



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIKA CRISTIANE MAYUMI MIMURA

**NÍVEIS SÉRICOS DE PRATA ENCONTRADOS EM
PACIENTES QUEIMADOS E AVALIAÇÃO DE SUA
TOXICIDADE EM CULTURA DE LEUCÓCITOS DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Londrina
2016

ERIKA CRISTIANE MAYUMI MIMURA

**NÍVEIS SÉRICOS DE PRATA ENCONTRADOS EM
PACIENTES QUEIMADOS E AVALIAÇÃO DE SUA
TOXICIDADE EM CULTURA DE LEUCÓCITOS DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho

Londrina
2016

ERIKA CRISTIANE MAYUMI MIMURA

**NÍVEIS SÉRICOS DE PRATA ENCONTRADOS EM PACIENTES
QUEIMADOS E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE EM CULTURA DE
LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa.Dra. Maria Josefa Santos Yabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.Dr. Olavo Franco Ferreira Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.Dr. Vinícius Daher Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.Dr. Tiago Severo Peixe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de maio de 2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mimura, Erika Cristiane Mayumi.

Níveis séricos de prata encontrados em pacientes queimados e avaliação de sua toxicidade em cultura de leucócitos de indivíduos saudáveis / Erika Cristiane Mayumi Mimura. - Londrina, 2016.
73 f.

Orientador: Alexandre José Faria Carrilho.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.
Inclui bibliografia.

1. queimados - Teses. 2. sulfadiazina de prata - Teses. 3. cultura de células - Teses. 4. toxicidade - Teses. I. Carrilho, Alexandre José Faria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

“Vós sois a luz do mundo; não se pode esconder uma cidade edificada sobre um monte;

Nem se acende a candeia e se coloca debaixo do alqueire, mas no velador, e dá luz a todos que estão na casa.

Assim resplandeça a vossa luz diante dos homens, para que vejam as vossas boas obras e glorifiquem a vosso Pai, que está nos céus”.

[Mateus 5:14-16](#)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Sidnei, por me acompanhar em mais esta jornada,

Aos meus filhos Rodrigo e Alexandre, amores da minha vida,

por fazerem TUDO VALER A PENA...

Ao Paciente Queimado

Que se encontrou com a dor por um acidente,

Que foi vítima de alguém,

Ou vítima de si mesmo,

Que experimentou os piores sofrimentos, indecifráveis à condição humana...

Que viu nas cicatrizes, a esperança de poder prosseguir...

Que nos transforma em seres tão pequenos, frente às suas lutas...

Muito obrigada!

Por me ensinar a valorizar a vida, e cada segundo...

Por me permitir compreender o significado de ter corpo e mente saudáveis,

Por me fazer querer ser uma pessoa melhor, a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de mais esta jornada, pelos desafios vencidos, pelas lições aprendidas, por me lembrar que o amor, a fé e a esperança necessitam ser conquistados diariamente.

Aos meus pais José e Ana Maria, por me ensinarem que os maiores tesouros são os que ninguém pode nos tomar... o conhecimento e as virtudes da alma.

Os meus irmãos, Erikson e Erik, parceiros de boas lembranças.

A minha sobrinha-filha Bárbara, “sol da nossa praia”.

Ao Professor Doutor Alexandre José Faria Carrilho, por toda dedicação, paciência, conhecimento técnico e científico, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Doutor Décio Sabatini Barbosa, por sua contribuição técnica, pela sua incrível capacidade de simplificar as dificuldades e buscar soluções, pela sua postura, pela sua amizade e pelo seu exemplo como profissional e mestre.

Ao Professor Doutor Tiago Severo Peixe pelas suas preciosas contribuições que viabilizaram estrategicamente e tornaram realidade a dosagem da prata sérica.

À Professora Doutora Maria Josefa Santos Yabe pela gentileza com que nos recebeu e acolheu, pela disponibilidade e entusiasmo para realização deste trabalho, além da enorme contribuição com o tratamento estatístico dos dados.

À Professora Maria Emília Favero, pela sua capacidade de enfrentar todos os desafios e as necessidades de desenvolver novas metodologias, pela sua amizade, seu bom ânimo e coragem, sem os quais as dificuldades não seriam superadas.

A todos os funcionários do Centro de Tratamento de Queimados do Hospital Universitário da UEL: enfermeiros, técnicos de enfermagem, fisioterapeutas, técnicos administrativos, auxiliares de serviços gerais, demais colegas médicos, pelas lutas de todos os dias, pelas lições que aprendemos, pelos sofrimentos que partilhamos... Pela atenção, colaboração e apoio fundamentais durante todo o período de coleta de dados.

A Elza Hiromi T. Anami, enfermeira chefe do Centro de Tratamento de Queimados do Hospital Universitário da UEL, por seus exemplos de retidão e responsabilidade, pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio nos momentos mais difíceis...

À enfermeira Márcia Bernadete Camuci, por ter iniciado todo o questionamento sobre a toxicidade da prata, que nos fez buscar respostas e desenvolver todo este trabalho.

A fisioterapeuta Andrea Akemi Morita, pelas contribuições com a análise estatística.

Aos integrantes do Laboratório de Pós Graduação em Ciências da Saúde, que não mediram esforços e empenho, utilizando seu tempo precioso, seus conhecimentos e boa vontade e assim contribuíram sobremaneira para a realização deste trabalho: Kamila Landucci Bonifácio, Denise Duarte Santiago, Carine Coneglian de Farias, Alissana Ester Iakimiu de Camargo, Luciana Higachi, Camila Franciele de Souza.

Aos funcionários do Laboratório de Toxicologia do Hospital Universitário da UEL, Adolfo Luiz e Cláudia Leiser.

Ao aluno de graduação em Medicina, João Paulo Favoreto, pela sua dedicação durante o período de coleta da prata sérica e pelo seu apoio incondicional nos períodos difíceis.

Aos técnicos de Laboratório, que nos permitiram obter as amostras de sangue utilizadas neste trabalho: Eliane Oliveira Patrocínio, Alex Barbosa Alves, Vanderlisio Beraldo, José Carlos Caetano, Francisco Carlos Mendes Alves, Jair Roberto Gelinsk, Neide Aparecida Sgarbossa Martins, Nilson de Mello Colluco, Benedito dos Santos, Maria Alice Galvão Ribeiro, Ademir José da Silva, Antônio Carlos Fernandes, Emilio Ferreira da Silva, Sidney Cesar dos Santos, Ivone Aparecida Maynardes da Silva.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital Universitário da UEL.

Aos meus amigos amados que me acompanham na caminhada, mesmo os que estão distantes, mas que moram no meu coração e torcem pelas lutas da minha vida...

Aos meus “alunos-filhos”, os que já cresceram e os que ainda são... Alguns de vocês são grandes mestres... Eu sou muito grata por tudo que aprendo com vocês, pelos desafios que enfrentamos juntos e pelo prazer da caminhada.

A todos os que contribuíram de alguma forma para a realização este trabalho...

Muito obrigada!!!

MIMURA, Erika Cristiane Mayumi. **Níveis séricos de prata encontrados em pacientes queimados e a avaliação de sua toxicidade em cultura de leucócitos de indivíduos saudáveis**. 2016. 78f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A sulfadiazina de prata 1% (SSD) é utilizada no tratamento dos pacientes queimados há aproximadamente 50 anos. A absorção sistêmica ocorre nas primeiras horas após a utilização da SSD. Trabalhos descrevem a toxicidade da SSD em culturas de células, utilizando valores arbitrários de concentração de prata. **Objetivos:** 1) Determinar os níveis séricos de prata (Ag^{1+}) em pacientes queimados tratados com sulfadiazina de prata; 2) avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas em cultura de células (monócitos e polimorfonucleares) expostos a concentrações de prata semelhantes às encontradas nos pacientes queimados. **Materiais e Métodos:** Fase I (dosagem de prata sérica): coletadas amostras de sangue dos pacientes no momento de sua admissão no Centro de Tratamento de Queimados e posteriormente, nos dias 3, 5, 10 e 30 respectivamente. A quantificação de prata (Ag^{1+}) foi realizada utilizando espectrometria de massas. Fase II : avaliação da toxicidade da prata em cultura de células mononucleares e polimorfonucleares. Valores de prata adicionados à cultura de células foram estimados baseados nos níveis séricos encontrados nos pacientes queimados,,: zero - controle; 1,3 $\mu g L^{-1}$; 8,5 $\mu g L^{-1}$; 19,5 $\mu g L^{-1}$; 39 $\mu g L^{-1}$; 78 $\mu g L^{-1}$; 195 $\mu g L^{-1}$ e 260 $\mu g L^{-1}$. Viabilidade, apoptose celular e produção de espécies reativas de oxigênio foram avaliadas por citometria de fluxo. Quantificação de interleucinas foi determinada pelo método *Cytometric Bead Array* . **Resultados:** Foram avaliados 20 pacientes (19 do sexo masculino e 1 paciente do sexo feminino), com idade média de 33 anos e média de superfície corporal queimada de 27,68%. Houve uma correlação entre os níveis de prata atingidos no terceiro dia e a superfície corporal queimada ($r = 0,5457$ e $p = 0,0128$). A média dos valores séricos da prata aumentou 3,4 vezes entre o terceiro e o primeiro dia, e 5,5 vezes entre o quinto e o primeiro dia. Foi realizada comparação entre os valores séricos de Ag^{1+} dos pacientes em relação à média dos valores encontrados em indivíduos não expostos, chegando a 100 a 130 vezes no D3, quase 300 vezes no D5 e 500 vezes no D10. A presença de íons Ag^{1+} nos meios de cultura não alterou a viabilidade nem a apoptose das células, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p = 0,4813$ e $0,4179$ respectivamente). A produção de espécies reativas de oxigênio pelos polimorfonucleares diminuiu, à medida que a concentração de prata aumentou nos meios de cultura ($r = - 0,9846$ e $p = 0,0046$). Houve correlação positiva entre a produção de IL6 e IL1 e o aumento na concentração de prata ($p = 0,072$ e $r = 0,8810$, e $p = 0,02$ e $r = 0,8571$ respectivamente). **Conclusão:** Esses achados sugerem os íons de prata possam contribuir para a manutenção de um estado pró-inflamatório deletério, diminuindo um mecanismo de defesa primária (*burst* respiratório) e favorecendo a manutenção de IL-1 e IL-6 elevadas, podendo contribuir para os desfechos negativos decorrentes da queimadura.

Palavras-chave: Queimados. Sulfadiazina de prata. Cultura de células. Toxicidade. *Burst* respiratório. Interleucinas.

MIMURA, Erika Cristiane Mayumi. **Serum silver levels found in burned patients and the evaluation of their toxicity in leukocytes culture of healthy individuals.** Thesis (Doctorate in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

One percent silver sulfadiazine (SSD) is used in the treatment of burn patients over the last 50 years. Systemic absorption occurs within hours following the use of SSD. Studies describe SSD toxicity in cell cultures, using arbitrary values of silver concentration. Objectives: 1) Quantitation of silver serum levels in burned patients treated with SSD; 2) to evaluate the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokines in cell culture (monocytes and polymorphonuclear cells) exposed to silver concentrations similar to those found in burn patients. Materials and Methods: Phase I (serum silver dosage): patient blood samples were collected at the time of admission to the Burn Treatment Center and then, on days 3, 5, 10 and 30 (D1, D3, D5, D10 and D30 respectively). The quantitation of silver (Ag^{1+}) was carried out using mass spectrometry. Phase II: Evaluation of silver toxicity in cell culture (mononuclears and polymorphonuclear). Silver added to the cell culture was estimated based on silver serum levels found in burn patients: zero (control) ; 1.3 ug L^{-1} ; 8.5 ug L^{-1} ; 19.5 ug L^{-1} ; 39 ug L^{-1} ; 78 ug L^{-1} ; 195 ug L^{-1} 260 ug L^{-1} . Viability, cell apoptosis and ROS production were evaluated by flow cytometry. Interleukins quantitation were determined by Cytometric Bead Array method. Results: twenty patients (19 males and 1 female patient) were eligible with a mean age of 33 years and mean burn body surface area of 27.68%. There was a correlation between silver levels achieved on the third day and the burned body surface area ($r = 0.5457$ and $p = 0.0128$). Mean silver serum levels increased by 3.4 times between the first and the third day and 5.5 times between the first and fifth day. Patients' Ag^{1+} serum levels were compared to the mean values found in unexposed individuals, reaching 100 to 130 times in D3, almost 300 times in the D5 and 500 times in the D10. The presence of Ag^{1+} ions in the culture media did not affect the viability nor apoptosis of cells, with no statistically significant difference ($p = 0.4813$ and 0.4179 respectively). Polymorphonuclears production of ROS decreased, as silver concentration raised in the culture media ($r = - 0.9846$ and $p = 0.0046$). There was a positive correlation between IL1 and IL6 production and silver concentration ($p = 0.072$ and $r = 0.8810$, and $p = 0.02$ and $r = 0.8571$ respectively). Conclusion: These findings suggest that silver ions could contribute to the maintenance of a deleterious pro-inflammatory state, decreasing one primary defense mechanism (respiratory burst) and favoring the maintenance of IL-1 and IL-6 at high levels, contributing to the negative outcomes after burns.

Keywords: Burns. Silver sulfadiazine. Cell culture. Toxicity. Respiratory burst. Interleukins.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros operacionais utilizados para a determinação da concentração de íons Ag^{1+} através da espectrometria de massas com plasma de argônio induzido (ICP-MS 820MS) 30
- Tabela 2** - Área de superfície queimada (%) e valores séricos dos íons Ag^{1+} (Ag^{107} em $\mu\text{g L}^{-1}$) determinados em indivíduos não expostos e nos pacientes nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30), respectivamente após a queimadura 39
- Tabela 3** - Razão entre a concentração plasmática de íons Ag^{1+} (Ag^{107} em $\mu\text{g L}^{-1}$) dos pacientes em relação a média dos indivíduos não expostos (expressa em número de vezes) nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30) após a queimadura 41
- Tabela 4** - Valores crescentes das concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) acrescentados às culturas de células (linfócitos e polimorfonucleares), baseados na média da concentração sérica de Ag^{1+} encontrada nos controles sadios ($0,13\mu\text{g L}^{-1}$)..... 43
- Tabela 5** - Avaliação da viabilidade celular (%) obtida por citometria de fluxo nos meios de cultura de leucócitos quando submetidos a diferentes concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) 45
- Tabela 6** - Avaliação da apoptose celular (%) obtida por citometria de fluxo nos meios de cultura de leucócitos quando submetidos a diferentes concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) 46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Determinação de viabilidade e apoptose celular na população de leucócitos totais.....	34
Figura 2 -	Produção de EROs por citometria de fluxo utilizando DCFH-DA como sonda.....	36
Figura 3 -	Média da concentração sérica de íons Ag^{1+} em pacientes queimados (expressos em $\mu g L^{-1}$) nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30) após a queimadura	40
Figura 4 -	Aumento da concentração plasmática dos íons Ag^{1+} nos pacientes queimados em relação aos controles sadios (em número de vezes) nos dias 1, 3 e 5 (D1X, D3X e D5X)	42
Figura 5 -	Correlação dos níveis de prata presentes na cultura de células com a produção de EROS produzidos pelos polimorfonucleares obtidos por citometria de fluxo. (IMF: intensidade média de fluorescência). (Correlação de Spearman $r = - 0,9048$ e $P = 0,0046$)	47
Figura 6 -	Correlação entre os níveis de prata presentes na cultura de células e a produção de IL -6 obtida pelo método <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) (Correlação de Spearman $r = 0,8810$ e $p = 0,0072$)	48
Figura 7 -	Correlação entre os níveis de prata presentes na cultura de células e a produção de IL-1 β obtida pelo método <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) (Correlação de Spearman $r = 0,8571$ e $p = 0,02$.).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SSD	Sulfadiazina de prata
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Ppm	Partes por milhão
Ppb	Partes por bilhão
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos
CTQ	Centro de Tratamento de Queimados
Rpm	Rotações por minuto
MCE	Éster misto de celulose
ICP-MS 820MS	MODELO de Espectrômetro de Massa
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PBS	Solução tampão fosfato
TA	Temperatura ambiente
SFB	Soro fetal bovino
RPMI 1640	Meio de cultura para células
7AAD	7-amino-actinomicina D
DFC	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7' diacetado de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMF	Intensidade média de fluorescência
FSC	<i>Forward scatter</i> (dispersão frontal)
SSC	<i>Side scatter</i> (dispersão lateral)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> (método de dosagem de interleucinas através de grânulos)
<i>Post mortem</i>	Pós morte
MT	Metalotioneínas
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental – Estados Unidos)

IL-1 β	Intertelucina-1beta
IL-6	Interleucina 6
IL- 8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
MODS	Disfunção de múltiplos órgãos
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i> (fator de crescimento transformador)
PGE-2	Prostaglandina E-2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Resposta Inflamatória, Infecção e Sepses	18
2.1.1	Polimorfonucleares e <i>burst</i> respiratório	18
2.1.2	Citocinas	19
2.2	Tratamento do paciente queimado	20
2.3	Utilização da Prata na Medicina	21
2.4	Mecanismo de Ação Antimicrobiana	21
2.5	Absorção, Distribuição Tecidual e Excreção da Prata.....	22
2.6	Utilização da prata em queimaduras	23
2.7	Sulfadiazina de Prata	23
2.8	Toxicidade da prata.....	25
2.8.1	Argiria (argirose ou argirismo).....	25
2.8.2	Citotoxicidade da Sulfadiazina de Prata.....	25
3	OBJETIVOS.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Delineamento do Estudo	28
4.2	Amostra.....	28
4.3	Etapas do Estudo	29
4.3.1	Fase I – Quantificação de íons Ag¹⁺ em pacientes queimados	29
4.3.1.1	Etapa 1 – Coleta.....	29
4.3.1.2	Etapa 2 - Diluição.....	29
4.3.1.3	Etapa 3 – Analítica.....	30
4.3.2	Reagentes, soluções e amostras	30
4.4	Fase II - Cultura de Células Mononucleares e Polimorfonucleares para avaliação da Citotoxicidade, produção de EROs e interleucinas	32
4.4.1	Coleta do Sangue Periférico.....	32
4.4.2	Delineamento Experimental	32

4.4.3	Isolamento das Populações de Leucócitos	32
4.4.4	Cultura de Células	33
4.4.5	Determinação da Viabilidade e Apoptose Celular	33
4.4.6	Avaliação da Produção de EROS.....	35
4.4.7	Quantificação de Interleucinas.....	37
4.5	Análise Estatística.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Fase I - Quantificação de Prata Sérica em Humanos	38
5.2	Fase II - Resultados da cultura de células	44
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÕES	54
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

A queimadura é considerada uma das piores agressões ao corpo humano¹, representando um evento catastrófico que o organismo busca reparar através de uma resposta inflamatória e metabólica proporcional à gravidade da lesão tecidual.

Anualmente ocorrem cerca de 1 milhão de acidentes com queimaduras no Brasil, com mortalidade de aproximadamente 2500 pessoas, sendo que entre 100.000 a 200.000 pacientes procuram atendimento hospitalar².

O tratamento do paciente queimado é complexo e exige internações prolongadas, múltiplas abordagens cirúrgicas, utilização de mão de obra qualificada e multiprofissional e demandando custos da ordem de US\$ 9600,00 por paciente³.

No estado do Paraná, há 2 serviços especializados no tratamento de queimaduras, mas somente o Centro de Tratamento de Queimados da Universidade Estadual de Londrina é bancado integralmente pelo Governo do Estado.

Apesar dos avanços na medicina, o tratamento do paciente queimado ainda constitui um grande desafio, devido às profundas alterações metabólicas, inflamatórias e imunológicas provocados pela queimadura, em especial nos pacientes grande queimados⁴.

A abordagem da ferida propriamente dita baseia-se em três etapas: curativos, desbridamentos cirúrgicos e enxertos quando necessário e a utilização de terapia tópica antimicrobiana. Esta continua sendo um dos principais cuidados com a área queimada, objetivando controlar a colonização e proliferação bacteriana⁵.

Há aproximadamente 200 anos, o principal agente utilizado nos curativos é a prata, em diferentes apresentações⁶.

A sulfadiazina de prata 1% (SSD) é um creme, amplamente utilizada em queimaduras há aproximadamente 50 anos. A facilidade de aplicação e o baixo custo são as principais vantagens da sua utilização, sendo tolerado pela maioria dos pacientes e eficaz contra a maioria dos microorganismos que colonizam a área queimada⁷.

As formulações de SSD liberam pequenas quantidades de íons prata Ag^{1+} , que são absorvidos pelas feridas⁸, favorecidas pela vascularização e pela ausência de uma barreira protetora eficiente⁹.

Estudos realizados com a SSD na década de 90 descreveram uma elevada absorção de prata de aproximadamente 20 vezes acima do normal, ocorrendo já nas 6 primeiras

horas após a utilização^{10,11}. Nesta mesma época, foram realizadas avaliações da citotoxicidade da prata em culturas de células (fibroblastos, queratinócitos e leucócitos) apontando para um potencial efeito deletério da prata sobre essas células^{12,13,14}.

Nas últimas 2 décadas, houve o desenvolvimento de novas tecnologias no cuidado da área queimada, sendo utilizadas novas formas de apresentação da prata, tais como a prata iônica e prata nanocristalina^{15,16}.

Para apoiar os possíveis benefícios desses novos produtos, várias comparações foram feitas com a sulfadiazina de prata. Desta forma, os efeitos colaterais da sulfadiazina de prata voltaram a ser destacados, principalmente quanto à citotoxicidade para queratinócitos e fibroblastos^{15,17}, para células-tronco mesenquimais, células mononucleares de sangue periférico¹⁸, células-tronco mesenquimais humanas¹⁹. Destacam-se entre esses estudos, os achados de Greulich e colaboradores¹⁸, nos quais as concentrações de prata lesivas ou letais para bactérias ocorreram nas mesmas faixas de concentração lesivas a células humanas.

Também são descritos retardo na cicatrização das feridas com a utilização da prata, além do surgimento de cepas resistentes à sulfadiazina¹⁶.

Uma revisão sistemática realizada pela Cochrane em 2013 comparou diferentes curativos utilizados para queimaduras superficiais e de segundo grau e sua meta-análise concluiu que a sulfadiazina foi associada com uma pior cicatrização quando comparada a curativos biossintéticos, revestidos com silicone ou tratadas com hidrogel²⁰.

Apesar de ser amplamente utilizada em nosso meio, existem efeitos adversos associados à SSD, tais como a emergência de cepas resistentes, dificuldade na cicatrização e citotoxicidade.

Portanto, este estudo pretende utilizar concentrações de prata semelhantes às encontradas em pacientes queimados tratados com curativo a base de SSD e avaliar a presença de toxicidade sobre a viabilidade e funcionalidade de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares em culturas de células.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resposta Inflamatória, Infecção e Sepsis

A queimadura é uma doença inflamatória pós-traumática²¹ que desencadeia a resposta inflamatória sistêmica, sendo mais intensa quanto maior a área queimada²².

A fisiopatologia da queimadura é amplamente estudada e conhecida²³, gerando intensa perda nitrogenada, desnutrição, aumento da taxa metabólica e imunodeficiência.^{21,24}

O paciente queimado apresenta uma predisposição a infecção devido a perda da barreira cutânea e falência de mecanismos de defesa locais e sistêmicos, sendo que a ferida gerada pela queimadura é a porta de entrada para bactérias invasoras²⁵. Desta forma, a infecção e a sepsis são as principais causas de mortalidade em pacientes queimados²⁶.

A inflamação descontrolada pode levar a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas comprometendo pulmões, rins, fígado, intestinos e cérebro. Células inflamatórias podem ultrapassar barreiras fisiológicas, com liberação de citocinas, espécies reativas de oxigênio, proteínas do complemento e outras substâncias, comprometendo ainda mais a disfunção orgânica²⁷.

Quanto maior a superfície queimada, maior a resposta metabólica e inflamatória, assim, pacientes com maior percentual de superfície queimada apresentam maiores taxas de sepsis, necessidade de ventilação mecânica, depressão miocárdica e mortalidade²⁷.

2.1.1 Polimorfonucleares e *burst* respiratório

Os Polimorfonucleares (PMN) são elementos importantes na proteção contra invasão bacteriana e são estudados nos pacientes queimados devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa que ocorrem após a queimadura²⁸.

Os neutrófilos são as primeiras células a se apresentar no local da infecção, participando do sistema inato de defesa. Seu arsenal bactericida e antifúngico consiste na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, matando patógenos fagocitados, e também liberando proteases e peptídeos antimicrobianos para atacar patógenos

extracelulares. Possuem meia vida curta (8-12 horas), mas são produzidos em larga escala e representam 60-70% dos leucócitos²⁹.

O *burst* respiratório, ou seja, a rápida geração de espécies reativas de oxigênio nos PMN é mediado pela NADPH oxidase. O produto primário deste sistema de oxidase é o ânion superóxido. A superóxido dismutase atua sobre o ânion superóxido e produz oxigênio e peróxido de hidrogênio, que é convertido pela mieloperoxidase a ácido hipocloroso e cloraminas no interior do fagossomo, levando à morte de microorganismos³⁰.

A atividade da NADPH oxidase dos PMN está diminuída nos pacientes queimados²⁸, contribuindo para a imunossupressão que ocorre neste grupo de pacientes.

2.1.2 Citocinas

As citocinas são importantes mediadores do processo fisiopatológico que ocorre após a queimadura, desencadeando resposta hipermetabólica, perda protéica, infecção, sepse e disfunção orgânica. São marcadores precoces da inflamação induzida pela queimadura: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF α ³¹.

Há um esforço para compreender o comportamento das diferentes interleucinas como biomarcador, buscando correlacionar a extensão e a duração da resposta inflamatória no paciente queimado e os possíveis desfechos quanto à sobrevida^{27,31}.

2.2 Tratamento do paciente queimado

O tratamento do paciente queimado necessita ser realizado por equipe interdisciplinar, em centros especializados, sendo indispensável conhecer as particularidades e dificuldades no manejo deste paciente³².

Em nosso meio, o tratamento baseia-se na utilização de balneoterapia e trocas diárias de curativos e procedimentos cirúrgicos (desbridamentos ou enxertos), a depender da gravidade da queimadura.

O principal objetivo do tratamento é a cicatrização da área queimada, prevenindo a infecção e as sequelas tardias¹⁶. A cicatrização permite interromper o ciclo vicioso que se instala com respostas inflamatórias sobrepostas, devido à persistência da área cruenta da queimadura (lesão tecidual), infecção (outro elemento desencadeador de resposta inflamatória) e trocas diárias de curativo (gerando mais lesão tecidual).

Neste cenário, destaca-se a utilização da sulfadiazina de prata a 1% há quase 50 anos no tratamento da área queimada.

2.3 Utilização da Prata na Medicina

A prata não é considerada um elemento traço em humanos, não possui valor nutricional ou fisiológico conhecido. É encontrada em baixas concentrações devido à exposição secundária por inalação ou ingestão³³, sendo considerada um xenobiótico⁷ (composto químico estranho a um organismo ou sistema biológico que pode ser encontrado, porém não é produzido ou esperado neste meio).

Dentre as utilizações mais remotas da prata para finalidades médicas, tem-se a desinfecção e armazenamento de água, relatadas desde Alexandre o Grande (335 a. C.), passando pelos gregos, romanos e civilizações antigas do Mediterrâneo. Com o aparecimento da Teoria dos Germes, a ideia de que micróbios poderiam causar doenças e o fato de que íons prata possuíam propriedades antimicrobianas trouxe uma base racional para seu uso⁶.

Não se conhece claramente quando as verdadeiras propriedades antibacterianas da prata foram descobertas, mas na segunda metade do século XIX, sua utilização fora descrita por Ehrlich e Credè. Em 1914, Lubinski descobriu a liberação de íons de prata a partir do nitrato de prata⁷.

Assim, a história do uso da prata na medicina pode ser dividida em 4 momentos: a antiguidade, o século XIX e a Teoria dos Microorganismos, o renascimento da prata em 1960 e a segunda geração dos curativos de prata no final do século 20⁶.

2.4 Mecanismo de Ação Antimicrobiana

A prata possui propriedades antimicrobianas e pode ser encontrada na forma metálica ou elementar (Ag^0). A prata metálica pura é $\text{Ag} [0]$ e possui 3 estados de oxidação Ag^{1+} , Ag^{2+} , Ag^{3+} , sendo que apenas o íon Ag^{1+} é estável para ser utilizado como antibiótico. Há uma correlação direta entre a ação bactericida e a quantidade de íons de prata livres no meio. No estado não ionizado, a prata não possui ação antimicrobiana³³.

Ao entrar em contato com meio aquoso, a prata elementar forma cátions de prata, conhecidos como prata iônica (Ag^{1+}), que é altamente reativa³⁴.

O termo “ação oligodinâmica” é utilizado em referência à capacidade de alguns metais serem agentes antibacterianos em concentrações muito baixas (menores que 1 parte por milhão) e pode ser aplicado à prata⁷.

O íon Ag^{1+} pode ligar-se a receptores de superfície celular de bactérias, leveduras e fungos, podendo também ligar-se a grupos doadores de elétrons de moléculas biológicas que contenham enxofre, nitrogênio e oxigênio. Sua ação antimicrobiana está associada a ligação com grupos sulfidríla e proteínas em membranas celulares³³.

Os mecanismos de ação da prata seriam: 1) inibição de enzimas essenciais à vida, inclusive da cadeia respiratória, 2) interação e ruptura da membrana celular ou parede celular, 3) interação com DNA da célula bacteriana, 4) destruição de células bacterianas pela formação de radicais livres de prata^{7,33}.

A ação inibitória da prata em cepas de Gram positivos e negativos foi demonstrada pela formação de regiões “*electron-light*” no citoplasma e condensação de moléculas de DNA, sendo que a lesão do DNA e RNA e a inativação protéica foram associados como os principais responsáveis pela bacteriostase³³.

2.5 Absorção, Distribuição Tecidual e Excreção da Prata

A superfície queimada constitui um ambiente rico em substâncias que compõem os fluídos corporais, tais como proteínas, peptídeos e cloreto^{8,35}. Ao entrar em contato esses fluídos, os sais de prata precipitam como cloreto de prata ou formam complexos com biomoléculas³⁶.

Outros componentes do soro, tais como glutatona, cisteína e metionina, são capazes de formar complexos mais estáveis que o cloreto. Além disso, as proteínas séricas aumentam a solubilidade da prata em 300 vezes e 3×10^5 vezes a liberação de prata iônica, quando comparadas ao cloreto³⁵.

A alta afinidade dos íons Ag^{1+} é responsável pela sua ligação a proteínas das camadas da pele e áreas ao redor da queimadura. Quando ocorre ligação com proteínas transportadoras, os íons Ag^{1+} são carregados pelo sistema circulatório⁸.

No processo de detoxificação é necessária a translocação dos íons Ag^{1+} ligados à glutatona para outras proteínas que contêm enxofre. A selenoproteína P é responsável pelo

sequestro dos íons Ag^{1+} da corrente sanguínea que são depositados no fígado e nos rins. A eliminação da prata ocorre através da excreção biliar pelas fezes⁸.

A quantidade de prata absorvida e o acúmulo em órgãos-alvo são as principais causas da toxicidade causada pela prata. Pouco se sabe sobre a correlação entre os níveis totais de prata sérica, deposição em órgãos, e demonstração de efeitos citotóxicos³⁴.

2.6 Utilização da prata em queimaduras

O tratamento da queimadura tem como objetivo a cicatrização das feridas, a prevenção da infecção e a diminuição das complicações funcionais e estéticas, sendo que o uso de quimioterapia tópica é fundamental para a melhoria da sobrevida dos pacientes queimados, agindo na prevenção da sepse originada no leito da queimadura¹⁶. Os microorganismos que colonizam as queimaduras são frequentemente *Staphylococcus aureus*, mas os patógenos mais perigosos são *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*⁷.

A prata tem sido utilizada no tratamento de queimaduras há mais de 200 anos, em diferentes apresentações. No início do século XX, o nitrato de prata em concentrações de 5 e 10% era utilizado como cáustico ou escarificante. O renascimento da prata ocorreu em meados de 1960, quando compostos de prata revolucionaram o cuidado com as queimaduras, principalmente o acetato de mafenido e solução de nitrato de prata a 0,5%, e posteriormente a sulfadiazina de prata⁶.

Pesquisas posteriores levaram a introdução de preparações contendo prata iônica de liberação contínua, numa variedade de cremes, curativos, hidrocolóides; associação de sulfadiazina de prata em combinação com clorexidina e nitrato de cério⁷, principalmente nas duas últimas décadas do século XX, com o desenvolvimento dos curativos “tecnológicos” para utilização em queimaduras e feridas⁶.

2.7 Sulfadiazina de Prata

A sulfadiazina de prata (SSD) é obtida através da complexação da prata com propilenoglicol, álcool esteril, mirislato de isopropil e misturada a sulfadiazina. A formulação da sulfadiazina de prata resulta da combinação de nitrato de prata e sulfadiazina sódica, substituindo um átomo de hidrogênio por um átomo de prata na molécula de sulfadiazina¹⁶.

Foi criada por Charles Fox, que publicou um trabalho em 1968 descrevendo sucesso na utilização em modelo animal seguido de estudo em humanos. Estudos posteriores confirmaram que o mecanismo de ação da sulfadiazina de prata relacionava-se a ação da prata, ligando-se a bactérias, e não da sulfadiazina. Apesar de ser pouco solúvel em água, a sulfadiazina de prata apresentava capacidade de ionização e liberação de íons prata na presença de fluídos corporais⁶.

A sulfadiazina de prata foi rapidamente aceita tornando-se a droga de escolha para o tratamento de queimaduras sendo amplamente utilizada para controlar infecção bacteriana³⁷, e durante anos, foi considerada um dos melhores antissépticos disponíveis⁷.

A facilidade de aplicação e uso, a ação reconhecida contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e a diminuição na taxa de sepse secundária à queimadura, com efeitos colaterais mínimos tornaram-na o tratamento “padrão ouro” para queimadura^{7,16,35,38}.

A consolidação do tratamento com sulfadiazina de prata ocorreu baseada em seus efeitos tópicos no leito das áreas queimadas, havendo pouca ou nenhuma referência quanto a sua ação sistêmica, e os trabalhos que descreviam efeitos colaterais geralmente se referiam à molécula da sulfadiazina³⁹.

Em 1992, Coombs e colaboradores¹⁰ descrevem a evolução de 22 pacientes queimados e os achados dos níveis séricos de prata, incluindo a deposição em órgãos parenquimatosos (fígado, rins). Em pacientes com áreas maiores que 20% de superfície queimada, nos primeiros 3 a 4 dias após a queimadura, os níveis séricos atingiram 20 vezes o normal, ocorrendo um platô por volta do quinto dia.

Este trabalho chamou atenção para um evento potencialmente grave, a rápida absorção da prata para a corrente sanguínea, chegando a sugerir a possibilidade de associação da deposição da prata com o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos, no entanto, esta possibilidade não foi confirmada posteriormente.

Outros questionamentos surgiram quanto a eficiência da sulfadiazina de prata, devido ao surgimento de cepas resistentes, a associação da utilização da sulfadiazina com o

retardo na cicatrização, e possibilidade de haver um efeito tóxico sobre as células da pele^{16,38,40}.

Devido aos estudos em pacientes queimados geralmente contemplarem uma amostra pequena e apresentarem imperfeições de delineamento, as comparações entre diferentes produtos ou tratamentos com a sulfadiazina de prata muitas vezes não possui poder científico adequado.

Em 2010, Storm-Versloot e colaboradores⁴¹ publicam uma revisão sistemática pela Cochrane, para avaliar se a prata poderia contribuir para a cicatrização de feridas e prevenção de infecção. Foram incluídos 26 estudos, com 2066 participantes, comparando-se curativos ou cremes contendo prata com curativos sem prata. Vinte estudos foram realizados em queimados, 14 comparando SSD com outro tratamento. Na conclusão desta revisão, os autores descrevem que não há evidência suficiente que justifique a utilização de cremes ou curativos a base de prata, pois esses curativos não previnem infecção nem promovem cicatrização. Houve a geração de “alguma evidência” de que compostos contendo SSD não têm efeito na infecção e realmente diminuem a cicatrização em pacientes com queimaduras de segundo grau.

2.8 Toxicidade da prata

2.8.1 Argiria (argirose ou argirismo)

Trata-se da presença de áreas de pele com descoloração azul-acinzentadas causadas pelo acúmulo de grânulos de prata metálica ou sulfureto de prata ao redor de glândulas sebáceas, folículos pilosos, leito ungueal e região inferior à membrana basal⁹, atingindo áreas subepiteliais da pele, conjuntiva, unhas e gengivas⁶.

Pode ocorrer localmente, associada à exposição prolongada a compostos que contém prata, tais como brincos, agulhas de acupuntura ou SSD. A argiria sistêmica decorre da ingestão oral de compostos de prata, principalmente prata coloidal⁶. Apesar do efeito estético negativo, a argiria raramente é causa de doença ou morte⁹.

2.8.2 Citotoxicidade da Sulfadiazina de Prata

Vários trabalhos foram realizados procurando esclarecer a citotoxicidade da sulfadiazina de prata.

McCauley e colaboradores¹² realizaram cultura de células, utilizando fibroblastos diplóides humanos e fibroblastos dérmicos humanos frescos de doadores. Foram produzidas microssuspensões de sulfadiazina de prata em concentrações 0,01%; 0,03% e 0,05% sendo adicionadas aos meios de cultura. As concentrações de prata variaram de 13 a 56 ppm. Após 48 hs de exposição, as contagens de células estavam diminuídas nas duas linhagens quando comparadas aos controles. Após 144h, não houve células viáveis nos grupos 0,05 e 0,03%, e no grupo 0,01% houve uma redução marcante na contagem de células. À medida que a concentração de sulfadiazina aumentou houve maior destruição na morfologia celular.

Em 1992, McCauley e colaboradores¹³ estudaram queratinócitos humanos basais, submetidos a concentrações de sulfadiazina de prata de 0,01%; 0,03% e 0,05%, verificando que houve vacuolização celular mas não houve inibição da divisão celular.

Um estudo realizado com leucócitos demonstrou que a alteração na viabilidade das células T ocorreu em concentrações acima de 1,5 ppm (ou 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$), e para monócitos a citotoxicidade ocorreu em concentrações acima de 1,0 ppm (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Neste mesmo estudo, a dose bactericida da prata foi de 1,0 ppm (ou 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), concluindo que a efetividade da prata está em limites muito estreitos, sendo que as concentrações críticas estão em faixas muito próximas tanto para bactérias, como para células eucarióticas¹⁸.

Boonkaew e colaboradores¹⁵ comparando diferentes tipos de curativo contendo prata comercialmente disponíveis, demonstraram a SSD apresentou toxicidade importante para fibroblastos (71,1%) e queratinócitos (82,2%) quanto comparada aos controles.

3. OBJETIVOS

3.1 Fase I

Quantificar os níveis séricos da prata (Ag^{1+}) em pacientes grande queimados submetidos ao tratamento tópico com sulfadiazina de prata 1 %.

3.2 Fase II

a) Testar a hipótese da toxicidade da prata (Ag^{1+}) sobre as células eucariontes (monócitos e polimorfonucleares) in vitro, utilizando como parâmetro as concentrações plasmáticas da prata encontradas no experimento I.

b) Quantificar os níveis de citocinas produzidos em cultura de células (mononucleares e polimorfonucleares) quando expostos a concentrações crescentes de Ag^{1+} semelhantes às concentrações encontradas no experimento I.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

O presente estudo foi dividido em 2 fases sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP) da Universidade Estadual de Londrina, parecer nº 083/2014 datado em 06/06/2014, conforme previsto na resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do conselho Nacional de Saúde.

Fase I (quantificação da prata sérica em pacientes queimados): estudo observacional longitudinal não controlado. Fase II (avaliação da toxicidade da prata em meio de cultura de células): estudo experimental.

4.2 Amostra

O Centro de Tratamento de Queimados (CTQ) da Universidade Estadual de Londrina atende pacientes queimados, sendo mantido integralmente pelo Governo do Estado, havendo somente 2 serviços especializados no tratamento de queimaduras no Estado do Paraná.

A coleta da prata sérica foi feita por amostra de conveniência, realizada em pacientes atendidos e internados no CTQ da Universidade Estadual de Londrina

a. Critérios de inclusão: Entre os meses de junho de 2014 a fevereiro de 2015, foram considerados elegíveis para o estudo os pacientes maiores de 18 anos, internados no Centro de Tratamento de Queimados do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, que apresentaram queimadura de pelo menos 15 % da superfície corporal ou queimadura elétrica em qualquer extensão, com até 48 horas após o evento, tratados com curativos à base de sulfadiazina de prata 1%, que concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

b. Critérios de exclusão: pacientes portadores de doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatoide, lúpus, etc), insuficiência renal crônica, *diabetes mellitus* mal controlado, dislipidemias graves ou presença de qualquer outra doença crônica mal controlada. Foram

excluídos ainda aqueles com história de exposição ocupacional à prata, queimadura por lesão inalatória ou que fizeram uso de outros tipos de curativo.

4.3. Etapas do estudo

4.3.1 Fase I – Quantificação de íons Ag^{1+} em pacientes queimados

Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas no momento de sua admissão no Centro de Tratamento de Queimados, e posteriormente no 3º., 5º., 10º. e 30º. dia de internação (D1, D3, D5, D10 e D30 respectivamente).

Os pacientes seguiram a rotina de tratamento determinada pela equipe de Cirurgia Plástica do Centro de Tratamento de Queimados, baseadas em troca diária de curativos utilizando-se creme de sulfadiazina de prata 1%. Procedimentos cirúrgicos tais como desbridamentos e enxertos foram indicados à medida que foram considerados necessários pela equipe de Cirurgia Plástica.

4.3.1.1 Etapa 1 – Coleta

Um indivíduo treinado colheu uma amostra de sangue de 5 ml foram coletadas em tubos livres de metais traço (BD Vacutainer, USA) contendo heparina como anticoagulante e centrifugados a 2500 rpm, por 3 minutos. 2 mL do sobrenadante foi aliquoteado para tubos Eppendorff e imediatamente congelado a - 80 °C antes da análise.

4.3.1.2 Etapa 2 - Diluição

Após o término das coletas, o material armazenado foi processado (conforme descrito abaixo) e encaminhado ao laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica da Universidade Estadual de Londrina para dosagem da prata sérica.

As amostras foram descongeladas, sendo utilizado 1 ml de soro, ao qual adicionou-se 1,0 ml de solução de ácido nítrico suprapuro a 0,2 %. Em seguida, foi realizada a filtração, utilizando-se filtros de éster misto de celulose (MCE) hidrofílico 25 mm de diâmetro com poros de 0,22 μm .

4.3.1.3. Etapa 3 – Analítica

A concentração dos íons Ag^{1+} foi determinada utilizando a espectrometria de massas com plasma de argônio induzido - ICP-MS 820MS – (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Para a introdução da amostra foi empregado nebulizador micro-concêntrico operado com bomba peristáltica. Cada amostra foi introduzida para análise manualmente. Os dados foram adquiridos pelo software ICP-MS Expert Varian v2.0 b87. As condições operacionais relevantes do ICP-MS encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros operacionais utilizados para a determinação da concentração de íons Ag^{1+} através da espectrometria de massas com plasma de argônio induzido (ICP-MS 820MS).

Parâmetros instrumentais		Parâmetros de aquisição	
Potência rf(kw)	1.4	Modo de medida	<i>Peak hopping</i>
Fluxo de gás argônio		Número de <i>scans</i>	10
Nebulizador (L min ⁻¹)	0.21	Isótopo	¹⁰⁷ Ag
Plasma (L min ⁻¹)	16		
Tempo de introdução da amostra (s)	30		
Volume da amostra (ml)	2		

4.3.2 Reagentes, soluções e amostras

A determinação da concentração dos íons Ag^{1+} nas amostras de plasma sanguíneo foi realizada fazendo uso da calibração externa quantitativa, que consiste na construção de

curva analítica para o íon. As soluções analíticas contendo Ag^{1+} , utilizadas para a curva analítica foram preparadas por diluição apropriada de uma solução padrão de prata de 1000 mg L^{-1} (Fluka Analytical) em água ultrapura (Milli-Q. $18\text{M}\Omega \text{ cm}$), com concentração variando de 1 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. O registro das suas intensidades foi realizado em relação a um padrão interno (Rh).

Foi realizada uma coleta de sangue em indivíduos não expostos à prata, pareados por gênero e idade para estabelecer uma média dos valores de prata sérica encontrados na população, que permitissem a comparação com os valores de prata sérica encontrados nos pacientes queimados.

Os resultados de íons Ag^{1+} obtidos para cada paciente foram comparados a esta média, quantificada em ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Os níveis séricos de prata obtidos nos pacientes foram utilizados para se estabelecer parâmetros de valores de íons Ag^{1+} que seriam adicionados às culturas de células inflamatórias (polimorfonucleares e mononucleares), em níveis crescentes.

4.4. Fase II : Cultura de Células Mononucleares e Polimorfonucleares para avaliação da Citotoxicidade, produção de EROs e interleucinas.

4.4.1 Coleta do Sangue Periférico

Amostras de sangue periférico (aproximadamente $16,0 \text{ mL}$) de voluntários saudáveis foram coletadas por punção venosa em tubos contendo $7,2 \text{ mg}$ de EDTA dipotássico (BD Vacutainer, USA) e capacidade de $4,0 \text{ mL}$ de sangue, utilizando o sistema de coleta a vácuo. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o momento do processo de isolamento de leucócitos por um período inferior a 2 horas.

4.4.2 Delineamento Experimental

Células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico obtidas de voluntários saudáveis foram isoladas por centrifugação em gradiente de gelatina 3% e submetidas a cultura celular com concentrações crescentes de prata, semelhantes aos

encontrados nos tempos D1, D3, D5, D10 e D30 em pacientes tratados no Centro de Tratamento de Queimados. Para efeito de comparação, foram acrescentados ainda 3 concentrações, uma sem nenhuma adição de prata (controle), e concentrações 1500 e 2000 vezes acima dos controles.

Foram realizados testes de viabilidade, apoptose celular, e determinação da produção de EROs nas células recém isoladas e após o tratamento com a prata, bem como quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura celular.

4.4.3 Isolamento das Populações de Leucócitos

As amostras de sangue periférico foram previamente diluídas com solução tampão fosfato (PBS) contendo albumina bovina (Sigma, A-6793) 1%, pH 7.4, na proporção de 1:2. Após adição da solução de gelatina (Sigma, G1890) 3% na proporção 1:2, a suspensão de células foi homogeneizada por inversão e mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante rico em leucócitos foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 300 g e o sobrenadante foi descartado. Para eliminar as hemácias remanescentes, o pellet de células foi ressuspenso em 2,0 mL de solução de cloreto de amônio 0,8% (BD Pharm Lyse), mantido em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente (TA) e centrifugado por 5 minutos a 300 g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de leucócitos foi lavado duas vezes com PBS (10 minutos, TA, 300 g) e ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, 23400) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, 12657).

A contagem de células foi realizada em contador automatizado ADVIA 120 (Siemens, USA). A morfologia celular foi avaliada por microscopia ótica em lâminas preparadas por citocentrifugação (Citocentrífuga Shandon, USA) com 1×10^5 células/lâmina, e coradas com a mistura de Romanovsky segundo Leishman. As células foram avaliadas em microscópio binocular (Olympus, USA) modelo CX31 em aumento de 1.000 vezes.

A viabilidade, a apoptose e a produção de EROs das células recém isoladas foram determinadas conforme procedimento descrito nas seções 4.5 e 4.6.

4.4.4 Cultura de Células

As células isoladas ($2 \cdot 10^6$ células/poço) foram distribuídas em placas de cultura estéreis com 24 poços, contendo 2,0 mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e

nitrato de prata (Sigma, 209139) em concentrações crescentes (0; 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$; 8,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; 19,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; 39 $\mu\text{g L}^{-1}$; 78 $\mu\text{g L}^{-1}$; 195 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 260 $\mu\text{g L}^{-1}$). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% de CO_2 (Incubadora Thermo Forma, USA, modelo 3110) durante 24 h. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos estéreis de 15,0 mL e centrifugada a 300 g por 5 minutos. A viabilidade, a apoptose e a produção de EROs das células tratadas com prata foram determinadas conforme procedimento descrito nas seções 4.5 e 4.6. O sobrenadante foi aliquotado e congelado para quantificação de citocinas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.7. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.5 Determinação da Viabilidade e Apoptose Celular

A viabilidade e a apoptose celular foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit para detecção de apoptose por Anexina V (BD Pharmingen™) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, alíquotas contendo $5 \cdot 10^5$ células foram transferidas para tubos de polipropileno de 12x75 mm e o volume final foi ajustado para 100 μL com o tampão de ligação diluído 1:10. As células foram marcadas com 5 μL de anti-CD45 conjugado com FITC (BD Pharmingen™), 5 μL de Anexina V conjugada com ficoeritrina (PE) e 5 μL de 7AAD simultaneamente. Após incubação por 15 minutos a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO_2 . A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCantoll (Becton Dickinson, USA), previamente ajustado de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle negativo foram utilizadas células não marcadas. Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra e os dados foram analisados com

utilização do software FACSDiva 1).

(Figura

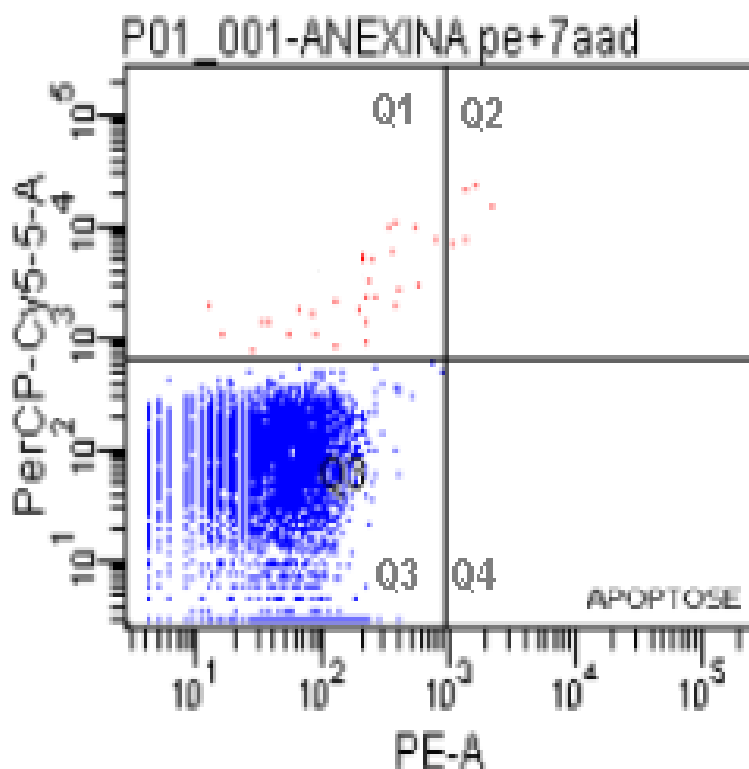


Figura 1- Determinação de viabilidade e apoptose celular na população de leucócitos totais. As células viáveis são negativas para a marcação com Anexina V (PE) e 7AAD (PercP-Cy5) e são observadas no quadrante Q3. As células mortas são positivas para 7AAD e estão localizadas nos quadrantes Q1 (necrose) e Q2 (apoptose tardia). As células em apoptose inicial, quando presente, são visualizadas no quadrante Q4.

4.4.6 Avaliação da Produção de EROs

A produção de EROs foi determinada pela formação de DCF a partir da oxidação do 2',7' diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Resumidamente, as células isoladas foram incubadas com solução de DCFH-DA (Sigma, D-6883) 10 μ M (concentração final) por 15 minutos a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Células estimuladas com 2 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram utilizadas como controle positivo e uma suspensão de células sem marcação foi usada como controle negativo. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCantoII, utilizando o software FACSDiva e com avaliação da intensidade média de fluorescência (IMF) de 10.000 eventos adquiridos em cada amostra (Figura 2).

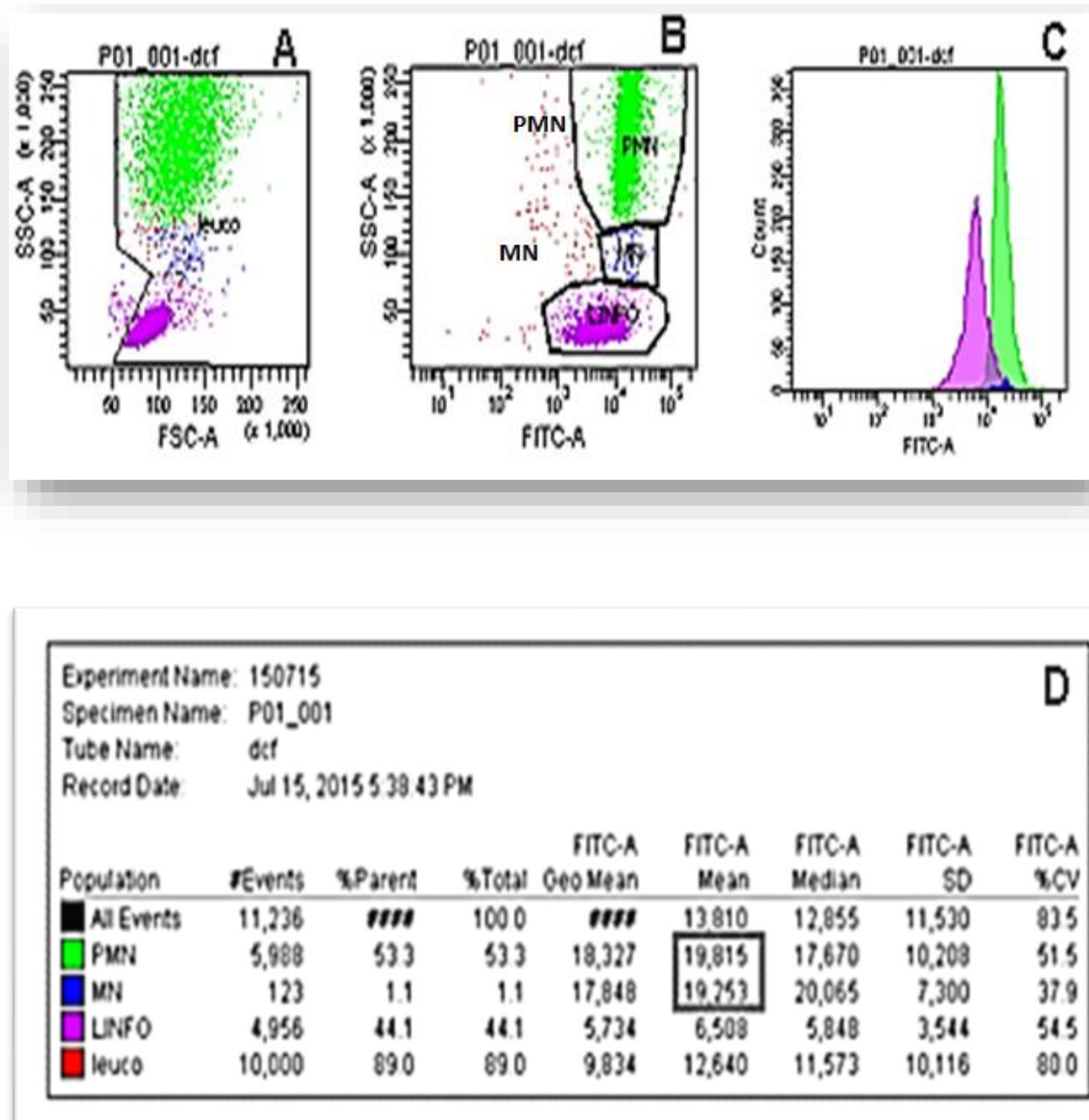


Figura 2- Produção de EROs por citometria de fluxo utilizando DCFH-DA como sonda.

A: Identificação das populações leucocitárias de acordo com tamanho (FSC) e complexidade (SSC). **B e C:** Avaliação da intensidade de fluorescência das subpopulações de leucócitos. **D:** Análise estatística dos dados obtidos. Os dados utilizados para análise da produção de EROS foi a IMF do fluorocromo FITC (FITC-A mean), destacado no retângulo. Em verde: polimorfonucleares, azul: mononucleares e lilás: linfócitos.

4.4.7 Quantificação de Interleucinas

A liberação de citocinas no sobrenadante da cultura de células tratadas com a prata foi determinada pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA). Foi realizada a quantificação de: Intertelucina-1beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-10 (IL-10); Interleucina-12p70 (IL-12p70) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) utilizando o kit *Human Inflammatory Cytokine* (BD Pharmingen, USA). O procedimento de quantificação foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante com pequenas modificações. Resumidamente, alíquotas do sobrenadante da cultura (50 μ L) e dos padrões (50 μ L) foram incubadas com a suspensão de *beads* (25 μ L) e reagente de detecção (25 μ L) por 3 horas, em temperatura ambiente e protegido da luz. As *beads* foram lavadas com 1,0 mL da solução de lavagem e centrifugadas a 200 *g* por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuspensas em 300 μ L de tampão de lavagem. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCantoll, utilizando o software FACSDiva e a análise foi realizada com o Software FCAP Array™ (Soft Flow Hungary Ltd), versão 3.0.

4.5 Análise Estatística

Para variáveis contínuas, os dados foram expressos como médias e desvios-padrão. Utilizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para determinar se os dados eram paramétricos ou não paramétricos. Para comparação entre 2 ou mais grupos, foi utilizada Análise de Variância One-Way ou ANOVA, utilizando-se o Teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e pós teste de Dunn. O coeficiente de correlação de Spearman (*r*) foi utilizado para estabelecer correlações entre as variáveis para dados não-paramétricos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O software utilizado foi GraphPad Prism 6.

5. RESULTADOS

5.1. Fase I : Quantificação de Prata Sérica em Humanos

Entre os meses de junho de 2014 e fevereiro de 2015 foram atendidos 134 pacientes no Centro de Tratamento de Queimados (CTQ) da Universidade Estadual de Londrina.

Centro e quatorze pacientes não preencheram os critérios de inclusão, a maioria deles por terem recebido atendimento no CTQ após 48 horas do evento da queimadura.

Vinte pacientes preencheram os critérios de inclusão e concordaram o termo de consentimento livre e esclarecido, sendo 19 do sexo masculino e 1 paciente do sexo feminino, com idade média de 33 anos. A média da superfície corporal queimada foi de 27,68%, e os pacientes foram admitidos no Centro de Tratamento de Queimados com uma média de 18,66 horas após o evento da queimadura.

Quanto ao mecanismo de queimadura, 12 pacientes foram vítimas de queimadura com líquidos inflamáveis, 3 pacientes por chamas, 4 pacientes sofreram queimadura elétrica e 1 paciente foi vítima de escaldos.

Os níveis de prata sérica encontrados durante os dias de acompanhamento encontram-se descritos na tabela 2 e figura 3.

Tabela 2. Área de superfície queimada (%) e valores séricos dos íons Ag^{107} (Ag^{107} em $\mu g L^{-1}$) determinados em indivíduos não expostos e nos pacientes nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30), respectivamente após a queimadura.

Paciente	Superfície	Indivíduos não expostos	Pacientes D1	Pacientes D3	Pacientes D5	Pacientes D10	Pacientes D30
	(% área queimada)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)
1	46	0,22	13,52	16,95	32,8	29,1	
2	33,5	0,11	0,15	13,34	18,46	13,75	7,86
3	30	0,06	0,76	2,62	5,13	6,02	
4	42	0,44	1,26	7,53	7,79		
5	19	0,12	1,29	5,43	5,09	9,47	
6	55	0,14	1,95	16,11	18,58	25,85	10,37
7	17	0,07	1,99	2,33	4,17	6,47	
8	59	0,05	0,31	6,69	10		
9	34	0,06	0,79	1,97	7,16	3,81	
10	4	0,02	0,26	5,32	4,96		
11	2,5	0,18	0,6	0,37	10		
12	22,5	0,11	0,36	0,3	9,44	12,28	
13	55	0,06	1,67	4,85	1,41	12,78	
14	27,5	0,2	5,94	10,62	1,46	6,29	3,79
15	2,5	0,24	0,44	0,53	0,41		
16	1	0,12	0,59	0,12	0,2	0,16	
17	26	0,1	0,47	3,73	6,43	8,48	
18	22,5	0,08	0,62	18,03	39,42	72,58	
19	17,5	0,17	1,44	4,96	7,91	9,74	2,09
20	37	0,16	1,78	4,19	9,22	12,38	14,75
Desvio Padrão	17,87	0,09	3,03	5,73	10,26	17,58	5,08
Média	26,71	0,13	1,80	6,29	10,00	15,27	7,77

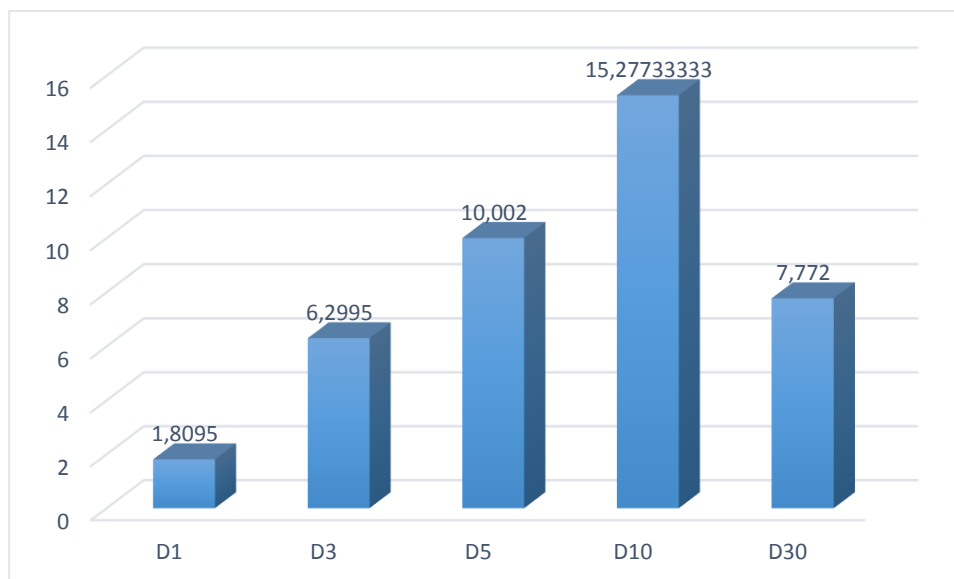


Figura 3. Média da concentração sérica de íons Ag¹⁺ em pacientes queimados (expressos em µg L⁻¹) nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30) após a queimadura.

Utilizando a correlação de Spearman, observou-se que houve uma correlação entre os níveis de prata atingidos no D3 e a superfície corporal queimada ($r = 0,5457$ e $p = 0,0128$).

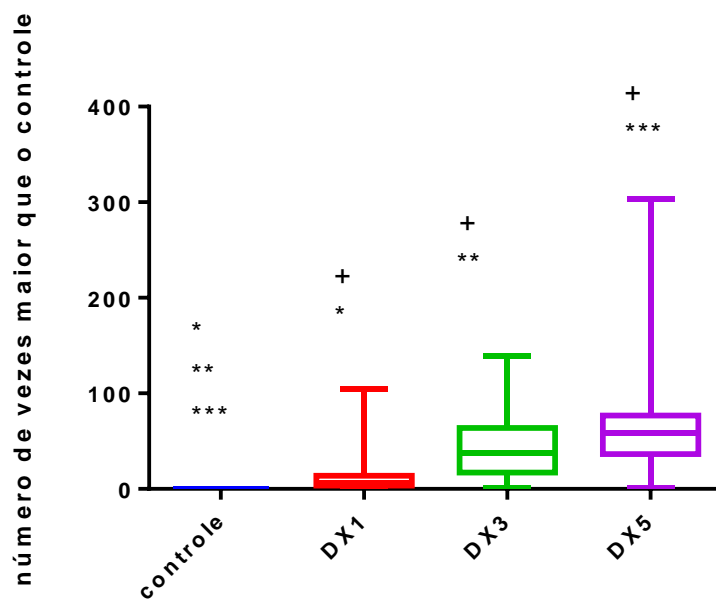
Ao observar que a média dos valores séricos da prata nos pacientes queimados aumentou 3,4 vezes entre o D1 e o D3 e 5,5 vezes entre o D1 e o D5, optou-se por comparar os valores séricos dos íons Ag⁺ em relação à média da prata sérica obtida nos indivíduos não expostos.

Desta forma, obteve-se quantas vezes o nível sérico encontrado no paciente foi maior que a média da população não exposta (tabela 3 e figura 4).

Tabela 3. Razão entre a concentração plasmática de íons Ag^{1+} (Ag^{107} em $\mu g L^{-1}$) dos pacientes em relação a média dos indivíduos não expostos (expressa em número de vezes) nos dias 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 e D30) após a queimadura.

Paciente	Superfície (% área queimada)	Média dos Indivíduos Não expostos Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacientes (D1) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacientes (D3) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacientes (D5) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacientes (D10) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacientes (D30) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)
1	46	0,13	104,00	130,38	252,31	223,85	0
2	33,5	0,13	1,15	102,62	142,00	105,77	60,46
3	30	0,13	5,85	20,15	39,46	46,31	0
4	42	0,13	9,69	57,92	59,92	0,00	0
5	19	0,13	9,92	41,77	39,15	72,85	0
6	55	0,13	15,00	123,92	142,92	198,85	79,76
7	17	0,13	15,31	17,92	32,08	49,77	0
8	59	0,13	2,38	51,46	76,92	0,00	0
9	34	0,13	6,08	15,15	55,08	29,31	0
10	4	0,13	2,00	40,92	38,15	0,00	0
11	2,5	0,13	4,62	2,85	76,92	0,00	0
12	22,5	0,13	2,77	2,31	72,62	94,46	0
13	55	0,13	12,85	37,31	10,85	98,31	0
14	27,5	0,13	45,69	81,69	11,23	48,38	29,15
15	2,5	0,13	3,38	4,08	3,15	0,00	0
16	1	0,13	4,54	0,92	1,54	1,23	0
17	26	0,13	3,62	28,69	49,46	65,23	0
18	22,5	0,13	4,77	138,69	303,23	558,31	0
19	17,5	0,13	11,08	38,15	60,85	74,92	16,07
20	37	0,13	13,69	32,23	70,92	95,23	113,46
Desvio padrão	17,87		23,32	44,10	78,99	127,29	32,06
média	26,71	0,13	13,92	48,46	76,94	88,14	14,95

Figura 4 – Aumento da concentração plasmática dos íons Ag^{1+} nos pacientes queimados em relação aos controles sadios (em número de vezes) nos dias 1, 3 e 5 (D1X, D3X e D5X).



(+) $p < 0,0001$ - Friedman

(*), (**), (***) – Pós teste de Dunn: estatisticamente significativo

Após esta comparação, pode-se observar que o aumento do nível sérico dos íons Ag^{1+} atingira alguns valores significativamente elevados, e em alguns casos, chegando a níveis de 100 a 130 vezes no D3, quase 300 vezes no D5 e 500 vezes no D10.

Os resultados obtidos na quantificação em humanos foram utilizados como parâmetro. Assim, a concentração de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) utilizados na cultura de células (polimorfonucleares e mononucleares) baseou-se na média da concentração de Ag^{1+} dos controles ($0,13 \mu\text{g L}^{-1}$), com aumentos progressivos de 10, 65, 150, 300, 600, 1500 e 2000 vezes acima desta média. (Tabela 4).

Tabela 4. Valores crescentes das concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) acrescentados às culturas de células (linfócitos e polimorfonucleares), baseados na média da concentração sérica de Ag^{1+} encontrada nos controles sadios ($0,13 \mu\text{g L}^{-1}$).

Número de vezes acima da média dos controles	Concentração de íons Ag^{1+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) adicionada à cultura de células
Zero	0
10 vezes	1,3
65 vezes	8,5
150 vezes	19,5
300 vezes	39,0
600 vezes	78,0
1500 vezes	195,0
2000 vezes	260,0

5.2 Fase II - Resultados da cultura de células

A presença de prata nos meios de cultura não alterou a viabilidade nem a apoptose das células, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p = 0,4813$ e $p = 0,4179$ respectivamente), conforme demonstrado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Avaliação da viabilidade celular (%) obtida por citometria de fluxo nos meios de cultura de leucócitos quando submetidos a diferentes concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu g L^{-1}$)

Concentração Ag^{1+} $\mu g L^{-1}$	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7	Experimento 8	Experimento 9	Experimento 10	Experimento 11	Experimento 12
0 controle	97,9	98,4	97,8	99,2	99,4	99,2	99,5	99,4	99,8	98,1	98,3	98,6
1,3 (10X)	98	97,3	97,1	99,3	99,4	99	99,2	99,4	99,1	98,2	98,1	98,1
8,5 (65X)	97,3	97,6	98,3	99,3	99,3	99,2	99,1	99,2	99,3	97,6	98	98,1
19,5 (150X)	98,1	97,8	97,9	99,4	99,5	99,3	99,3	99,4	99,3	98,5	98,7	98,5
39 (300X)	98,2	98,3	98,4	99,3	99,3	99,2	99,3	99,3	99,4	98,7	98,4	98,6
78 (600X)	97,7	98,6	98,3	99,6	99,5	99,2	99,2	99,3	99,3	98,4	97,8	98,2
195 (1500X)	98,4	98,3	98,5	99,1	99,,	99,2	98	99,1	99	98	98,1	97,7
260 (2000X)	98,7	98,7	98,1	99,2	99,1	99	99,2	99,2	99,1	98,2	98,3	98,1

(Kruskal- Wallis p = 0,4813)

Tabela 6. Avaliação da apoptose celular (%) obtida por citometria de fluxo nos meios de cultura de leucócitos quando submetidos a diferentes concentrações de íons Ag^{1+} ($\mu g L^{-1}$)

Concentração Ag^{1+} ($\mu g L^{-1}$)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7	Experimento 8	Experimento 9	Experimento 10	Experimento 11	Experimento 12
0 controle	14,3	13,8	14,4	16,1	16,4	16,7	16,9	15,8	15,8	10,3	10,8	9,3
1,3 (10X)	16,4	17,2	21,4	19,4	16,4	16,4	19,5	16,7	15,6	11,1	9,9	10,4
8,5 (65X)	19,5	15,7	17,3	16,5	17,2	17,2	17,4	18	16,3	11,6	10	9,5
19,5 (150X)	16,7	19,7	19,4	16,3	18	17,5	15	15,6	16	10,4	8,8	11,7
39 (300X)	18,2	18,9	17,2	16,8	15,9	15,3	15	15,8	15,6	10,9	12,1	11,9
78 (600X)	17	17,6	18,9	19	18,2	19,4	17,5	15,6	18,8	11,9	11,6	11,5
195 (1500X)	18	16,7	16,9	19	18	18,6	21	17	18,4	8,2	6,5	9,6
260 (2000X)	18,7	17,8	14,9	19,8	26,4	19,9	15,9	16,6	17,1	8,3	8	8,4

(Kruskal-Wallis $p = 0,4179$)

Quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, houve uma queda na produção de espécies reativas de oxigênio pelos polimorfonucleares, à medida que a concentração de prata aumentou nos meios de cultura ($r = -0,9048$ e $P = 0,0046$), conforme demonstrado na figura 5.

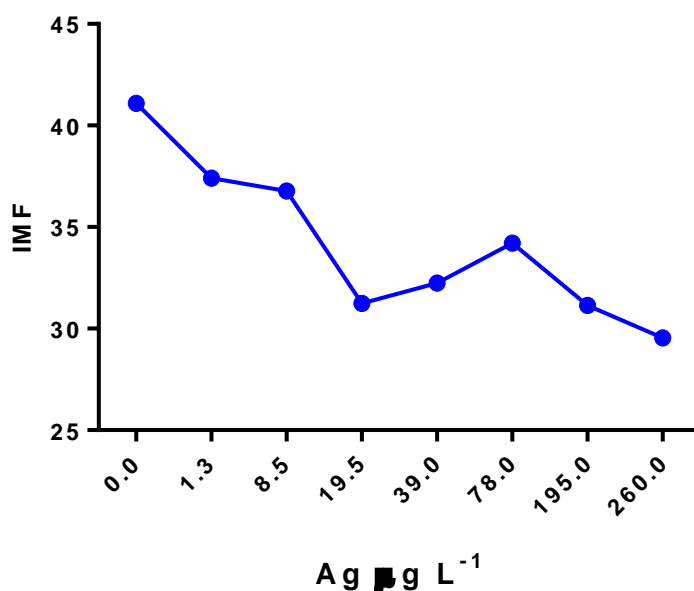


Figura 5 . Correlação dos níveis de prata presentes na cultura de células com a produção de EROS produzidos pelos polimorfonucleares obtidos por citometria de fluxo. (IMF: intensidade média de fluorescência). (Correlação de Spearman $r = -0,9048$ e $P = 0,0046$)

Nos mononucleares também houve correlação negativa entre a produção de EROs e os níveis de prata ($r = -0,2143$) porém não foi estatisticamente significativa ($p = 0,6191$).

Houve correlação positiva entre a produção de IL6 e IL1 e o aumento na concentração de prata ($p = 0,0072$ e $r = 0,8810$, e $p = 0,02$ e $r = 0,8571$ respectivamente), demonstrados nas figuras 6 e 7.

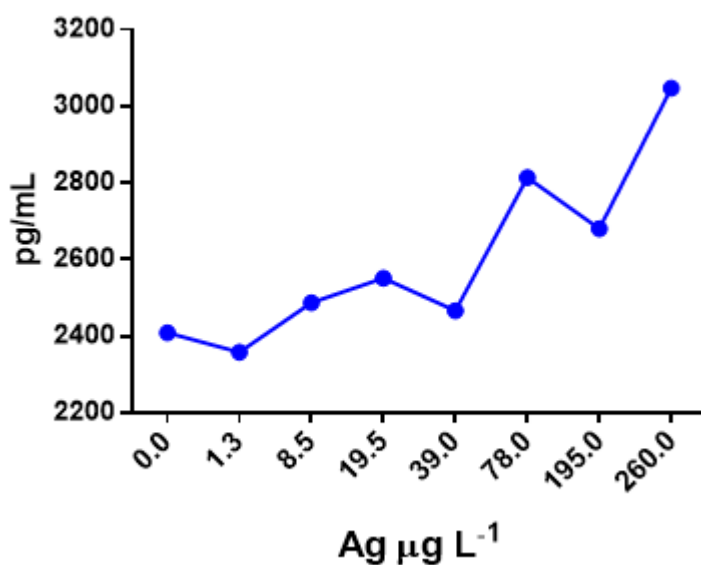


Figura 6 - Correlação entre os níveis de prata presentes na cultura de células e a produção de IL -6 obtida pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) (Correlação de Spearman $r = 0,8810$ e $p = 0,0072$)

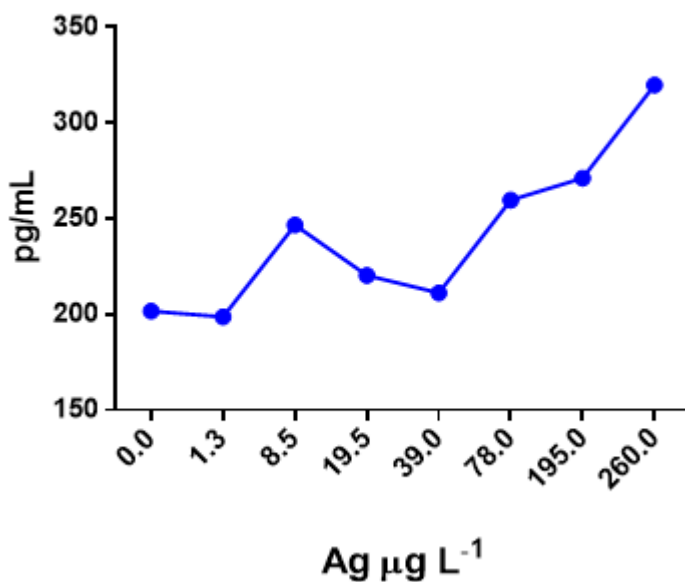


Figura 7 - Correlação entre os níveis de prata presentes na cultura de células e a produção de IL-1 β obtida pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) (Correlação de Spearman $r = 0,8571$ e $p = 0,02$)

6. DISCUSSÃO

(Para facilitar a presente discussão, ao utilizarmos o termos prata sérica, estamos nos referindo aos íons prata Ag^{1+}).

No presente estudo, observou-se que no primeiro dia de internação, a média da elevação dos valores de prata foi de 13,34 vezes acima dos valores encontrados nos controles. No terceiro dia, esta média foi de 48,46 vezes, atingindo 76,94 vezes e 88,14 vezes nos dias 5 e 10, respectivamente. Dos 20 pacientes estudados, 14 pacientes apresentaram níveis séricos de prata 50 vezes acima da média encontrada em indivíduos não expostos em pelo menos uma quantificação, e alguns o apresentaram em mais de uma quantificação. Um paciente apresentou níveis séricos 500 vezes acima da média da população não exposta.

Ao longo de várias décadas, a sulfadiazina de prata 1% tem sido utilizada amplamente no tratamento das feridas do paciente queimado, sendo considerada o tratamento “*gold-standart*”^{16,25}. Em nosso meio, a SSD continua sendo o tratamento de escolha pelo baixo custo e facilidade de aplicação. Embora consagrada pelo uso, os efeitos colaterais da sulfadiazina de prata tem sido relatados desde a década de 80¹⁰.

A absorção de prata que ocorre no leito das feridas está favorecida pela ausência de uma barreira efetiva e pela vascularização, sendo mais intensa durante a fase inflamatória⁹.

Seria confortável acreditar que a prata não seja tóxica se considerarmos que ela é transportada na corrente sanguínea e excretada pela bile, podendo ser armazenada na forma de compostos estáveis e insolúveis (seleneto de prata, sulfeto de prata)⁸.

No paciente queimado, a exposição à prata ocorre diariamente. Ao considerarmos que a taxa de eliminação da prata presente na corrente sanguínea é lenta, com uma meia vida de eliminação estimada em 46,4 dias, ou 1,5% ao dia⁸, podemos questionar se os mecanismos de proteção, ou de “sequestro” da prata estariam disponíveis e adequados para uma situação de sobrecarga de prata.

Para que ocorra a excreção biliar e excreção fecal da prata é necessário um adequado metabolismo hepático. No paciente grande queimado, o hipermetabolismo que se instala pode aumentar as taxas metabólicas entre 118 a 210% sendo que o fígado e os músculos são os tecidos que apresentam o maior aumento na demanda de oxigênio durante a fase “*flow*” após a queimadura²⁴.

Uma “falência hepática” por suprimento inadequado de oxigênio não parece algo que ocorra frequentemente no paciente queimado. Entretanto nos pacientes mais graves, a

instalação de um quadro de sepse grave ou choque séptico poderia comprometer a função hepática, e a excreção de prata.

A literatura descreve que a prata absorvida é depositada no fígado, entretanto somente o estudo de Coombs e colaboradores¹⁰ (1992) realizou avaliação *post mortem* encontrando uma grande deposição hepática (14µg/g de peso seco), e o estudo com microscopia eletrônica demonstrou uma extensa deposição tecidual com grânulos contendo prata nos lisossomos hepáticos.

É descrito que a prata possa induzir metalotioneínas que são enzimas que se ligam a vários xenobióticos, tais como prata, cádmio, ouro e mercúrio⁹.

No estudo de Miyayama e colaboradores⁴² (2013), utilizando células epiteliais brônquicas humanas, a exposição aos íons Ag¹⁺ aumentou a síntese de metalotioneínas (MT), ocorrendo um rápido sequestro dos íons pelas MT. No entanto, após 3 horas, houve decomposição das MT e os íons Ag¹⁺ foram relocados para frações celulares insolúveis e inibiram a transferência de elétrons da cadeia respiratória de complexos mitocondriais.

Este achado chama atenção para um grave potencial tóxico associado à prata, ou seja, o comprometimento da cadeia respiratória, com prejuízo na obtenção de energia. Nos pacientes queimados, devido ao hipermetabolismo, a obtenção de energia é fundamental.

Segundo Sterling³⁴ (2014) a concentração citotóxica da prata é desconhecida. A dose de referência da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) é de 0,005mg/kg/dia para exposição crônica e subcrônica, calculada a partir de um menor nível de efeito colateral observado de 0,014mg/kg/dia e uma única dose máxima não parece ser tão tóxica quanto o acúmulo crônico.

Estudos publicados por McCauley e colaboradores no final dos anos 80 e início da década de 90 apontavam para a citotoxicidade da prata para fibroblastos e queratinócitos, havendo queda na contagem de células, alterações na proliferação celular e alterações estruturais comprometendo a morfologia celular^{12,13,43}. Nesses trabalhos, foram utilizadas concentrações arbitrárias de prata, em torno de aproximadamente 1/100 da concentração do creme de sulfadiazina de prata.

Zapata-Sivent¹⁴ e colaboradores avaliaram a citotoxicidade da prata para leucócitos, utilizando sulfadiazina de prata em diluições de 0,004; 0,001; 0,0001 e 0,0003 da concentração de sulfadiazina a 1%. Houve supressão do *burst* respiratório em 100% com as diluições 0,004 e 0,001. Não houve aumento da mortalidade dos leucócitos nas concentrações utilizadas.

Greulich e colaboradores¹⁸ demonstraram que houve citotoxicidade dose-dependente para monócitos em concentrações acima de 1,0ppm (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), e alterações da viabilidade das células T em concentrações acima de 1,5 ppm (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Um outro estudo da mesma autora realizado em células tronco mesenquimais humanas demonstrou que foram observados efeito citotóxico e alterações na quimiotaxia em concentrações de prata de 2,5ppm (ou 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Não houve reações citotóxicas com concentrações de acetato de prata menores que 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁹.

Na fase I, observou-se que a concentração da prata sérica eleva-se rapidamente, atingindo valores 50 vezes maiores que os encontrados nos controles a partir do 3º. dia de utilização, chegando a valores acima de 100 vezes no quinto dia. A concentração sérica de prata em indivíduos não expostos escrita na literatura varia entre menor que 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ até menor que 2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^{10,11}. Os valor máximo atingido neste estudo foi de 72,58 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na fase II, foram utilizadas concentrações de prata baseadas em resultados obtidos no experimento I com objetivo de dimensionar a quantidade de prata absorvida pelos pacientes além de permitir extrapolar para uma avaliação *in vitro* uma situação que está ocorrendo *in vivo*.

A concentração de prata utilizada em cultura de células no presente estudo atingiu valor máximo de 260 $\mu\text{g L}^{-1}$, aproximadamente 25% da dose supostamente citotóxica e não houve alteração na viabilidade nem na apoptose celular. Entretanto, a exposição dos PMN a níveis crescentes de prata levou a queda da produção de espécies reativas de oxigênio, havendo uma forte correlação negativa, ou seja, quanto maior a exposição, menor a produção de EROs.

A diminuição do *burst* respiratório demonstrou que a primeira linha de defesa é comprometida quando os níveis de prata se elevam. Considerando que os neutrófilos são as primeiras células ao atingir o foco de inflamação^{29,44}, a diminuição do *burst* respiratório e consequentemente da fagocitose favorecem a proliferação bacteriana¹⁴. A queimadura leva a supressão do sistema imune e aumento da susceptibilidade à infecção⁴⁵, assim, o comprometimento do *burst* respiratório dos PMN pode trazer um prejuízo ainda maior ao sistema imune.

No presente estudo, houve forte correlação positiva entre os níveis de IL -1 β e IL-6, com os aumentos dos níveis de prata.

A IL-1 é liberada principalmente por fagócitos mononucleares e possui efeitos na ativação da inflamação e coagulação, liberação de vasodilatadores, resposta de fase aguda, febre e catabolismo⁴⁶. É considerada um elemento chave na regulação da resposta à infecção, trauma, inflamação e manutenção do estado inflamatório⁴⁷.

Assim como o TNF- α , a IL-1 é liberada logo após o trauma ou em vigência de infecção. Além de induzirem alterações na expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, podem estimular a produção de citocinas (IL-6 e IL-8) numa “segunda onda” e atuar localmente como sistemicamente¹.

Vindenes⁴⁸ e colaboradores estudaram a concentração de citocinas em pacientes grande queimados, utilizando IL-1 β , seu antagonista IL-1ra, interferon gama e TNF- α . Detectou que as concentrações de IL-1 β na admissão foram maiores nos pacientes sobreviventes do que os que não sobreviveram. O autor sugere que a liberação de IL-1 β seja necessária para a defesa do organismo após a queimadura, mas que a liberação excessiva desencadeada por processos infecciosos subsequentes possam provocar respostas inflamatórias adversas.

Um estudo experimental utilizando ratos com queimaduras terceiro grau em 60% da superfície corporal demonstrou que a IL-1 β apresentou uma elevação significativa 3 horas após a queimadura, permanecendo elevado e apresentado pico máximo 12 horas após o trauma e mantendo-se elevado até 48 horas, e posteriormente decrescendo aos níveis basais entre 96 e 168 horas⁴⁷.

A correlação positiva entre os níveis de prata e os níveis da IL-1 encontradas no presente estudo poderia ser deletéria, uma vez que uma interleucina desencadeante da resposta inflamatória estaria presente em níveis persistentemente elevados.

A interleucina 6 é uma citocina envolvida na regulação da resposta imune, hematopoiese, resposta de fase aguda, sendo produzida por células T, B, monócitos, fibroblastos e células endoteliais¹, contribuindo para a inflamação e lesão tecidual pós traumática⁴⁷.

Tanto a IL-6 como a IL-8 são mediadores da fase aguda, porém, quando apresentam níveis persistentemente elevados, há uma associação com complicações e mortalidade em pacientes politraumatizados, queimados ou em pós-operatório⁴⁶. Aumentos progressivos nos valores de IL-6 foram achados em pacientes queimados com superfície > 30%, indicando resposta inflamatória ascendente⁴⁹. Em pacientes com queimaduras com área corporal entre 30-85% a IL-6 apresentou maiores níveis entre os não sobreviventes¹.

Dentre as citocinas, a IL-6 tem sido o mediador mais útil e utilizado em pesquisas de resposta inflamatória pós-traumática devido a sua meia vida plasmática e padrão consistente de liberação, sendo utilizada para descrever a severidade do trauma⁵⁰.

Cuschieri e colaboradores⁵¹ sugerem que a elevação precoce da IL-6 no plasma a níveis maiores ou iguais a 350pg/ml estejam associados com aumento nas complicações inflamatórias, sendo potencial biomarcador na determinação do desenvolvimento subsequente de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (MODS).

Em um modelo experimental de trauma e choque hemorrágico em ratos, foi feita a supressão da IL-6, resultando em menor lesão hepática e pulmonar, com supressão de mediadores inflamatórios, com diminuição imunossupressão linfocitária, concluindo que a IL-6 teria um papel importante na inflamação e imunossupressão induzida pelo trauma⁵².

No presente estudo, houve correlação positiva entre o aumento dos níveis de prata dos meios de cultura e a produção da IL-6. Desta forma, duas citocinas (IL-1 e IL-6) com características claramente pró-inflamatórias apresentaram elevações à medida que as concentrações de prata aumentaram.

A “disfunção inflamatória” subsequente à queimadura é um evento conhecido, que ocorre principalmente nas queimaduras graves nas quais a inflamação aguda é rapidamente substituída pelo desenvolvimento da SIRS descontrolada por falência dos mecanismos anti-inflamatórios⁴. Nesta condição, há grande contribuição da desregulação da atividade dos macrófagos, que aumentam a capacidade de produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios [IL-1, TNF- α , IL-6, TGF- β (transforming growth factor), intermediários reativos de nitrogênio e PGE-2], levando ao desenvolvimento das complicações que ocorrem após a queimadura, tais como disfunção imune e sepse⁵³.

Desta forma, pode-se inferir que a queimadura gera um desbalanço inflamatório e imunológico, mais intenso nas queimaduras mais graves. A utilização da sulfadiazina de prata 1% é acompanhada de rápida absorção sistêmica^{10,11}. No presente estudo, ao utilizar níveis de prata em concentrações muito menores às utilizadas em estudos para avaliar a citotoxicidade da prata, observou-se a diminuição do *burst* de neutrófilos e a produção de interleucinas pró-inflamatórias.

7. CONCLUSÕES

Nossos achados demonstraram que a absorção sistêmica da prata decorrente do tratamento tópico com sulfadiazina em pacientes queimados ocorre de forma expressiva, e sugerem que a prata possa contribuir para a manutenção de um estado pró-inflamatório deletério, associado a diminuição de um mecanismo de defesa primária (*burst* respiratório) e favorecendo a manutenção de IL-1 e IL-6 elevadas, podendo contribuir para os desfechos negativos decorrentes da queimadura.

Considerações Finais

A queimadura é a agressão mais devastadora que o ser humano pode enfrentar. Do ponto de vista fisiopatológico, desencadeia imediatamente uma resposta inflamatória proporcional à gravidade da lesão, levando o indivíduo a exaurir todas as suas reservas metabólicas e energéticas na busca da cicatrização, ainda que isto lhe custe a própria vida.

Do ponto de vista emocional e psicológico, para os sobreviventes, traz marcas que são difíceis de passarem despercebidas, quanto mais, esquecidas. Sem mencionar as sequelas funcionais, que podem ser debilitantes.

O tratamento do paciente queimado, exige, portanto, um grande esforço multiprofissional para que possamos oferecer o que temos de melhor, não apenas para salvar uma vida, mas para restaurar a integridade funcional e psicológica, minimizando ao máximo todo o sofrimento ao qual este indivíduo foi exposto.

Para a realização desta tarefa, muitas vezes nos deparamos com dificuldades de toda sorte: tempo de internação prolongado, necessidade de cuidados intensivos, necessidade de múltiplas intervenções cirúrgicas, exposição à infecção e o alto custo.

Os custos são um fator extremamente relevante. Neste quesito, necessitamos ponderar: custo/ benefício.

Muitas vezes, ao optarmos pelo que seria menos dispendioso, acabamos por expor o paciente a outras complicações:

- infecção e conseqüente necessidade de investimentos em antibioticoterapia ampla,
- procedimentos de alta complexidade que não atingem seu objetivo (como perda de enxertos),
- aumento do tempo de internação, mantendo o paciente em um ambiente desfavorável, e muitas vezes, apesar do tratamento instituído, obtemos o pior desfecho possível: o óbito.

E desta maneira, o que parecia trazer o menor custo, torna-se algo caríssimo e irrecuperável.

Fazendo uma avaliação imparcial caso a caso, é imperioso que tenhamos acesso às novas tecnologias, oferecendo as melhores condições para a plena recuperação dos nossos pacientes.

Que o cálculo custo/benefício possa ser feito de maneira global e racional, considerando as múltiplas variáveis e o verdadeiro ganho que se espera obter.

Que o paciente queimado possa ser tratado dignamente, com todos os recursos tecnológicos, terapêuticos e humanos disponíveis.

REFERÊNCIAS

1. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH. Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns*. 1999; 25(2), 131-136.
2. Soares T, Delázari L, Sperandio R. Profile of children and adolescents admitted to a Burn Care Unit in the countryside of the state of São Paulo. *Rev Paul Pediatr*. 2014; 32(3):177-182.
3. Adorno filho ET, Almeida KGD, Reis GDC, Costa GR, Kracik AS, Tuluche LHF, Souza ASD, et al. Cost analysis in patients admitted to the Santa Casa Misericórdia de Campo Grande, treated with and without the aid of hyperbaric oxygen therapy. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery*, 2014 29(4). Retrieved from <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2177-1235.2014RBCP0098>.
4. Chipp E, Milner CS, Blackburn AV. Sepsis in burns. A Review of Current Practice and Future Therapies. *Ann Plast Surg*. 2010; 25(2):228-236.
5. Gear AJL, Hellewell TB, Wright HR, Mazzaresse PM, Arnold PB, Rodeheaver GT, Edlich RF. A new silver sulfadiazine water soluble gel. *Burns*. 1997; 23(5):387-391.
6. Barillo DJ, Marx DE. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns*. 2014; 40(S1), S3-S8.
7. Lansdown, ABG. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002; 11(4):125-130.
8. Walker M, Parsons D. The biological fate of silver ions following the use of silver-containing wound care products – a review. *Int Wound J*. 2014; 11:496-504.
9. Lansdown, ABG. Silver. 2: Toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *J W Care*. 2002; 11: 173-177.
10. Coombs CJ, Wan AT, Masterton JP, Conyers RAJ, Pedersen J, Chia YT. Do patients have a silver lining? *Burns*. 1992; 18(3):179-184.
11. Wan AT, Conyers RAJ, Coombs CJ, Masterton JP. Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients. *Clin Chem*. 1991; 37(10):1683-1687.
12. McCauley R, Linares H, Pelligrini V, Herndon D, Robson M, Heggors J. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res*. 1989; 46(3), 267-274.
13. McCauley RL, Li YY, Poole B, Evans MJ, Robson MC, Heggors JP, Herndon DN. (1992). Differential inhibition of human basal keratinocyte growth to silver sulfadiazine and mafenide acetate. *J Surg Res*. 1992; 52(3), 276-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538606>.
14. Zapata-Sirvent RL, Hansbrough JF. Cytotoxicity to human leukocytes by topical antimicrobial agents used for burn care. *J Burn Care Rehabil*. 1993; 14(2):132-140.
15. Boonkaew B, Kempf M, Kimble R, Cuttle L. Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns*. 2014; 40(8), 1562-1569.
16. Atiyeh BS, Costagiola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*. 2007; 33:139-148.
17. Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*. 2004; 30:140-147.

18. Greulich C, Braun D, Peetsch, A, Diendorf J, Siebers B, Epple M, Köller M. (2012). The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Adv.* 2012; 2(17), 6981-6987.
19. Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G, Köller M. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSC). *Langenbecks Arch Surg.* 2009; 394:495-502.
20. Wasiak J, Cleland H, Campbell F, Spinks A. Dressings for treating superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database for Systematic Reviews* 2013, Issue 3 Art No.: CD002106. DOI: 10.1002/14651858.CD002106.pub4. Retrieved from http://summaries.cochrane.org/CD002106/WOUNDS_dressings-for-treating-superficial-and-partial-thickness-burns.
21. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* 2008; 34:6-17.
22. Jeschke MG, Mlcak PR, Finnerty CC, Norbury WB, Gauglitz GG, Kulp GA, et al. Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Crit Care.* 2007; 11:R90. Available online <http://ccforum.com/content/11/4/R90>.
23. Jeschke MG, Chinkes DL, Finnerty CC, Kulp G, Suman OE, Norbury WB, et al. The pathophysiologic response to severe burn injury. *Ann Surg.* 2008; 248(3):387-401.
24. Herndon DN, Tompkins RG. Support to the metabolic response to burn injury. *The Lancet.* 2004; 363:1895-1902.
25. Deitch EA, Bridges RM, Dobke M, McDonald JC. Burn wound sepsis may be promoted by a failure of local antibacterial host defenses. *Ann Surg.* 1987; 206(3):340-346.
26. Schultz L, Walker SAN, Elligsen M, Walker SE, Simor A, Mubareka S, et al. Identification of predictors of early infection in acute burn patients. *Burns.* 2013; 39:1355-1366.
27. Ruiz-Castilla M, Roca O, Masclans JR, Barret JP. Recent advances in biomarkers in severe burns. *Shock.* 2016; 45(2):117-125.
28. Rosenthal J, Thurman GW, Cusack N, Peterson VM, Malech HL, Ambruso DR. Neutrophils from patients after burn injury express a deficiency of the oxidase components p47-phox and p67-phox. *Blood.* 1996; 88(11):4321-4329.
29. Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski, P. Immunosenescence of Polymorphonuclear Neutrophils. *The Scientific World Journal.* 2010; 10:145-160.
30. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry Part A.* 2009; 75, 475-481.
31. Jeschke MG, Gauglitz GG, Finnerty CC, Kraft R, Mlcak RP, Herndon DN. Survivors Versus Nonsurvivors Postburn. Differences in inflammatory and hypermetabolic trajectories. *Ann Surg.* 2014; 259(4):814-23.
32. Maciel E, Serra MC. Tratado de Queimaduras. São Paulo: Atheneu; 2006.
33. Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: The basic science. *Burns.* 2014; 40(S1), S9-S18.
34. Sterling, JP. Silver-resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend? *Burns.* 2014; 40(S1), S19-S23.

35. Tsipouras N, Rix CJ, Brady PH. Solubility of Silver Sulfadiazine in Physiological Media and Relevance to Treatment of Thermal Burns with Silver Sulfadiazine Cream. *Clin Chem.* 1995; 41:87-91.
36. Chernosouva S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle and metal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013; 52:1636-1653.
37. Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006; 33:627-634.
38. Adhya A, Bain J, Ray O, Hazra A, Adhikari S, Dutta G, Ray S, et al. Healing of burn wounds by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and nano-crystalline silver. *Journal of basic and clinical pharmacy.* 2014; 6(1), 29-34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4268627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 39 Fuller, FW. The Side Effects of Silver Sulfadiazine. *J Burn Care Res.* 2009; 30:464-470.
- 40 Aziz Z, Abu SF, Chong NJ. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. *Burns.* 2012; 38:307-318.
41. Storm-Versloot MN, Vos CG, Ubbink DT, Vermeulen H. Topical Silver for preventing wound infection. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010, Issue 3. Art. No.: CD006478. DOI: 10.1002/14651858.CD006478.pub2.
42. Miyayama T, Arai Y, Suzuki N, Hirano S. Mitochondrial electron transport is inhibited by disappearance of metallothionein in human bronchial epithelial cell following exposure to silver nitrate. *Toxicology.* 2013; 305:20-29.
43. McCauley RL, Li YY, Chopra W, Herndon DN, Robson MC. Cytoprotection of Human Dermal Fibroblasts against Silver Sulfadiazine Using Recombinant Growth Factors. *J Surg Res.* 1994; 56:378-384.
44. Parment K, Zetterberg A, Ernerudh J, Bakteman K, Steinwall I, Sjöberg, F. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst®). *Burns.* 2007; 33, 865-871.
45. Farina Jr JA, Rosique MJ, Rosique RG. Curbing Inflammation in Burn Patients. *Int J Inflam.* 2013; Article ID 715645, 9 pages.
46. Herndon DN. Total Burn Care. Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier; 2012.
47. Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral JM, Jeschke MG. Characterization of the Inflammatory Response During Acute and Post-Acute Phases After Severe Burn. *Shock.* 2008; 30(5):503-507.
48. Vindenes HA, Ulvestad E, Bjerknes R. Concentrations of Cytokines in Plasma of Patients with Large Burns: Their Relation to Time after Injury, Burn Size, Inflammatory Variables, Infection and Outcome. *Eur J Surg.* 1998; 164:647-656.
49. Dehne MG, Sablotzki A, Hoffmann A, Mühling J, Dietrich FE, Hempelmann G. Alterations of acute phase reaction and cytokine production in patients following severe burn injury. *Burns.* 2002; 28:535-542.
50. Andruszkow H, Fisher J, Sasse M, Brunnemer U, Andruszkow JHK, Gänsslen A et al. Interleukin-6 as inflammatory marker referring to multiple organ dysfunction syndrome in

severely injured children. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2014; 22:16. Retrieved from: <http://www.sjtrem.com/content/22/1/16>

51. Cushieri J, Bulger E, Schaeffer V, Sakr S, Nathens AB, Hennessy L et al. Early Elevation in Random Plasma IL-6 after Severe Injury is Associated with Development of Organ Failure. *Shock*. 2010; 34(4):346-351.

52. Zhang Y, Zhang J, Korff S, Ayoob F, Vodovotz Y, Billiar T. Delayed neutralization of interleukin 6 reduces organ injury, selectively suppresses inflammatory mediator and partially normalizes immune dysfunction following trauma and hemorrhagic shock. *Shock*. 2014; 42(3):218-227.

53. Schwacha M. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*. 2003; 29:1-14.

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Para o próprio paciente

Coleta Somente da prata**Título da pesquisa:****“..AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADOS COM NÍVEIS SÉRICOS DE PRATA EM PACIENTES QUEIMADOS”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Avaliação da resposta inflamatória e estresse oxidativo relacionados com níveis séricos de prata em pacientes queimados”** realizada em **“Centro de Tratamento de Queimados do Hospital Universitário de Londrina ”**. O objetivo da pesquisa é avaliar se a prata, um componente da pomada cicatrizante utilizada na superfície queimada, pode interferir na reação do organismo à queimadura. Convém esclarecer que a pomada à base de prata é utilizada mundialmente para o tratamento dos pacientes com queimaduras e tem como objetivo combater o crescimento das bactérias na área lesada. Entretanto alguns estudos têm sugerido que a prata possa, por outro lado, atrapalhar a reação do organismo à queimadura. O nosso objetivo é investigar se a prata altera ou não a resposta do organismo à queimadura. Nesse estudo não estamos propondo nenhum tipo diferente de tratamento, nem o uso de nenhuma medicação nova, apenas queremos avaliar os efeitos de um tratamento já estabelecido universalmente e que faz parte da rotina de atendimento aos pacientes queimados no Hospital Universitário. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: permitir a coleta de sangue (5ml) no momento da admissão hospitalar, e depois, no 3º., 5º. 10º. e 30º. dia de internação, para podermos medir alterações no sangue causadas pelo aumento da prata. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer custo ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

O sangue será processado no laboratório e ficará armazenado em freezers na temperatura de -80°C e permanecerá congelado em duplicata.

Os benefícios esperados são identificar se há alguma alteração na resposta do organismo quando o paciente recebe curativo com prata diariamente.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar **Erika Cristiane Mayumi Mimura**, Rua Robert Koch no. 60, Centro de Tratamento de Queimados ou Departamento de Clínica Médica, telefone 3371-2692, e-mail: rkmimura@hotmail.com., telefone pessoal: (43) 3345-1212, ou procurar o "LABESC - Laboratório Escola Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEP/UEL - Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445) Campus Universitário - ao lado do Banco Itaú - Londrina- Pr - CEP: 86057-970 - Telefone(43) 3371-5455 - E-mail: cep268@uel.br Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue ao(a) senhor(a).

Londrina, ____ de _____ de 201__.

Dra. Erika Cristiane Mayumi Mimura

RG::21.959.833 SSP/SP

_____ tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

ANEXO II – PARECER DO CEP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	083/2014
CAAE:	31168514.8.0000.5231
Data da Relatoria:	06/06/2014
Pesquisador(a):	Erika Cristiane Mayumi Mimura
Unidade/Órgão:	CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

Prezado(a) Senhor(a):

O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina” (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADOS COM NÍVEIS SÉRICOS DE PRATA EM PACIENTES QUEIMADOS.”

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 06 de junho de 2014.

Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini

Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina

SILVER SERUM LEVELS IN BURN PATIENTS AND EVALUATION OF TOXICITY IN CELL CULTURE

Authors:

1. ALEXANDRE JOSÉ FARIA CARRILHO

PhD, MD. Science Center of Health of the State University of Londrina. Department of Internal Medicine. Division of Endocrinology. Address: Rua Robert Koch n.60 – Vila Operária. CEP: 86038-350 – Londrina, Paraná, Brazil

2. ERIKA CRISTIANE MAYUMI MIMURA

MD, Science Center of Health of the State University of Londrina. Department of Internal Medicine. Division of Internal Medicine and Burn Treatment Center. Londrina, Paraná, Brazil

3. MARIA JOSEFA SANTOS

PhD, Department of Chemistry, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

4. TIAGO SEVERO PEIXE

PhD, Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis
State University of Londrina, Paraná, Brazil.

5. MARIA EMILIA FAVERO

MSc. Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

6. KAMILA LANDUCCI BONIFACIO

MSc Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina UEL, Paraná, Brazil.

7. DECIO SABBATINI BARBOSA

PhD. Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

8. ANDREA AKEMI MORITA

MSc .Department of Physiotherapy, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

9. JOÃO PAULO FAVORETO

Graduation student in Medicine. State University of Londrina, Paraná, Brazil.

SILVER SERUM LEVELS IN BURN PATIENTS AND EVALUATION OF TOXICITY IN CELL CULTURE

1. ABSTRACT

One percent silver sulfadiazine (SSD) is used in burn treatment over the last 50 years with documented systemic absorption. SSD toxicity is described in cell cultures using arbitrary silver concentrations. Objectives: 1) Quantitation of silver (Ag^{1+}) serum levels in burned patients; 2) to evaluate SSD toxicity in cell culture (monocytes and polymorphonuclears). **Materials and Methods:** Phase I : serum silver quantitation in burn patients using mass spectrometry. Phase II: Evaluation of silver toxicity in cell culture (mononuclear and polymorphonuclear cells) using silver concentrations similar to those found in burn patients. **Results:** 20 patients were eligible with mean burn body surface area of 27.68%. Patients' Ag^{1+} serum levels reached levels up to 50 to 500 fold when compared to unexposed individuals. Ag^{1+} ions added to the culture media did not affect the viability nor apoptosis of cells, with no statistically significant difference ($p = 0.4813$ and 0.4179 respectively). Polymorphonuclears production of reactive oxygen species decreased, as silver concentration raised in the culture media ($r = -0.9846$ and $p = 0.0046$). There was a positive correlation between IL1 and IL6 production and silver concentrations ($p = 0.072$ and $r = 0.8810$, and $p = 0.02$ and $r = 0.8571$ respectively). **Conclusions:** These findings suggest that silver ions could contribute to the maintenance of a deleterious pro-inflammatory state, decreasing a primary defense mechanism (respiratory burst) and favoring the maintenance of IL-1 and IL-6 at high levels, contributing to the negative outcomes after burns. **Key words:** silver sulfadiazine, burns, cell culture, toxicity, interleukins, respiratory burst.

2. INTRODUCTION

One percent silver sulfadiazine (SSD) is a cream, widely used in burn treatment over the last 50 years¹. The ease of implementation and low cost are the main advantages of its use, being well tolerated by most patients and effective against most microorganisms that colonize the burn area¹. Studies conducted with SSD in the 90's reported a high silver absorption of about 20 times above normal levels occurring within the first 6 hours after being used^{2,3}. At the same time, there were evaluations of cytotoxicity of silver in cell cultures (fibroblasts, keratinocytes and leukocytes) pointing to a potential deleterious effect of silver on these cells^{4,5,6}.

In the last two decades, new technologies were developed for caring of the burned area with new forms of presentation of silver, such as ionic silver and nanocrystallin silver^{7,8}. To support the potential benefits of these new products, various comparisons were made with silver sulfadiazine. Thus, the side effects of silver sulfadiazine were highlighted, especially the cytotoxicity to keratinocytes and fibroblasts^{7,9} to mesenchymal stem cells, mononuclear blood cells¹⁰, human mesenchymal stem cells¹¹. Foremost among these studies, the findings of Greulich and collaborators¹⁰ in which silver concentrations harmful or lethal to bacteria occurred in the same concentration ranges that could be harmful to human cells.

Retardation on wound healing is described with use of silver, besides the emergence of resistant strains to sulfadiazine⁸. A systematic review by Cochrane in 2013, compared different dressings used for second degree burns, concluded that sulfadiazine was associated with a worse healing when compared with biosynthetic dressings, silicone coated or treated with hydrogel¹². Therefore, despite being widely used in our country, there are adverse effects associated with SSD, such as the emergence of resistant strains, difficulty in healing and cytotoxicity.

This study used silver concentrations similar to those found in burn patients to evaluate the presence of toxicity on the viability and functionality of polymorphonuclear and mononuclear leukocytes in cell cultures.

2. OBJECTIVES

- 1) quantitation of silver serum levels in burned patients undergoing topical treatment with silver sulphadiazine 1% (Phase I).
- 2) test the hypothesis of silver cytotoxicity on eukaryotic cells (polymorphonuclear cells and lymphocytes) in vitro (Phase II), using silver concentrations similar to those found in phase I.

3. MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in two phases and was approved by the Ethics Committee in Research Involving Human Beings (CEP) of the State University of Londrina, opinion No. 083/2014 dated 06.06.2014. Phase I (longitudinal uncontrolled study) was designed to quantify serum silver in burn patients treated with silver

sulfadiazine 1%. Phase II (experimental study): based on values obtained from the Phase I, to determine silver cytotoxicity on cell culture media (lymphocytes and polymorphonuclear).

Inclusion criteria: Between June 2014 to February 2015, patients older than 18 years admitted to the Burn Treatment Center of the University Hospital of the State University of Londrina were eligible, after agreeing with Informed Consent Term. The inclusion criteria were: burn of at least 15% of total burn surface area or electrical burns at any length, up to 48 hours after injury, treated with dressings containing silver sulfadiazine 1%. Exclusion criteria: patients with chronic inflammatory diseases (rheumatoid arthritis, lupus, etc.), chronic renal failure, poorly controlled diabetes mellitus, severe dyslipidemias or presence of any other poorly controlled chronic disease, history of occupational exposure to silver, burn injury inhalation, use of other types of dressings.

3.1 Phase I: Serum silver Dosage in burned patients

Blood samples for serum silver levels were collected at the time of admission of the patient (D1) and subsequently, in the morning of the third, fifth, tenth and thirty days of hospitalization (D3, D5, D10 and D30 respectively). After being centrifuged, the supernatant was aliquoted and immediately stored at -80°C for further analysis.

After the period of data acquisition, the samples were thawed, using 1 ml of serum to which was added 1 ml of ultrapure nitric acid solution to 0.2%. Filtration was performed with mixed ester hydrophilic cellulose filter with pore diameter of 25mm to $0,22\mu\text{m}$. Analytical measurements were carried out using mass spectrometry with inductively-coupled plasma - ICP-MS 820MS - (Varian, Palo Alto, CA, USA). Data were acquired by ICP-MS Varian Expert Software V2.0 b87.

Silver serum results for each patient were compared to silver serum concentration of unexposed individuals in $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.2 Phase II: mononuclear cells and polymorphonuclear culture: cytotoxicity evaluation (Reactive Oxygen Species and interleukins production)

Mononuclear and polymorphonuclear cells (PMN) from peripheral blood obtained from healthy volunteers were isolated by gelatin gradient 3% and subjected to cell culture with increasing concentrations of silver, similar to that found in the time D1, D3, D5, D10, D30 patients treated at the Center Burns treatment.

The cell count was performed on ADVIA 120 automated counter (Siemens, USA). Cell morphology was assessed by optical microscopy on cytospin slides prepared by (Shandon Cytocentrifuge, USA) with 1×10^5 cells / slide, and stained with Romanovsky mixing according to Leishman. Cells were evaluated in binocular microscope (Olympus, USA) model CX31 increase of 1,000 times.

Viability and apoptosis were determined by flow cytometry using the kit for detection of apoptosis with Annexin V (BD Pharmingen™). The cells were labeled with 5 μL of anti-CD45 conjugated with fluorescein isothiocyanate (BD Pharmingen™), 5 μL of Annexin V conjugated to phycoerythrin (PE) and 5 μL of 7 amino actinomycin D simultaneously. Data acquisition was performed in FACSCantoII flow cytometer (Becton Dickinson, USA), previously adjusted according to the manufacturer's recommendations. As a negative control unlabeled cells were used. 10,000 events were acquired for each sample and data were analyzed using the FACSDiva software. The production of ROS was determined by dichlorofluorescein formation from the oxidation of the 2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). The data acquisition was performed in flow cytometer FACSCantoII using FACSDiva software and evaluation of mean fluorescence intensity (MFI) 10,000 events acquired for each sample.

The release of cytokines in the supernatant of cell culture treated with silver was determined by Cytometric Bead Array method (CBA) kit for Human inflammatory cytokine (BD Pharmingen, USA). Quantitation was performed: Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10); Interleukin-12p70 (IL-12p70) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) kit using the Human Cytokine inflammatory (BD Pharmingen, USA). The measurement procedure was performed according to the manufacturer's recommendation with minor modifications.

3.3 Statistical Analysis

For continuous variables, the data were expressed as means and standard deviations. To compare two or more groups, we used analysis of variance One-Way or ANOVA (for parametric data). For nonparametric data, we used the Kruskal-Wallis test. The Spearman correlation coefficient was used to establish correlations between

variables for nonparametric data. A p value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software 6.

4. RESULTS

4.1 Silver Dosage in Human Serum

Between June 2014 and February 2015 we were treated 134 patients in the Burn Treatment Center, State University of Londrina. Twenty patients met the inclusion criteria and agreed the informed consent and informed, with 19 males and 1 female patient with a mean age of 33 years. The average body surface area burned was 27.68%, and the admission of patients was on average 18.66 hours after the burn event. Silver serum levels found during the follow-up days are described in Table 1.

Table 1. Total burn surface área (%) and silver ions serum levels (Ag^{107}) expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$, quantified in non exposed individuals and in burn patients on days 1, 3, 5, 10 e 30 (D1, D3, D5, D10 and D30), respectively after burn

Patient	Total burn surface area (%)	Unexposed individuals Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pacients D1 Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pacients D3 Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pacients D5 Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pacients D10 Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pacients D30 Ag^{107} ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	46	0,22	13,52	16,95	32,80	29,1	
2	33,5	0,11	0,15	13,34	18,46	13,75	7,86
3	30	0,06	0,76	2,62	5,13	6,02	
4	42	0,44	1,26	7,53	7,79		
5	19	0,12	1,29	5,43	5,09	9,47	
6	55	0,14	1,95	16,11	18,58	25,85	10,37
7	17	0,07	1,99	2,33	4,17	6,47	
8	59	0,05	0,31	6,69	10,00		
9	34	0,06	0,79	1,97	7,16	3,81	
10	4	0,02	0,26	5,32	4,96		
11	2,5	0,18	0,60	0,37	10,00		
12	22,5	0,11	0,36	0,30	9,44	12,28	
13	55	0,06	1,67	4,85	1,41	12,78	
14	27,5	0,20	5,94	10,62	1,46	6,29	3,79
15	2,5	0,24	0,44	0,53	0,41		
16	1	0,12	0,59	0,12	0,20	0,16	
17	26	0,10	0,47	3,73	6,43	8,48	
18	22,5	0,08	0,62	18,03	39,42	72,58	
19	17,5	0,17	1,44	4,96	7,91	9,74	2,09
20	37	0,16	1,78	4,19	9,22	12,38	14,75
Standart deviation	17,87	0,09	3,03	5,73	10,26	17,58	5,08
mean	26,75	0,13	1,81	6,30	10,00	15,28	7,77

Using Spearman correlation it was observed that there was a correlation between silver levels achieved in D3 and the total burn surface area ($r = 0.5457$ and $p = 0.0128$).

Noting that the average silver serum levels found in burned patients increased 3.4 times between D1 and D3 and 5.5 times between D1 and D5, we chose to compare the serum values of Ag^{1+} ions in relation to mean serum silver obtained in non-exposed individuals.

Thus, it was obtained how many times silver serum level found in patients were higher than the mean of the unexposed population (Table 2).

Table 2. Ratio between patients plasma Ag^{1+} ions concentration (Ag^{107} in $\mu g L^{-1}$) in relation to the average of unexposed individuals (expressed in number of times) on days 1, 3, 5, 10 and 30 (D1, D3, D5, D10 and D30) after burning.

Pacients	Total burn surface area (%)	Unexposed individuals mean Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacients (D1) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacients (D3) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacients (D5) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacients (D10) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)	Pacients (D30) Ag^{107} ($\mu g L^{-1}$)
1	46	0,13	104,00	130,38	252,31	223,85	0
2	33,5	0,13	1,15	102,62	142,00	105,77	60,46
3	30	0,13	5,85	20,15	39,46	46,31	0
4	42	0,13	9,69	57,92	59,92	0,00	0
5	19	0,13	9,92	41,77	39,15	72,85	0
6	55	0,13	15,00	123,92	142,92	198,85	79,76
7	17	0,13	15,31	17,92	32,08	49,77	0
8	59	0,13	2,38	51,46	76,92	0,00	0
9	34	0,13	6,08	15,15	55,08	29,31	0
10	4	0,13	2,00	40,92	38,15	0,00	0
11	2,5	0,13	4,62	2,85	76,92	0,00	0
12	22,5	0,13	2,77	2,31	72,62	94,46	0
13	55	0,13	12,85	37,31	10,85	98,31	0
14	27,5	0,13	45,69	81,69	11,23	48,38	29,15
15	2,5	0,13	3,38	4,08	3,15	0,00	0
16	1	0,13	4,54	0,92	1,54	1,23	0
17	26	0,13	3,62	28,69	49,46	65,23	0
18	22,5	0,13	4,77	138,69	303,23	558,31	0
19	17,5	0,13	11,08	38,15	60,85	74,92	16,07
20	37	0,13	13,69	32,23	70,92	95,23	113,46
Standart deviation	17,87		23,32	44,10	78,99	127,29	32,06
Mean	26,71	0,13	13,92	48,46	76,94	88,14	14,95

After this comparison, it could be seen that increasing in Ag^{1+} ions serum levels reached some significantly high values with rates of 100 to 130-fold in D3, nearly 300 times in D5 and 500 times the D10. Based on these results obtained in humans, silver concentrations values were established to be added to cells culture medium.

The values defined for use in cell culture were zero, 10 times the control mean, 65 times the control mean, 150 times the control mean, 300 times the control mean, 600 times the control mean, 1500 times the control mean, 2000 times the control mean (0 ; $1,3 \mu g L^{-1}$; $8,5 \mu g L^{-1}$; $19,5 \mu g L^{-1}$; $39 \mu g L^{-1}$; $78 \mu g L^{-1}$; $195 \mu g L^{-1}$ e $260 \mu g L^{-1}$ respectively).

4.2 Cell culture results

The presence of silver in the culture media did not affect the viability nor apoptosis of cells, with no statistically significant difference ($p = 0.4813$ and 0.4179 respectively).

There was a drop in the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear, as silver concentrations increased in the culture media ($r = -0.9048$ and $P = 0.0046$), shown in Figure 1.

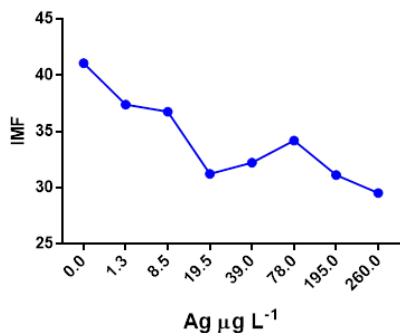


Figure 1 . Correlation of silver levels present in the cell culture media with PMN ROS production (obtained by flow cytometry). (IMF: mean fluorescence intensity). (Spearman correlation $r = -0.9846$ and $p = 0.0046$).

There was a positive correlation between IL1 and IL6 production and increased silver concentration ($p = 0.072$ and $r = 0.8810$, and $p = 0.02$ and $r = 0.8571$ respectively), as shown in figures 2 and 3.

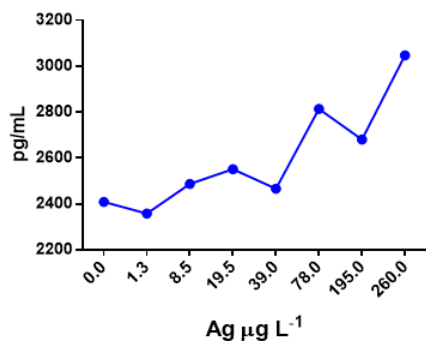


Figure 2. Correlation between silver levels present in cell culture media and IL – 6 levels, obtained by Cytometric Bead Array (CBA)

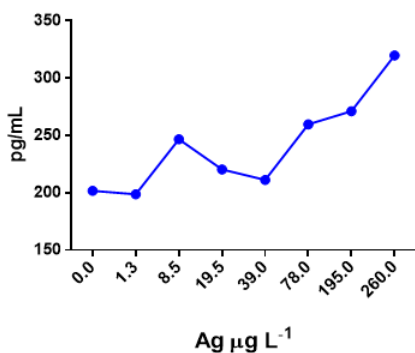


Figure 3. Correlation between silver levels present in cell culture media and IL – 1 β levels, obtained by Cytometric Bead Array (CBA)

5. DISCUSSION

Over several decades, silver sulfadiazine has been widely used in the treatment of wounds of burn patients, and was considered the gold standart treatment ^{8,13}. In our reality SSD remains the treatment of choice due to its low cost and ease of application. Nevertheless side effects of silver sulfadiazine has been reported since the late 80's ².

Studies published by McCauley and colleagues in the late 80s and early 90s pointed to the silver cytotoxicity to fibroblasts, with reduction in the cell count, changes in cell proliferation and structural changes affecting the cellular morphology^{4,5,14}. In these studies, arbitrary concentrations of silver were used, around about 1/100 the concentration of silver sulfadiazine cream.

Zapata-Sivent⁶ et al assessed the cytotoxicity of silver to leukocytes using dilutions of 0.004; 0.001; 0.0001 and 0.0003 of the concentrations of silver sulfadiazine 1%. There was suppression of respiratory burst on 100% with dilutions 0,004 and 0,001. There was no increase in leukocyte mortality with concentrations used.

Greulich and collaborators¹⁰ demonstrated that there was dose-dependent cytotoxic to monocytes at concentrations above 1,0 parts per million (1000 parts per billion or 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), and changes in the viability of T cells in concentrations above 1.5 parts per million (1500 parts per billion). Another study by the same author with human mesenchymal stem cells showed that cytotoxic effect and changes in chemotaxis occurred with silver concentrations of 2,5 parts per million (2500 parts per billion or 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$). There was no cytotoxic reactions with silver acetate concentrations lower than 1000 parts per billion¹¹.

In phase I it was observed that silver serum concentration rises rapidly, reaching values 50 times higher than those found in unexposed individuals from the 3rd. day of use, reaching values above 100 times on the fifth day. Silver serum concentrations in unexposed individuals found in the literature ranges from less than 2 ug L^{-1} to less than 2.3 ug L^{-1} ^{10,11}. The highest value achieved in this study was 72.58 ug L^{-1} . In phase II, silver concentrations used in culture media were based on results obtained in phase I in order to scale the amount of silver absorbed by patients trying to extrapolate to an evaluation in vitro a situation that occurred in vivo.

Silver concentrations used in this study reached a peak of 260 ug L^{-1} , approximately 25% of the presumable cytotoxic dose. There were no change in viability or apoptosis. However, exposure of PMN to increasing levels of silver led to reduced production of reactive oxygen species (ROS). There was a strong negative correlation, ie, the higher the exposure, the lower ROS production.

The decreased in respiratory burst showed that the first line of defense is compromised when silver levels rose. Whereas neutrophils are the first cells to achieve inflammatory focus^{16,17}, the decrease in respiratory burst and phagocytosis could favor the bacteria proliferation⁶. Burns lead to suppression of the immune system and increases susceptibility to infection¹⁸ thus the commitment of polymorphonuclears' respiratory burst can bring even greater harm to the immune system.

There was a positive correlation between levels of IL-1 and IL-6 with silver levels. Cytokines are important mediators of the pathophysiologic process that takes place after burns, triggering hypermetabolic response, protein loss, infection, sepsis and organ dysfunction, and early markers of inflammation induced by burns are: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF α ¹⁹.

IL-1 is released primarily by mononuclear phagocytes and it has effects in the activation of inflammation and coagulation, release of vasodilators, acute phase response, fever, and catabolism²⁰. It is considered a key element in the regulation response to infection, injury, inflammation and maintenance of an inflammatory state²¹.

As TNF- α , IL-1 is released soon after trauma or in presence of infection. In addition to inducing changes in the expression of adhesion molecules in endothelial cells, it may stimulate the production of cytokines (IL-6 and IL-8) in a "second wave" and act locally as systemically²².

Vindenes²³ and colleagues studied the concentration of cytokines in major burn patients, using IL-1 β , and IL-1ra which is its antagonist, interferon gamma and TNF- α . They found that IL-1 β concentration at admission in survivors were higher than those who did not survive. The author suggests that the release of IL-1 β is required for the body's defense after the burn, but that excessive release triggered by subsequent infectious processes can cause adverse inflammatory responses.

An experimental study using rats with third degree burn on 60% of body surface showed that IL-1 β had a significant rise 3 hours after burn, remaining at high levels and presented peak 12 hours after the trauma and maintaining elevated up to 48 hours and subsequently decreasing to baseline levels between 96 and 168 hours²¹.

The positive correlation between silver levels and IL-1 levels in the present study could be deleterious, since an interleukin involved in triggering the inflammatory response would be present in persistently elevated levels.

Interleukin 6 is a cytokine involved in the regulation of immune response, hematopoiesis, acute phase response, and it is produced by T cells, B cells, monocytes, fibroblasts and endothelial cells ²², contributing to inflammation and tissue injury after trauma ²¹.

Both IL-6 and IL-8 are mediators of the acute phase, however, when they have persistently high levels, there is an association with complications and mortality in patients with multiple trauma, burns or post-operative period ²⁰. Progressive increases in IL-6 values were found in patients with total burn surface area bigger than 30%, indicating an ascending inflammatory response ²⁴. In burn patients with a total burn surface area between 30-85%, IL-6 levels were higher among non survivors ²².

Cuschieri and colleagues ²⁵ suggest that early elevation of IL-6 in plasma levels greater than or equal to 350pg / mL was associated with increases in inflammatory complications, and that it could be a potential biomarker in determining the subsequent development of MODS. In an experimental model of trauma and hemorrhagic shock in rats, suppression of IL-6, resulted in less liver and lung lesion, and decrease in lymphocyte immunosuppression, concluding that IL-6 could have an important role in inflammation and immunosuppression induced by trauma ²⁶.

In the present study, there was a positive correlation between the increased levels of silver in culture media and IL-6 production. Thus, two cytokines (IL-1 and IL-6), with clear proinflammatory characteristics increased as silver concentrations raised.

The "inflammatory disorder" following burn is a known event, which occurs mainly in severe burns in which acute inflammation is quickly replaced by uncontrolled development of SIRS by failure of anti-inflammatory mechanisms ²⁷. In this condition, there is great contribution of dysregulation of macrophage activity, which increase the production and release of pro-inflammatory mediators (IL-1, TNF- α , IL-6, transforming growth factor β , reactive intermediates nitrogen and prostaglandin E-2), leading to the development of complications occurring after burn, such as immune dysfunction and sepsis ²⁸. Thus, one can infer that burn generates an inflammatory and immune imbalance, more intense in the most severe burns.

Silver sulfadiazine has a rapid systemic absorption. In the present study, using silver levels at much lower concentrations than those used in studies to assess the cytotoxicity of silver, it was observed the decrease in oxidative burst of polymorphonuclears and rise in the release of proinflammatory interleukins.

These findings suggest that silver may contribute to maintaining a detrimental pro-inflammatory state associated with decreasing a primary defense mechanism (respiratory burst) and favoring the maintenance of IL-1 and IL-6 in high levels, leading to negative outcomes resulting from burns.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

REFERENCES

1. Lansdown, ABG. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002; 11 (4): 125-130.
2. Walker M, Parsons D. The biological fate of silver ions Following the use of silver-containing wound care products - a review. *Int Wound J* 2014; 11: 496-504.
3. CJ Coombs, Wan AT, JP Masterton, Conyers RAJ, Pedersen J, Chia YT. Do Patients have a silver lining? *Burns*. 1992; 18 (3): 179-184.
4. McCauley R, Linares H, V Pelligrini, Herndon D, M Robson, J. Heggens in vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res*. 1989; 46 (3), 267-274.

5. McCauley RL, Li YY, Poole B, Evans MJ, Robson MC, Hegggers JP, Herndon DN. (1992). Differential inhibition of human basal keratinocyte growth to mafenide acetate and silver sulfadiazine. *J Surg Res.* 1992; 52 (3), 276-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538606>.
6. Zapata Sirvent-RL, Hansbrough JF. Cytotoxicity to human leukocytes by topical antimicrobial agents used for burn care. *J Burn Care Rehabil.* 1993; 14 (2): 132-140.
7. Boonkaew B, Kempf M, R Kimble, Cuttle L. Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns.* 2014; 40 (8), 1562-1569.
8. Atiyeh BS, Costagiola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns.* 2007; 33: 139-148.
9. VKM Poon, A. Burd In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns.* 2004; 30: 140-147.
10. Greulich C, Braun D, Peetsch, A, J Diendorf, Siebers B, M Epple, Köller M. (2012). The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells Occurs in the same concentration range. *RSC Adv* 2012.; 2 (17), 6981-6987.
11. Greulich C, S Kittler, Epple F, G Muhr, Köller M. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg.* 2009; 394: 495-502.
12. Wasiak J, Cleland H, F Campbell, Spinks A. Dressings for superficial and partial thickness burns treating. *Cochrane Database for Systematic Reviews* 2013 Issue 3 Art No .: CD002106. DOI: 10.1002 / 14651858.CD002106.pub4. Retrieved from http://summaries.cochrane.org/CD002106/WOUNDS_dressings-for-treating-superficial-and-partial-thickness-burns
13. The Adhya, Bain J, Ray O Hazra A Adhikari S Dutta L, Ray S, et al. Healing of burn wounds by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and nano-crystalline silver. *Journal of Basic and Clinical pharmacy.* 2014; 6 (1), 29-34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4268627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. McCauley RL, Li YY, Chopra W, Herndon DN, Robson MC. Cytoprotection of Human Dermal Fibroblasts against Silver Sulfadiazine Using Recombinant Growth Factors. *J Surg Res.* 1994; 56: 378-384.
15. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. Part A. *Cytometry* 2009; 75, 475-481.
16. Wessels I, J Jansen, L Rink, Uciechowski, P. Immunosenescence of polymorphonuclear Neutrophils. *The Scientific World Journal.* 2010; 10: 145-160.
17. Parment K, Zetterberg A Ernerudh J, K Bakteman, Steinwall I, Sjoberg, F. Long-term immunosuppression in burned patients avaliado by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst®). *Burns.* 2007; 33, 865-871.
18. Farina Jr JA, Rosique MJ, Rosique RG. Curbing Inflammation in Burn Patients. *Int J Inflam.* 2013; Article ID 715645, 9 pages.
19. Jeschke MG, Gauglitz GG, CC Finnerty, Kraft R, Mlcalc RP, Herndon DN. Survivors Versus Nonsurvivors Postburn. *Ann Surg.* 2013; 00 (00): 1-10.
20. Herndon DN. *Total Burn Care.* Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier; 2012.
21. Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty DC, Boehning D, Barral JM, Jeschke MG. Characterization of the Inflammatory Response During Acute and Post-Acute Phases After Severe Burn. *Shock.* 2008; 30 (5): 503-507.
22. Yeh FL, WL Lin, Shen HD, Fang RH. Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns.* 1999; 25 (2), 131-136.
23. Vindenes HA, Ulvestad And Bjercknes R. Concentrations of Cytokines in Plasma of Patients with Large Burns: Their Relation to Time after Injury, Burn Size, Inflammatory Variables, Infection and Outcome. *Eur J Surg.* 1998; 164: 647-656.

24. Dehne MG, Sablotzki A, Hoffmann A, Mühling J, Dietrich FE, Hempelmann G. Alterations of acute phase reaction and cytokine production in Patients Following severe burn injury. *Burns*. 2002; 28: 535-542.
25. Cushieri J, Bulger And Schaeffer V, S Sakr, Nathens AB, L Hennessy et al. Early Elevation in Random Plasma IL-6 after Severe Injury is Associated with Development of Organ Failure. *Shock*. 2010; 34 (4): 346-351.
26. Zhang Y, Zhang J, S Korff, Ayoob F, Vodovotz Y, Billiar T. Delayed neutralization of interleukin 6 angiograms organ injury, selectively Suppresses inflammatory mediator and partially normalizes immune dysfunction Following trauma and hemorrhagic shock. *Shock*. 2014; 42 (3): 218-227.
27. Chipp And Milner CS, Blackburn AV. Sepsis in burns. A Review of Current Practice and Future Therapies. *Ann Plast Surg*. 2010; 25 (2): 228-236.
28. Schwacha M. Macrophages and immune dysfunction post-burn. *Burns*. 2003; 29: 1-14.