



Avaliação dos efeitos clínicos do uso de uma emulsão de sinvastatina tópica em pacientes com dermatite atópica: fase pré-clínica

Palavras-Chave: dermatite atópica, *Staphylococcus aureus*, sinvastatina.

Autoras:

Marina Martins da Lavra [Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp]

Profa. Dra. Andréa Fernandes Eloy da Costa França (orientadora) [Departamento de Clínica Médica. Disciplina de Dermatologia – Faculdade de Ciências médicas da Unicamp]

1. INTRODUÇÃO:

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por xerose, prurido e lesões eczematosas que seguem uma morfotopografia típica em cada faixa etária. A DA tem alta prevalência na infância e participa de uma progressão sequencial de condições alérgicas, a marcha atópica, da qual também participam a rinite alérgica e a asma. Sua fisiopatologia é multifatorial e não completamente elucidada, envolvendo fatores genéticos e ambientais.¹ O principal agente da microbiota cutânea envolvido na patogênese e na gravidade da DA é o *Staphylococcus aureus*.² Estudos indicam que as estatinas, fármacos amplamente usados na redução de lípidos séricos, exercem ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras, podendo ser utilizadas para a prevenção de doenças infecciosas.³ A sinvastatina, droga pertencente a essa classe de fármacos, mostrou-se capaz de inibir o crescimento do *S. aureus*, sugerindo um novo método de controle da DA.^{4,5} O presente estudo corresponde à fase pré-clínica de um ensaio clínico, randomizado, duplo cego, do tipo crossover, que pretende avaliar os efeitos uma emulsão tópica de sinvastatina em comparação com placebo sobre o crescimento bacteriano de *S aureus* em uma coorte de pacientes com dermatite atópica.

2. OBJETIVOS:

- 2.1. **Objetivo geral:** promover o crescimento e o isolamento do *S. aureus* a partir de lesões de pele de pacientes com DA seguindo as orientações já preconizadas na literatura.

- 2.2. **Objetivos específicos:** a) padronização da coleta de material a partir da pele de pacientes com DA; b) padronização da metodologia para isolamento do *S.aureus* a partir de amostras de pele de pacientes com DA.

3. METODOLOGIA:

O presente trabalho corresponde à fase pré-clínica de um estudo desenvolvido em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp, como parte de um projeto de Doutorado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp sob o número 36550820.6.0000.5404.

O projeto em sua magnitude é um ensaio clínico, randomizado, duplo cego, do tipo crossover, a ser realizado em 40 pacientes com o diagnóstico de DA atendidos no ambulatório de dermatologia do HC Unicamp, que pretende avaliar a inibição do crescimento in vivo de *S aureus* e a melhora clínica das lesões de pele por uma formulação tópica com sinvastatina 1%.

3.1. Coleta de amostra para isolamento de *S. aureus* da pele de pacientes com DA

Para a tentativa de isolamento do *S. aureus* da microbiota da pele, foram selecionados pacientes para uma pré-avaliação, diagnosticados com DA segundo os critérios de Hanifin e Rajka, sob a supervisão de uma médica responsável, que também selecionou a área para realização da coleta. Para a coleta do material biológico, foi utilizado um swab de algodão previamente molhado em: a) NaCl 0.9%, b) NaCl 0,9% + tween 0,1% e c) meio AIMES (COPAN, Itália). Os swabs foram esfregados na pele lesional em uma área de 4cm² por 10 vezes girando 360°.

Após a coleta, os swabs foram cortados com uma tesoura e vortexados por 1 minuto e uma alíquota de 30 µL foi semeada em placas de petri contendo: a) meio manitol, b) meio TSA (Tryptic Soy Agar) e c) ágar sangue e, posteriormente, incubadas por até 48h em aerobiose à 37°C. As colônias obtidas foram isoladas para identificação do *S aureus* a partir dos seguintes testes:

- a) Método de Fermentação do manitol: cada cepa foi semeada em placas de ágar com sal de manitol (Scott). Uma zona amarela de qualquer tamanho ao redor das colônias após 48 h de incubação aeróbia foi considerada uma reação positiva.⁶
- b) Teste de DNase: cada cepa foi semeada em DNase meio ágar (Scott). Após incubação a 37° C por 48 h, as placas foram inundadas com uma solução de HCl. Uma zona de clara ao redor das colônias foi considerada uma indicação da produção de DNase.⁶
- c) Teste da hemólise: as colônias selecionadas foram semeadas em meio ágar sangue para a verificação visual da hemólise característica de espécie *Staphylococcus aureus*.⁶
- d) Teste da catalase: as colônias selecionadas foram colocadas em uma Lâmina de vidro e foram adicionados 10µ de peróxido de hidrogênio e em seguida foi verificado a formação de bolhas de oxigênio (reação positiva que identifica o gênero *Staphylococcus*).⁶

4. RESULTADOS

Para padronizar a melhor solução de transporte do material coletado e validar a técnica para crescimento e isolamento de *S aureus* na fase pré-clínica, foram selecionados 7 pacientes com lesões cutâneas de DA, cujas características estão descritas no quadro 1.

Pacientes	Gênero	Idade	Área da lesão
1	Masculino	10 anos	Fossa antecubital
2	Masculino	8 anos	Fossa poplíteia
3	Masculino	32anos	Fossa poplíteia
4	Feminino	15 anos	Fossa antecubital
5	Feminino	37 anos	Fossa antecubital
6	Feminino	21 anos	Dorso das mãos
7	Masculino	10 anos	Pés

Foram testados 3 meios de transporte após coleta do material, posteriormente semeados em meios diferentes e analisados quanto à formação das unidades formadoras de colônia/ml, conforme descrito nas tabelas 1, 2 e 3:

Tabela 1. Culturas a partir do meio Tween

solução Tween + salina em TSA Pacientes	UFC/mL
5	16666,667
6	11666,667
4	20000
7	1666,6667

solução Tween + salina em manitol Pacientes	UFC/mL
5	20000
6	66666,667
4	33333,333
7	66666,667

Solução Tween + Salina em ágar sangue Pacientes	UFC/mL
5	26666,667
6	66666,667
4	33333,333
7	33333,333

Tabela 3. Culturas a partir de solução salina 0,9%

Solução salina 0,9% em ágar sangue Pacientes	UFC/mL
2	6666,66667
1	4000
3	3966,66667

Tabela 2. Culturas a partir do meio AIMES

Meio AIMES em TSA Pacientes	UFC/mL
5	33,333333
6	6666,6667
4	23333,333
7	433,33333

Meio AIMES em ágar-sangue Pacientes	UFC/mL
5	13333,333
6	6666,6667
4	33333,333
7	20000

Meio AIMES em manitol Pacientes	UFC/mL
5	33,333333
6	6666,6667
4	20000
7	433,33333

Solução salina 0,9% em manitol Pacientes	UFC/mL
2	2333,333333
1	2666,66667
3	1400

Solução salina 0,9% em TSA Pacientes	UFC/mL
2	4333,333333
1	2666,66667
3	3966,66667

A solução de transporte tween + salina, foi a condição mais adequada para o crescimento bacteriano em todos os meios de cultura testados.

Quanto aos testes para a identificação de *S. aureus* nas culturas, apenas a amostra da paciente 6 não apresentou fermentação do manitol indicado pela mudança de coloração de vermelho para amarelo. Em todas as outras amostras de pacientes houve mudança de coloração, indicativo de *Staphylococcus* (figura 1a).

Foi observado halo transparente em torno das colônias no teste da DNase (figura 1b).

Em algumas amostras semeadas em ágar sangue, foi observado hemólise total o que caracteriza a espécie *S. aureus* e em alguns casos não houve formação de hemólise (figura 1c e 1d).

Todas as amostras foram positivas para a catalase, indicando gênero *Staphylococcus* (figura 1e).

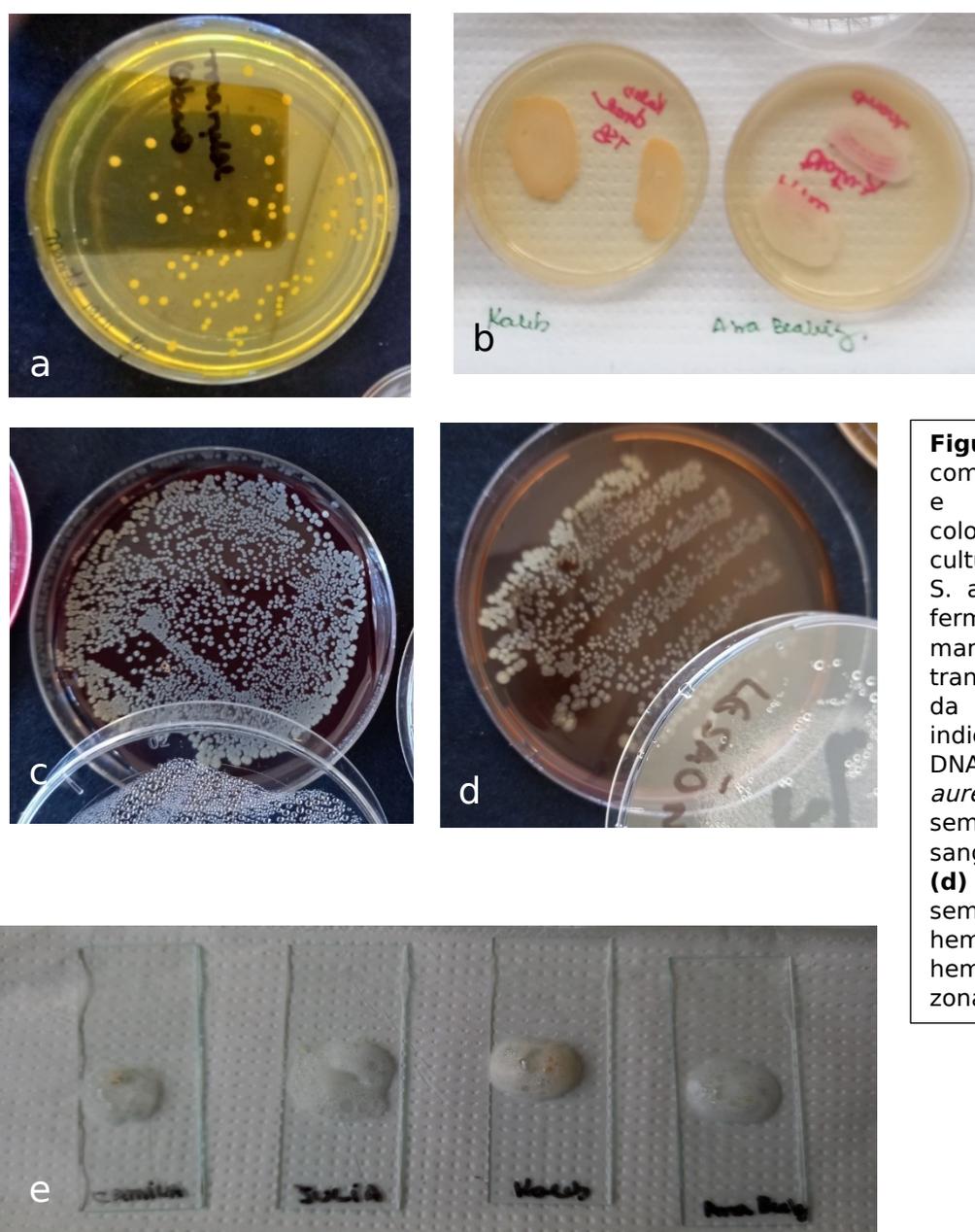


Figura 1. (a) Placas com colônias amarelas e mudança de coloração do meio de cultura e indicativo de *S. aureus* no teste de fermentação do manitol; (b) Zona transparente no local da sementeira indicando atividade da DNase, indicação de *S. aureus*; (c) amostras semeadas em ágar sangue sem hemólise; (d) amostras semeadas com hemólise completa das hemácias formando zona transparente ao

5. DISCUSSÃO:

Antes do início da pesquisa clínica propriamente dita, a elaboração da formulação com simvastatina pela Faculdade de Farmácia da Unicamp, concomitante à padronização da coleta de material biológico e isolamento do *S aureus*, foram ações desenvolvidas ao longo de 2021. A coleta de material biológico foi dificultada pois o fluxo de pacientes aos ambulatórios do HC Unicamp ainda estava diminuído durante a padronização.

Realizamos uma pesquisa sobre a melhor técnica para a coleta de material biológico a partir das lesões cutâneas, em que foram considerados a curetagem das lesões ou o swab, na tentativa de obter maior quantidade de material para a semeadura de *S aureus*. Não houve diferença na obtenção do *S aureus* entre as técnicas, sendo que a curetagem pode trazer algum desconforto ao paciente, em especial em lesões de pele com barreira cutânea rompida. Sendo assim, optamos pela escolha do swab para a coleta de material a partir da pele de pacientes com DA.

Outros métodos de identificação de *S aureus* serão ainda realizados durante a condução do estudo clínico, entre eles o teste da coagulase em tubo e o teste da meticilina. Também está previsto a realização e PCR para identificação genética e quantificação das espécies bacterianas presentes.

Na DA ocorre um desequilíbrio na microbiota cutânea, em especial na área lesionada, com predomínio do *S aureus* sobre outras espécies de estafilococos, em especial o *S epidermidis*. Os tratamentos atualmente disponíveis, com exceção dos antibióticos tópicos e sistêmicos, não atuam especificamente nesse fator etiopatogênico da doença.

6. CONCLUSÕES:

O isolamento do *S. aures* foi alcançado a partir das técnicas utilizadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):1.
- 2- Geoghegan JA, Irvine AD, Foster TJ. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. Trends Microbiol. 2018;26(6):484-497. doi:10.1016/j.tim.2017.11.008
- 3- Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MF, et al. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. Sci Rep. 2015; 5:16407.
- 4- Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC, Schwartz-Filho HO, de Andrade ED, Groppo FC, et al. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against Staphylococcus aureus Biofilm. PLoS One. 2015;10(5):e0128098.
- 5- Wang CC, Yang PW, Yang SF, Hsieh KP, Tseng SP, Lin YC. Topical simvastatin promotes healing of Staphylococcus aureus-contaminated cutaneous wounds. Int Wound J. 2016;13(6):1150-7.
- 6- Notarnicola SM, Zamarchi GR, Onderdonk AB. Misidentification of mucoid variants of Staphylococcus aureus by standard laboratory techniques. J Clin Microbiol. 1985 Sep;22(3):459-61. doi: 10.1128/jcm.22.3.459-461.1985. PMID: 3930566; PMCID: PMC268436.