais e servirá como um reservatório de fatores de crescimento (REINKE; SORG, 2012).

Na fase inflamatória, que tem duração média de três dias, ocorre a migração sequencial das células para a ferida por meio de mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da ferida. Os mediadores bioquímicos de curta ação (histamina e serotonina) e os de longa ação (leucotaxina, bradicinina e prostaglandina) atraem os neutrófilos e os monócitos. Esses últimos são os primeiros elementos a alcançar o local sítio da ferida, dando início ao processo de desbridamento da ferida e fagocitose de partículas antigênicas ou de microrganismos invasores (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; REINKE; SORG, 2012).

A fase proliferativa tem início por volta do 3º dia após a lesão e dura por 2 a 3 semanas, sendo composta pelas etapas de neoangiogênese, fibroplasia e epitelização. Essa fase caracteriza-se pela formação de tecido de granulação (início em torno do 3º dia), que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. A neoangiogênese é responsável pela nutrição do tecido e aporte de células, como macrófagos e fibroblastos, para o local da ferida. A fibroplasia tem início por volta do

terceiro dia com a chegada dos fibroblastos no sítio da ferida, dando início à síntese e deposição de fibras colágenas ainda na fase inflamatória. Por fim, na etapa de epitelização que ocorre nas primeiras 24 a 36 horas após a ferida, os fatores de crescimento epidérmicos estimulam a separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação dos queratinócitos. Essas células, por sua vez, são capazes de sintetizar diversas citocinas que induzem a contração e a neopitelização da ferida, reduzindo, assim, a sua superfície (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A fase de remodelamento das feridas ocorre a partir da 3ª semana após a ferida e pode durar até um ano após o trauma. A apoptose celular interrompe a formação do tecido de granulação e os componentes da matriz extracelular (MEC) sofrem alterações que irão favorecer a maturação das fibras de colágeno com aumento das ligações transversas e melhor alinhamento do colágeno ao longo das linhas de tensão. Ocorre também a interrupção dos processos angiogênicos e da atividade metabólica. Esses eventos culminam com o aumento da resistência e da força tênsil por meio da contração da ferida e redução da cicatriz em desenvolvimento (REINKE; SORG, 2012; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Nessa perspectiva, os resultados obtidos com quantificação global e diferencial de leucócitos demonstram que a fase inflamatória das feridas, neste estudo, apresentou-se de forma bastante clássica e sem diferenças estatisticamente significativas na comparação de ambos os grupos avaliados.

A avaliação global de leucócito no sangue periférico, assim como a composição de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, não apresentou diferenças significativas na avaliação entre os grupos Pbs e Pa. Todavia, percebeu-se que a contagem global de leucócitos no dia 0 (basal) foi em torno de $2,0 \times 10^7$, em ambos os grupos, e cursou com queda de aproximadamente 50% no número dessas células nos dias 5 e 7 do experimento, com recuperação do número dessas células superior a $3,0 \times 10^7$ no décimo dia do seguimento experimental. Essa queda no número de leucócitos totais no sangue periférico, nos dias 5 e 7, coincide com o período de maior carga bacteriana nas feridas (UFC/g de feridas) e com os piores escores de cicatrização das feridas observados durante os experimentos, sugerindo que não houve infecção em nível sistêmico, pois há um deslocamento dessas células para os tecidos.

A quantificação dos polimorfonucleares apresentou queda acentuada nos dias 3, 5 e 7 quando comparada ao nível sanguíneo basal (D0), seguida por um aumento expressivo no 10º dia do experimento. Entretanto, essa redução e esse aumento não foram estatisticamente significativos na comparação entre os dois grupos. Tal situação é esperada, uma vez que, na prática clínica, o pico de atividade dos polimorfonucleares ocorre nas primeiras 24 a 48 horas após o evento traumático (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Contudo, a ocorrência do maior aporte de macrófagos esperada entre o 3º e o 5º dia após a confecção e infecção das feridas (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008) só ocorreu no 10º dia, o que pode ser confirmado pelo maior aporte de monócitos (células precursoras dos macrófagos) no grupo Pa ($> 6,0 \times 10^6$ céls/mL), no 10º dia do seguimento experimental, quando comparado ao grupo Pbs ($\sim 4,0 \times 10^6$ céls/mL). Nos dias 0 e 3, os monócitos apresentaram número de células semelhantes ($< 2,0 \times 10^6$ céls/mL), seguido por uma redução do número de células superior a 50% nos dias 5 e 7, em ambos os grupos. Entretanto, essas diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

É conhecido que os biofilmes bacterianos maduros são capazes de modular a resposta imune dos hospedeiros por meio da redução ou inibição da fagocitose pelas células do sistema imune, da resistência antimicrobiana; produção e secreção de toxinas capazes de promover um microambiente hipóxico e inflamatório persistente na ferida (TRAN *et al.*, 2009; WOLCOTT; DOWD, 2011; PHILLIPS *et al.*, 2010; COOPER *et al.*, 2014). Algumas dessas características dos biofilmes maduros podem ser observadas, neste estudo, pela redução acentuada de monócitos nos dias 5 e 7, bem como pelo aumento da carga bacteriana e piora (estagnação) do processo de cicatrização nesse mesmo período. Tais condições suscitaram os seguintes questionamentos: a carga bacteriana empregada no estudo foi capaz de formar biofilme? O biofilme formado está modulando a resposta imune como descrito na literatura? A redução de monócitos observada está relacionada à redução da fagocitose em feridas infectadas por biofilmes? Entretanto, a investigação pormenorizada desses questionamentos não foi factível para o momento atual da pesquisa e será motivo de investigação nas próximas etapas deste estudo.

Por outro lado, quando os dois grupos foram comparados individualmente quanto ao número de monócitos ao longo do tempo, observaram-se diferenças no número de células com significância estatística no tempo de 5 e 7 dias para o grupo Pbs e em todas as marcações temporais avaliadas para o grupo Pa (3, 5, 7 e 10 dias) com valor de $p < 0,05$. Esse fato sugere

que nos animais do grupo Pa, apesar de não ter significância estatística, há uma mobilização mais acentuada dessas células ao longo dos dias do seguimento experimental quando comparada ao grupo Pbs.

Os neutrófilos se apresentaram com número de células abaixo de $5,0 \times 10^6$ até o dia 7. No 10º dia, houve aumento no número dessas células em níveis superiores a $1,0 \times 10^7$, enquanto os eosinófilos apresentaram um pico no número de células no dia 3, quando comparados ao nível basal (D0), atingindo número de células superior 500.000 céls/mL em ambos os grupos. A seguir, houve redução acentuada, em mais de 50%, nos dias 5, 7 e 10, respectivamente, em ambos os grupos.

As avaliações intergrupos demonstraram que a quantificação de basófilos no dia 3 foi inferior no grupo Pa e estatisticamente significativa quando comparada ao grupo Pbs ($p < 0,05$). Esse aumento foi seguido por uma queda abrupta no dia 5 em ambos os grupos e com recuperação em níveis levemente superior ao nível basal no 10º dia dos experimentos.

A quantificação das células mononucleares também cursou com redução do nº de células no sangue atingindo a menor proporção celular nos dias 5 e 7 do seguimento experimental. Em contrapartida, no 10º dia, houve aumento no nº dessas células em proporção quase dobrada (~50%) quando comparado ao nível basal dos animais (D0). Na avaliação intragrupos ao longo do tempo, ambos os grupos apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao dia 0 (nível basal).

Os linfócitos apresentaram uma queda acentuada nos dias 3, 5 e 7 quando comparados ao nível basal dos animais (D0). Todavia, houve recuperação dessas células no 10º dia próximo ao nível basal. Essas alterações não foram estatisticamente significativas.

Esses resultados diferem de outro estudo que avaliou a infecção de feridas por *P. aeruginosa* e identificou que a presença dessa bactéria causou respostas imunes locais e sistêmicas demonstradas por alterações na contagem de neutrófilos sistêmicos, histologia e atividade de mieloperoxidase (BRANDENBURG *et al.*, 2019).

Contudo, esses achados indicam que nas feridas agudas de camundongos saudáveis, mesmo considerando a carga bacteriana que foi aplicada nas feridas, eles conseguem debelar o processo inflamatório, impedindo a instalação da cronicidade. Entretanto, esse resultado não é confirmado para a avaliação das feridas dos pacientes atendidos nos diversos serviços de

saúde. A cronicidade dessas feridas, principalmente das úlceras venosas, está diretamente relacionada à persistência ou exacerbação da fase inflamatória (LIGI *et al.*, 2016). O excesso de carga bacteriana tem sido considerado uma das principais justificativas para o estado de cronicidade das feridas / úlceras cutâneas (SERRA *et al.*, 2017).

A avaliação das amostras por meio da MET não possibilitou a identificação do biofilme bacteriano. Outra ausência observada foi a presença de bactérias em sua forma planctônica. Essa metodologia também foi aplicada no estudo de Zhao *et al.* (2010) e os autores identificaram a presença do biofilme apenas na região da crosta das feridas em proporções quase 100 vezes superior ao resultado observado na cultura das feridas.

Em outro estudo, detectou-se a presença de *P. aeruginosa* enredada em uma matriz extracelular na superfície do modelo de ferida porcina (queimadura) por meio da microscopia eletrônica de varredura (BRANDENBURG *et al.*, 2019).

Um terceiro estudo se dedicou à indução e formação do biofilme em murinos (STOFFEL *et al.*, 2019). Os referidos autores descrevem uma carga de infecção e uma técnica de indução da infecção de forma bastante parecida com as técnicas empregadas para esta pesquisa e deixam a entender que o resultado positivo da cultura das feridas (UFC/mL) foi considerado como a comprovação de que o biofilme foi formado no leito das feridas. Na publicação desses resultados, não há informações que permitam verificar se houve e como foi realizada a identificação estrutural do biofilme (STOFFEL *et al.*, 2019). Tais condições sugerem a necessidade de revisão da técnica de preparação e processamento das amostras da ferida/pele para MET ou requerem a associação de outras técnicas auxiliares para a identificação ultraestrutural dos biofilmes.

Por outro lado, a avaliação das amostras por MET permitiu identificar algumas características nas estruturas celulares correspondentes à área das feridas, por exemplo, a presença de fibras colágenas, células do sistema imune, presença de nervos, vasos sanguíneos e células em processo de apoptose, por exemplo. Dentre essas características observadas, destacou-se a presença de fibras colágenas e de células contendo grânulos eletrodensos.

A deposição de fibras colágenas no grupo Pa apresentou-se de forma mais proeminente quando comparado ao grupo Pbs, o que pode ser confirmado pela presença de inúmeros fibroblastos dispersos no tecido e visualizado nas imagens da MET como feixes de fibras pouco eletrodensas (pontos brancos e brilhantes) distribuídos ao longo dos cortes do tecido.

Esses feixes de fibras apresentam-se desorganizados e com diferente orientação espacial, sendo observados nas imagens como posicionamento transversal ou longitudinal das fibras de colágeno. Espera-se que, entre o 3º e o 10º dia após o trauma, os fibroblastos sejam as células dominantes no tecido, visto que cumprem diferentes funções essenciais ao processo de cicatrização, tais como a síntese e a degradação de colágeno e a produção de substâncias da matriz extracelular, ou seja, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico (REINKE; SORG, 2012). A síntese de colágeno tipo III, inicialmente, é a principal responsável pela sustentação e força tênsil da cicatriz, sendo substituída ao longo de semanas pela formação de ligações cruzadas entre os feixes de colágeno. O equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno ocorre por volta de 4 semanas após o ferimento, dando início à fase de maturação dessas fibras, caracterizada pela substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, o que pode durar meses ou até anos (REINKE; SORG, 2012; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Outro achado foi a presença de células como fibroblastos, eosinófilos e neutrófilos com grânulos eletrodensos dispersos no citoplasma e células com vacúolos contendo esses grânulos bem delimitados dentro da estrutura dos vacúolos, sugerindo que as amostras avaliadas se encontravam na fase inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização. A presença desses grânulos mostrou-se mais proeminente no grupo Pa quando comparada ao grupo Pbs, entretanto não foram realizadas análises estatísticas desses achados em função do número reduzido de amostras avaliadas até a conclusão dessa etapa da pesquisa.

A presença de fibroblastos na matriz extracelular fornece um “andaime” para a aderência celular e regula/organiza o crescimento, o movimento e a diferenciação celular (REINKE; SORG, 2012). Além disso, a última fase da proliferação celular é caracterizada por uma alta densidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares e fibras de colágeno pouco organizadas, conhecido como tecido de granulação (REINKE; SORG, 2012).

As temáticas sobre a criação de modelo de biofilme, análise da presença e composição do biofilme, fatores predisponentes para a sua formação e avaliação de produtos, incluindo coberturas para ruptura do biofilme, fazem parte do escopo dos diferentes estudos consultados.

Os modelos de biofilme *in vivo* incluem feridas traumáticas, abrasões de pele, queimaduras, lacerações, feridas cirúrgicas e excisionais ou fraturas expostas, desenvolvidos em suínos,

coelhos, ratos e camundongos. Os microrganismos mais comumente estudados e associados à infecção de feridas são *S. aureus* e *P. aeruginosa* (LEBEAUX *et al.*, 2013). Esses dados corroboram para a escolha do modelo de ferida cutânea excisional realizado nesta investigação e amparam a escolha da *Pseudomonas aeruginosa* como fonte indutora do biofilme.

Lebeaux *et al.* (2013) consideram que, apesar das limitações dos modelos substitutivos de não mamíferos, *in vitro* e *in vivo*, eles continuam sendo amplamente utilizados e revelando informações importantes sobre a fisiologia e tratamento dos biofilmes. Todavia, há um forte questionamento na comunidade científica a respeito da multiplicidade dos modelos de feridas infectadas descritos nos últimos anos em função da irreprodutibilidade desses modelos no cotidiano das pesquisas (KILKENNY *et al.*, 2010; PERCIE du SERT *et al.*, 2020). Há enorme esforço, por parte dos pesquisadores, para a padronização de modelos, mas não há o cuidado de publicar o passo a passo que permita a reprodução dos mesmos de forma assertiva e econômica. Tal lacuna induz os novos pesquisadores ao erro, ao uso de recursos que poderiam ser evitados e, por fim, ao dispêndio do tempo envolvido nas idas e vindas dos processos de padronização de modelos experimentais.

As evidências mostram que a maioria das publicações em pesquisa experimental não inclui informações relevantes sobre os métodos de pesquisa utilizados e há erros e omissões no processo de redação dos resultados, levando a implicações científicas, éticas e econômicas para todo o processo de pesquisa. Na tentativa de melhorar a comunicação e os relatórios de pesquisa envolvendo animais, o Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (NC3Rs) publicou, em 2010, as diretrizes ARRIVE - Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (KILKENNY *et al.*, 2010; PERCIE du SERT *et al.*, 2020).

Essa diretriz foi publicada em 2010, no entanto não foi absorvida de prontidão pela comunidade científica. E, mais recentemente (em 2020), essa metodologia foi traduzida para vários idiomas, na tentativa de divulgar e expandir o uso dessa ferramenta entre os pesquisadores (PERCIE du SERT *et al.*, 2020). O ARRIVE tem funções semelhantes à declaração CONSORT e à declaração STROBE, publicadas em 2010 e 2007, respectivamente, e já amplamente difundidas na pesquisa clínica. Essas declarações têm como finalidade melhorar a publicação dos resultados dos ensaios clínicos randomizados de grupos

paralelos, enquanto a declaração STROBE visa ao fortalecimento do relatório de estudos observacionais em epidemiologia, por exemplo (MOHER *et al.*, 2010; ELM *et al.*, 2007).

Nesse sentido, o ARRIVE é composto por uma lista de verificação de informações a serem incluídas em um manuscrito e tem como principal função melhorar a escrita e a publicação dos relatórios de pesquisa experimental visando garantir a padronização da escrita científica, a reprodutibilidade da pesquisa experimental e, ainda, permitir que outros avaliem o rigor metodológico dos estudos, o quão confiáveis são os achados e possam repetir ou desenvolver o trabalho (KILKENNY *et al.*, 2010; PERCIE du SERT *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as publicações apresentam um crescente corpo de evidências sugerindo que biofilmes bacterianos representam um importante pilar na patogênese de feridas crônicas (GURJALA *et al.*, 2011), sinalizam ainda que as principais barreiras para a execução dos modelos de pesquisa *in vitro* incluem as falhas relacionadas à reprodução do ambiente do hospedeiro e as questões éticas que envolvem o uso de animais nas pesquisas *in vivo* (LEBEAUX *et al.*, 2013) em oposição a uma pequena quantidade de pesquisas clínicas.

Apesar de ser um assunto controverso, há variedade de métodos para a identificação, diagnósticos e avaliação da eficácia de tratamentos contra o biofilme microbiano (STOFFEL *et al.*, 2020). O que deveria ser um alento para os novos pesquisadores dessa temática acaba se tornando uma dificuldade, uma vez que os estudos avaliados demonstraram uma diversidade de metodologias empregadas para a indução e formação do biofilme. Todavia, esses estudos trazem pouca ou nenhuma descrição das etapas metodológicas executadas até a identificação do biofilme impedindo ou limitando a reprodução de forma precisa e pontual dos modelos de feridas crônicas ou infectadas com biofilme já publicados.

Nesse sentido, a validação de um modelo de feridas *in vivo* torna-se essencial para o entendimento do mecanismo de formação do biofilme e avaliação dos produtos mais utilizados para prevenção e manejo do mesmo na prática clínica.

Este estudo permitiu estabelecer a técnica de indução da infecção e a carga bacteriana segura para induzir a infecção local da ferida, mantendo o animal em segurança. Contudo, não foi possível a comprovação da presença de biofilme por meio da MET, tornando o modelo limitado para avaliação de produto na remoção de biofilme. A ausência de confirmação da presença do biofilme na ferida instiga os pesquisadores a prosseguir o estudo para novas adequações e ajustes. Ao se buscar respostas na literatura para explicar os achados, deparou-

se com outra limitação referente à escassez de publicações que abarquem a padronização dos modelos de feridas com biofilme. Tal fato pode retardar a construção de conhecimento robusto sobre a temática. Outra limitação observada na avaliação dos estudos *in vivo* no modelo animal se relaciona à ausência de discussão na literatura em torno da taxa de mortalidade dos animais após a infecção das feridas com microrganismos patogênicos.

Ao refletir os resultados obtidos neste estudo, tem-se como expectativas para a próxima fase da pesquisa a hipótese de avaliar a aplicação de um reforço da carga bacteriana para garantir a manutenção da infecção e/ou colonização das feridas pelo biofilme por um período de tempo maior a fim de implementar os testes de produtos empregados no tratamento das feridas infectadas com biofilme. Essa condição se mostra necessária, considerando que o modelo de feridas adotado, independente da carga bacteriana aplicada, conduz para o fechamento da ferida entre o 10º e o 14º dia após o trauma cirúrgico.

Outro ponto de reavaliação necessário é a técnica de preparo das amostras para MET. A técnica empregada nessa fase do estudo não foi capaz de identificar o biofilme nas feridas e, por se tratar de uma metodologia muito dispendiosa, em termos de tempo e de recursos financeiros, induz a reflexão, inclusive econômica, sobre as estratégias disponíveis para esse fim. Nesse sentido, a investigação pretende rever a técnica de fixação padrão empregada no preparo das amostras de pele nessa fase do estudo, tendo como meta buscar algum biomarcador que facilite a identificação das microcolônias de biofilmes na ferida, assim como admite a possibilidade de associar outras técnicas de preparo das amostras como as técnicas de crio-fixação e “rapid freezing”, técnicas de imuno-histoquímica e a microscopia de fluorescência, por exemplo, que possam favorecer a demarcação do sítio específico da ferida a ser avaliada por meio da MET.

Os dados dos estudos suscitam a necessidade de os profissionais refletirem sobre a prática clínica da enfermagem, considerando que o cuidado de enfermagem perpassa por ações que são fundamentadas no conhecimento científico, experiência profissional e pensamento crítico (SANTOS *et al.*, 2010). Em sua essência, o cuidado de enfermagem tem caráter interativo e dinâmico, entretanto essas características assumem outras perspectivas quando o cuidado de enfermagem é pensado e discutido cientificamente com um olhar diferenciado para as novas tendências e possibilidades de cuidar.

Nesse aspecto, cuidar transcende a ação de cuidado direto e imediato prestado às pessoas sob a orientação e responsabilidade da enfermagem. O cuidar, em sua máxima magnitude, pode assumir as mais diferentes oportunidades e possibilidades terapêuticas decorrentes do conhecimento técnico-científico já construído, assim como se torna uma poderosa ferramenta de investigação das lacunas do conhecimento envolvidas no contexto do cuidado e da assistência integral de enfermagem.

O cuidar em enfermagem, no âmbito do tratamento de feridas cutâneas, vem assumindo nos últimos anos esse papel investigativo da pesquisa translacional e tem como princípios fundamentais a busca de respostas que possam não só responder às lacunas do conhecimento, mas gerar conhecimentos que possam subsidiar, nortear e melhorar a prática clínica.

Além de estar inserido nesse contexto da pesquisa translacional, este trabalho assumiu os princípios investigativos dessa metodologia e buscou investigar as limitações do manejo e da gestão do biofilme em feridas, um problema recorrente na prática clínica assistencial (BJARNSHOLT, 2017; MISIC; GARDNER; GRICE, 2014) e ainda pouco esclarecido pela literatura que abarca essa temática.

Os biofilmes microbianos são reconhecidos, por toda comunidade científica, como causa da cronicidade de feridas (STOFFEL; KOHLER RIEDI; HADJ ROMDHANE, 2020) e retardo no processo de cicatrização e reparo tecidual de feridas (METCALF, BOWLER, HURLOW, 2014; HURLOW, BOWLER, 2012). Entretanto, a discussão sobre a avaliação, a identificação clínica do biofilme e os mais diversos tipos de tratamentos tópicos para a sua ruptura, erradicação e inibição de sua recomposição nas feridas (PERCIVAL *et al.*, 2017; PERCIVAL, 2018), apesar de controversa, tem sido frequente nas últimas décadas e aponta para diversas frentes de investigação desses microrganismos.

Essas diferentes frentes de investigação do biofilme ampliam o leque de possibilidades para o manejo e gerenciamento desses microrganismos e incluem as pesquisas de bancada nas modalidades *in vitro* e *in vivo*, como é caso deste estudo, assim como explora alternativas em busca de avanços na pesquisa clínica. Reitera-se que existem diferentes modalidades de pesquisa dentro dessa temática e, independentemente da metodologia adotada pelos pesquisadores, todos são corresponsáveis pela construção e elaboração do conhecimento sobre os biofilmes.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam que o modelo de ferida infectada proposto com carga bacteriana de 10^4 foi capaz de retardar o processo de cicatrização, simulando a colonização crítica em feridas excisionais de camundongos, além de ser seguro para garantir a sobrevivência dos animais ao longo do delineamento experimental.

A recuperação de *P. aeruginosa* no tecido das feridas, nos tempos de 5 e 7, quando associada ao retardo do processo de cicatrização nos animais no grupo intervenção (Pa) é um forte indicativo da colonização das feridas por *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, a avaliação por meio da MET não detectou a presença do biofilme ou de *Pseudomonas* em sua forma planctônica nas feridas investigadas. Tais achados confirmam a necessidade de prosseguimento deste estudo para ajustes no modelo de feridas infectadas com biofilme e aprimoramento das técnicas de detecção do mesmo.

REFERÊNCIAS

- AKERS, K. S., *et al.* Infectious Disease Clinical Research Program Trauma Infectious Disease Outcomes Study Group. Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: a case-control analysis. **BMC Infect Dis**, v. 8, n. 14, p. 190, 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-190.
- ALLESEN-HOLM, M., *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Mol. Microbiol**, v. 59, p. 1114–1128, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x.
- BAY, L., *et al.* Bacterial Aggregates Establish at the Edges of Acute Epidermal Wounds. **Adv Wound Care**, v. 7, n. 4, p. 105-13, 2018. DOI: 10.1089/wound.2017.0770.
- BIOKAR DIAGNOSTICS. Ágar Cetrimida. 2009. Disponível em: www.biokar-diagnostics.com. Acesso em: 20 de junho de 2018.
- BJARNSHOLT, T., *et al.* Management of wound biofilm Made Easy. **Wounds**, UK, v. 8, p. 1-6, 2017. Disponível em: <https://www.woundsinternational.com/resources/details/management-of-wound-biofilm-made-easy>. Acesso em: 20/10/2020.
- BJARNSHOLT, T., *et al.* Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 1, p. 2-10, 2008. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x.
- BORGES, E. L.; NASCIMENTO FILHO, H. M.; PIRES JÚNIOR, J. F. Prevalence of chronic wounds in a city of Minas Gerais (Brazil). **Rev Min Enferm**, v. 22, p: e-1143, 2018. DOI: 10.5935/1415-2762.20180074.
- BOWLER, P. G.; DAVIES, B. J. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. **Int J Dermatol**, v. 38, n. 8, p. 573-8, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-4362.1999.00738.x.
- BRANDENBURG, K. S., *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on wound dressings. **Wound Rep Reg**, v. 23, p. 842-54, 2015. DOI:10.1111/wrr.12365.
- BRANDENBURG, K., *et al.* Development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in partial-thickness burn wounds using a Sprague-Dawley rat model. **J Burn Care Res**, v. 40, n. 1, p. 44-57, 2019. DOI: 10.1093/jbcr/iry043.
- BROWN, V. I., LOWBURY, E. J. L. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 752-756, 1956. DOI: 10.1136/jcp.18.6.752.
- BURMOLLE, M., *et al.* Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 324 – 336, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x.

CANESSO, M. C. C., *et al.* Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **Journal of Immunology**, v.193, p. 5171-5180, 2014. DOI:10.4049/jimmunol.1400625.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Orientação Técnica, nº 12 de 08 de maio de 2018. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/orientacoes_tecnicas/OT-12.pdf. Acesso em: 20/08/2018.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_37_de_15022018.html. Acesso em: 20/08/2018.

COOPER, R. A., *et al.* Biofilms in wounds: a review of present knowledge. **Journal of Wound Care**, v. 23, n. 11, p. 570, 572-4, 576–80, 2014. DOI:10.12968/jowc.2014.23.11.570.

DAVIS, S. C., *et al.* Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. **Wound Repair Regen**, v, 16, n. 1, p. 23-9, 2008. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00303.x.

DAVIS, S. C., *et al.* Preclinical evaluation of a novel silver gelling fiber dressing on *Pseudomonas aeruginosa* in a porcine wound infection model. **Wound Repair Regen**, v. 27, n. 4, p. 360-65, 2019. DOI: 10.1111/wrr.12718.

DHALL, S., *et al.* A novel model of chronic wounds: importance of redox imbalance and biofilm-forming bacteria for establishment of chronicity. **PloS One**, v. 9, n. 10, 2014. e109848. DOI: 10.1371/journal.pone.0109848.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-510, 2002. DOI:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

DOWD, S.E., *et al.* Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. **BMC Microbiol**, v. 8, n. 43, p. 1-15, 2008. DOI: 10.1186/1471-2180-8-43

ELM, E. v., *et al.* STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **Ann Intern Med**. Oct, v. 147, n. 8, p. 573-7, 2007. DOI: 10.7326/0003-4819-147-8-200710160-00010.

FERREIRA, M. C., *et al.* Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Rev. Bras. Cir. Plást**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbcp/v26n4/a28.pdf>. Acesso em: 20/11/2020.

FERRER-SOLÀ, M., *et al.* Prevalencia de la heridas crónicas en una comarca de la provincia de Barcelona [Prevalence of chronic wounds in a county in the province of Barcelona (Spain)]. **Enferm Clin**, v. 19, n. 1, p. 4-10, 2009. DOI: 10.1016/j.enfcli.2008.10.005.

FURTADO, K. A. X., *et al.* Prevalence of acute and chronic wounds - with emphasis on pressure ulcers - in integrated continuing care units in Alentejo, Portugal. **Int Wound J**, v. 17, n. 4, p. 1002-1010, 2020. DOI: 10.1111/iwj.13364.

GAO, Z., *et al.* Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 8, p. 2927-32, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0607077104. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17293459; PMCID: PMC1815283.

GHASEMINEZHADA, S. M.; SHOJAOSADATIB, A. A.; MEYER, R. L. Ag/Fe₃O₄ nanocomposites penetrate and eradicate *S. aureus* biofilm in an in vitro chronic wound model. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 163, p. 192-200, 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.035

GIANINO, E.; MILLER, C.; GILMORE, J. Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. **Bioengineering**, v. 5, n. 3, p. 51, 2018. DOI: 10.3390/bioengineering5030051.

GRAY, T. A., *et al.* Opportunities for better value wound care: a multiservice, cross-sectional survey of complex wounds and their care in a UK community population. **BMJ Open**, v. 8, n. 3, e019440, 2018. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-019440.

GUOQI, W., *et al.* Negative pressure wound therapy reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* and enhances wound healing in a rabbit ear biofilm infection model. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1557-70, 2018. DOI: 10.1007/s10482-018-1045-5.

GURJALA, A. N., *et al.* Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. **Wound Rep Reg**, v. 19, p. 400-10, 2011. DOI:10.1111/j.1524-475X.2011.00690.x.

HAMDAN, S., *et al.* Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. **ACS Central Sci**, v. 3, n. 3, p. 163-75, 2017. DOI: 10.1021/acscentsci.6b00371.

HAN, A., *et al.* The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. **Wound Repair Regen**, v. 19, n. 5, p. 532-41, 2011. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2011.00720.x.

HASAN, N., *et al.* PEI/NONOates-doped PLGA nanoparticles for eradicating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in diabetic wounds via binding to the biofilm matrix. **Materials Science & Engineering C**, v. 103, p. 109741, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109741.

HOIBY, N., *et al.* ESCMID - guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. **Clin Microbiol Infect**, 1 Suppl., v. 1, 2015, p. S1-S25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.

HURLOW, J.; BOWLER, P. G. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series. **Ostomy Wound Manage**, v. 55, n. 4, p. 38-49, 2009. PMID: 19387095. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19387095/>. Acesso em: 20/11/2020.

HURLLOW, J.; BOWLER, P. G. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. **J Wound Care**, v. 21, n. 3, p. 109–114, 2012. DOI: 10.12968/jowc.2012.21.3.109.

JAMAL, M., *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc.** v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

JAMES, G. A., *et al.* Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen.** v. 16, p. 37-44, 2008. DOI: 10.1111 / j.1524-475X.2007.00321.x.

JOCKENHÖFER, F. *et al.* Aetiology, comorbidities and cofactors of chronic leg ulcers: retrospective evaluation of 1 000 patients from 10 specialised dermatological wound care centers in Germany. **Int Wound J**, v. 13, n. 5, p. 821-8, 2016. DOI: 10.1111/iwj.12387.

KANNO, E., *et al.* Reconsideration of iodine in wound irrigation: the effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **J Wound Care**, v. 25, n. 6, p. 335-9, 2016. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.6.335.

KARNA, S. L., *et al.* RNA-Seq transcriptomic responses of full-thickness dermal excision wounds to *Pseudomonas aeruginosa* acute and biofilm infection. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165312, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165312.

KILKENNY, C., *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol**, v. 8, n. e1000412, 2010. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.

KIM, J. H., *et al.* High Levels of Oxidative Stress Create a Microenvironment That Significantly Decreases the Diversity of the Microbiota in Diabetic Chronic Wounds and Promotes Biofilm Formation. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 259, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00259.

KROM, B. P.; OSKAM, J. Microbial biofilms and wound healing: an ecological hypothesis. **Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine**, v. 29, 1 suppl, p. 168–173, 2014. DOI:10.1177/0268355514528845.

KWIECIŃSKA-PIRÓG, J., *et al.* The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by *Proteus Mirabilis* strains isolated from chronic wounds infections. **Nat Prod Res**, v. 33, n. 22, p. 3293-97, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1470513.

LEBEAUX, D., *et al.* From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013. DOI:10.3390/pathogens2020288.

LENSELINK, E.; ANDRIESSEN, A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. **J Wound Care**, v. 20, n. 11, p. 534–539, 2011. DOI: 10.12968/jowc.2011.20.11.534.

LIGI, D., *et al.* Chronic venous disease - Part I: inflammatory biomarkers in wound healing. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1862, n.10, p.1964-1974, 2016, DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.07.018.

LINDLEY, L. E., *et al.* Biology and biomarkers for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 138, ss. 18–28, 2016. DOI: 10.1097 / PRS.0000000000002682.

MALONE, M., *et al.* The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. **J Wound Care**, v. 26, n. 1, p. 20-25, 2017. DOI: 10.12968/jowc.2017.26.1.20.

MALONE, M., *et al.* The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. **J Wound Care**, v. 26, n. 1, p. 20-25, 2017. DOI: 10.12968/jowc.2017.26.1.20. PMID: 28103163.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 893-916, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.

METCALF, D. G.; BOWLER, P. G.; HURLOW, J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. **J Wound Care**, v. 23, n. 3, 2014, p. 137–142. DOI: 10.12968/jowc.2014.23.3.137.

MISIC, A. M.; GARDNER, S. E.; GRICE, E. A. The Wound Microbiome: Modern Approaches to Examining the Role of Microorganisms in Impaired Chronic Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 502–510, 2014. DOI:10.1089/wound.2012.0397.

MOHER, D., *et al.* CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **BMJ**, v. 23, n. 40, p. 340. DOI: 10.1136/bmj.c869.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biol.** v. 5, n. 11, p. e307, 2007. DOI:10.1371/journal.pbio.0050307.

MORI, Y., *et al.* Effectiveness of biofilm-based wound care system on wound healing in chronic wounds. **Wound Rep Reg**, v. 27, p. 540-47, 2019. DOI:10.1111/wrr.12738.

MORRIS, C. Wound management and dressing selection. **Wound Essentials**, v. 1, p. 178-83, 2006. Disponível em: https://www.woundsinternational.com/uploads/resources/content_9364.pdf. Acesso em: 11/11/2020.

NGO, Q. D.; VICKERY, K.; DEVA, A. K. The effect of topical negative pressure on wound biofilms using an in vitro wound model. **Wound Rep Reg.** v. 20, n. 1, p. 83-90, 2012. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2011.00747.x.

PASTAR, I., *et al.* Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. Review. **Adv Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014. DOI: 10.1089/wound.2013.0473.

PASTAR, I., *et al.* Interactions of methicillin resistant Staphylococcus aureus USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56846, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056846.

PERCIE DU SERT, N., *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*, v. 18, n. 7, e3000411, 2020. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000411.

PERCIVAL, S. L. Restoring balance: biofilms and wound dressings. **J Wound Care**, v. 27, n. 2, p. 102-113, 2018. DOI: 10.12968/jowc.2018.27.2.102.

PERCIVAL, S. L., *et al.* Surfactants and their role in wound cleansing and biofilm management. **J Wound Care**, v. 26, n. 11, p. 680-690, 2017. DOI: 10.12968 / jowc.2017.26.11.680. PMID: 29131752.

PERCIVAL, S. L., *et al.* A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair Regen**, v. 20, n. 5, p. 647-57, 2012. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00836. x.

PHILLIPS, P. L., *et al.* Biofilms Made Easy. *Wounds International*. **Wounds**, v. 1, n. 3, 2010, p. 1-6. Acesso em: 20/11/2020. Disponível em: <https://www.woundsinternational.com/uploads/resources/6e7fffcdeef76d9d3e652be2854315a6.pdf>. Acesso: 15/05/2018.

PIRLAR, F. R., *et al.* Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. **PLoS One**, v. 15, n.16, p. e0235093, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0235093.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 283, n. 5409, p. 1837-39, 1999. DOI: 10.1126/science.283.5409.1837.

PRUDENT, E., *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization (fish) and peptide nucleic acid probe-based FISH for diagnosis of Q fever endocarditis and vascular infections. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 9, p. e00542-18, 2018. DOI: 10.1128/JCM.00542-18.

RAMOS-GALLARDO, G. Chronic wounds in burn injury: a case report on importance of biofilms. **World J Plast Surg**, v. 5, n. 2, p. 175-80, 2016. PMC5003954. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5003954/>. Acesso em: 10/09/2020.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012. DOI: 10.1159/000339613.

RIBEIRO, D. Gestão do cuidado a usuários com feridas crônicas na Atenção Básica. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 90, n. 28, 2019. DOI: 10.31011/reaid-2019-v.90-n.28-art.503.

SANTOS, I., *et al.* Fundamentos filosóficos e teóricos para novas concepções do cuidar em enfermagem: contribuição da sociopoética. **Rev Bras Enferm**, v. 63, n. 4, p. 644- 651, 2010. DOI: org/10.1590/S0034-71672010000400022.

SCHIERLE, C. F., *et al.* Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. **Wound Repair Regen**, v. 17, n. 3, p. 354-9, 2009. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00489.x.

SCHULTZ, G., *et al.* Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. **Wound Rep Reg**, v.25, p. 744-757, 2017. DOI: 10.1111/wrr.12590.

SERRA, M. B., *et al.* From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. **International Journal of Inflammation**, Epub 2017, 3406215, 2017. DOI: 10.1155/2017/3406215.

SETH, A. K., *et al.* Impact of a novel, antimicrobial dressing on in vivo, *Pseudomonas aeruginosa* wound biofilm: quantitative comparative analysis using a rabbit ear model. **Wound Rep Reg**, v. 22, n. 6, p. 712-9, 2014. DOI: 10.1111/wrr.12232.

SINGH, V. A.; BARBUL, A. Bacterial biofilms in wounds. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 1, 2008. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00349.x.

SMANIOTTO, P. H. S., *et al.* Systematization of dressings for clinical treatment of wounds. **Rev Bras Cir Plást**, v. 27, n. 4, p. 623-6, 2012. DOI: org/10.1590/S1983-51752012000400026.

STOFFEL, J. J.; RIEDI, P. L. K.; ROMDHANE, H. B. A multimodel regime for evaluating effectiveness of antimicrobial wound care products in microbial biofilms. **Wound Repair Regen**, v. 28, n. 4, p. 438-47, 2020. DOI: 10.1111/wrr.12806.

STOODLEY, P., *et al.* Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.

STREMPER, N., *et al.* Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, 2013, v. 8, e82240. DOI: 10.1371/journal.pone.0082240.

SULEMAN, L., *et al.* Use of internally validated *in vitro* biofilm models to assess antibiofilm performance of silver-containing gelling fibre dressings. **J Wound Care**, v. 29, n. 3, p. 154-161, 2020. DOI: 10.12968/jowc.2020.29.3.154.

TÁZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina: Ribeirão Preto**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v41i3p259-264.

TRAN, P. L., *et al.* Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 11, p. 3586-92, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02683-08.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (Brasil). Resolução nº 09, de 16 de abril de 2013. Comissão de ética no uso de animais – CEUA / UFMG. Belo Horizonte: 2013. Disponível em: <https://www2.ufmg.br/sods/content/search?SearchText=ceua+regimento>. Acesso em: 15/05/2018.

VIEIRA, C. P. B.; ARAUJO, T. M. E. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 52, e03415, 2018. DOI: 10.1590/s1980-220x2017051303415.

WEI, D., *et al.* Chronic wound biofilms: diagnosis and therapeutic strategies. **Chin Med J**, v. 132, n. 22, p. 2737-2744, 2019. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000523.

WOLCOTT, R.; DOWD, S. The role of biofilms: are we hitting the right target? **Plastic and Reconstructive Surgery**, 127, Suppl. 1, p. 28S–35S, 2011. DOI:10.1097/PRS.0b013e3181fca244.

WORLD UNION OF WOUND HEALING SOCIETIES (WUWHS). Florence Congress Position Document. Management of Biofilm. London: **Wounds International**, 2016.

YANG, Q., *et al.* Development of a novel ex vivo porcine skin explant model for the assessment of mature bacterial biofilms. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 5, p. 704-14, 2013. DOI: 10.1111/wrr.12074.

ZHAO, G., *et al.* Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: a model for the study of chronic wounds. **Wound Repair Regen**, v. 18, n. 5, p. 467-77, 2010. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2010.00608.x.

ZHAO, G., *et al.* Time course study of delayed wound healing in a biofilm-challenged diabetic mouse model. **Wound Repair Regen**, v. 20, n. 3, p. 342-52, 2012. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00793.x.

APÊNDICE A

Estudos selecionados com estratégias de busca nas bases de dados para revisão de literatura.

Categoria	Data/ Base	Proposta	Referência
In vitro	2012/ CINAHL	Modelo de biofilme <i>aeruginosa</i> foi desenvolvido para simular biofilmes de feridas. Curativo de pressão negativa tópico foi aplicado ao modelo e os efeitos do tratamento tópico curativo de pressão negativa nos biofilmes da ferida in vitro foram examinados usando técnica de contagem microbiológica quantitativa e estudos de imagem.	NGO Q. D.; VICKERY K.; DEVA A. K.. The effect of topical negative pressure on wound biofilms using an in vitro wound model. Wound Rep Reg. v.20, n.1, p.83-90, 2012. Doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00747.x
In vitro	2016/ SCOPUS	Apresentação da combinação de nanopartículas de Ag com Fe ₃ O ₄ na produção de nanocompósitos (NCs) de Ag / Fe ₃ O ₄ pode contornar problemas de penetração tecidual limitada e alta citotoxicidade da prata no tratamento de infecções de feridas, pois eles penetram e erradicam biofilmes na aplicação de um campo magnético.	GHASEMINEZHADA S. M., SHOJAOSADATIB A. A., MEYER R. L.. Ag/Fe ₃ O ₄ nanocomposites penetrate and eradicate S. aureus biofilm in an in vitro chronic wound model. Colloids Surf B Biointerfaces v.163, p.192-200, 2018. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.035
In vitro	2019/ SCOPUS	Investigação das propriedades antibacterianas do extrato etanólico de própolis (EEP) contra cepas de <i>P. mirabilis</i> isoladas de infecções crônicas de feridas e comparação de sua atividade biocida com antissépticos selecionados.	KWIECINSKA-PIRÓG J, <i>et al.</i> The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by <i>Proteus Mirabilis</i> strains isolated from chronic wounds infections. Nat Prod Res. v.33, n.22, p.3293-97, 2019. Doi: 10.1080/14786419.2018.1470513.
In vitro	2020/ SCOPUS	Avaliação da eficácia da tripsina, β-glucosidase, e enzimas DNase I na degradação de biofilmes de duas espécies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em um meio semelhante de a uma ferida.	PIRLAR <i>et al.</i> Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms in the wound-like medium. PLoS One. v.15, n.6, p.e0235093, 2020. Doi: 10.1371/journal.pone.0235093
In vivo – Animal	2010/ CINAHL	Criação de um modelo reprodutível de ferida crônica em camundongos diabéticos pela aplicação de biofilme bacteriano. Avaliação com culturas quantitativas e microscopia eletrônica de transmissão	ZHAO G, <i>et al.</i> Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm challenge: a model for the study of chronic wounds. Wound Repair Regen. v.18, n.5, p.467-77. 2010. Doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00608.x.
In vivo - Animal	2011/ CINAHL	Criação de modelo biofilme <i>Staphylococcus aureus</i> em orelha de coelho	GURJALA <i>et al.</i> Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. Wound Rep Reg. v.19, p.400-10, 2011. , DOI:10.1111/j.1524-475X.2011.00690.x
In vivo - Animal	2014/ CINAHL	Avaliação do impacto de cobertura antimicrobiana [AQUACEL Ag+ Hydrofiber Dressing, ConvaTec Ltd] em feridas em orelha de coelho infectadas por biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Contagens bacterianas ao longo do tempo revelou uma diminuição significativa carga no biofilme em 24 horas da aplicação da cobertura. Análise histológica e contagem de bactérias. Microscopia eletrônica de varredura foi usada para avaliação da gaze com biofilme	SETH <i>et al.</i> . Impact of a novel, antimicrobial dressing on in vivo, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> wound biofilm: quantitative comparative analysis using a rabbit ear model. Wound Rep Reg. v.22, p.712-19, 2014. DOI: 10.1111/wrr.12232
In vivo - Animal	2015/ SCOPUS	Proposição de modelo para a formação de biofilme de <i>P. Aeruginosa</i> em um curativo biológico disponível comercialmente (Biobrane) e avaliação da inibição de <i>Pseudomonas</i> na formação de biofilme aeruginosa pelo aminoácido triptofano em feridas de ratos (murinos). Avaliação incluiu microscopia eletrônica de varredura	BRANDENBURG <i>et al.</i> Inhibition of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation on wound dressings. Wound Rep Reg. v.23, p.842-54, 2015. Doi:10.1111/wrr.12365

Categoria	Data/ Base	Proposta	Referência
In vivo - Animal	2016/ SCOPUS	Avaliação da solução de PVP-I a 1% contra solução salina para determinar redução da contagem de bactérias nas feridas abertas criadas nas costas dos ratos Sprague Dawley inoculadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Análise histológica e a contagem de bactéria foram usadas. Espécimes foram visualizados em microscópio de fluorescência	KANNO <i>et al.</i> Reconsideration of iodine in wound irrigation: the effects on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation. J Wound Care . v.25, n.6, p.335-9, 2016. Doi: 10.12968/jowc.2016.25.6.335
In vivo - Animal	2016/ SCOPUS	Avaliação das mudanças transcriptômicas de feridas em orelhas de coelho à medida que se opõem à infecção <i>P. Aeruginosa</i> . Foi usado o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) para gerar transcriptomas porque quantifica as transcrições de forma eficaz e precisa, pode delinear os limites da transcrição e identifica novas espécies de RNAs pequenos ou não codificantes. As feridas cujos transcriptomas de RNA-Seq foram analisados também foram caracterizadas quanto à contagem bacteriana, morfologia do biofilme, e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), monócitos e macrófagos	KARNA SL, <i>et al.</i> RNA-Seq transcriptomic responses of full-thickness dermal excision wounds to pseudomonas aeruginosa acute and biofilm infection. PLoS One . v.11, n.10, p.e0165312, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0165312.
In vivo - Animal	2018/ CINAHL	Avaliação do efeito da pressão negativa (NP) na motilidade de <i>P. aeruginosa</i> [in vitro], e o efeito de terapia de pressão negativa em fatores de virulência e biofilmes de orelha de coelho [in vivo] A estrutura do biofilme foi estudada com microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Contagens de bactérias viáveis e parâmetros histológicos de cicatrização de feridas foram medidos.	GUOQI <i>et al.</i> Negative pressure wound therapy reduces the motility of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and enhances wound healing in a rabbit ear biofilm infection model. Antonie van Leeuwenhoek v.111, p.1557-70, 2018. Doi: 10.1007/s10482-018-1045-5
In vivo - Animal	2019/ CINAHL	Efeito da cobertura de fibra gelificante com prata usando modelo de biofilme de ferida espessura parcial em porco inoculadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27312. Microscópio Nikon Eclipse E800 foi usado para coleta de imagens digitais. Agregados bacterianos no biofilme da ferida foram detectados com base na sobreposição de um sinal específico da espécie (vermelho) e DNA (azul).	DAVIS SC, <i>et al.</i> Preclinical evaluation of a novel silver gelling fiber dressing on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in a porcine wound infection model. Wound Repair Regen . 2019 v.27, n.4, p.360-65, 2019, doi: 10.1111/wrr.12718.
In vivo - Animal	2019/ MEDLINE	Criação de modelo de biofilme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em queimadura feita no rato com análise das características do biofilme. Sangue e tecido foram coletados para hemograma completo, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), expressão do gene do biofilme, histologia, microscopia eletrônica de varredura e atividade da mieloperoxidase na escara de queimadura	BRANDENBURG <i>et al.</i> Development of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms in partial-thickness burn wounds using a Sprague-Dawley rat model. J Burn Care Res . v.40, n.1, p.44-57, 2019. Doi: 10.1093/jbcr/iry043.
In vivo - Animal	2019/ SCOPUS	Feridas com biofilme <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à <i>meticilina</i> (MRSA) em camundongos diabéticos. nanopartículas (NP) de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) como polímero formador de NP e polietilenimina / diazeniodiolato (PEI / NONOate) com capacidade de se ligar à matriz de biofilme são desenvolvidas para facilitar a entrega de óxido nítrico (NO) à ferida infectada por biofilme MRSA	HASAN <i>et al.</i> PEI/NONOates-doped PLGA nanoparticles for eradicating methicillinresistant <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm in diabetic wounds via binding to the biofilm matrix. Materials Science & Engineering C v.103, p. 109741, 2019. Doi: 10.1016/j.msec.2019.109741
In vivo - Animal	2020/ SCOPUS	Análise da hipótese que altos níveis de estresse oxidativo (OS) levam ao desenvolvimento de feridas crônicas, promovendo a colonização de bactérias formadoras de biofilme sobre bactérias comensais / benéficas no modelo de ratos diabéticos para feridas crônicas onde biofilmes patogênicos se desenvolvem naturalmente após a indução de alta OS imediatamente após o ferimento.	KIM <i>et al.</i> High levels of oxidative stress create a microenvironment that significantly decreases the diversity of the microbiota in diabetic chronic wounds and promotes biofilm formation. Front Cell Infect Microbiol . v.10, p.259, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00259

Categoria	Data/ Base	Proposta	Referência
In vivo - Animal	2020/ CINAHL	Produtos comerciais contendo os agentes antimicrobianos tópicos comumente usados: iodo, prata, polihexametileno biguanida, octenidina, ácido hipocloroso, cloreto de benzalcônio e um tópico à base de surfactante contendo poloxamer 188. Cinco diferentes modelos de biofilme in vitro de complexidade variada foram usados, incorporando vários patógenos bacterianos: Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Acinetobacter, Klebsiella e Enterobacter. Os fungos patógenos Candida albicans e Candida auris e alguns produtos foram avaliados no modelo in vivo (camundongo) de biofilme	STOFFEL JJ, KOHLER RIEDI PL, HADJ ROMDHANE B. A multimodel regime for evaluating effectiveness of antimicrobial wound care products in microbial biofilms. Wound Repair Regen. v.28, n.4, p.438-47, 2020. doi: 10.1111/wrr.12806
In vivo - Humano	2008/ MEDLIN E	Descrição da utilização da amplificação ribossomal parcial e pirosequenciamento (PRAPS) para observar o nível da diversidade microbiana em feridas crônicas, combinado com mais 2 métodos moleculares tradicionais; amplificação ribossômica completa, clonagem e sequenciamento Sanger (FRACS) e parcial amplificação ribossomal, eletroforese em gel de gradiente de densidade (DGGE) e sequenciamento Sanger (PRADS). Foram utilizadas para pesquisar as principais populações de bactérias que ocorrem nos biofilmes patogênicos de 03 tipos de feridas crônicas: úlceras de pé diabético, úlceras venosas e lesões por pressão	DOWD, S.E. et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. BMC Microbiol v.8, n.43, p.1-15, 2008. Doi: 10.1186/1471-2180-8-43
In vivo - Humano	2011/ CINAHL	Descrição abrangente das características microbianas de 15 feridas crônicas, pela amostra de tecido. Usado pirosequenciamento de alto rendimento e microscopia de epifluorescência.	HAN A, <i>et al.</i> The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. Wound Repair Regen. v.19, n.5, p.532-41, 2011. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00720.x.
In vivo - Humano	2014/ CINAHL	Caso-controle. Fatores de risco para formação de biofilme. Avaliação da produção de biofilmes bacterianos como um fator de risco potencial para infecções persistentes nas feridas de militares. As relações entre as cepas bacterianas de cada espécie individual foram avaliadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	AKERS KS, <i>et al.</i> ; Infectious Disease Clinical Research Program Trauma Infectious Disease Outcomes Study Group. Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: a case-control analysis. BMC Infect Dis. v.8, n.14, p.190. 2014. doi: 10.1186/1471-2334-14-190.
In vivo - Humano	2016/ MEDLIN E	Descrição de um caso de ferida crônica em paciente queimado, onde o biofilme é envolvido e atenção especial é dada à relação biofilme-ferida crônica em um paciente queimado. Ao remover o tecido de granulação foi possível diminuir a quantidade de biofilme, melhorar a condição e fazer outro procedimento para fechar a ferida como enxerto de pele. O estudo contou apenas com avaliação clínica.	RAMOS-GALLARDO G. Chronic wounds in burn injury: a case report on importance of biofilms. World J Plast Surg. v.5, n.2, p.175-180, 2016.
In vivo - Humano	2018/ CINAHL	Avaliação da composição e distribuição bacteriana em feridas epidérmicas agudas feitas em pele de pessoas saudáveis. A biópsia das feridas foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser	BAY <i>et al.</i> Bacterial Aggregates Establish at the Edges of Acute Epidermal Wounds. Adv Wound Care. v.7, n.4, p.105-13, 2018. Doi: 10.1089/wound.2017.0770
In vivo - Humano	2019/ CINAHL	Estudo transversal para examinar a proporção de remoção de biofilme por desbridamento ultrassônico em lesões por pressão [Estudo 1] e estudo de coorte retrospectivo para examinar a eficácia do sistema de tratamento de feridas com base em biofilme (BWCS) para a cura de feridas crônicas [Estudo 2].	MORI Y., <i>et al.</i> Effectiveness of biofilm-based wound care system on wound healing in chronic wounds. Wound Rep Reg v.27, p. 540-47, 2019. Doi:10.1111/wrr.12738

ANEXO A

Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG - Protocolo 87/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Eline Lima Borges,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA POLIHEXAMETILENO-BIGUANIDA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INFECTADAS E BIOFILMES PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM CAMUNDONGOS, submetido a esta comissão pelo protocolo 87 / 2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/08/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 18/08/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B

Declaração de transferência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* cepa ATCC 25853 pelo Professor Flaviano dos Santos Martins, coordenador do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Avenida Antonio Carlos, 6627, C.P. 488
Pampulha – Campus UFMG
31270-901 Belo Horizonte MG Brasil

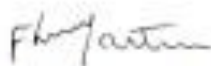
Belo Horizonte, 30 de novembro de 2020

Ref: Declaração de transferência de amostra biológica

Declaro, para os devidos fins, que transferi, em caráter de doação, uma alíquota da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 25853, que foi utilizada pela estudante **Gilmara Lopes Amorim**, sob orientação das professoras **Eline Lima Borges** (Escola de Enfermagem/UFMG) e **Luciôla da Silva Barcelos** (ICB/UFMG), para a realização de seu mestrado em Enfermagem pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Encontro-me disponível para quaisquer informações adicionais.

Atenciosamente,



Flaviano dos Santos Martins
Professor Associado
Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Tel.: (31) 3409-2738
E-mail: flaviano@icb.ufmg.br

ANEXO C

Fluxograma do processamento de amostras biológicas e inclusão em resina EPON padronizado e empregado neste estudo pelo Centro de Microscopia da UFMG.

