

# CONECTA SIM 2020

Universidade Federal de Minas Gerais

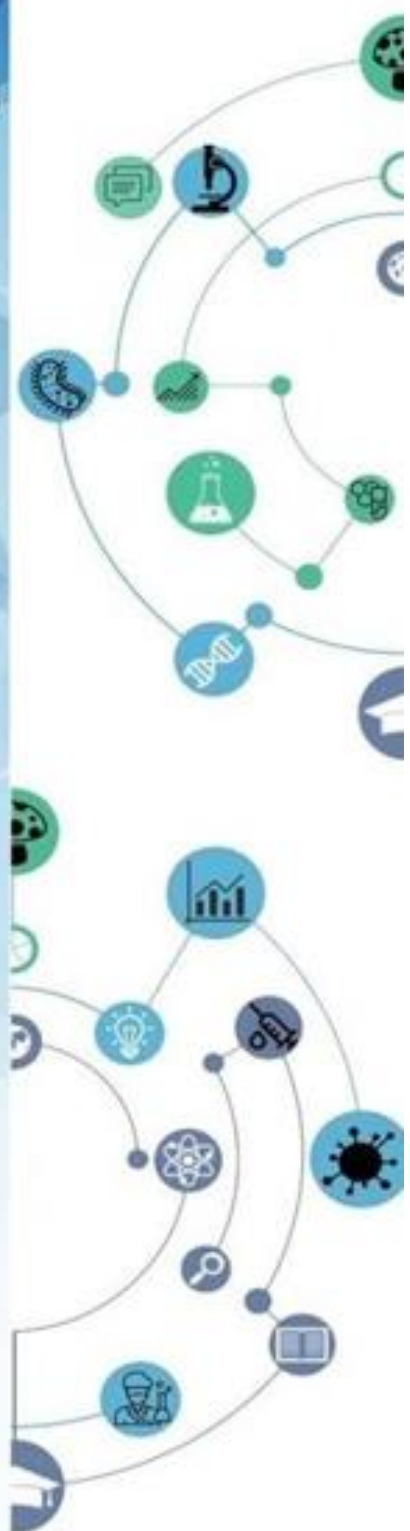
VII Simpósio de Microbiologia  
da UFMG

## Caderno de Resumos



**MICROBIOLOGIA  
INTERLIGADA**

**03 a 06  
Novembro de  
2020**



## Índice

<b>Apresentação .....</b>	<b>3</b>
<b>Organização e Realização .....</b>	<b>5</b>
<b>Patrocinadores e Apoiadores .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>7</b>
<b>Agradecimento Especial .....</b>	<b>8</b>
<b>Programação do Evento .....</b>	<b>9</b>
<b>Palestrantes .....</b>	<b>13</b>
<b>Resumos .....</b>	<b>19</b>
Ambiental .....	19
Microbiologia Geral .....	24
Virologia .....	34
Bacteriologia .....	49
Micologia .....	69
Educação .....	94
<b>Resumos Expandidos .....</b>	<b>98</b>
Ambiental .....	98
Microbiologia Geral .....	117
Virologia .....	156
Bacteriologia .....	184
Micologia .....	260
Educação .....	364

## Apresentação

O programa de Pós-Graduação em Microbiologia (PPGM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) abrange os cursos de Mestrado, Doutorado, Mestrado profissional e Especialização *lato sensu*. Atualmente possui 30 docentes orientadores que desenvolvem trabalhos experimentais em 17 amplas linhas de pesquisa bem consolidadas.

A tradição do Curso é reconhecida nacional e internacionalmente, com conceito 7 na última avaliação trienal da CAPES. O Programa objetiva a formação de discentes, técnica e cientificamente qualificados para o exercício das atividades profissionais de ensino, extensão e pesquisa em Microbiologia e áreas correlatas.

O PPGM da UFMG foi idealizado, estruturado e implantado em 1970, criado pela resolução do Conselho Universitário de 23 de setembro do mesmo ano. A responsabilidade de sua implantação foi do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, tendo sido oferecido inicialmente o grau de Mestrado em Microbiologia. A idealização e criação teve a participação marcante do Prof. Eduardo Osório Cisalpino, então diretor do ICB, com o Prof. José de Alencar como primeiro coordenador.

O curso de Mestrado, desde sua criação em 1970, tem acolhido estudantes com ampla variedade de objetivos e que hoje se encontram em posições acadêmicas em instituições de nível superior, bem como posições técnicas, tanto na indústria quanto em institutos de pesquisa aplicada. A sedimentação do Programa de Mestrado abriu perspectivas para um salto qualitativo maior, que culminou na criação do Programa de Doutorado, pelo parecer do Conselho Universitário em 17/12/1992.

A criação do curso de Doutorado objetivou fundamental e essencialmente a criação de condições para a capacitação de docentes do Ensino Superior, voltados para o desenvolvimento da pesquisa. As perspectivas principais voltam-se à transferência do conhecimento gerado para iniciativa privada e, principalmente, profissionais para atender a demanda existente no País e na América Latina de um número maior de pesquisadores qualificados.

A existência do Doutorado permitiu aos discentes e docentes o envolvimento em projetos de pesquisa de maior profundidade, contribuindo para a melhora da qualidade da pesquisa científica no Brasil. A participação na formação de recursos humanos para a Microbiologia no país pode ser avaliada pelo destino dos egressos do Programa, hoje ocupando cargos ou funções em centros acadêmicos, de saúde ou de biotecnologia em Minas Gerais, bem como Piauí, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo, Bahia e Maranhão, além de países como Estados Unidos, Austrália, Angola, Áustria, Alemanha, Bolívia, Colômbia, Reino Unido, Canadá e Finlândia.

Consolidado em 2005 e com demanda contínua para o Mestrado, houve o empenho em criar o Curso de Especialização *lato sensu* para atender à comunidade. O curso foi criado em 2005 e é ministrado nas sextas-feiras no período noturno e aos sábados no período diurno, permitindo a adesão de diversos profissionais da saúde e meio ambiente.

O Fórum de Microbiologia passou a integrar as atividades do ano letivo do PPGM no início dos anos 2000. A intenção, à época de sua criação, foi dar visibilidade aos trabalhos executados por estudantes do programa, bem como prover aos alunos experiência na apresentação dos dados gerados durante o desenvolvimento de suas teses e dissertações. Por alguns anos, o Fórum de Microbiologia foi um evento de cunho eminentemente local, envolvendo basicamente o Departamento de Microbiologia e a comunidade científica da UFMG. Ao passar dos anos, a adesão por parte da comunidade aumentou, tornando o ano de 2013 particularmente emblemático, com o então IX Fórum de Microbiologia se estabelecendo definitivamente um evento científico Nacional, atraindo a participação de mais de 370 inscritos e convidados de Minas Gerais e outros estados brasileiros.

Neste ano de 2020, mediante muitos desafios, atingimos a marca de 892 inscritos e pela primeira vez todo o evento foi ministrado de forma online, com participantes de todos estados brasileiros. Assim, damos as boas-vindas aos participantes do **VII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG: CONECTA SIM 2020-*Microbiologia Interligada.***

São os votos da comissão organizadora,



## Organização e Realização

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – Universidade Federal de Minas Gerais

### Comissão Organizadora

#### Comissão Científica

Amanda Carvalho	Júlio Roger
Ana Gabriella	Kamila Lorene
Ana Luiza	Karen Costa
Ana Paula Crispin	Letícia Maria
Bárbara Alves Miranda	Lucas Hebert
Betânia Paiva Drumond	Luiz Rosa
Bruna Azevedo	Mônica Larucci Vieira
Daisymara Priscila de Almeida	Nalu T. A. Peres
Driele Souza	Natalia Ingrid
Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga	Natália Pessoa
Flávio Guimarães da Fonseca	Nidia Arias
Gabriela de Oliveira	Pedro Henrique Loureiro
Gabriele Moreira	Priscyla dos Santos
Geislane da Silva	Renan Vasconcelhos
Gisele Souza	Rodrigo Rodrigues
Isabella Luiza	Samile Henriques
Izabela Oliveira	Talita Bastos
Jamil Silvano	Thamar Holanda
Jaqueline Silvana Moreira	Victória Fulgêncio
Jéssica Pauline	Viviane Alves
Jordana Coelho dos Reis	Walter Rebuite

#### Editores

Bárbara Alves Miranda  
Driele Souza  
Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga

## Patrocinadores e Apoiadores



## Agradecimentos

A comissão organizadora, com muita alegria e satisfação agradece a participação de todos. Um evento desse nível só acontece pela confiança, dedicação, trabalho e empenho de vários segmentos envolvidos:

Ao corpo docente, especialmente aos professores Betânia Paiva Drumond, Viviane Alves Gouveia, Flávio Guimarães da Fonseca, Jordana Coelho dos Reis, Luiz Rosa, Mônica Larucci Vieira e Nalu Peres pelo apoio na organização deste evento.

A comissão de avaliação de resumos do evento, professores Caio Fagundes, Daniel de Assis, Graciéle Cunha Alves, Grazielle Pereira Oliveira, Jordana Reis, Lorena Silva, Marliete Carvalho da Costa, Maxwell Adriano Abegg, Mila Madeira, Mônica Vieira, Nalu Peres, Natália Guimarães e Simone Gonçalves;

A comissão de seleção dos melhores resumos do evento, professores Luiz Felipe Leomil Coelho, Amanda Latercia Tranches Dias e Silvana Queiroz.

Aos ilustres professores, doutores e profissionais palestrantes que abrilhantaram nosso evento, compartilhando conosco conhecimento inovador e de qualidade científica.

Aos participantes do Conecta SIM 2020 que acreditaram em nosso evento em um ano atípico, e foram fundamentais para a realização do evento.

Aos nossos patrocinadores e apoiadores, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização e sucesso deste evento.

Betânia Paiva Drumond e Viviane Alves Gouveia

Presidentes do VII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG: **CONETA  
SIM 2020**

## **Agradecimento Especial da Presidência do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG**

Queridos colegas, alunos e professores,  
queremos mais uma vez, manifestar aqui os nossos mais sinceros e profundos agradecimentos a cada um de vocês pela disponibilidade, envolvimento e dedicação demonstrados durante todas as etapas do nosso trabalho.

Organizar um evento como este é sem dúvida um enorme desafio. Organizar um evento científico em tempos de uma grande pandemia como COVID19, sem dúvida nenhuma é muito mais desafiador. Todos os desafios foram superados devido às múltiplas habilidades demonstradas por vocês, inteligência, criatividade, gentileza, sorriso, disposição, bom humor, garra e absoluto engajamento à proposta do nosso Simpósio de Microbiologia.

Agradecemos toda a amizade, respeito e carinho com que conduziram todo o trabalho superando os limites e expectativas. Foi extremamente gratificante trabalhar com vocês nesse projeto, apesar da distância. Que nossa parceria se repita em outras oportunidades da vida.

Nossos sinceros agradecimentos e congratulações pelo belo trabalho que realizaram!

Betânia Paiva Drumond e Viviane Alves Gouveia

## Programação do Evento

Dia 03 de Novembro - 2020	
Período	Atividade
14:00 - 14:20	Abertura
14:20 - 15:20	<p>Apresentação dos melhores trabalhos de 2019 dos Programas de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia- UFMG</p> <p>“O uso do alphaherpesvírus humano 1 oncolítico como estratégia terapêutica no controle de células metastáticas do câncer de mama” - Jéssica Pauline Coelho Souza - Melhor Monografia da Especialização</p> <p>"Análise de riscos sanitários em odontologia obtidos a partir de banco de dados informatizados da superintendência de vigilância sanitária de minas gerais" - Patricia Maria de Faria e Silva - Melhor Dissertação do Mestrado Profissional</p> <p>“Avaliação do efeito probiótico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905 em um modelo murino de alergia alimentar” - Vívian Correia Miranda</p> <p>“Estudo preclínico de uma vacina experimental contra dengue composta por vetores Adenovirais e Poxvirais recombinantes” - Raissa Prado Rocha - Melhor Tese de Doutorado</p>
15:20 - 15:40	Coffee Break
15:40 - 17:00	<p>Prêmio Claudio Bonjardim: apresentação de trabalhos</p> <p>"Desenvolvimento e validação de um kit para a detecção da COVID-19 e avaliação da resposta sorológica em indivíduos oligossintomático" - Flávia Fonseca Bagno</p> <p>"Yaravirus: Um vírus de 80 nm que infecta <i>Acanthamoeba castellanii</i>" - Paulo Boratto</p> <p>"Utilização de vírus influenza recombinante como plataforma vacinal bivalente contra <i>Streptococcus pneumoniae</i> e influenza A: avaliação da capacidade protetora e perspectiva industrial” - Kimberly Freitas Cardoso</p> <p>“Plasticidade do conteúdo de RNAs das vesículas extracelulares de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes condições ambientais” - Brenda Silva Rosa da Luz</p> <p>“O consumo crônico do álcool pelos doadores de medula óssea afeta a resposta imunológica dos receptores na infecção contra <i>Aspergillus fumigatus</i>” - Flávia Martins</p>
17:00 - 17:20	Sorteio de brindes e encerramento das atividades do 1º dia

Dia 04 de Novembro - 2020	
Período	Atividade
14:00 - 14:55	<p>Mesa-redonda temática: emergência de microrganismos resistentes</p> <p>Palestra: Resistência a antimicrobianos em Salmonella e Shigella: Dados do Brasil" - Dra. Juliana Pfrimer Falcão – USP</p> <p>Palestra: Leveduras resistentes e a importância da busca por novos antifúngicos" - Dra. Susana Johann - UFMG</p> <p>Discussão final da mesa-redonda "Pequenos vilões, grandes ameaças: a emergência de microrganismos resistentes"</p>
14:55 - 15:10	Coffee Break
15:10 - 16:00	<p>Mesa redonda: Precisamos falar de ciência!</p> <p>Palestra: A complexidade de comunicar ciência - Dr. Hugo Aguilaniu - Instituto Serrapilheira</p> <p>Palestra: Comunicação científica com empatia - Dra. Viviane Alves – UFMG</p>
16:00 - 16:20	Coffee Break
16:20 - 16:50	Palestra: O microbiologista no mercado de trabalho (parte 1): "Atuação do microbiologista na indústria do diagnóstico in vitro" - Rafael Calixto (Bioclin)
16:50 - 17:00	Sorteio de brindes e encerramento das atividades do 2º dia

Dia 05 de Novembro - 2020	
Período	Atividade
14:00 - 14:40	<p>Mesa-redonda - Conexões invisíveis: microrganismos e impactos ambientais</p> <p>Palestra: "Enxergando os impactos ambientais nos ambientes marinhos através dos microbiomas" - Dr. Pedro Milet Meirelles - UFBA</p> <p>Palestra: "Uso de fagos: Biocontrole e Microbiologia industrial, o lado bom da força!" - Dr. Sérgio Oliveira De Paula - UFV</p>
14:40 - 15:00	Coffee Break
15:00 - 15:40	<p>Mesa-redonda - Conexões invisíveis: microrganismos e impactos ambientais (continuação)</p> <p>Palestra: "Utilização biotecnológica de microrganismos em processos de biorremediação e biodegradação de poluentes" - Dra. Elen Aquino Perpetuo - UNIFESP</p> <p>Discussão final da mesa-redonda - Conexões invisíveis: microrganismos e impactos ambientais</p>
15:40 - 16:00	Coffee Break
16:00 - 16:30	Palestra - O microbiologista no mercado de trabalho (parte 2): "O papel do microbiologista no mercado de tratamento de água e efluentes residenciais, hospitalar e comercial" - D'artagnam Gomes - Grupo Clear Water
16:30 - 17:00	Palestra: "Como escolher um anticorpo ideal para a sua pesquisa e produtos para COVID-19." - Dra. Gabrielly Denadai Chiarantin (Nova Analítica)
17:00 - 17:15	Sorteio de brindes e encerramento das atividades do 3º dia

Dia 06 de Novembro - 2020	
Período	Atividade
14:00 - 15:00	<p>Mesa-redonda - O ano em que a Terra parou: impactos e perspectivas da COVID-19</p> <p>Palestra: "Aspectos Epidemiológicos locais e nacionais da epidemia de Sars-Cov-2" - Dr. Maurício Nogueira - FAMERP</p> <p>Palestra: "Habemus vacinas?" - Dr. Flávio Guimarães da Fonseca – UFMG</p> <p>Discussão final da mesa-redonda - O ano em que a Terra parou: impactos e perspectivas da COVID-19</p>
15:00 - 15:20	Coffee Break
15:20 - 16:20	<p>Mesa redonda - Papo cabeça: saúde mental na academia e em tempos de COVID-19</p> <p>Palestra: "Saúde mental e vida acadêmica" - Patrícia C. Carvalho Campos</p> <p>Palestra: "O vírus e nossas sacadas: observações clínicas" - Dr. Alexandre Simões</p> <p>Discussão final da mesa-redonda - Papo cabeça: saúde mental na academia e em tempos de COVID-19</p>
16:20 - 16:40	Premiação e encerramento oficial do evento
14:40 - 17:00	Coffee Break
17:00 - 18:00	Happy hour! Diário da Peste - Atualidades e discussões sobre COVID19 - Dr. Maurício Nogueira (FAMERP) e Dra. Natália Pasternak (IQC)



## Palestrantes



D'artagnam Gomes

Diretor Técnico Clear Water, especialista em projetos voltados para área de tratamento de água para fins hospitalares, tratamento de efluentes, inclusive para reuso, com tecnologias de última geração (processos oxidativos Avançados), de 1986 a 2008 atuou no controle da qualidade da água distribuída nos diversos Sistemas de Abastecimento de água atendidos pela EMBASA, bem como na supervisão técnica de Estações de Tratamento de água, Instrutor do Senai, palestrante em varias instituições de ensino superior na área ambiental e pesquisador da FAPESB).



Dr. Alexandre Simões Ribeiro

Psicanalista, graduado em Psicologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (1993), com Mestrado (finalizado em 1997) e Doutorado (concluído em 2002), ambos na linha de pesquisa dedicada à Teoria Psicanalítica (UFMG). Dedicou suas pesquisas, a partir de Freud e Lacan, à Psicanálise na Contemporaneidade e ao campo da Subjetividade e Saúde Coletiva. Atua como professor universitário desde 1993. Atualmente, é docente efetivo da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), nas cadeiras voltadas à Psicanálise e também à Drogadição. Já atuou e atua em diversas outras Instituições de Ensino Superior (graduação e pós-graduação).



Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1993), mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (1996) e doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia, ênfase em Virologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2000). Realizou dois pós-Doutorados, sendo um junto ao National Institutes of Health (NIH), em Bethesda, MD, EUA (2001-2003) e o segundo realizado no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, MG (2004-2005).

Atualmente é Professor Associado junto ao Departamento de Microbiologia do ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG e Coordenador do curso de Pós Graduação em Microbiologia da UFMG (conceito 7 CAPES) (Biênio 2017-2018). Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Virologia (SBV - gestão 2018 a 2020).



Dr. Hugo Aguilaniu

Biólogo, se dedicou às bases genéticas dos processos de envelhecimento. É doutor pela Universidade de Gothenburg (Suécia), pós-doutor pelo Salk Institute for Biological Studies (EUA) e membro do National Scientific Research Council (França). Foi diretor de um laboratório na École Normale Supérieure em Lyon. Os resultados de sua pesquisa científica foram publicados em revistas como Nature, Science, Cell Metabolism e PLoS Biology e premiados pelo CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) e European Research Council (ERC). Também foi Pesquisador Visitante Especial na Universidade de São Paulo (USP) e mediu relações institucionais entre universidades francesas e brasileiras.



Dr. Maurício Nogueira FAMERP

Possui graduação em Medicina pela Universidade Federal de Minas Gerais (1995), mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (1998) e doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2001). Foi Pós-doutorando no National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2000 a 2004). Em 2010 obteve o título de Livre Docente em Virologia. Atualmente é Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Virologia, atuando principalmente nos seguintes temas: flavivírus, dengue e relação vírus célula. Atua também no Hospital de Base de São José do Rio preto na Unidade de Biologia Molecular. Foi Presidente da Sociedade Brasileira de Virologia (2017-2019).





Dr. Pedro Milet Meirelles

Pedro Meirelles é um cientista preocupado com os efeitos do aquecimento global. O biólogo voltou suas atenções para os aquíferos. Seu estudo analisa microrganismos presentes nesses reservatórios para medir os efeitos da liberação de carbono na atmosfera. Em outra frente,

Pedro Meirelles também investiga a possibilidade que esses microrganismos têm de processar o CO<sub>2</sub> e mitigar os efeitos do aquecimento global. Professor do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Pedro é mestre e doutor em genética pelo mesmo instituto. Além de tentar frear o aquecimento global e enriquecer o conhecimento sobre os aquíferos, o biólogo ainda é pai de duas crianças.



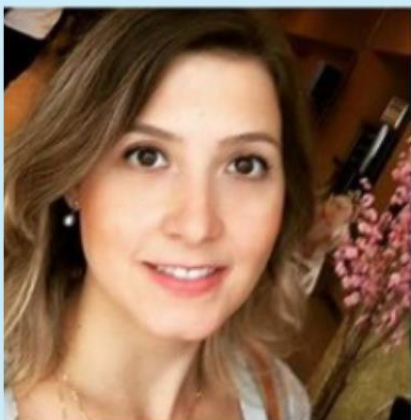
Dr. Sérgio Oliveira De Paula

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (1999), mestrado (2001) e doutorado (2004) pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Bioagentes Patogênicos pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Atualmente é professor associado IV da Universidade Federal de Viçosa e Coordenador do Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral/UFV. Tem experiência na área de microbiologia e genética molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: genomas, dengue, SARS-COV-2, Zika, Mayaro, vacina, diagnóstico molecular, bacteriófagos e expressão heteróloga de proteínas. É orientador dos programas de pós-graduação em biologia celular (Capes 5) e microbiologia agrícola (Capes 6) da UFV. Atua como revisor de projetos de várias agências de fomento. Faz parte do corpo editorial e é revisor de vários periódicos nacionais e internacionais. Foi diretor executivo do centro tecnológico de desenvolvimento regional de Viçosa - CENTEV / UFV de 2015 a 2019. É integrante da Câmara de Ciências Biológicas e Biotecnologia - CBB da Fapemig.



Dra. Elen Aquino Perpetuo

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina (1997), mestrado (2000) e doutorado (2004) em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo. Possui Pós Doutorado em Engenharia Química pela Escola Politécnica (USP). Atualmente é Professora Adjunta na UNIFESP-DCMar-Baixada Santista e atua como pesquisador colaborador - no CEPEMA - POLI-USP-Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente. Também é orientador específico credenciado no Programas de Pós Graduação: Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar (UNIFESP), Engenharia Química (USP) e Interunidades em Biotecnologia (USP-IPT-Butantan), sendo neste último responsável pela disciplina "BTC 5S01-2: Bioprospecção de micro-organismos para degradação de poluentes orgânicos". Tem experiência na área de Microbiologia Aplicada, Bioprocessos e Bioprodutos atuando principalmente nos seguintes temas: biorremediação, biodegradação de poluentes, microbiologia ambiental, processos biotecnológicos.



**Dra. Gabrielly Denadai Chiarantin**

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo (2011), mestrado em Biologia Química pela Universidade Federal de São Paulo (2014) e doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo (2018). Realizou pós-doutorado na Universidade Federal do ABC, no laboratório de Neurogenética. Tem experiência na área de medicina, com ênfase em neurobiologia, atuando principalmente em biologia celular, bioquímica e biologia molecular.



**Dra. Juliana Pfrimer Falcão**

Possui graduação em Farmácia Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP (1997), mestrado em Ciências Biológicas (Área de Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP(2000), doutorado em Ciências (Área Imunologia Básica e Aplicada Opção Bioagentes Patogênicos) pela Universidade de São Paulo-USP (2004), pós-doutorado realizado no Departamento de Genética (Área de Genética de Micro-organismos) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (2006). Atualmente, é Professora Associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. A principal linha de pesquisa de seu laboratório tem sido em epidemiologia molecular, virulência, genômica e transcriptômica de bactérias enteropatogênicas Gram-negativas tais como Salmonella spp., Yersinia spp., Shigella spp. e Campylobacter spp. e outras bactérias de interesse clínico. Atualmente, é orientadora de mestrado e doutorado do Programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP.



**Dra. Natalia Pasternak**

Formada em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), PhD com pós-doutorado em Microbiologia, na área de Genética Molecular de Bactérias pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Foi diretora no Brasil do festival internacional de divulgação científica Pint of Science - Um Brinde à Ciência, coordenando palestras em 85 cidades. É colunista do jornal O Globo, da revista The Skeptic UK, colunista da revista Saúde, e autora do livro Ciência no Cotidiano, da editora Contexto. Atuou como pesquisadora colaboradora do ICB-USP, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) entre 2018 e 2020. Atualmente é membro da Science Teaching Fellows Alumni Community da American Society for Microbiology, publisher da revista Questão de Ciência (www.iqc.org.br), o primeiro Instituto brasileiro para promoção de pensamento crítico e racional, e políticas públicas baseadas em evidências científicas.





**Dra. Susana Johann**

Possui graduação em Ciências Biológicas pela UNIOESTE, mestrado em Biotecnologia pela UFSC e doutorado em Microbiologia pela UFMG.

Atualmente é professora adjunta junto ao Departamento de Microbiologia na Universidade Federal de Minas Gerais. Têm experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Micologia, atuando principalmente nos seguintes temas: antifúngicos, candidíase, criptococose, paracoccidioidomicose, onde sua maior atuação é na busca de novos fármacos com atividade antifúngica.



**Dra. Viviane Alves**

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1998), mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2001) e doutorado em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (2004). Realizou pós-doutorado na UNIFESP (2005 - 2007), no IRR - FIOCRUZ/ MG (2008), atuou como pesquisadora DCR (CNPq) no IAM - FIOCRUZ/ PE (2009) e na Brown University (2014). É professora Adjunta da Universidade Federal de Minas Gerais desde 2010. Investiga o papel da regulação traducional no envelhecimento e na resposta imune, interação microrganismos-hospedeiro e atividade de novos compostos bioativos, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*. Orientadora do Programa de Pós Graduação em Microbiologia (ICB-UFMG) e do Mestrado Profissional em ensino de Biologia (PROFBIO). Atua na extensão como divulgadora científica nas redes sociais, coordenando o projeto de extensão @microUFMG.



**Rafael Calixto**

Farmacêutico generalista, especialista e mestre em microbiologia. O mestrado proporcionou uma sólida experiência em microbiologia, virologia e biologia molecular. Os projetos de pesquisa foram focados na detecção molecular, patogênese e disseminação viral em modelos animais. No período de sete anos na pesquisa acadêmica resultou em seis diferentes publicações científicas em revistas de grande impacto e um capítulo de livro. Atualmente, trabalha como Analista de P&D Pleno em uma indústria farmacêutica, dedicada à fabricação de testes de diagnóstico *in vitro*, com pesquisa, desenvolvimento, validação, suporte científico e técnico em métodos de PCR em tempo real para diagnósticos de doenças humanas e veterinárias.



Patrícia C. Carvalho Campos

Possui graduação em Psicologia com ênfase em Prevenção de Doenças e Promoção de Saúde pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (2011); mestrado em Psicologia do Desenvolvimento Humano pela Universidade Federal de Minas Gerais (2015). Atualmente é doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Psicologia: Cognição e Comportamento da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Maycoln Teodoro e docente na Pós Graduação em Saúde Mental da Faculdade Dom Luciano Mendes. Desde 2013 é servidora efetiva na Prefeitura de Belo Horizonte, onde ocupa o cargo de de Analista de Políticas Públicas na Subsecretaria Municipal de Assistência Social. Anterior a este período, trabalhou em serviços públicos e entidades do terceiro setor no interior do estado de Minas Gerais.

## RESUMOS ÁREA AMBIENTAL

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

### CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DA VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE *PSEUDOGYMNOSCUS* ISOLADOS DA ANTÁRTICA

Gomes<sup>1</sup>, E. C. Q.; da Silva<sup>1</sup>, T. H.; Fernandes<sup>1</sup>, B.; Valério<sup>1</sup>, D. A.; Gonçalves<sup>1</sup>, V. N.; Costa<sup>2</sup>, M.; Santos<sup>2</sup>, D. A.; Johann<sup>1</sup>, S.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – MicroPolar.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

E-mail: eldonqueres@gmail.com

---

**Resumo:** O gênero *Pseudogymnosascus* é relatado na Antártica, e também é responsável pela redução da população de morcegos em diferentes continentes, através da Síndrome do Nariz Branco. Até o momento, não há informações sobre o potencial de virulência *in vitro* de *Pseudogymnosascus* na Antártica. Onze isolados Antárticos do gênero *Pseudogymnosascus* foram selecionadas para avaliar o potencial patogênico. Todos os isolados foram capazes de crescer em temperaturas de 5 a 28 °C; oito isolados cresceram em pH 4 (vaginal), 7 (sangue humano) e 9 (intestinal); dez isolados apresentaram atividade fosfolipídica, indicando a capacidade de degradar os fosfolipídios da membrana celular; sete isolados apresentaram atividade de esterase, podendo causar lesões na pele; nove isolados apresentaram atividade hemolítica, indicando uma possível capacidade do fungo de romper hemácias e adquirir ferro do hospedeiro; oito isolados demonstraram atividade de urease, influenciando no pH do fungo; seis isolados apresentaram crescimento na condição de hipóxia, podendo levar a morte de indivíduos; dois isolados cresceram na condição de halotolerância, facilitando sua esporulação; o tamanho dos esporos variaram de  $2,16 \pm 0,44 \times 2,57 \pm 0,65 \mu\text{m}$  a  $3,20 \pm 0,79 \times 3,98 \pm 1,33 \mu\text{m}$ , indicando grande potencial de penetração nos alvéolos pulmonares. Quatro isolados foram resistentes ao Fluconazol. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variaram de 0,25 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para o Itraconazol e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para Anfotericina B. Os resultados obtidos indicam que os fatores de virulência presentes no gênero *Pseudogymnosascus* são relevantes, suscitando grande preocupação quanto à sua possível disseminação diante do aquecimento global.

**Palavras-chave:** Antártica; *Pseudogymnosascus*; potencial de virulência; fungo patogênico.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## **MICROPLÁSTICOS: UMA INVESTIGAÇÃO SOBRE OS IMPACTOS CAUSADOS NA CADEIA TRÓFICA**

**Paula<sup>1</sup>, K. G.; Araújo<sup>1</sup>, M. R.; Alves<sup>2</sup>, L. F. e Negreiros<sup>2</sup>, D.**

<sup>1</sup> Cidade Universitária UNA.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais.

E-mail: keilagoncalvesdepaula@gmail.com

---

**Resumo:** O plástico é amplamente utilizado em nossa sociedade, porém seu uso excessivo tem resultado diversas consequências para o meio ambiente. Os plásticos não são biodegradáveis, assim, após sua fragmentação em partículas entre 5mm e 333µm, eles passam a ser denominados microplásticos. Em decorrência do seu tamanho reduzido, eles podem ser ingeridos por diversos organismos aquáticos e serem transferidos de um nível trófico inferior para o nível trófico seguinte. Porém, os materiais poliméricos que compõem os plásticos possuem também substâncias com efeitos toxicológicos nocivos aos seres vivos, mostrando-se bioacumulados e levando à suspeita de desencadear ou causar doenças. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água e inferir a presença de microplásticos nesta, e seus possíveis impactos gerados na cadeia trófica. Foram realizadas análises microbiológicas e qualitativas de microplásticos. As análises de coliformes totais e termotolerantes, no ponto controle, mostraram-se ausentes. Já nas demais regionais foi encontrada a presença dos dois grupos de bactérias. As análises de bactérias heterotróficas estão dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Saúde. Quanto às análises de microplásticos, foram encontradas partículas em todas as amostras de água. A partir dos resultados, observamos que pode estar havendo uma recontaminação da água após o seu processamento, ou ainda a existência de nutrientes que podem ter elevado o crescimento microbiano nas redes de distribuição. Os microplásticos e os efeitos que suas substâncias podem causar nos seres vivos são ainda assuntos atuais e que precisam de maior atenção da comunidade científica.

**Palavras-chave:** água; microplásticos; microrganismos; bioacumulação; cadeia trófica.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## **RESULTADOS PRELIMINARES DA OCORRÊNCIA DE COLIFORMES EM RIOS E POÇOS DA CIDADE DE CURITIBANOS, SC.**

**Proença<sup>1</sup>, J. E.; Ribeiro<sup>1</sup>, G. F.; Kemer<sup>1</sup>, H. A.; Angelo<sup>1</sup>, N. M. M.; Cruz<sup>1</sup>, S. P.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, Departamento de Ciências Naturais e Sociais/Laboratório de Microbiologia.

E-mail: julia.elizabeth@grad.ufsc.br

---

**Resumo:** A água é o meio pelo qual diversas doenças de origem microbiana podem se alastrar, gerando problemas de saúde pública. Esse aspecto é particularmente importante em regiões do interior que não recebem água tratada por companhias de abastecimento. Além disso, o uso de águas de rios com altos níveis de contaminação pode gerar problemas ambientais e de saúde animal, caso o uso não esteja em conformidade com níveis de poluentes estabelecidos pela legislação brasileira. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água de rios e poços através da quantificação de coliformes totais e fecais. A coleta foi realizada em Curitibanos, na sub-bacia do Rio Marombas, nos Rios Pessegueirinho e Marombas, em outubro de 2020. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao Teste de Scott-Knott a um nível de probabilidade de 5%. Observou-se que, dentre os poços estudados, o maior nível de coliformes ocorreu em um poço próximo ao Centro do Rio Pessegueirinho. Em relação a água coletada diretamente dos rios, o maior nível de poluição microbiana também ocorreu no Centro do Rio Pessegueirinho. Esse local foi o único com água classificada como “Classe 2”, enquanto todos os demais enquadraram-se como Classe 1. Os dados revelam o potencial poluidor dos efluentes urbanos da cidade e seu impacto negativo na qualidade do recurso hídrico usado pela população. Políticas de tratamento de resíduos urbanos e esgotos, bem como preservação ambiental, devem ser adotadas para que ocorram melhorias na qualidade da água da cidade de Curitibanos.

**Palavras-chave** recursos hídricos; saúde pública; doenças bacterianas.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## QUALIDADE DA ÁGUA E OCORRÊNCIA DE COLIFORMES FECAIS EM RECURSOS HÍDRICOS DESTINADOS PARA CONSUMO ANIMAL

Ribeiro<sup>1</sup>, G. F.; Proença<sup>1</sup>, J. E.; Angelo<sup>1</sup>, N. M. M.; Cruz<sup>1</sup>, S. P.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, Departamento de Ciências Naturais e Sociais/Laboratório de Microbiologia.

E-mail: gabrielle.f.r@grad.ufsc.br

---

**Resumo:** A alta carga de microrganismos patogênicos na água é um fator agravante para a disseminação de doenças de veiculação hídrica tanto para populações humanas como rebanhos. Dessa maneira, o monitoramento da qualidade microbiológica da água ofertada aos animais é muito importante, e se faz necessário para garantir a sanidade dos mesmos, especialmente em regiões de interior onde o consumo de água é feito sem tratamento prévio (Madigan et al., 2016; Correa et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de bactérias de origem fecal em águas destinadas à dessedentação de animais de produção, oriundas de propriedades no município de Curitibanos, SC. Foram selecionadas 15 propriedades em regiões abrangentes do município. Observou-se que 33% das propriedades apresentaram água com número de coliformes fecais que excede o permitido pela legislação vigente, ou seja, 1.100 UFC/100 mL (Brasil, 2005). Do total de locais amostrados, 4 propriedades apresentaram água do tipo Classe 1, com valores de coliformes abaixo de 200 ml<sup>-1</sup> de água. Outras 6 propriedades tiveram água classificada como Classe 2/3, ainda enquadradas como adequadas para consumo animal. Porém, 5 propriedades apresentaram níveis de coliformes fecais superior ao permitido para dessedentação animal. Com base nos resultados encontrados, conclui-se que a água consumida pelos animais em algumas das propriedades representa risco para a saúde dos mesmos, sendo recomendado o tratamento prévio para que sejam atendidos padrões de qualidade satisfatórios.

**Palavras-chave:** poluição hídrica; *Escherichia coli*; dessedentação animal.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## **PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE OXIDANTE DE FERRO ISOLADOS DE UMA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

**Spagiari<sup>1</sup>, M. S.; Bizani<sup>2</sup>, D.**

<sup>1</sup> Universidade La Salle, Laboratório de Microbiologia Aplicada.

<sup>2</sup> Faculdades Integradas de Taquara, Laboratório de Microbiologia.

E-mail: souzasp@hotmai.com

---

**Resumo:** Um dos grandes problemas ambientais causados pela atividade mineradora é o líquido de escoamento das minas, conhecido como Drenagem Ácida de Mina (DAM). A oxidação dos minerais sulfetados na água de drenagem forma ácido sulfúrico, e a condição ácida possibilita a solubilização dos metais, que pode ser catalisada pela atividade microbiana. Atualmente, estudos estão sendo realizados a fim de encontrar microrganismos oxidantes de ferro e alternativas para inibir a ação dos mesmos. O objetivo do estudo foi realizar a prospecção de microrganismos oxidantes de ferro isolados de uma Drenagem Ácida de Mina. Foi amostrada uma alíquota de DAM proveniente do município de Butiá/RS. Para o isolamento dos microrganismos foi preparado diluições seriadas do efluente e diluição em ágar nutriente por 24 horas a 30 °C. Para as linhagens obtidas foram caracterizados morfologia e gram. Os testes de oxidação de ferro foram desenvolvidos em duas etapas, a primeira com ferro inorgânico (meio T&K, 20 dias a 30 °C) e a segunda com ferro orgânico (meio citrato férrico amoniacal, 14 dias a 30 °C). Os resultados indicaram o isolamento de seis linhagens microbianas (DAM 1-6), com morfologias e aspectos diferentes. Para a capacidade de oxidar ferro, somente duas linhagens (DAM 1 e DAM 3) obtiveram resultado positivo no meio citrato férrico amoniacal, e nenhuma positiva para o meio T&K. Esse estudo mostra que mesmo os microrganismos estando presentes no ambiente contaminado, uma relação direta da atividade catalisadora com os isolados não pode ser estabelecida.

**Palavras-chave:** Drenagem Ácida de Mina; Microrganismos; Oxidação; Ferro.

## RESUMOS MICROBIOLOGIA GERAL

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### POSSÍVEL CONVERGÊNCIA EVOLUTIVA EM PROTEÍNAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM HUMANOS

Arancibia <sup>1</sup>, R. A.H.; De Freitas <sup>1</sup>, L. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia, Núcleo de Biointegração/Laboratório de Genética e Bioinformática.

E-mail:rodrigo.alex@ufba.br

---

**Resumo:** O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas; doença tropical negligenciada e de grande impacto para saúde pública ao redor do mundo. Durante sua história evolutiva este parasita desenvolveu sofisticados mecanismos que subvertem os componentes do sistema imunológico e garantem sua sobrevivência no hospedeiro. Entretanto há lacunas na compreensão da origem e função de grande parte desses mecanismos. Considerando o longo processo de interação molecular como agente de pressão seletiva sugerimos que a eficiência de alguns desses mecanismo de virulência, como as proteínas de superfície parasitária se deve a certa similaridade com proteínas humanas devido a uma convergência evolutiva molecular. Para verificar esta possibilidade realizamos análises de similaridade entre proteínas humanas chave no processo de interação com o parasita contra os principais grupos de proteínas de superfície do parasita buscando identificar a semelhança entre as proteínas e indicar possíveis explicações quanto o seu significado o estudo da patogênese da doença de chagas. Também realizamos a comparação com proteínas homólogas em outros mamíferos do continente, com o objetivo de verificar a possível trajetória evolutiva dessa similaridade. Como resultado preliminares foram identificados fragmentos de proteínas da família trans-sialidase com similaridade com a proteínas de CARD6 e componentes da família do colágeno como também fragmento de proteínas GP63 similar a proteína USP7.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; doença de chagas; convergência evolutiva; fatores de virulência

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE AMOSTRAS DE COMPOSTAGEM**

**Campos<sup>1</sup>, L. L.; Amorim, C. M. <sup>2</sup>; Oliveira <sup>3</sup>, J. C. M. D.**

<sup>1</sup> Faculdade Ciências da Vida.

<sup>2</sup> Faculdade Ciências da Vida.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

E-mail: laradlcampos@gmail.com

---

**Resumo:** As enzimas são os produtos mais explorados pela indústria atualmente e possuem aplicação biotecnológica em diversos setores. A obtenção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é uma prática sustentável empregada ao desenvolvimento dos processos manufatureiros atuais. A exploração e estudo da microbiota existente na compostagem para esta finalidade ainda é escassa. Bactérias isoladas de amostras ambientais demonstram a capacidade deste grupo de microrganismos em produzir enzimas hidrolíticas. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a capacidade das bactérias obtidas de composto orgânico em produzir as enzimas hidrolíticas amilase, lipase e protease. Realizou-se o processamento da amostra de composto orgânico e, posteriormente, o plaqueamento em meio sólido a fim de caracterizar morfológicamente as bactérias isoladas. Em seguida, as estirpes foram inoculadas em meios contendo diferentes fontes de carbono, na forma de spots, para avaliação da atividade enzimática. A atividade enzimática foi avaliada semiquantitativamente por meio do índice enzimático (IE). O IE variou de 0 a 2,21, demonstrando o potencial biotecnológico de algumas cepas. Os isolados B1 e B10 apresentaram os maiores valores para amilase, enquanto que os isolados B4 e B7 para lipase e B3 e B11 para protease. Os dados apresentados neste estudo mostraram baixa variabilidade genética e morfológica entre os 12 isolados de bactérias obtidos no composto orgânico, porém existem estirpes com alto potencial de uso para produção de enzimas em escala industrial.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática; Biotecnologia; Compostagem; Enzimologia.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **ESTUDO DE CASO: ANÁLISE DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTE COM SEPSE EM HOSPITAL PRIVADO DE MINAS GERAIS**

**Carvalho, M.S.<sup>1</sup>; Nogueira, I. M. C. N.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FaSaR- Faculdade Santa Rita, autora

<sup>2</sup>FaSaR- Faculdade Santa Rita, coautor

E-mail: mariana07031998@gmail.com

---

**Resumo:** A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do organismo devido a infecção. Analisando sinais e sintomas, pode-se observar anormalidade celular, circulatória, metabólica, assim como também alterações laboratoriais. No Brasil, as UTI's são tidas como infecções bacterianas mais comuns, que podem desencadear a uma sepse, sendo responsáveis por 80 em cada 1.000 consultas clínicas. O presente estudo terá como objetivo avaliar os parâmetros laboratoriais e clínicos de paciente com sepse em hospital privado de Minas Gerais. O estudo será realizado a partir de resultados levantados no banco de dados do laboratório co-participante situado em Ouro Branco, MG.

**Palavras-chave:** Sepse; *Proteus sp*; *Clostridium difficile*; *Klebsiela sp*; *Serratia sp*

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS A PARTIR DA EPIDERME DE ANUROS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO – MG

Fernandes, C. H. P.<sup>1</sup>; Cordeiro, I. F.<sup>1</sup>; Sanchez, A.B.<sup>1</sup>; Matos, R. C.<sup>1</sup>; Moreira, L. M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

E-mail: camilahenriquesp@gmail.com.

---

**Resumo:** O controle biológico utilizando bactérias como antagonistas é uma maneira eficiente para o controle de pragas causadas por fungos. Neste cenário, o objetivo geral deste trabalho foi prospectar o potencial antifúngico de isolados bacterianos cultiváveis obtidos a partir da pele de quatro espécies de anuros coletados na Estação Ecológica do Tripuí. Assim, 192 isolados bacterianos foram investigadas quanto à capacidade de atuarem como biocontroladores de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Para o ensaio inicial, todos os isolados foram avaliados contra *F. oxysporum*, por meio de ensaio de inibição direta. Destes, 15 foram capazes de inibir em até 60% do crescimento do fungo. Estes 15 isolados foram então selecionados para o ensaio de inibição direta contra o *C. lindemuthianum*, seguindo o mesmo protocolo. Oito apresentaram taxa de inibição superior a 80%, dentre eles, dois com inibição de 100% do crescimento. Esses 8 isolados foram submetidos a outros ensaios de inibição e apresentaram resultados equivalentes aos testes anteriores. Porém, nenhum foi capaz de inibir por meio da produção de compostos voláteis. Além disso, foram realizados ensaios de produção de enzimas, produção de biofilme, auto-agregação, fixação de N e solubilização de fosfato para estes 8 isolados, dos quais apresentaram resultado positivo para produção de enzimas, produção de biofilme, auto-agregação, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Além disso, os gêneros dos 8 isolados foram identificados. Desta forma, conclui-se que estes isolados bacterianos apresentam potencial antagonico até então desconhecido com características fisiológicas que os apontam como potenciais agentes biocontroladores contra fungos de importância agrícola.

**Palavras-chave:** antagonismo; anurofauna; controle biológico; microrganismos; prospecção.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA SERRA DA CANASTRA

Ferraz<sup>1</sup>, K. S.; Gonçalves<sup>2</sup>, S. M.; Monteiro<sup>3</sup>, L. J. M.; Valentini<sup>4</sup>, H. S.; Rocha<sup>5</sup>, B. A. R.; Almeida<sup>6</sup>, A. A. P.

<sup>1</sup> Kamyille Silva Ferraz, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>2</sup> Sara Maria Gonçalves dos Santos, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>3</sup> Luanna Jessie Moreira Monteiro, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>4</sup> Helena Salles Valentini, acadêmica do curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

<sup>5</sup> Bernardo Alonso Ribeiro Rocha, acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

<sup>6</sup> Ana Amélia Paolucci Almeida, Doutora em Ciência de Alimentos, Professora/Pesquisadora do Curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

E-mail: aamelia@fumec.br

---

**Resumo:** A produção artesanal do queijo representa uma alternativa bem sucedida de conservação e aproveitamento da produção leiteira regional. O objetivo do presente estudo foi acompanhar a maturação com as alterações microbiológicas e análises físico-químicas de um queijo produzido de forma artesanal. Neste trabalho foram realizadas análises microbiológicas de coliformes a 30°C e identificação de *Escherichia coli* e análises físicas de pH, medidas do diâmetro, altura e massa da amostra; análises químicas de umidade e cinzas. Foram também isoladas culturas de fungos filamentosos responsáveis pela maturação, em uma amostra de queijo do tipo Canastra, produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, durante o segundo semestre de 2019. Foi observado que os resultados de pH, cinzas, extrato seco total e coliformes estavam dentro dos parâmetros desejados para esse tipo de amostra, exceto a umidade, que obteve resultados abaixo dos parâmetros, além de comprovado o crescimento de *E. coli*. Pretende-se, em uma segunda etapa identificar os fungos isolados do queijo responsáveis pelo seu aroma, textura e sabor, bem como os processos através dos quais eles se desenvolvem no queijo.

**Palavras-chave:** queijo; Canastra; artesanal; físico-química; coliformes; maturação .



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Myrciaria cauliflora* E DA *Eugenia uniflora* L.

Magalhães<sup>1</sup>, R. S.; Stewart<sup>1</sup>, S. S. e Crispim<sup>1</sup>, J. S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Colégio Técnico/Setor de Biologia.

E-mail: rafaelasmagalhaes@hotmail

---

**Resumo:** A resistência antimicrobiana nos ameaça e uma possibilidade para a produção e pesquisa de novos antibióticos é o uso de plantas com atividades antimicrobianas. Em vista disso, o objetivo do projeto foi determinar *in vitro* a atividade antibactericida dos extratos hidroalcoólicos misto das folhas e cascas da *Myrciaria cauliflora* e das folhas da *Eugenia uniflora* L. sobre culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para o preparo do extrato, o material botânico foi seco e posteriormente triturado. A extração dos princípios ativos foi realizada com o álcool e concentrou-se a solução em um rotaevaporador. Para determinação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana em placas e da Concentração Inibitória Mínima do extrato, utilizou-se o método de difusão em meio sólido. Para isso, as bactérias foram ativadas em caldo nutriente e inoculadas em meio de cultura de sólido, onde depositou-se soluções do extrato bruto e suas diluições. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição bacteriana foram medidos e foi realizada análise estatística no programa BioEstat 5.3. Como resultado obtivemos que o extrato hidroalcoólico das folhas da jabuticaba e da pitanga. (EHF) sobre cultura de *E. coli* e o misto das folhas de pitanga e da casca da jabuticaba (EHFC) sobre cultura de *S. Aureus* tiveram uma atividade antimicrobiana maior quanto comparado aos extratos aquosos sobre estas bactérias. Conclui-se que o EHF apresentou uma atividade antimicrobiana *in vitro* maior sobre as bactérias estudadas, sugerindo assim, mais pesquisa dessa substância para a sua utilização no tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana; Extrato; Bactérias; Pitanga; Jabuticaba;

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## INVESTIGAÇÃO BACTERIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA EM AMOSTRAS DE ÁGUA ORIUNDAS DE UM RESERVATÓRIO LOCALIZADO NO INTERIOR DO CEARÁ - BRASIL

Prado<sup>1</sup>, J. C. S.

<sup>1</sup>Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR

E-mail: cesarprado55@gmail.com

---

**Resumo:** O dado trabalho teve objetivo de analisar a qualidade microbiológica e parasitológica da água do açude São Vicente que está localizado no Município de Santana do Acaraú – CE. Para as análises microbiológicas quantificou e qualificou as bactérias do grupo dos coliformes, sendo estes coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (CTT), através da técnica dos Tubos Múltiplos para se quantificar o Número Mais Provável dos microrganismos presentes nas amostras. Já para as análises parasitológicas utilizou a técnica de Hoffman, que tem como princípio a decantação das partículas sólidas em amostras líquidas, confeccionou-se lâminas com as amostras e analisou-se em microscópio para detecção de possíveis estruturas parasitárias. Os resultados das 9 amostras analisadas para CT variaram de  $2,7 \times 10$  a  $9,0 \times 10^2$  CT/100mL, já para CTT variaram de  $1,7 \times 10$  a  $>1,6 \times 10^3$  CTT/100mL. Os resultados parasitológicos apresentaram *Ascaris lumbricoides* presente em 36,1% das amostras, o protozoário *Giardia lamblia* representado por 22,2%, *Entamoeba coli* (16,7%), *Balabtidium coli* (13,9%) e *Entamoeba histolyca* (11,1%). Com isso, conclui-se que os parâmetros microbiológicos e parasitológicos das águas do açude São Vicente presente no Município de Santana do Acaraú – CE, estão totalmente fora dos critérios de potabilidade estabelecidos pela Resolução N° 5, de 5 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde.

**Palavras-chave** Açude; Água; Coliformes Totais; Coliformes Termotolerantes; Parasitas; Santana do Acaraú.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## MÉTODOS DE DESINFECÇÃO NO MANEJO DE FUNGOS ASSOCIADO ÀS SEMENTES DE GIRASSOL PARA CONSUMO HUMANO

Rodrigo <sup>1</sup>, M. A, Alves <sup>2</sup>, R. S.

<sup>1</sup> Centro Universitário AGES/Laboratório de Microbiologia

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS)

E-mail: manoelrodrigo233@gmail.com

---

**Resumo:** O presente trabalho, tem como objetivo analisar os diferentes métodos de desinfecção com relação a incidência de fungos com potencial micotoxigênico em sementes de girassol relacionada ao consumo humano. Dessa forma, o trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário AGES em Paripiranga, BA utilizando-se de um total de 360 sementes, distribuídas em Placas de Petri contendo 30 sementes cada, totalizando 4 repetições por tratamento: com hipoclorito de sódio a 2%, radiação UV e testemunha. Os fungos foram identificados por meio da visualização das estruturas em microscópio estereoscópio e confirmados por meio da visualização em microscópio óptico pela técnica (*transparent adhesive tape method*). Dos gêneros de fungos descritos na literatura como produtores de micotoxinas foram identificados os gêneros, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Assim, os métodos de utilizados para desinfecção das sementes não foram efetivos, sendo necessário o uso de outras técnicas de desinfecção.

**Palavras-chave:** Desinfecção, Fungos filamentosos, Consumo Humano.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**ANÁLISE COMPARATIVA DA MICROBIOTA DA MUSCULATURA DA *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1896) E *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) ENTRE AMBIENTES EUTROFIZADO E DE PISCICULTURA.**

**Silva<sup>1</sup>, K. F. A; Araújo<sup>1</sup>, M. R.; Leal<sup>2</sup>, L. L. O. C; Soares<sup>1</sup>, L. F; Duarte<sup>1</sup>, I. A; Scoggin<sup>3</sup>, M. B; Casali<sup>4</sup>, A. K. e Silva<sup>3</sup>, A. R. M.**

<sup>1</sup> Centro Universitário UNA.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>3</sup> Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

<sup>4</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E-mail: kleber.felipe2997@gmail.com

---

**Resumo:** Este trabalho apresenta uma análise comparativa da microbiota da musculatura da *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1896) e *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) entre ambientes eutrofizado (Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, MG) e de piscicultura (BeGreen). Devido ao consumo de peixe do ambiente eutrofizado, a análise foi feita para avaliar uma possível contaminação que poderia inviabilizar o consumo desta carne. Para tanto, foram recolhidas amostras do músculo de dez peixes da espécie *Tilapia rendalli* coletados da Lagoa da Pampulha e dez peixes da espécie *Oreochromis niloticus* que foram obtidos por doação da empresa BeGreen. Estes peixes foram triados e analisados no laboratório de microbiologia localizado na Cidade Universitária Una. Foi realizada a contagem de coliformes a 45° (NMP/g), a contagem total de bactérias heterotróficas (UFC/g), além da avaliação de presença ou ausência de *Salmonella* sp. Verificou-se que, em média, foram encontradas 23 bactérias de coliformes a 45°C (NMP/g) e 2.100 na contagem total de bactérias heterotróficas (UFC/g) no *pool*, ou seja, no agrupamento feito com as amostras da Lagoa da Pampulha, e ausência de *Salmonella* sp. Já nas amostras da BeGreen, a média foi de < 7,1 bactérias de coliformes a 45°C (NMP/g) e 5.690 na contagem total de Bactérias Heterotróficas (UFC/g) e também houve a ausência de *Salmonella* sp.. Com base nos resultados e no Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos imposto pelo Ministério da Saúde brasileiro, ambos os peixes são viáveis para o consumo humano, não crus.

**Palavras-chave:** bactérias; peixe; musculatura; BeGreen; lagoa; Pampulha.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS DE LEITE HUMANO ÁCIDO DE UM BANCO DE LEITE

Stela<sup>1</sup>, M. V. L. e Falconi<sup>1</sup>, F. A.

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas/Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Medicamentos

E-mail: mariavitoriasstela@hotmail.com

---

**Resumo:** O leite materno é um alimento importante para os recém-nascidos e é recomendado seu uso exclusivo até os 6 meses de idade. Quando a mãe não pode amamentar, ou tem leite excedendo, o Banco de Leite Humano torna-se responsável por amparar essa mãe. A doação de leite é de extrema importância, porém, durante a coleta do leite materno para doação, pode ser que ocorra contaminação, principalmente por coliformes, que irá afetar a qualidade do mesmo e será descartado. O objetivo do trabalho foi realizar a identificação e contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes em amostras de leite humano ácido do banco de leite de um hospital universitário. Baseado em 23 amostras de leite humano cru e ácido, obtidos através do Banco de Leite Humano de um Hospital Universitário, foram realizadas análises e contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, pelo método do Número Mais Provável. A partir de diluições das amostras, houve inoculação em tubos de ensaio com Caldo Lauril Sulfato Triptose e tubos de Durhan invertidos. Os tubos com resultados positivos, foram transferidos uma alíquota para prova da presença de *Escherichia coli*. Como resultado, observou-se presença de Coliformes Totais 13 em amostras e presença de Coliformes Termotolerantes em 7 amostras. Concluiu-se que é de extrema importância os cuidados higiênicos-sanitários no momento de ordenha e coleta do leite materno que será doado, a fim de evitar a contaminação e posterior descarte.

**Palavras-chave:** Aleitamento Materno; Bancos de Leite; Técnicas Microbiológicas; Segurança Alimentar; Contaminação de Alimentos.

## RESUMOS VIROLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM KIT PARA A DETECÇÃO DA COVID-19 E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SOROLÓGICA EM INDIVÍDUOS OLIGOSSÍNTOMÁTICOS

**Bagno<sup>1,2</sup>, F. F.; Andrade<sup>1,2</sup>, L. A. F.; Sérgio<sup>1</sup>, S. A. R.; Figueiredo<sup>1</sup>, M.M.; Godoi<sup>1,3</sup>, L. C. <sup>1</sup>, Salazar<sup>1</sup>, N. C.; Gazzinelli<sup>1,4</sup>, R.T.; Fernandes<sup>1</sup>, A. P. S. M.; Teixeira<sup>1</sup>, S. M. R. e da Fonseca<sup>1,2</sup> F. G.**

<sup>1</sup> Centro de Tecnologia de Vacinas (CT Vacinas), BH-Tec, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Colégio Técnico da UFMG (COLTEC), Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, CEP: 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: flavia.bagno@gmail.com

---

**Resumo:** O SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), surgiu em dezembro de 2019 e causou uma pandemia associada a doença COVID-19, podendo variar de um quadro assintomático a uma infecção letal. Testes sorológicos, tais como os ensaios imunoenzimáticos (EIE), são uma ferramenta útil e, associadas a técnicas moleculares, auxiliam na detecção de novos casos, bem como são essenciais para estudos epidemiológicos e para o controle da pandemia. Este estudo descreve o processo de desenvolvimento de um kit de detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2, desde a produção de um antígeno recombinante do vírus até a validação externa do produto final denominado EIE COVID-19 IgG. O kit foi testado no laboratório de desenvolvimento (CT-Vacinas) e em três laboratórios de referência com mais de 600 soros (total de soros positivos n= 398 e negativos=262) e encontra-se atualmente em processo de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para produção em larga escala no instituto Bio-Manguinhos (Fiocruz, RJ). Além dos ensaios de performance, acurácia e estabilidade, o kit foi utilizado para avaliar a resposta de anticorpos contra o SARS-CoV-2 em 42 pacientes com COVID-19. Após 21 dias de confirmação por PCR, 100% dos pacientes testaram positivo para presença de imunoglobulina-G (IgG) específica contra o SARS-COV-2 pelo kit EIE COVID-19, sendo que o tempo médio de soroconversão após a confirmação por qRT-PCR foi de 10,9 dias. O EIE COVID19 IgG demonstrou ser um método conveniente e específico para a determinação em grande escala de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em soros humanos com alta precisão.

**Palavras-chave:** coronavírus; SARS-COV-2; pandemia; ELISA; EIE; diagnóstico; soroconversão.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## YARAVIRUS: UM VÍRUS DE 80nm QUE INFECTA *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

Boratto<sup>1</sup>, P.V.M.; Oliveira<sup>1</sup>, G. P.; Machado<sup>1</sup>, T. B.; Andrade<sup>1</sup>, A. C. S. P.; Baudoin<sup>2</sup>, J.P; Klose<sup>3</sup>, T.; Schulz<sup>4</sup>, F.; Azza<sup>2</sup>, S.; Decloquement<sup>2</sup>, P.; Chabrière<sup>2</sup>, E.; Colson<sup>2</sup>, P.; Levasseur<sup>2</sup>, A.; La Scola<sup>2</sup>, B.; Abrahão<sup>1</sup>, J.S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus

<sup>2</sup> Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection

<sup>3</sup> Purdue University, Department of Biological Sciences

<sup>4</sup> Department of Energy Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory

E-mail: pvboratto@gmail.com

---

**Resumo:** Neste trabalho relatamos a descoberta do Yaravírus, uma linhagem de vírus de amebas com uma origem e evolução intrigantes. Yaravírus apresenta partículas em torno de 80 nm e um genoma de dsDNA de 44.924 bp, codificando para 74 proteínas preditas. A anotação do genoma desse vírus mostrou que nenhum de seus genes se relaciona com sequências de organismos conhecidos quando comparamos a nível de nucleotídeos; já a nível de aminoácidos seis proteínas preditas apresentaram correspondências distantes nos bancos de dados nr. De forma complementar, a predição de estruturas tridimensionais indicou uma possível função para 17 proteínas no total. Além desses resultados, não fomos capazes de detectar genomas de origem viral intimamente relacionados ao Yaravirus em cerca de 8.535 metagenomas publicamente disponíveis, abrangendo diversos habitats ao redor do globo. O genoma do Yaravirus também contém seis tipos de tRNAs que não correspondem a códons comumente utilizados por ele. Análises de proteômica revelaram que partículas do Yaravirus contêm 26 proteínas virais, uma das quais potencialmente representando uma proteína divergente do capsídeo (MCP) com um domínio predito de *double jelly-roll*. A filogenia guiada por estrutura da MCP sugere uma relação entre os Yaravírus e membros do grupo *Pleurochrysis endemic virus*. A descoberta do Yaravirus expande nosso conhecimento sobre a diversidade dos vírus de DNA. A distância filogenética entre esse e todos os outros vírus destaca nosso conhecimento ainda preliminar da diversidade dos vírus eucarióticos, reforçando a necessidade de isolamento de novos vírus de protistas.

**Palavras-chave** Yaravírus; ORFan; NCLDVs; metagenômica; capsídeo

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL EM EXTRATOS DE *Tontelea* sp. (CELASTRACEAE) CONTRA O CHIKUNGUNYA VIRUS

Corrêa<sup>1</sup>, B. H. B. C.; Hauck<sup>2</sup>, M. S.; Coutinho<sup>1</sup>, J. E.; Magalhães, C. L. B.<sup>3</sup> Magalhães<sup>1</sup> J. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), Laboratório de Virologia e Tecnologia Celular (LAVITEC).

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Física, Laboratório de Pesquisas Aplicadas ao Câncer.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Ciências Exatas e Biológicas, Centro de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM).

E-mail: brenoboos@hotmail.com

---

**Resumo:** O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, sendo transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, que causa a Febre Chikungunya. As arboviroses possuem sintomatologias muito semelhantes, o que dificulta o diagnóstico da doença. Não há vacinas ou tratamento específico contra o CHIKV, portanto, a busca por compostos antivirais torna-se necessária. Nesse contexto, os compostos isolados de membros da família Celastraceae são bons atrativos para pesquisa de antivirais pela sua diversidade de moléculas bioativas relatadas. Este trabalho investiga o efeito citotóxico, a atividade antiviral e índices de seletividade em extratos de *Tontelea* sp., da família Celastraceae. Em células VERO, foram realizados os ensaios citotóxico e antiviral. A concentração citotóxica dos extratos para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi determinada pela técnica colorimétrica do metiltiazol-tetrazólio (MTT). Em seguida, foi determinada a concentração efetiva/protetora para 50% das células infectadas ( $CE_{50}$ ) e, finalmente, o índice de seletividade (IS). Os valores encontrados de  $CC_{50}$  foram de 157,20; 351,47; 224,96; 181,91 e 370,78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os extratos TFH, TFM, TFAE, TGH, TGC, respectivamente. Quanto à ação antiviral, os valores de  $CE_{50}$  foram de 34,31; 54,33; 79,43; 70,40 e 46,52  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os respectivos extratos. Os IS foram determinados e se mostraram acima de 4 apenas para os extratos TFM e TGC com valores de 6,47 e 7,97, respectivamente, conforme recomenda a literatura. Os resultados evidenciam presença de ação antiviral em compostos da planta investigada e estimulam a busca tanto dos princípios ativos quanto dos mecanismos da ação antiviral.

**Palavras-chave:** Chikungunya; *Tontelea* sp; antivirais; citotoxicidade.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA IN HOUSE PARA CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL EM MODELO MURINO DE UMA VACINA TERAPÊUTICA ANTI-HTLV-1**

**Cox<sup>1</sup>, L. J.; Daian e Silva<sup>1,2</sup>, D. S. O.; da Fonseca<sup>1</sup>, F. G.; Coelho dos Reis, J. G. A.<sup>1</sup>; Barbosa-Stancioli<sup>1,2</sup>, E. F.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia / Laboratório de Virologia Básica e Aplicada.

<sup>2</sup> GIPH – Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV.

E-mail: laura.cox@outlook.com.

---

**Resumo:** O vírus linfotrófico de células T humanas 1 (HTLV-1) pertence à família *Retroviridae* e é o agente etiológico da Mielopatia Associada ao HTLV-1 / Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), bem como, da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL). Atualmente, não existem vacinas ou tratamentos eficazes contra a infecção por esse vírus. Neste âmbito, a proteína HBZ do HTLV-1 surge como um promissor alvo terapêutico, estando associada à patogenicidade, mecanismos de evasão imune, dentre outros. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo padronizar um ELISA *in house* para a caracterização da resposta de um candidato vacinal terapêutico para o HTLV-1 através da utilização da proteína HBZ como alvo, a fim de estimular uma resposta imune mais eficiente. Neste trabalho foi avaliada a resposta humoral em modelo murino, através da realização de ensaios de ELISA *in house*. Testes ELISA foram feitos utilizando soros de camundongos C57BL/6 previamente imunizados em protocolo dose-reforço homólogo e heterólogo (n=7), com duas doses intervaladas por 14 dias (dose MVA-HBZp [vetor MVA recombinante contendo proteína HBZ multiepitopo e um peptídeo sinal] ou proteína HBZ completa; reforço de MVA-HBZp). Como resultado, o ELISA desenvolvido mostrou bom desempenho para a avaliação da resposta humoral. Os animais vacinados em ambos os regimes produziram anticorpos IgG, sendo que o protocolo heterólogo foi capaz de induzir uma resposta imune mais robusta. Os resultados obtidos são promissores e novas variáveis serão testadas buscando refinar o desempenho do teste.

**Palavras-chave** HTLV-1; ELISA; HBZ; purificação de proteína.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES PERIODONTAIS INDUZIDAS PELO VÍRUS *CHIKUNGUNYA* EM CAMUNDONGOS

Cruz<sup>1</sup>, M. F. A.; Anestino<sup>1</sup>, T. A.; Moreira<sup>1</sup>, T. P.; Souza<sup>1</sup> D. G. e Madeira<sup>1</sup> M. F. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, ICB/Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro (LIMHO)

E-mail: amamfcruz@gmail.com

---

**Resumo:** *Chikungunya* virus (CHIKV) é um alfavírus de RNA de fita simples, agente etiológico da febre de Chikungunya. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a inoculação de CHIKV em camundongos induz a produção de diversos mediadores, como as citocinas IL-6 e TNF, indutoras da atividade de osteoclastos. Objetivou-se, assim, entender o processo infeccioso por CHIKV na homeostase óssea e em doenças que envolvem reabsorção óssea como a doença periodontal, uma vez que foi observada a presença de CHIKV em tecidos periodontais de camundongos infectados. Para isso, foram utilizados camundongos machos selvagens (WT) da linhagem C57BL/6 infectados com  $1 \times 10^6$  UFP de CHIKV e seus controles não infectados. Foi realizada uma cinética de infecção (3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação intraplantar do CHIKV) e, após a eutanásia, em cada tempo experimental, os tecidos periodontais foram removidos e processados para análise de perda óssea alveolar, detecção indireta de macrófagos (NAG), detecção indiretas de neutrófilos (MPO) e produção de mediadores inflamatórios pela técnica de ELISA. Foi observada uma perda óssea alveolar significativa em animais com 7 ou 14 dias de infecção por CHIKV e não houve um aumento significativo na quantificação de NAG e MPO na maxila dos animais infectados pelo CHIKV. Concluiu-se que a presença de CHIKV nos tecidos periodontais está relacionada a alterações teciduais, como a perda óssea alveolar. Tem-se como perspectiva analisar a produção de mediadores inflamatórios nos mesmos tempos experimentais avaliados para a perda óssea alveolar, para o entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

**Palavras-chave:** CHIKV; Perda óssea alveolar; camundongos; inflamação

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PROTEÍNA HBZ RECOMBINANTE – EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Daian e Silva D.S.O.<sup>1,2</sup>; Cox L.J.<sup>1</sup>, Da Fonseca F.G.<sup>1</sup>; Coelho dos Reis J.G.A.<sup>1,2</sup> Barbosa-Stancioli E.F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup> GIPH – Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV.

E-mail: danybiolog@gmail.com.

---

**Resumo:** O vírus linfotrófico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus associado ao desenvolvimento de diversas patologias em seres humanos. O provírus codifica a proteína HBZ que atua em vias distintas na infecção e patogênese do HTLV-1, sendo considerada um promissor alvo terapêutico. Não existem vacinas ou tratamentos disponíveis para o combate a infecção, sendo emergencial o desenvolvimento de uma ferramenta imunoterapêutica promissora e efetiva. Neste contexto, o nosso grupo tem atuado na caracterização de um protótipo vacinal para o enfrentamento do HTLV-1. Parte dos nossos estudos envolve protocolos de imunização dose-reforço heterólogo que utilizam como dose a proteína HBZ completa, produzida em vetor procarioto, e como reforço um vírus MVA recombinante que expressa uma proteína HBZ multiepitopo. Estudos preliminares apresentaram-se promissores, mas sugeriram que uma melhoria da purificação da proteína utilizada na imunização seria fundamental. Sendo assim, a proteína HBZ (região codificante completa) teve a sua sequência otimizada comercialmente, expressão realizada em vetor procarioto e purificação em sistema AKTA. A presença da proteína foi confirmada por *Western Blot* e a citotoxicidade dos eluatos avaliada por MTT. A proteína HBZ foi produzida e purificada com sucesso, possibilitando a produção em larga escala dos estoques vacinais. O tampão utilizado na purificação demonstrou-se citotóxico *in vitro*, sendo os processos de precipitação ou diálise alternativas eficientes para a sua eliminação e utilização segura dos eluatos nos ensaios posteriores *in vivo*. Protocolos de remoção do LPS das amostras purificadas estão atualmente sendo avaliados para garantir um produto final de melhor qualidade para os ensaios de imunização seguintes.

**Palavras-chave:** HTLV-1, vacina terapêutica, proteína recombinante, HBZ.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO POR PCR QUANTITATIVO (QPCR) PARA O VÍRUS DA HEPATITE D (HDV)

Lara, J. L.<sup>1</sup>; Paixão, V.M.<sup>1</sup>; Mota, B. E. F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Microbiologia Clínica.

E-mail: vivianmp95@gmail.com

---

**Resumo:** A infecção pelo vírus da hepatite D é diagnosticada através de anticorpos. No Brasil, o diagnóstico sorológico da infecção por HDV só é realizado nos casos em que o indivíduo resida em áreas endêmicas ou tenha um antecedente epidemiológico que o ligue a estas regiões e testes moleculares só são realizados em caráter de pesquisa. Apesar da existência de alguns “kits” comerciais para a detecção do HDV por qPCR, os mesmos apresentam algumas desvantagens, como alto custo e incapacidade de detectar alguns genótipos, como, por exemplo, o genótipo 3, circulante no Brasil. Portanto, o projeto teve o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico para o HDV baseado em qPCR que seja de baixo custo e com capacidade de detecção de todos os genótipos circulantes no Brasil. Para isso, foi realizada uma busca na literatura para identificação de testes moleculares para a detecção do HDV já publicados (denominados PAN e KARA); foram selecionados aqueles em que os iniciadores utilizados tiveram maior probabilidade de detectar diferentes genótipos do HDV e esses iniciadores foram utilizados para a padronização de uma reação de qPCR utilizando agentes intercalantes (SYBR Green). Esses valores foram comparados com os obtidos no artigo original. Os resultados iniciais obtidos mostram que foi possível obter bons resultados com os artigos base escolhidos, no entanto, ainda há o que melhorar para obter um teste 100% eficiente.

**Palavras-chave:** Hepatite; qPCR; HDV; SYBRGreen

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA INDIRETO IN HOUSE PARA TESTES DIAGNÓSTICOS PARA O SENECAVIRUS A

Leocadio, V.A.T.<sup>1</sup>; Pinheiro-de-Oliveira, T.F.<sup>1,2</sup>; Carmargos, M.F.<sup>2</sup>; Barbosa-Stancioli, E. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais

<sup>2</sup>LANAGRO/MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Av. Rômulo Joviano s/n, Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: vtleocadio@gmail.com

---

**Resumo:** O *Senecavirus A* (SVA) é um vírus que infecta suínos, sendo pertencente à família *Picornaviridae*. O SVA é responsável pela indução de duas síndromes conhecidas, a doença idiopática vesicular suína (PIVD) e a mortalidade neonatal epidêmica transiente. Ambas síndromes já foram diagnosticadas em fazendas do Brasil, causando grandes prejuízos financeiros. O SVA tornou-se também importante devido à indução de doença vesicular com clínica assemelhada à Febre Aftosa (FA), sendo atualmente um dos vírus da lista de triagem em casos suspeitos. Dada a importância crescente do SVA, sua inserção como um dos agentes da triagem obrigatória para FA e a relativa ausência de ferramentas diagnósticas, controle e estudos epidemiológicos, o objetivo deste trabalho foi expressar as proteínas virais VP1 e VP2 do SVA em sistema heterólogo procarioto para geração de sistemas diagnósticos. As sequências nucleotídicas codificadoras de VP1 e VP2 foram sintetizadas comercialmente, clonadas em pET-21a e expressadas em *Escherichia coli* BL21 (DE3). Após expressão, as proteínas foram purificadas com sucesso por cromatografia de afinidade, sendo detectadas em ensaio de *western*. No desenvolvimento do sistema de ELISA indireto, foram utilizando 321 soros suínos provenientes de surtos de doença vesicular suína, sendo previamente avaliados por um ensaio de soroneutralização viral no LFDA-MAPA-MG. Os resultados de ELISA demonstraram que a VP2 apresentou potencial para diagnóstico sorológico da infecção. Utilizando a VP2 na fase sólida, o ELISA apresentou diferença estatisticamente significativa na separação dos soros reagentes dos não-reagentes. Este conjunto de dados apontam a proteína recombinante VP2 como promissora em sistemas diagnósticos para o SVA.

**Palavras-chave:** *Senecavirus A*; diagnostico; proteínas recombinantes; ELISA; doenças vesiculares.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## VACCINIA VIRUS ZOONÓTICOS PERTENCENTES A DIFERENTES CLADOS GENÉTICOS EXIBEM HABILIDADES DE IMUNOMODULAÇÃO PROPORCIONAIS AO SEU POTENCIAL PATOGENICO

Lourenço<sup>1</sup>, K. L.; Leão<sup>2</sup>, T. L. Queiroz<sup>1</sup>, C.O. Fonseca<sup>1</sup>, F.G.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Virologia Básica e Aplicada

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Belo Horizonte, MG

E-mail: karine\_lourenco@hotmail.com

---

**Resumo:** Os isolados de *Vaccinia virus*, Guarani P1 vírus (GP1V) e Passatempo vírus (PSTV) provenientes de surtos zoonóticos no Brasil, pertencem a dois grupos diferentes de VACV-BR de acordo com análises filogenéticas. Essa divisão reflete propriedades biológicas dos isolados, como virulência em camundongos BALB/c, mas informações sobre o perfil de resposta imune desencadeada por estes vírus são escassas. Neste sentido, respostas imunológicas de camundongos BALB/c à infecção pelos vírus GP1V e PSTV foram avaliadas por análises de marcadores de superfície, fenotipagem e detecção dos níveis de citocinas intra-citoplasmáticas. O fator de transcrição XBP1 assim como a ativação do sensor IRE1 da via UPR, foram avaliados em função do seu importante papel na resposta imune desses vírus. Nossos resultados mostram um perfil de modulação mais intensa nos animais infectados com VACV-WR, que apresentaram redução de linfócitos totais (CD3+), macrófagos (CD14+) e células NK (CD3-CD49+). Os camundongos infectados com GP1V apresentaram um perfil de modulação intermediário, com redução de macrófagos (CD14+). A infecção por PSTV não apresentou um perfil de modulação considerável quando comparado a GP1V e WR. Observamos também que a infecção pelos três vírus leva à ativação de ATF6 e modula negativamente o processamento de XBP1, componente que está associado a mecanismos de imunidade. Nossos resultados mostram que amostras de VACV-BR, pertencentes a grupos de virulência diferentes, também apresentam diferenças na modulação de componentes do sistema imune.

**Palavras-chave:** VACV; WR; GP1V; PSTV; UPR; IRE1.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DE OVITRAMPAS PARA O MONITORAMENTO DOS CASOS DE DENGUE EM IBIRITÉ – MG

Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Rodrigues<sup>1</sup>, M. F. R.; Martelleto<sup>1</sup>, N.C.; Teixeira<sup>1</sup>, C.W.; Silva<sup>2</sup>, S.I.A.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibirité, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP).

<sup>2</sup>Centro de Controle Epidemiológico de Zoonoses do Município de Ibirité.

E-mail: leonardopp127@gmail.com

---

**Resumo:** A dengue é uma doença viral comum em regiões tropicais e subtropicais, onde, o clima favorece a proliferação do vetor. De acordo com dados do SINAN, Minas Gerais em 2020, Minas Gerais acumulou até o mês de abril, cerca de 46.681 casos prováveis da doença. Portanto o trabalho tem como objetivo a instalação de armadilhas para captura de ovos do vetor da doença. Inicialmente foram definidos pontos nos bairros (residências) para receberem as armadilhas OVITRAMPAS. Para confecção das armadilhas foram utilizados: um vaso de planta médio, uma paleta de madeira (no formato de uma lâmina laboratorial de vidro), água, um clip grande e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diluída em água. Pode ser observar que o número de ovos capturados em maio de 2019 foi o mais alto, refletindo indiretamente o maior número de casos de dengue no Município. Ainda em maio foram capturados um total de cerca de 2 mil ovos do mosquito. Desde a colocação das armadilhas em dezembro de 2018, foi possível observar que em 2019 o número de casos registrados de dengue foi menor comparado ao ano de 2016, e em contrapartida o número de ovos coletados nas OVITRAMPAS tem aumentado de 2019 a 2020 com a intensificação do trabalho com as armadilhas para o mosquito. Esse dado reforça a importância da utilização de OVITRAMPAS como forma de monitoramento dos casos de dengue no Município.

**Palavras-chave:** OVITRAMPAS; Dengue; Monitoramento.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Zika virus* EM *E. coli*

Pezzopane, R. R.<sup>1\*</sup>; Silva, L. C. F.<sup>1,2</sup>; Gasparini, M.C.<sup>1</sup>; Moreira, A.P.<sup>1,2</sup> Kroon, E. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Vírus

<sup>2</sup> Viriontech do Brasil, MG

\*E-mail: rafaelapezzopane@gmail

---

**Resumo:** O *Zika virus* (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, é um vírus envelopado, de RNA e polaridade positiva. O ZIKV é um dos principais vírus causadores de arboviroses patogênicas. Em 2016, o Brasil passou por uma epidemia de Zika, com uma estimativa de 128.266 casos confirmados no total (Brasil, 2017). Apesar de ser considerada uma infecção viral leve e, na maioria dos casos, assintomática, o ZIKV pode acometer o sistema nervoso, sendo associado à microcefalia em neonatos e à Síndrome de Guillian-Barré (Awadh et al., 2017; Heukelbach et al., 2016). Assim, neste trabalho foi proposta a utilização de um modelo procarioto (*Escherichia coli* M15) para produção da proteína heteróloga do envelope de ZIKV com o objetivo de potencial aplicação em testes diagnósticos. Para isso, foram utilizadas as seguintes metodologias: indução de quimiocompetência em bactérias M15; transformação bacteriana; *screening* das colônias positivas por PCR convencional; microindução, produção e purificação da proteína E recombinante sob condições desnaturantes. A proteína E de ZIKV foi produzida de forma heteróloga em modelo procarioto com sucesso.

**Palavras-chave** Proteínas recombinantes; ZIKV; *E.coli*, aplicação diagnóstica; biotecnologia



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**FERRAMENTAS INOVADORAS NO CONTROLE DE DOENÇAS VESICULARES NO BRASIL: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE PCR DIGITAL, METAGENÔMICA VIRAL E APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA AVALIAÇÃO DO *SENECAVIRUS A* E OUTROS VÍRUS EM SURTOS OCORRIDOS EM SUÍNOS**

**Pinheiro de Oliveira<sup>1,2</sup>, T. F.; Bortolini<sup>3</sup>, D. E., Giannattasio-Ferraz<sup>1</sup>, S., Fonseca-Júnior<sup>2</sup>, AA; Aguiar<sup>3</sup>, ERGR; Camargos<sup>2</sup>, MF; Santos<sup>4</sup>, MA; Góes-Neto<sup>3</sup>, A; Barbosa-Stancioli<sup>1</sup>, EF.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA), UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG) / Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF), UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Ciência da Computação, UFMG, Belo Horizonte, MG.

E-mail: pinheirodeoliveiratf@gmail.com; edelfb@ufmg

---

**Resumo:** O *Senecavirus A* (SVA), pertencente ao gênero *Senecavirus*, família *Picornaviridae* foi relatado no Brasil em surtos de doenças vesiculares em suínos pelo laboratório do Ministério da Agricultura (LFDA-MG) em 2015. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento, padronização e aplicação de PCR digital, metagenômica viral e aprendizado de máquina para uso em surtos de enfermidades vesiculares. A PCR digital desenvolvida foi utilizada para selecionar amostras a serem submetidas à metagenômica viral a partir dos resultados de quantificação absoluta. A plataforma HiSeq foi utilizada para a análise do viroma usando a adaptação do pipeline MetLab com a adição de parâmetros de qualidade. Ferramentas de máquinas de busca e regressão logística foram desenvolvidas para caracterizar e selecionar características exclusivas do SVA. Como resultados, a PCR digital detectou e quantificou o RNA do SVA em 07 de 12 pools submetidos ao estudo do viroma e este recuperou o SVA em 05 dos 12 pools. A metagenômica viral detectou outros vírus de RNA além do SVA, sendo a análise de qualidade dos contigs classificados proposta no presente trabalho crucial para reduzir o número de falso positivos. O aprendizado de máquina com o uso de ferramentas de máquinas de busca e regressão logística permitiu agrupar as amostras de SVA em vetores, sem uso de alinhamento de sequências e definir características exclusivas do vírus. Este trabalho criou ferramentas inovadoras para uso em surtos de enfermidades vesiculares, fortalecendo o programa nacional de controle de Febre Aftosa sendo extensivas ao uso em estudos semelhantes.

**Palavras-chave:** *Senecavirus A*; PCR digital; metagenômica viral; aprendizado de máquina; enfermidades vesiculares

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## APLICAÇÃO DA TRANSFUSÃO DE PLASMA CONVALESCENTE EM PACIENTES ACOMETIDOS PELA COVID-19: REVISÃO SISTEMÁTICA

Silva<sup>1</sup>, L. F.; Gomes<sup>2</sup>, T. N.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GEHMED).

<sup>2</sup> Universidade Federal do Piauí., Biomédico e Mestre em Ciências Biomédicas (UFPI).

E-mail: lucasflorenci@gmail.com

---

**Resumo:** O presente trabalho objetivou expor os principais trabalhos desenvolvidos que utilizam a TPC como via terapêutica em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, visando demonstrar possíveis impactos desta abordagem imunoterápica. Trata-se de uma revisão sistemática, a partir da busca por publicações indexadas nas bases de dados EMBASE, PubMed e SCOPUS, as quais estivessem disponíveis para *download*, redigidas em Inglês e publicadas no recorte bienal de 2019-2020, auxiliada pelo Protocolo PRISMA. Verificou-se que 77,2% (n=17) são trabalhos de cientistas da China, enquanto 22,8% (n=5) pertencem a pesquisadores da Coreia do Sul. Apurou-se cinco trabalhos com delineamento quantitativo e qualitativo abordando a intervenção terapêutica da TPC perante a Doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19). Nulidade no índice de mortalidade, opacidade pulmonar exaurida e reações adversas minimamente inócuas foram observadas em pacientes submetidos à TPC. Contudo, a dose ideal e o tempo de tratamento permanecem incertos, as quais precisam ser investigadas em estudos clínicos randomizados.

**Palavras-chave** COVID-19; Imunoterapia; SARS-CoV-2.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PROSPECÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM MAMÍFEROS SILVESTRES DE REMANESCENTES FLORESTAIS URBANOS

Silva, P. H. B.<sup>1</sup>; Dutra, A. G. S.<sup>1</sup>; Oliveira, J. S.<sup>1</sup>; Domingos, I. J. S.<sup>1</sup>; Trindade, G. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus.

E-mail: pedrohebastos@gmail.com

---

**Resumo:** As doenças infecciosas emergentes (DIE) representam uma ameaça para a saúde pública mundial. O Brasil é considerado um “hotspot” para a emergência de patógenos infecciosos. As zoonoses correspondem a aproximadamente 60% de todos os eventos de emergência de DIE, e dentre essas 70% estão relacionadas a patógenos de origem silvestre, onde os roedores podem atuar como amplificadores e hospedeiros de diversas zoonoses. Dentre os vírus de maior importância para a saúde pública estão os flavivírus, como o Dengue vírus, o Zika vírus e o vírus da Febre amarela, que são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar flavivírus circulantes em roedores, marsupiais e procionídeos inseridos em remanescentes florestais nos Parques das Mangabeiras e Jacques Cousteau na cidade de Belo Horizonte, MG. Amostras de fígado e rim provenientes desses mamíferos foram submetidas à investigação molecular de flavivírus por PCR em tempo real. Não foram detectadas amostras positivas para RNA viral de flavivírus, portanto, não foi detectada evidência de circulação desses vírus nos mamíferos inseridos na área investigada. A manutenção dos flavivírus na natureza em ciclos silvestres é comprovada e impede a erradicação desses arbovírus. Diante disso, e da evidência de circulação de flavivírus em outros hospedeiros vertebrados a investigação molecular desses vírus em animais inseridos em áreas de mata próximas a grandes centros urbanos é uma importante ferramenta de vigilância que possibilita antecipar a ocorrência de possíveis ciclos silvestres que podem originar ciclos de transmissão urbana.

**Palavras-chave** Flavivírus; Zoonoses virais; Doenças infecciosas emergentes.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## MULTIMERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA E SEU POTENCIAL PARA A INDUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O ZIKA VÍRUS

De Souza<sup>1</sup>, G. A. P.; De Castro<sup>2</sup>, R. F. G.; Da Silva<sup>1</sup>, L. C. F.; Abrahão<sup>1</sup>, J. S.; Coelho<sup>2</sup>, L. F. L.

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, 31270-901, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Vacinas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, 37130-001, Minas Gerais, Brasil

E-mail:neogaps@gmail.com

---

**Resumo:** Desde que o Zika vírus (ZIKV) passou a ser considerado um risco para o desenvolvimento de microcefalia, o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e eficaz se tornou uma alta prioridade. Muitos grupos têm se dedicado a desenvolver estratégias para a prevenção da infecção por ZIKV e indicado o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) como um alvo promissor. Buscando superar as limitações das vacinas de subunidade, que muitas vezes são pouco imunogênicas, a multimerização de epítomos para o desenvolvimento de plataformas vacinais parece uma estratégia interessante por apresentar uma alta densidade de antígenos; apresentando-os lado a lado. Este trabalho objetiva avaliar a indução de anticorpos anti-ZIKV em animais imunizados com uma proteína quimérica de albumina sérica bovina e zEDIII, unidas por um tetrâmero de glicina. Para tal, a proteína quimérica foi expressa em *Escherichia coli* BL21, purificada por cromatografia de afinidade e a multimerização foi induzida com adição de etanol seguida de reação cruzada com glutaraldeído. Camundongos C57BL/2 foram imunizados com a proteína quimérica após a multimerização e com os monômeros quiméricos associados ou não a adjuvante completo de Freund. A avaliação da soroconversão por ensaio imunoenzimático revelou uma maior produção de anticorpos anti-ZIKV pelas proteínas multimerizadas, quando se avaliou a produção IgG específicos contra o domínio alvo, essa produção se mostrou pouco específica em comparação as outras formulações administradas.

**Palavras-chave:** Zika vírus; vacinas; proteína quimérica; multimerização de proteínas

## RESUMOS BACTERIOLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* PELO ALFA-PINENO

ARAÚJO NETO<sup>1</sup>, J. B.; FREITAS<sup>1</sup>, P. R.; ARAÚJO<sup>1</sup>, A. C. J.; SILVA<sup>1</sup>, M. M. C.; NUNES<sup>2</sup>, R. G. S. TINTINO<sup>1</sup>, S. R.; COUTINHO<sup>1</sup>, H. D. M.

<sup>1</sup> Universidade Regional do Cariri - URCA, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM

<sup>2</sup> Universidade Regional do Cariri - URCA, Departamento de Ciências Biológicas – DCBio, Laboratório de Biologia e Toxicologia - LABTOX

E-mail: jose.bezerra456@gmail.com

---

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo do composto alfa-pineno frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Para isso, foram utilizadas as cepas RN-4220 e IS-58, que portam as bombas de efluxo MsrA (resistente à eritromicina) e TetK (resistente à tetraciclina), respectivamente. Para avaliar a atividade antibacteriana intrínseca do produto, este foi microdiluído em caldo BHI a 10% contendo o inóculo bacteriano, e após 24 h de incubação a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através da variação colorimétrica da resazurina sódica. Nos ensaios de inibição do efluxo o brometo de etídio (EtBr) e os antibióticos foram microdiluídos em caldo BHI a 10% contendo o inóculo bacteriano e o alfa-pineno em concentração sub-inibitória (CIM/8). O mesmo processo foi realizado com o carbonilcianeto-m-clorofenil hidrazona (CCCP), inibidor padrão de efluxo. A análise estatística foi realizada através do GraphPad Prism 5.0, com  $p < 0,05$  considerado significativo. A CIM do produto para ambas as cepas foi  $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$ , concentração considerada clinicamente irrelevante. Nos testes de associação com EtBr e antibióticos, houve inibição do efluxo em ambas as cepas. Todavia, o alfa-pineno foi mais eficaz contra a bomba TetK (IS-58), reduzindo a CIM do EtBr de 16 para  $5,03 \mu\text{g/mL}$ , e da tetraciclina de 128 para  $64 \mu\text{g/mL}$ , sendo mais eficaz que o CCCP. Logo, conclui-se que o alfa-pineno não possui eficácia na atividade antibacteriana por ação direta contra as cepas testadas, mas modifica a atividade de bombas de efluxo.

**Palavras-chave:** Resistência Bacteriana; Terpenos; Sinergismo; Tetraciclina; Eritromicina.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS DE ISOLADOS AMBIENTAIS CAPAZES DE LISAR LINHAGENS MULTIRRESISTENTES PARA USO EM CONTROLE BACTERIANO**

**BARBOSA<sup>1</sup>, R. A.; SANTOS<sup>2</sup>, V. L.**

<sup>1, 2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Aplicada - LMA

**E-mail: [abrachell@hotmail.com](mailto:abrachell@hotmail.com)**

**E-mail: [verabio@gmail.com](mailto:verabio@gmail.com)**

---

**Resumo:** Nos últimos anos, um grande número de estratégias para minimizar o consumo de antibióticos e agentes antimicrobianos em geral tem sido explorada. A utilização de Bacteriófagos (Fagos), que são classes de vírus exclusivamente bacterianos, capazes de reduzir ou eliminar populações bacterianas de forma sustentável tem sido altamente empregada. Neste contexto, exploramos o uso de fagos isolados de lagoas aeradas de uma estação de tratamento de efluentes industriais quanto à eficácia bacteriolítica contra 7 linhagens isoladas neste ambiente e posteriormente, isolados clínicos multirresistentes das mesmas espécies (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). A partir do isolamento e propagação viral foram obtidos 4 Fagos de *P. aeruginosa*, 4 fagos de *S. marcescens* e 2 fagos de *S. maltophilia*, sendo 2 líticos em linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa* e 2 em linhagem multirresistente de *S. marcescens* (dados sujeitos à confirmação). Ensaios de atividade lítica *in vitro* também foram empregados. Os resultados parciais sugerem que bacteriófagos podem ser utilizados como opção de tratamento contra bactérias de forma eficiente em ambientes industriais, bem como meio preventivo e complementar com antimicrobianos em geral.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos; Antimicrobianos; Formulações biofarmacêuticas; Terapia fágica; Bactérias multirresistentes.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## O PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE EM UM MODELO MURINO DE PNEUMOSEPSE INDUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa*

BEZERRA, R.O<sup>1</sup>; BRITO, C.B<sup>1</sup>; IGÍDIO, C.E.D<sup>1,2</sup>; ARIFA R.D.N<sup>1</sup>; FAGUNDES C.T<sup>1,2</sup>; SOUZA D.G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiologia/Laboratório de interação microrganismo-hospedeiro

<sup>2</sup>Centro de pesquisa e desenvolvimento de fármacos

E-mail: rafaolibe97@gmail.com

---

**Resumo:** A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno extracelular oportunista, que infecta as vias aéreas de hospedeiros imunossuprimidos podendo levar a pneumonia grave e, em alguns casos, sepse. Sua condição oportunista, além da alta capacidade de adaptação a ambientes inóspitos justifica a relevância clínica do patógeno, especialmente em ambientes hospitalares. Após a infecção, o hospedeiro reconhece padrões moleculares presentes na *P. aeruginosa*, desencadeando uma cascata de sinalização que induz a produção de mediadores inflamatórios e o influxo de neutrófilos ao sítio de infecção.

A PI3K é uma família de enzimas envolvidas no recrutamento e ativação celular. A PI3K<sup>γ</sup> é a isoforma presente em leucócitos e regula diversas etapas da resposta inflamatória.

O objetivo desse trabalho é avaliar o papel da fosfatidilinositol-3-cinase<sup>γ</sup> em um modelo murino de pneumosepse induzido por *P. aeruginosa*. Para tal, infectamos camundongos C57Bl/6 WT e PI3K<sup>kd/kd</sup> com a cepa PA103 e, 6h ou 24h após a infecção, o pulmão, lavado broncoalveolar e o sangue foram coletados para análises de MPO e ELISA, além da contagem total e diferencial de leucócitos. Nossos resultados demonstram que animais WT não apresentam alteração na carga bacteriana quando comparados a animais PI3K<sup>kd/kd</sup> 6h após a infecção. No entanto, há menor influxo de leucócitos e maior expressão de citocinas. De forma interessante, 24h após a infecção podemos observar menor carga bacteriana em animais PI3K<sup>kd/kd</sup> em relação a animais WT, além de maior influxo de neutrófilos e expressão de citocinas no pulmão e no BAL. Logo, o estudo indica que a enzima PI3K<sup>γ</sup> tem papel importante na infecção por *P. aeruginosa*, e sua ausência pode levar a uma resposta inflamatória mais rápida.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; PI3ky; inflamação; sepse.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## O PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO PELA MICROBIOTA INTESTINAL NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PULMONAR POR *Pseudomonas aeruginosa*

BRITO, C.B<sup>1</sup>; IGÍDIO, C.E.D<sup>1,3</sup>; BEZERRA, R.O<sup>1</sup>; ARIFA, RDN<sup>1</sup>; FAGUNDES, M<sup>1,3</sup>; BATISTA, R.R.A<sup>1,3</sup>; CASSIANO, L.M.G<sup>2</sup>; KOHLHOFF, M<sup>2</sup>; COIMBRA, R.S<sup>2</sup>; FAGUNDES, C.T<sup>1,3</sup>; SOUZA, D.G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Interação microrganismo-hospedeiro (ICB/UFMG)

<sup>2</sup> Instituto René Rachou, FIOCRUZ

<sup>3</sup> Centro de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (ICB/UFMG)

E-mail: cbbrito.farma@gmail.com

---

**Resumo:** O triptofano é um aminoácido essencial que é metabolizado tanto pelo hospedeiro, gerando as kinureninas, através da enzima IDO1, quanto pela microbiota intestinal, gerando derivados indólicos. Ambos funcionam como agonistas do receptor AHR, que desempenha diversas funções imunomoduladoras. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal na infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*. Induzimos a disbiose em camundongos selvagens (WT) com coquetel de antimicrobianos por 14 dias, quando os animais foram inoculados intranasalmente com  $10^7$  UFC de *P. aeruginosa*. Camundongos que receberam os antimicrobianos apresentaram disbiose intestinal com redução de bactérias totais, incluindo produtoras de indol. A disbiose foi acompanhada do aumento da concentração sérica de triptofano e da redução de kinurenina. Camundongos WT disbióticos infectados apresentaram maior letalidade quando comparados a camundongos eubióticos, bem como maior carga bacteriana no lavado broncoalveolar e no pulmão e menor expressão da enzima iNOS e da produção de ROS em neutrófilos quando comparados a camundongos eubióticos infectados. Diferente do que ocorre com camundongos WT, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos não apresentaram aumento da carga bacteriana quando comparados a animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos. A disbiose em camundongos WT foi acompanhada do aumento da expressão de AHR em neutrófilos recrutados o que não ocorreu em camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos. Além disso, o bloqueio do receptor AHR durante a disbiose resultou na reversão do fenótipo de animais WT disbióticos após a infecção. Assim, a disbiose por antimicrobianos interfere no metabolismo de trp, levando a maior ativação do receptor AHR e maior susceptibilidade dos animais a infecção.

**Palavras chaves:** microbiota; inflamação; triptofano; *P.aeruginosa*; IDO1.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

***Streptococcus pneumoniae* E influenza A: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETORA E PERSPECTIVA INDUSTRIAL**

**Cardoso, K. F.<sup>1</sup>; Santos, B. S. A. S.<sup>2</sup>; Andrade, K. R.<sup>1</sup>; Xavier, M. A. P.<sup>1</sup>; Alves, P. A.<sup>1</sup>; Campos, M. A. S.<sup>1</sup>; Miyaji, E. N.<sup>3</sup>; Machado, A. M. V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>2</sup> UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>3</sup> Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

**E-mail: kimberlycardoso@hotmail.com**

---

**Resumo:** As infecções por *Streptococcus pneumoniae* e influenza ocasionam doenças infecciosas do trato respiratório, sendo responsáveis por elevada mortalidade no mundo. Além disso, infecções secundárias ocasionadas por *S. pneumoniae* frequentemente agravam o quadro clínico de pacientes com gripe. Nesse contexto, visando desenvolver uma vacina bivalente contra estes patógenos, geramos, por genética reversa, um vírus influenza recombinante que carrega uma proteína pneumocócica (denominado Flu-SP). Neste trabalho, avaliamos a eficácia protetora de um protocolo vacinal associando o Flu-SP com a proteína rSP como vacina bivalente, e a viabilidade de produção deste vírus em larga escala utilizando ovos embrionados de galinha. Nas imunizações, camundongos C57BL/6 foram inoculados, via intranasal, com: Flu-SP (prime) e proteína rSP+alúmen (boost); vírus controle (prime) e PBS+alúmen (boost); PBS (prime e boost). Em seguida, os anticorpos anti-rSP e anti-influenza presentes no soro dos animais imunizados foram quantificados por ELISA. Posteriormente, estes animais foram desafiados com doses letais de pneumococo ou vírus influenza. Por fim, a capacidade de multiplicação do Flu-SP em ovos foi determinada através de sua inoculação na cavidade alantoide dos ovos. Assim, observamos que o protocolo vacinal induziu elevados títulos de anticorpos específicos, os quais desempenham um papel crucial na proteção contra ambos patógenos, além de índices de proteção satisfatórios após os desafios letais, corroborando com a resposta imune observada. Ademais, confirmamos a capacidade do vírus Flu-SP de multiplicar em ovos embrionados, o que permite sua produção em escala industrial com alto rendimento. Assim, o vírus influenza recombinante Flu-SP representa uma estratégia vacinal promissora contra *S. pneumoniae* e influenza.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*; Vírus influenza recombinante; Vacina bivalente; Eficácia protetora; Aplicação industrial.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DA FOLHA DE *CURCUMA LONGA* L.

CORRÊA<sup>1</sup>, A. N. R.; MOURA<sup>2</sup>, J. G. L.; MATOS<sup>3</sup>, C. B.; PERQUIM<sup>4</sup>, L. C.; KONZEN<sup>3</sup>, M. P.; MOSSMANN<sup>2</sup>, V.; ROSSI<sup>1,2,3</sup>, R. C.; GEMELLI<sup>1,2,3</sup>, T.

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Departamento de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

<sup>2</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Departamento de Farmácia

<sup>3</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (Itt Nutrifor)

<sup>4</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico de Semicondutores (Itt Chip)

**E-mail:** aldreyrc@edu.unisinos.br

---

**Resumo:** O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do óleo essencial de *Curcuma longa* L. em bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* e na levedura *Candida albicans*. Utilizando a metodologia de difusão em disco, as bactérias mais sensíveis ao óleo essencial foram *S. aureus* (15 mm), *B. cereus* (10 mm) e *E. coli* (10 mm). Na metodologia de MIC, *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* foram os mais inibidos, com valores de 6,25 mg/mL, seguidos de *S. typhimurium* e *C. albicans*, com concentração 12,50 mg/mL. *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram os microrganismos com menor taxa de inibição. Nos resultados obtidos através da metodologia de CBM, as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* obtiveram valores de 12,50 mg/mL, *S. typhimurium* de 25,00 mg/mL e as mais resistentes foram *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. De modo geral, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foram mais suscetíveis. Os resultados apresentados demonstram o óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* L. têm potencial para aplicação no desenvolvimento de antimicrobianos naturais, na produção farmacêutica ou de alimentos.

**Palavras-chave** Óleo essencial; *Curcuma longa* L.; Antimicrobiano; Fungicida; Bactericida.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

## **RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM GRAVE PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA E O PAPEL DO PROFISSIONAL FARMACÊUTICO**

**Freitas<sup>1</sup>, L. M.; Sobrinho<sup>1</sup>, B.A.; Lima<sup>1</sup>, L.R.C.; Brabo<sup>1</sup>, J.S.; Maia<sup>1</sup>, S.M.M.; Silva<sup>1</sup>, J.H.A.; Moreira<sup>1</sup>, W.F.P.; Moreira<sup>2</sup>, M.G.C.**

<sup>1</sup> Centro Universitário do Estado do Pará, graduando(a) em Farmácia

<sup>2</sup> Centro Universitário do Estado do Pará, docente - Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário do Estado do Pará (LAC CESUPA)

**E-mail:** [liliamarquesfarm@gmail.com](mailto:liliamarquesfarm@gmail.com)

---

**Resumo:** Para curar infecções bacterianas, os antibióticos são medicamentos eficazes e tem salvado milhões de vidas. Contudo, interferências humanas como o uso indiscriminado de antimicrobianos, têm acelerado e facilitado a ocorrência de mecanismos de resistência de microorganismos. A alta prevalência, a cada ano, das superbactérias pode estar relacionado a vários fatores. Nesse contexto, profissionais de saúde, especialmente o farmacêutico que detém conhecimento sobre medicamentos, possuem papel importante na execução de tarefas que visem prevenir, orientar e tratar infecções resistentes.

Assim, os objetivos desse trabalho foram: Identificar as principais bactérias multirresistentes; pontuar os fatores contributivos para promoção da resistência bacteriana; analisar qual o papel do farmacêutico dentro desse cenário e produzir um panfleto informativo para disponibilizar ao público atendido pelo LAC CESUPA e CEMEC CESUPA. Realizou-se busca de informações em artigos e sites oficiais como o portal da ANVISA e bibliotecas como a BVS e a SCIELO. Práticas realizadas pelos pacientes, ao fazer uso de antimicrobianos, assim como fatores ambientais possuem influência na aceleração da multirresistência bacteriana, principalmente o descarte incorreto de medicamentos e seu uso de forma irracional, exercendo pressão seletiva sobre cepas resistentes. Dentro da área hospitalar, o farmacêutico é um profissional qualificado técnico-cientificamente, presente em atividades técnico-gerenciais e técnico-assistenciais. Com o foco na promoção da saúde do paciente, através da produção e divulgação de materiais de impressos ou digitais, como o folheto aqui apresentado, monitoramento das prescrições, vigilância epidemiológica, atendimento na farmácia comunitária, pesquisa e desenvolvimento, gerência hospitalar, são importantes papéis desempenhados pela categoria farmacêutica dentro desse contexto.

**Palavras-chave:** antibióticos, multirresistência, superbactérias, antimicrobianos, assistência farmacêutica

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido

***Klebsiella variicola* MULTIRRESISTENTE ISOLADA DE URINA DE BOVINOS SAUDÁVEIS: UM POTENCIAL PATÓGENO EMERGENTE**

**GIANNATTASIO-FERRAZ, S.<sup>1</sup>; QUEIROZ, C.O.<sup>1</sup>; GOMES, V.J.<sup>1</sup>; ENE, A.<sup>2</sup>; MASKERI, L.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, A.P.<sup>3</sup>; PUTONTI, C.<sup>4</sup>; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>2</sup> Bioinformatics Program, Loyola University Chicago, Chicago, Illinois, USA. <sup>3</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Uberaba, MG, Brasil. <sup>4</sup> Department of Biology, Loyola University Chicago, Chicago, Illinois, USA

**E-mail: [silvia.giannattasio@gmail.com](mailto:silvia.giannattasio@gmail.com)**

---

**Resumo:** A *Klebsiella variicola* é um patógeno oportunista em humanos. Essa espécie também tem sido associada à mastite bovina, que pode ter efeitos econômicos significativos. Embora inúmeros isolados tenham sido sequenciados de infecções humanas, apenas 12 foram sequenciados de bovinos (amostras fecais e de leite) até o momento. Recentemente descobrimos a presença de *K. variicola* na urina de duas novilhas saudáveis, sendo essa a primeira identificação de *K. variicola* no trato urinário bovino. Aqui, apresentamos as sequências do genoma e análises desses isolados. Os genomas do trato urinário de bovinos são mais semelhantes a isolados do trato urinário humano do que a outros isolados de bovinos, sugerindo uma especialização de nicho. Ambos os isolados possuem resistência a Amoxicilina, Vancomicina e Eritromicina. A presença de genes de resistência a antibióticos enfatiza a preocupação com a emergência desse patógeno, uma vez que essas amostras estão circulando em bovinos saudáveis, animais de contato próximo com seres humanos. Esses achados são importantes para entender a circulação de *K. variicola* em animais saudáveis e seu papel como membro da microbiota indígena.

**Palavras-chave** *Klebsiella variicola*; Microbiota do trato urinário; Patógeno emergente; Microbiota bovina

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**METABÓLITOS DE TRIPTOFANO MODULAM A VIRULÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* E INTERFEREM NO PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA EM UM MODELO MURINO**

**IGÍDIO, C. E. D.<sup>1,2</sup>; BRITO, C. B.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, S. N.<sup>1,2</sup>; SOUZA, D. G.<sup>1</sup> E FAGUNDES, C.T.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/ Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

**E-mail: carloseduardobiomed@gmail.co**

---

**Resumo:** A microbiota indígena exerce papel protetor contra patógenos, seja pela competição por nicho e nutrientes ou produção de substâncias antibacterianas. O triptofano, por exemplo, é metabolizado pela microbiota e produz metabólitos capazes de modular a virulência em bactérias oportunistas. Nesse sentido, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito de metabólitos de triptofano sobre a virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. A linhagem PAO1 foi inoculada em meios de cultura contendo os metabólitos Indol, Indol-3-acético (IAce), Indol-3-acrílico (IAcr) e Indol-3-propiónico (IPro) na concentração de 100 µM e mantida por 24h a 37 °C. A partir disso, o biofilme foi quantificado pelo método de cristal violeta. Os padrões de motilidade foram avaliados por inoculação em meios de cultura específicos e o halo de motilidade medido em milímetros. A produção de pioverdina foi avaliada a partir da inoculação da bactéria em meios de cultura que estimulam a produção do pigmento. Além disso, camundongos C57/BL6 foram infectados intranasalmente com 10<sup>7</sup> UFC de *P. aeruginosa* crescida ou não na presença dos metabólitos. Os camundongos infectados foram avaliados quanto a perda de peso e letalidade. Observou-se que o indol, IAce e IAcr foram capazes de aumentar a formação de biofilme por *P. aeruginosa*. Por outro lado, todos os metabólitos testados reduziram a motilidade. Além disso, IAce e IAcr também diminuíram a produção de pioverdina. Associado a isso, camundongos infectados com *P. aeruginosa* crescida na presença de IAce apresentaram maior percentual de sobrevivência. Os resultados apresentados sugerem que os metabólitos de triptofano modulam a virulência de *P. aeruginosa in vitro* e interferem na susceptibilidade de camundongos à infecção.

**Palavras-chave:** triptofano; virulência; microbiota indígena; indol; indol-3-acético.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**PLASTICIDADE DO CONTEÚDO DE RNAs DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

**LUZ<sup>1,2</sup>, B. S. R.; NICOLAS<sup>2</sup>, A.; CHABELSKAYA<sup>3</sup>, S.; RODOVALHO<sup>1,2</sup>, V. R.; LE-LOIR<sup>2</sup>, Y.; AZEVEDO<sup>1</sup>, V. A. C.; FELDEN<sup>3#</sup>, B.; GUÉDON<sup>2#</sup>, E.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Belo Horizonte, Brasil.

<sup>2</sup> INRAE, Instituto Agro, STLO, F-35000, Rennes, França.

<sup>3</sup> Universidade de Rennes, Inserm, Medicina de RNAs bacterianos regulatórios, UMR S1230, Rennes, França.

# Esses autores contribuíram igualmente para esse trabalho

**E-mail: brenndally2015@gmail.com**

---

**Resumo:** Vesículas extracelulares (VEs) transportam macromoléculas bioativas que podem afetar a comunicação celular. O papel de RNAs em VEs bacterianas é uma área de estudo de grande interesse, porém pouco explorada. *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno humano e animal, e, neste trabalho, investigamos se VEs derivadas dessa bactéria carregam RNAs. Para isso, RNA-seq foi realizado em amostras de VEs da linhagem clínica HG003 sob diferentes condições ambientais: fases estacionárias iniciais e finais na presença ou ausência de concentrações sub letais de vancomicina. Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de partículas liberadas entre as condições, porém, VEs liberadas durante crescimento estacionário tardio são ~55% maiores. Análises transcriptômicas revelaram que VEs de *S. aureus* transportam várias classes de RNA (mRNAs, tRNAs e sRNAs), e a que média de cobertura deles é menor quando comparada às células produtoras de EVs, sugerindo que muitos RNAs não estão intactos em VEs. RNAs com cobertura  $\geq 90\%$  incluem mRNAs codificando fatores de virulência, reguladores da transcrição e enzimas metabólicas, além de *rsaC*, um sRNA implicado na adaptação ao estresse oxidativo. Além disso, a abundância relativa dos RNAs variou entre as condições experimentais e entre VEs e suas células produtoras, o que sugere que o empacotamento de RNAs em VEs é um processo regulado. Este é o primeiro estudo a fornecer o perfil de RNA de VEs de *S. aureus*. Nossos resultados indicam possíveis papéis desses RNAs na virulência e patogênese bacteriana, dando novos insights sobre infecções estafilocócicas, e abrindo caminho para futuros estudos nessa área.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, vesículas extracelulares, RNAs, fase de crescimento, vancomicina.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE *Akkermansia muciniphila* BAA-835 EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR**

**MIRANDA<sup>1</sup>, V. C.; ASSIS<sup>2</sup>, H. C.; SOUZA<sup>1</sup>, R. O.; QUINTANILHA<sup>1</sup>, M. F.; GALLOTTI<sup>1</sup>, B.; NICOLI<sup>1</sup>, J. R., FARIA<sup>2</sup>, A. M. C., CARA<sup>3</sup>, D. C., MARTINS<sup>1</sup>, F. S.**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia

<sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia

**E-mail: [viviancorreiamiranda@gmail.com](mailto:viviancorreiamiranda@gmail.com)**

---

**Resumo:** A alergia alimentar vem causando preocupações devido as suas escassas formas de tratamento. Uma das estratégias que vem sendo investigada é o uso de probióticos, tendo em vista seu papel imunomodulador. Desse modo, esse trabalho visa avaliar o efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* em um modelo murino de alergia alimentar, avaliando parâmetros clínicos e imunológicos. Camundongos Balb/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) (dia 0). Após 14 dias eles receberam uma segunda imunização. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante com salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. A partir do dia 18, os camundongos receberam uma dose oral diária de  $1 \times 10^9$  UFC de *A. muciniphila* até o fim do experimento (dia 28). O grupo controle recebeu apenas salina. No dia 21 os camundongos foram desafiados com uma dieta contendo OVA. No dia 28 os camundongos foram sacrificados. Durante todo o experimento a perda de peso foi avaliada diariamente. Para os parâmetros imunológicos, foram avaliados IgE e IgG anti-OVA, as enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) (para avaliar indiretamente o infiltrado eosinofílico e neutrofílico, respectivamente), as quimiocinas Eotaxina-1 e CXCL1/KC e as citocinas IL4, IL6, IL9, IL13 e TNF. A administração oral de *A. muciniphila* proporcionou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da perda de peso. Além disso, *A. muciniphila* promoveu redução significativa de todos os parâmetros imunológicos pró-inflamatórios investigados. Sendo assim, *A. muciniphila* apresenta um efeito imunomodulador que atenua os sinais de inflamação no modelo murino de alergia alimentar.

**Palavras-chave** Alergia alimentar; probiótico; *Akkermansia muciniphila*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

***Staphylococcus-coagulase NEGATIVO RESISTENTE À METICILINA É MENOS VIRULENTO DO QUE Staphylococcus aureus RESISTENTE À METICILINA EM MODELO MURINO DE ARTRITE SÉPTICA***

**PEDROSO, S. H. S. P.<sup>1</sup>; COSTA M. C. D.<sup>1</sup>, FREITAS<sup>1</sup>, G. J. C.; BASTOS, R. W.<sup>2</sup>; PAIXÃO<sup>1</sup> T.; MARTINS, H. R.<sup>1</sup>; SANTOS, D. A.<sup>1</sup>; SANTOS S. G. D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

**E-mail: shspietra@gmail.com**

---

**Resumo.** Os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) vêm emergindo como um dos principais microrganismos causadores de infecções nosocomiais. O aumento de sua prevalência é acompanhado por vertiginosa perda de sensibilidade à oxacilina. A resistência a tal antimicrobiano é mediada principalmente pelo gene *mecA* inserido dentro do cassete cromossômico *SCCmec*, que pode também carrear genes relacionados à virulência dentro do gênero. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar a virulência de SCN resistente à meticilina (MRSN) em modelo murino e compará-la com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) - espécie reconhecidamente virulenta dentro do gênero estudado. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com seis semanas adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram anestesiados e a região caudal, higienizada com etanol 70%. A inoculação, na veia caudal foi feita usando micro seringa carregada com 50 uL de suspensão bacteriana contendo  $3,3 \times 10^7$  bactérias. Os animais foram acompanhados por 25 dias para realização do protocolo de avaliação comportamental e funcional de distúrbios neurológicos (Shirpa) e eutanasiados para análises histológicas. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG. Os animais passaram por avaliação como tônus e força muscular, comportamento motor, estado neuropsiquiátrico, função autônoma e função e reflexo sensorial. Nos quatro primeiros domínios clínicos, pode-se observar que o grupo infectado por MRSN apresentou maior tônus e força muscular, melhor comportamento motor, melhor estado neuropsiquiátrico e maior função autônoma. Com relação às análises histológicas, o grupo apresentou menor intensidade de lesão. Os resultados observados revelam que a infecção por MRSN não gera o mesmo grau de lesão observada para MRSA.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* coagulase negativo; resistência a antimicrobianos; virulência; artrite séptica.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### ANÁLISE FUNCIONAL DO PANGENOMA DE *Acinetobacter baumannii*

RODRIGUES<sup>1</sup>, D. L. N.; MORAIS-RODRIGUES<sup>1</sup>, F.; SANTOS<sup>1</sup>, R. G.; ABURJAILE<sup>1,2</sup>, F. F. E AZEVEDO<sup>1</sup>, V. A. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Genética Celular e Molecular.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pernambuco, Departamento de Genética.

**E-mail:** [diego.neresr@gmail.com](mailto:diego.neresr@gmail.com)

---

**Resumo:** *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo aeróbio e um dos principais patógenos nosocomiais do mundo. Sua sobrevivência em locais incomuns tais como mecanismos de ventilação artificial, e a resistência à antimicrobianos tornaram essa bactéria um importante modelo para estudos de resistência e patogenicidade. Ao longo das últimas décadas, tem se tornado um dos principais patógenos responsáveis por casos graves de pneumonia e bacteremia. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar realizar a análise do pangenoma funcional de *A. baumannii*. Para isso foram avaliados os genomas completos e públicos de 206 linhagens da espécie através de ferramentas computacionais de pangenômica. Como principais resultados, observamos a presença de genes centrais relacionados ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e xenobióticos presentes em todas as linhagens. Em termos estatísticos, 1.373 genes foram compartilhados por todas as linhagens, 15.626 foram exclusivos de determinadas linhagens, e 10.683 foram identificados em mais de uma linhagem. Estes dados demonstram que o pangenoma da espécie ainda permanece aberto e que novos genomas precisam ser sequenciados e analisados. Deste modo, nosso trabalho abre perspectivas para a compreensão genômica e evolutiva da espécie *A. baumannii*.

**Palavras-chave** *Acinetobacter baumannii*; nosocomial; patógeno; pangenoma.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA BIOLIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE COBRE

RODRIGUES<sup>1</sup>, H. F.; JÚLIO, A. D. L.; SILVA, G. M. F. E SANTOS, V. L.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Aplicada

E-mail: hortencia280@hotmail.com

---

**Resumo:** A biolixiviação é um processo no qual se utiliza a ação microbiana para solubilizar elementos metálicos, como o cobre. Diversos microrganismos já foram isolados e identificados em ambientes ácidos de minas como potenciais agentes biolixivantes. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi o enriquecimento e identificação de dois importantes grupos de bactérias envolvidos na biolixiviação de minérios de cobre, oxidantes de ferro (BOF) e/ou oxidantes de enxofre (BOS). Para isso foram utilizadas diferentes amostras coletadas em ambientes ácidos de minas. As BOF foram enriquecidas em meio 9K-Fe e as BOS em meio 9K-S. Após 3 subcultivos as BOF foram isoladas em meio T&K-Fe e as BOS em meio T&K-S e meio sólido tiosulfato. Após essas etapas os microrganismos foram avaliados quanto a sua capacidade oxidativa de Fe e/ou S. Os resultados demonstraram que o pH se correlacionou negativamente com os íons  $Fe^{3+}$ , ORP e DO ( $p < 0,05$ ). Já os íons  $Fe^{3+}$  se correlacionaram positivamente com a ORP e a DO ( $p < 0,05$ ). Além disso, dentre os 20 isolados avaliados, 5 foram classificados como os melhores oxidantes de enxofre, devido aos resultados de pH próximos a 1 e as maiores DO, e 8 como os melhores oxidantes de ferro, por terem apresentado as maiores taxas de solubilização de Fe e valores de ORP. Conclui-se então que estes microrganismos são potenciais agentes solubilizadores de metais, podendo ser utilizados na montagem de um eficiente consórcio de biolixiviação de minério de cobre.

**Palavras-chave:** mineração; cobre; biolixiviação; bactérias; consórcio; minérios.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**Avaliação do papel dos receptores FcγRIIb e FcγRIII na doença periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

**SANTOS<sup>1</sup>, A. C. P. M.; LARANJEIRA<sup>1</sup>, A. O.; CHAVES<sup>1</sup>, I. M.; ANESTINO<sup>1</sup>, T. A.; SOUZA<sup>1</sup>, D. G.; MADEIRA<sup>1</sup>, M. F. M.;**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia, Laboratório de  
Interação Microrganismo Hospedeiro

**E-mail: annacpmenezes@gmail.com**

---

**Resumo:** O remodelamento ósseo é um processo fisiológico gerado pela produção e reabsorção de matriz. Várias doenças são causadas por um desequilíbrio nessa homeostase, incluindo a doença periodontal (DP), uma doença inflamatória e infecciosa. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) é uma das bactérias associadas à patogênese da DP e trabalhos anteriores descreveram um aumento na quantidade de IgG anti-*Aa* em pacientes com DP. Também há uma relação entre a ativação de FcγR com a osteoclastogênese, indicando sua importância para o metabolismo ósseo. Assim, o objetivo do projeto é avaliar o papel dos receptores FcγRIIb e FcγRIII na perda óssea alveolar, em um modelo de DP induzida com *Aa* em camundongos. Para isso, induzimos DP em camundongos C57BL/6 (WT) machos e camundongos deficientes para FcγRIIb ou FcγRIII pela inoculação direta de uma suspensão de *Aa*. Após 30 ou 60 dias, foi realizada a eutanásia e as amostras de maxilas foram extraídas para ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) e perda óssea alveolar. No experimento de 30 dias, amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de IgG total. (CEUA 89/2016). Pelo MPO, constatamos um aumento no número de neutrófilos em animais FcγRIII<sup>-/-</sup> no experimento de 30 dias. Não houve alteração no número de neutrófilos no experimento de 60 dias. A análise da perda óssea mostrou que *Aa* induz perda óssea e, nos animais FcγRIIb<sup>-/-</sup> e FcγRIII<sup>-/-</sup> esta perda não foi significativa, padrão que se manteve nos experimentos de 30 e 60 dias. A quantificação de IgG total no soro não mostrou alterações.

**Palavras-chave:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; doença periodontal; reabsorção óssea; IgG; FcγR; camundongos.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

**SILVA<sup>1</sup>, C. L.; FERREIRA<sup>1</sup>, J. F. G.; SILVA<sup>1</sup>, C. P.; LEITE<sup>1</sup>, A. C. A. D.; LIMA<sup>2</sup>, M. E.; MAGALHÃES<sup>1</sup>, P. P.; SANTOS<sup>1</sup>, V. L.; FARIAS<sup>1</sup>, L. M.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia.

<sup>2</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Misericórdia de BH.

**E-mail: cassialopes77@hotmail.com**

---

**Resumo:** A introdução dos antimicrobianos na prática clínica, na década de 1930, revolucionou a medicina e promoveu avanços na terapêutica das doenças infecciosas. Contudo, logo se percebeu que o emprego desses fármacos promovia um efeito indesejado, qual seja, a seleção de amostras resistentes aos mesmos, problemática cada vez mais preocupante, em especial, em hospitais e demais ambientes nos quais o uso de antimicrobianos é rotineira. O estudo dos genes e dos mecanismos relacionados à resistência a antimicrobianos é uma ferramenta que contribui para o controle da disseminação da propriedade, minimizando suas consequências. Dentre os microrganismos de relevância clínica, destacam-se, na atualidade, os bastonetes Gram negativos não fermentadores, entre eles, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar, por PCR, a presença de marcadores genéticos associados à resistência a fármacos  $\beta$ -lactâmicos e colistina em amostras de *A. baumannii* (n = 54) e *P. aeruginosa* (n = 50) isoladas de pacientes hospitalizados. Foram observados *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> em 4,0%, 16,0%, 6,0% e 6,0% das amostras de *P. aeruginosa*, respectivamente. Em *A. baumannii*, apenas *bla*<sub>KPC</sub> foi detectado (14,8%). Observou-se resistência a mais de uma classe de antimicrobianos na mesma amostra. Nenhuma bactéria albergava os marcadores *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *mcr-1*. Os resultados são preocupantes, considerando os grupos bacterianos estudados e a enorme relevância dos fármacos  $\beta$ -lactâmicos na rotina clínica. Os dados gerados pelo presente estudo contribuem para o conhecimento do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos local, subsidiando do estabelecimento de antibioticoterapia empírica, quando necessária.

**Palavras-chave** resistência a antimicrobianos; fármacos  $\beta$ -lactâmicos; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus* E *Enterococcus* DE ORIGEM HOSPITALAR

SILVA, C. P.<sup>1</sup>; FERREIRA, J. F. G.<sup>1</sup>; SILVA, C. L.<sup>1</sup>; LEITE, A. C. A. D.<sup>1</sup>; LIMA, M. E.<sup>2</sup>; FARIAS, L. M.<sup>1</sup>; MAGALHÃES, P. P.<sup>1</sup>; SANTOS, V. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

<sup>2</sup> Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

E-mail: cpeconick@gmail.com

---

**Resumo:** O uso indiscriminado de antimicrobianos, por todo o mundo, aumenta a pressão de seleção sobre os microrganismos, favorecendo a disseminação da resistência bacteriana. Dentre os microrganismos de relevância clínica atual, bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* estão presentes em alta frequência nos ambientes hospitalares como importantes patógenos nosocomiais resistentes a fármacos antimicrobianos. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida, resultado de características estruturais, funcionais e metabólicas. Devido a alta disseminação de resistência no âmbito hospitalar o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de marcadores genéticos associados à resistência bacteriana (GRAs) a fármacos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. isoladas de pacientes hospitalizados. As amostras foram submetidas a extração de DNA por lise térmica e PCR pra detectar a presença de GRAS. Dentre as 38 amostras de *Enterococcus* sp. analisadas, 50,0%, 18,4%, 23,7%, 28,9%, 10,52% e 2,6% apresentaram resultados positivos para *tet(M)*, *vanA*, *tet(L)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *ant(4')IA*. Os genes *tet(O)* e *erm(A)* não foram detectados nas amostras. Entre os representantes do gênero *Staphylococcus* sp. (n=202), 72 amostras foram analisadas para *mec(A)* e *van(A)*, 202 para *erm(A)* e 130 para *erm(B)*. O percentual de amostras positivas para o marcador *mec(A)* foi de 34,7% (n=72), para *erm(A)* 4,1 % (n= 202), e *van(A)* = 1,4% (n=72). Não foi detectado o marcador genético *erm(B)*, em nenhuma das 130 amostras analisadas. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *erm(B)*, dentro do gênero *Staphylococcus*. Os dados gerados pelo presente estudo poderão contribuir para o melhor conhecimento sobre a temática da resistência antimicrobiana em ambientes hospitalares impactados zpor esses fármacos, contribuindo para um melhor entendimento epidemiológico das doenças vinculadas a estes microrganismos.

**Palavras-chave** resistência aos antimicrobianos; genes de resistência; *Staphylococcus*; *Enterococcus*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## O USO DE SOFTWARES NA CARACTERIZAÇÃO DE PROFAGOS EM BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *Helicobacter pylori*

SOUSA<sup>1</sup>, S.L.; SILVA<sup>1</sup>, H.V.; CRISPIM<sup>1</sup>, J.S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais - Setor de biologia Coltec.

**E-mail:** sandraleticiabio@gmail.com

---

**Resumo:** Este trabalho foi desenvolvido durante a graduação do curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais e teve como objetivo promover a caracterização inicial de profagos presentes na espécie : *Helicobacter pylori*, uma bactéria patogênica e de grande interesse médico devido a algumas características como: sua capacidade cosmópole, difícil erradicação devido a altas taxas de resistência a antibióticos convencionais e impressionante adaptação e sucesso reprodutivo em um ambiente extremamente inóspito. Para a caracterização de profagos foi utilizada como metodologia apenas softwares de bioinformática.

**Palavras-chave:** Profagos, Bioinformática, *Helicobacter pylori*, Bacteriófagos, Microbiologia.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DE *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-835 EM MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL**

**SOUZA, R. O.<sup>1</sup>; MIRANDA, V. C.<sup>1</sup>; QUINTANILHA, M. F.<sup>1</sup>; GALLOTTI, B.<sup>1</sup>; DE JESUS, L. C. L.<sup>2</sup>; AZEVEDO, V. A. C.<sup>2</sup> E MARTINS, F. S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Genética

**E-mail: ramonsouza8@hotmail.com**

---

**Resumo:** O 5-Fluouracil (5-FU) é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, sua administração está associada à elevada incidência de mucosite intestinal (MI) em pacientes oncológicos. Esta condição é caracterizada pela inflamação e ulceração da mucosa intestinal devido à inespecificidade do quimioterápico sobre as células cancerígenas. Atualmente, não existe tratamento curativo para a MI; portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* BAA-835 em modelo murino de MI induzida por 5-FU. Camundongos Balb/c foram divididos em grupos Controle (CTL) e Mucosite (MUC), que receberam 0,1 mL de salina por via intragástrica, e grupos Controle Probiótico (AKK) e tratamento com mucosite induzida (AKK+MUC), que receberam 0,1 mL do probiótico na dose de 10<sup>9</sup> UFC, pela mesma via. Para a indução da mucosite, os animais pertencentes aos grupos MUC e AKK+MUC receberam, por via intraperitoneal, 300 mg/Kg de 5-FU. Ao 3º dia após a indução da mucosite os animais foram sacrificados. A partir do dia da indução da doença, a avaliação clínica dos animais foi mensurada pelo índice de atividade da doença (DAI), que apresentou redução estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AKK+MUC e MUC. Já os parâmetros imunológicos avaliados por meio das enzimas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), e citocina TNF, apresentaram redução significativa, enquanto a sIgA e citocina anti-inflamatória IL10 apresentaram aumento significativo após a administração probiótica. Portanto, o uso de *A. muciniphila* foi capaz de atenuar os danos causados pela mucosite induzida por 5-FU.

**Palavras-chave:** probiótico; *Akkermansia muciniphila*; mucosite intestinal; câncer



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PREDIÇÃO DE VACINA MULTI-EPÍTOPO CONTRA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* APLICANDO ABORDAGENS DE IMUNOINFORMÁTICA

VILELA RODRIGUES<sup>1</sup>, T. C.; AZEVEDO <sup>1</sup>, V. A. C.; SALES-CAMPOS<sup>2</sup>, H.; JAISWAL<sup>1</sup>, A. K.; KATO<sup>1</sup>, R. B.; TOSTA<sup>1</sup>, S. F. O.; GIOVANETTI<sup>3</sup>, M.; SOARES<sup>4</sup>, S. C.; TIWARI<sup>1</sup>, S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Laboratório de Genética Celular e Molecular.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Departamento de Biociências e Tecnologia, Laboratório de Imunologia de Mucosas.

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Flavivírus

<sup>4</sup>Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Bioinformática

**E-mail:** thaiscristinavr@gmail.com

---

**Resumo:** A pneumonia é uma enfermidade que causa de morte de cerca de três milhões de pessoas anualmente. O *Mycoplasma pneumoniae* é um dos principais patógenos associados à doença, com aumento significativo nos últimos anos. As vacinas são fundamentais na prevenção de infecções, além de evitarem consideravelmente a necessidade de serviços hospitalares e recursos financeiros. Dessa forma, a proposta deste estudo é determinar a partir de ferramentas de imunoinformática, uma vacina multi-epítipo contra o *M. pneumoniae*. Para isso, epítopos capazes de induzir tanto respostas celulares quanto humorais foram filtrados quanto à imunogenicidade, cobertura populacional, entre outros. Predições estruturais e análises quanto as propriedades físicas foram realizadas e a vacina construída foi considerada imunogênica, não tóxica, não alérgica e estável. Ferramentas *in silico* para clonagem e simulação imune foram utilizadas para investigar a expressão da vacina em um vetor apropriado e o potencial imunogênico, respectivamente. Para verificar a afinidade entre a vacina com o receptor Toll Like 2, o *docking* molecular está sendo realizado, além da simulação da dinâmica molecular para avaliar a estabilidade do complexo. Nesta prospecção, construímos um potencial candidato vacinal para pneumonia causada por *M. pneumoniae*. Além de contribuir para o entendimento da interação e mecanismos imunes decorrentes deste tipo de infecção, após validação experimental este trabalho poderá auxiliar na prevenção da pneumonia grande escala.

**Palavras-chave** *Mycoplasma pneumoniae*; imunoinformática; vacina multi-epítipo; vacina; simulação dinâmica; simulação imune.

## RESUMOS MICOLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### DIVERSIDADE E PERFIL XEROFÍLICO E HALOFÍLICO DE FUNGOS PRESENTES EM ROCHAS DO DESERTO POLAR DA ANTÁRTICA CONTINENTAL

Alves<sup>1</sup>, S. E. O.; Menezes<sup>1</sup>, G. C. A.; Souza<sup>4</sup>, C. D.; Oliveira<sup>3</sup>, F. S.; Schaefer<sup>2</sup>, C. E. G. R.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Geografia.

<sup>4</sup> Instituto Federal de Minas Gerais, Coordenadoria de Geografia.

E-mail: stephanie.evelin@gmail.com

---

**Resumo:** Dentre os microrganismos extremófilos, há aqueles que habitam a superfície e o interior de rochas, que têm sido o foco de pesquisas com diversos tipos de enfoque por serem capazes de sobreviver em ambientes tão extremos. As superfícies rochosas são consideradas um ambiente inóspito, devido às condições extremas de temperatura, contato direto com o ar, mudanças rápidas na atividade da água e alta radiação ultravioleta (UV) da Antártica. Entretanto, os fungos que colonizam as superfícies rochosas e minerais desempenham um importante papel como agentes geoativos nestes ecossistemas. Os fungos encontrados nesses ambientes são considerados extremófilos e possuem adaptações morfofisiológicas e acredita-se que haja uma relação direta entre resistência à seca, à alta salinidade e ao frio. Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar os fungos do deserto polar Antártico. Até o presente momento, os resultados mostram um número restrito de espécies cultiváveis, encontradas predominantemente na crosta salina das rochas. Dentre os táxons encontrados e identificados, o gênero *Penicillium* se destaca em relação à alta resistência em baixa atividade de água e todos os táxons isolados em meio seletivo confirmaram-se halófilos. Esses resultados demonstram que a comunidade fúngica cultivável presente em rochas de Heritage Range, parte sul das montanhas Ellsworth é composta por fungos adaptados a condições extremas de estresse salino e resistência a baixa atividade de água.

**Palavras-chave:** fungos; extremófilos; halofilia; xerofilia; Antártica.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AO ITRACONAZOL CAUSA RESISTÊNCIA CRUZADA ENTRE ANTIFÚNGICOS E ALTERA A INTERAÇÃO DE *Trichophyton interdigitale* COM MACRÓFAGOS

Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Oliveira<sup>1</sup>, J. C. M. D.; Alves<sup>1</sup>, B. M.; Almeida<sup>1</sup>, B. C. T.; Gouveia-Eufrasio<sup>1</sup>, L.; Peres<sup>1</sup>, N. T. A. e Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia

E-mail: paulofonsecca@gmail.com

---

**Resumo:** A emergência da resistência aos antifúngicos é uma problemática na prática clínica. A resistência *in vitro* pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca determina a tolerância a um antifúngico específico; enquanto a resistência adquirida representa eventos de surgimento de uma linhagem resistente de uma população que, anteriormente, era sensível ao antifúngico. O fungo pode exibir ainda resistência cruzada, que ocorre quando um mecanismo de resistência referente a uma droga também propicia resistência a outras moléculas. Para dermatófitos, mecanismos de resistência adquirida e resistência cruzada ainda não são totalmente elucidados. No intuito de avaliar a influência da resistência adquirida ao itraconazol e resistência cruzada em agentes causadores de dermatofitose *in vitro* e *in vivo*, três linhagens *Trichophyton interdigitale* (II, 865 e 917) passaram por um processo de adaptação a este antifúngico, originando linhagens adaptadas (AI) que, posteriormente, foram subcultivadas em meio na ausência deste antifúngico (10pI). As linhagens AI adquiriram resistência e exibiram resistência cruzada para cetoconazol, ciclopirox e terbinafina. As linhagens 10pI mantiveram o perfil de resistência adquirida, mas não houve resistência cruzada. A resistência acarretou alterações no crescimento e na germinação de conídios. As linhagens foram menos fagocitadas por macrófagos e tiveram reduzida capacidade de proliferação em modelo murino. Deste modo, itraconazol induz resistência, que pode ser cruzada com outros antifúngicos de diferentes classes químicas.

**Palavras-chave:** resistência cruzada; dermatófito; antifúngico; itraconazol; resistência adquirida.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Sporothrix* ASSOCIADAS À EPIDEMIA DE ESPOROTRICOSE FELINA NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

Colombo<sup>1\*</sup>, S. A.; Fonseca<sup>1</sup>, M. N.; Salvato<sup>1</sup>, L. A.; Rodrigues<sup>1</sup>, M. P. R.; Pinto<sup>1</sup>, N. P.; Keller<sup>1</sup>, K. M.; Azevedo<sup>1\*</sup>, M. I.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária.

E-mail: salenecolombo@vetufmg.edu.br/ isabelazevedo@vetufmg.edu.br

---

**Resumo:** A esporotricose é uma doença zoonótica causada por fungos patogênicos do gênero *Sporothrix*. Essa infecção provoca um quadro crônico de infecção da pele e tecido subcutâneo, com alta morbidade e, em casos de indivíduos imunossuprimidos, alta mortalidade. Atualmente os felinos são os animais mais acometidos pela doença e são uma importante fonte de infecção para outros animais e humanos. Em Belo Horizonte a partir de 2015, houve um aumento significativo no número de felinos infectados com a doença e atualmente o município apresenta uma epidemia em progresso de esporotricose em felinos e humanos. Apesar dos impactos significativos na saúde humana e animal, não há dados da prevalência das espécies circulantes no município associados a esporotricose zoonótica. Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar as espécies de *Sporothrix* circulantes em casos clínicos de felinos na cidade de Belo Horizonte. Para tal, foram selecionadas 50 isolados de *Sporothrix* obtidos de diferentes localidades do município, estes foram submetidos a extração de DNA, com posterior identificação molecular com primers espécie-específico baseados no gene da Calmodulina. Os isolados foram identificados como *S. brasiliensis*, a aplicação de primers espécie-específico comprovou ser um método capaz de identificar de maneira confiável a nível de espécie agentes causadores da esporotricose felina. A melhoria na taxa de identificação laboratorial verificada pode ajudar na evolução da compreensão dos aspectos clínicos e epidemiológicos desse patógeno fúngico, contribuindo com dados fundamentais para estudos epidemiológicos futuros para desenvolvimento de ações de controle e prevenção da esporotricose zoonótica no município de Belo Horizonte.

**Palavras-chave:** Felino; *Sporothrix brasiliensis*; zoonose; saúde pública; diagnóstico molecular; prevenção.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## ALTERAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DE *Cryptococcus neoformans* EXPOSTO A AGROQUÍMICOS E APÓS INTERAÇÃO COM *Nicotiana benthamiana*

Dornelas<sup>1</sup>, J. C. M.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Paixão<sup>1</sup>, V. M.; Resende-Stoianoff<sup>1</sup>, M. A. e Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

E-mail: joacmndo@yahoo.com.br

---

**Resumo:** Com o objetivo de verificar a influência da resistência à agroquímicos na interação Cn-planta, linhagens de H99 não adaptadas (NA), adaptadas (A) e subcultivadas em meio na ausência dos agroquímicos (10p) piraclostrobina (PCT) e tebuconazol (TBZ) foram avaliadas quanto a contagem de UFC, morfologia, susceptibilidade a fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) e TBZ e PCT, taxa de crescimento e atividade enzimática para fosfolipase, proteinase e urease antes e após a passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). O pico de recuperação fúngica para as linhagens de Cn H99 ocorreu ao sétimo dia após a inoculação em Nb. As linhagens obtidas de Nb apresentaram significativas alterações morfológicas em relação à linhagem não adaptada aos agroquímicos. É possível observar que as linhagens H99 A TBZ e H99 10p TBZ recuperadas de Nb mostram aumento de 4x para AMB e FCZ, respectivamente. A curva de crescimento da linhagem adaptada a TBZ e PCT recuperado após 7 dias de inoculação em Nb é menor que do fungo não recuperado da planta quando comparado o tempo de 48 horas. A produção das enzimas urease e proteinase permaneceram inalteradas para as linhagens de Cn H99. A atividade de fosfolipase reduziu qualitativamente para as linhagens H99 NA, H99 A TBZ e H99 10p TBZ e aumentou para as linhagens H99 A PCT e H99 10p PCT após passagem na planta. Conclui-se que o contato prévio com antifúngicos e a passagem em Nb induz alterações morfo-fisiológicas no fungo promovendo uma modificação no seu perfil de susceptibilidade a antifúngicos clínicos.

**Palavras-chave** *Cryptococcus*; modelo vegetal; tebuconazol; piraclostrobina.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **AVALIAÇÃO DE EXOENZIMAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO**

**Fontenelle<sup>1</sup>, P. H. C.; Macedo<sup>1</sup>, A. T.; Furtado<sup>1</sup>, H. L. A.; Silva<sup>1</sup>, T. O.; Silva<sup>1</sup>, S. L.; Costa<sup>1</sup>, E.V.S; Santos<sup>1</sup>, J. R. A.**

<sup>1</sup> Universidade Ceuma, Laboratório de Microbiologia Ambiental

E-mail: pedrohfontenelle@hotmail.com

---

**Resumo:** As micoses são doenças negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública, apresentando uma alta morbimortalidade, principalmente em áreas endêmicas, embora não sejam de notificação compulsória no Brasil. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho o perfil fosfolipídico de isolados clínicos de pacientes com infecções fúngicas invasivas em hospital de referência no estado do Maranhão. O estudo foi realizado com amostras biológicas de pacientes internados em uma Unidade Hospitalar (São Luís-MA), no período de Setembro de 2018 a Outubro de 2019. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pelo MALDI-TOF. Em seguida, foi realizado o teste de fosfolipase para a verificação da presença da zona de precipitação (Pz) e o teste de catalase para verificação da conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A avaliação da atividade da enzima fosfolipase mostrou que 69,4% dos isolados apresentaram atividade moderada a muito forte. Além disso, todas as amostras foram positivas para a presença da catalase. Desta forma, a presença de tais enzimas em isolados clínicos mostra o potencial de virulência do microrganismo no hospedeiro, o que contribui para a invaginação de tecidos mais profundos. Portanto, espera-se contribuir com o conhecimento da presença de tais exoenzima em infecções fúngicas invasivas em um hospital de referência para doenças infecto-contagiosas no Estado, no intuito de contribuir com a terapia correta de pacientes com tais patologias.

**Palavras-chave** Micoses; Fosfolipase; Fungos; Infecções.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## ***CRYPTOCOCCUS GATTII* E *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* USAM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE VIRULÊNCIA EM MODELO MURINO**

**Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Gouveia-Eufrasio, L.<sup>1</sup>; Carneiro, H.C<sup>1</sup>; Baltazar, L. M.; Emídio, Paixão, T. A<sup>3</sup>; E. C. P.<sup>1</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Interação Microorganismo hospedeiro.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Patologia.

E-mail: [gujcf@yahoo.com.br](mailto:gujcf@yahoo.com.br)

---

**Resumo:** Os fatores de virulência de *Cryptococcus* são amplamente estudados *in vitro*, mas sua influência na patogenicidade ainda permanece pouco esclarecida. Nesse estudo, avaliamos a relação entre a diversidade fenotípica de *Cryptococcus*, observada *in vitro* e *in vivo*, e a virulência em modelo murino. Demonstramos que leveduras de *Cryptococcus* sofrem remodelamento celular, apresentando microcélulas no início da infecção e células maiores em tempos tardios. O aumento da cápsula polissacarídica *in vivo*, com manutenção de um corpo celular pequeno, foi correlacionado à virulência de *C. neoformans*. Para *C. gattii*, a característica que foi comum às cepas mais virulentas foi maior crescimento no interior dos macrófagos, com menor estresse nitrosativo. A melanização, até então considerada fator primordial para colonização do sistema nervoso central, não foi um fator determinante para a colonização cerebral, uma vez que cepas não letais e pouco letais foram capazes de melanizar nesse sítio. A análise da expressão gênica por sequenciamento de RNA da linhagem hipervirulenta H99 diretamente do lavado broncoalveolar de camundongos, demonstrou a dinâmica de expressão ao longo da infecção, com predominância de genes relacionados à replicação celular no início da infecção. Em tempos tardios, foi demonstrado aumento da síntese de cápsula e montagem do proteassoma, corroborando os dados sobre remodelamento celular. O tratamento de camundongos com bortezomib (inibidor de proteassoma) inibiu o remodelamento celular de *C. neoformans*. Concluindo, *C. neoformans* e *C. gattii* utilizam estratégias distintas de sobrevivência durante a infecção.

**Palavras-chave:** Criptococose, fatores de virulência *in vivo*, estresse nitrosativo, capsula, melanização, proteassoma.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE *Strongyloides venezuelensis* NA PROGRESSÃO DA CRIPTOCOCOSE MURINA EXPERIMENTAL

Gouveia-Eufrazio, L.<sup>1</sup>; Costa, M.C.<sup>1</sup>; Peres-Emídio, E.C.<sup>1</sup>; Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Carmo, P.H.F.<sup>1</sup>; Rezende, M.C.<sup>2</sup>; Rodrigues, V.F.<sup>2</sup>; Rodrigues, J.G.M.<sup>2</sup>; Negrão-Corrêa, D.A.<sup>2</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: milagouveia@yahoo.com.br

---

**Resumo:** *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica que afeta os pulmões, podendo acometer o sistema nervoso central. A strongiloidíase é uma doença intestinal causada por parasitas do gênero *Strongyloides*. Um fator comum entre essas doenças é que *Strongyloides* passa pelos pulmões do hospedeiro, o que poderia contribuir para a ocorrência de coinfeções com esses organismos. Desse modo, este trabalho tem o objetivo de avaliar a influência de *S. venezuelensis* (Sv) na progressão da criptococose murina causada por *C. gattii* (Cg). Inicialmente, foi avaliada a fagocitose de *C. gattii* por macrófagos estimulados com antígeno de larva infectante (L3) de Sv. Posteriormente, camundongos foram infectados com Sv antes ou depois de Cg, para determinação do tempo de coinfeção. Após a essa etapa, animais foram infectados com Sv 2 dias antes de Cg e eutanasiados 10 dias após a infecção fúngica, para determinação de carga fúngica no cérebro, pulmão e lavado broncoalveolar. O estímulo de macrófagos com o L3 3 horas antes da infecção com Cg resultou em uma maior proliferação intracelular fúngica. Em relação à morbimortalidade dos animais, houve redução da sobrevivência em todos os grupos infectados com Sv depois do fungo, quando comparados ao grupo Cg. Em relação à recuperação de carga fúngica, observou-se um aumento da carga fúngica no lavado broncoalveolar do grupo coinfectado, em comparação ao grupo Cg, com redução do recrutamento de leucócitos, sugerindo que a redução na sobrevivência dos animais pode estar associada a uma alteração na resposta inflamatória ou dano tecidual.

**Palavras-chave** coinfeção; criptococose; *Cryptococcus gattii*; *Strongyloides venezuelensis*.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## DA MICOLOGIA CLÁSSICA À NANOTECNOLOGIA: AUMENTO DA EFICIÊNCIA PARA DETECÇÃO DE MICOSES SISTÊMICAS E APLICAÇÃO DE UM NOVO TESTE RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO PARA DIAGNÓSTICO DE CRIPTOCOCOSE

Junqueira<sup>1</sup>, C. M.; Siman<sup>2</sup>, L. G.; Corrêa<sup>3</sup>, A. J.; Santos<sup>3</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física/Laboratório de Física de Sistemas Biológicos

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

E-mail: caroline.junqueira@ctnano.org

---

**Resumo:** A criptococose é uma doença causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. É a infecção fúngica que mais acomete o SNC. Quanto ao diagnóstico, métodos imunológicos, são bastante laboriosos, exigindo fino treinamento de pessoal e disponibilidade de equipamentos onerosos para a obtenção de resultados. Testes imunocromatográficos são de rápida e simples execução, porém podem gerar resultados falso-positivos devido à ocorrência de reação cruzada com outros microrganismos. Considerando as lacunas importantes no diagnóstico da criptococose causadas pelas falhas inerentes a cada método, é de grande importância o desenvolvimento e aplicação de testes rápidos, sensíveis, específicos, de fácil manuseio e acessíveis em ambientes distantes de grandes centros. Esse trabalho visa a combinação de fotônica e nanotecnologia para um novo método de diagnóstico através da geração de nanosensores capazes de se ligar a antígenos criptocócicos e de medidas óticas que possibilitem a detecção e caracterização dessas ligações. Assim, nanobastões de ouro foram sintetizados e funcionalizados com anticorpos monoclonais 18B7, que são capazes de reconhecer fragmentos de GXM. Os nanosensores foram testados utilizando soros de camundongos infectados e sadios através de medidas realizadas por um espectrômetro portátil de espalhamento de luz que utiliza medidas de espalhamento dinâmico de luz sendo capaz de detectar, em minutos, a presença de fragmentos da cápsula criptocócica, além de estimar a massa molecular dos mesmos e medir a constante de afinidade química com os anticorpos. Portanto, nesse trabalho demonstra-se a prova de conceito de uma tecnologia do tipo *point of care* de alta acurácia para o diagnóstico de criptococose.

**Palavras-chave** *Cryptococcus*; Diagnóstico de criptococose; Nanotecnologia; Fotônica.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## COMORBIDADES MICROBIANAS EM PACIENTES COM COVID-19 EM BELO HORIZONTE

Lima, C.M.<sup>1</sup>; Silva, D.L.<sup>2</sup>; Magalhães<sup>1</sup>, V.C.R.<sup>2</sup>; Baltazar, L.M.<sup>2</sup>; Johann, S.<sup>1</sup>; Peres, N.T.A.<sup>2</sup>; Caligorne, R.B.<sup>3</sup>; Martins, J.C.<sup>4</sup>; Rabelo, L.F.<sup>4</sup> e Santos, D.A.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

<sup>3</sup>Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, MG.

<sup>4</sup>Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, MG.

Email: carolinemiranda.bio@gmail.com

---

**Resumo:** A infecção ocasionada pelo novo coronavírus (COVID-19) está relacionada à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), que pode predispor às coinfeções bacterianas e fúngicas, porém pouco ainda se sabe sobre a epidemiologia e consequências desses processos. No presente estudo foi realizada uma análise descritiva dos pacientes que internados com COVID-19 de Maio à Setembro de 2020, no Hospital Eduardo de Menezes. Foram incluídos 158 pacientes com diagnóstico confirmado por RT-PCR. A taxa de mortalidade total foi de 17,08%. A distribuição dos pacientes com COVID-19 por sexo foi 53,16% masculino 46,83% feminino. A taxa de coinfeções dentro do grupo analisado foi de 22,15%, contudo, a taxa de mortalidade nesse grupo foi maior (48,57%) do que no grupo dos sem coinfeção (8,13%). Do total de indivíduos coinfectados, observou-se que 45,71% apresentaram infecção mista, isto é, em mais de um sítio. E na maioria (51,42%) dos casos a coinfeção envolvia mais de um agente. *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. e *Candida* sp. foram os agentes mais isolados. Apesar de ter sido uma análise inicial, os dados revelam a importância do estudo de coinfeções, principalmente, para o direcionamento do tratamento desses pacientes.

**Palavras-chave:** coinfeção; bacteriana; levedurose; COVID-19.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **A IMPORTÂNCIA DE UM SERVIÇO QUALIFICADO EM MICOLOGIA EM UM HOSPITAL REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS.**

**Magalhães<sup>1,2</sup>, V.C.R.; Moura<sup>2</sup>, A. C. L.; Costa<sup>1</sup> M. C. e Santos<sup>1</sup>, D. A.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

<sup>2</sup> Hospital Eduardo de Menezes/Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais -FHEMIG

E-mail: [dasufmg@gmail.com](mailto:dasufmg@gmail.com)

---

**Resumo:** O Hospital Eduardo de Menezes (HEM) é um hospital público, localizado na cidade de Belo Horizonte, considerado referência em doenças infectocontagiosas e dermatologia sanitária no estado de Minas Gerais. O objetivo deste trabalho foi reestruturar o laboratório de micologia da instituição no intuito de se obter um serviço de diagnóstico qualificado e capaz de atender a demanda exigida pelo HEM. Para isso, utilizou-se uma detalhada análise situacional para identificar possíveis problemas que poderiam estar comprometendo o desempenho dos exames micológicos. As notificações da Vigilância Sanitária (VISA) foram atualizadas e listadas. A partir das inconsistências obtidas com a análise situacional e com as notificações da VISA, definiu-se ações como: organização física, elaboração e atualização de processos, capacitações, alinhamento com a equipe multidisciplinar de saúde e utilização de técnicas micológicas fundamentadas em evidências científicas para solucionar os problemas identificados. Implementou-as e verificou se as modificações contribuíram para o objetivo proposto. Além disso, foi feito um levantamento dos laudos micológicos, do período de 2014 a 2019, para se obter o perfil epidemiológico das micoses sistêmicas e subcutâneas do HEM. Assim, evidenciou-se que a organização estrutural, processual e de recursos humanos, juntamente com programas de capacitação e uso de metodologias baseadas em evidências científicas, impactam positivamente e de forma relevante no desempenho final do serviço prestado. Este estudo também possibilitou verificar que as técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico micológico possuem limitações inerentes a cada metodologia, e que o ideal é o uso associado destas.

**Palavras-chave** hospital referência em doenças infectocontagiosas; micoses sistêmicas e subcutâneas; diagnóstico micológico; gestão laboratorial; sistema de qualidade.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## O PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 DURANTE INFECÇÃO POR *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Malacco<sup>1</sup>, N.L.S.O.; Souza<sup>1</sup>, J. A. M.; Moura<sup>1</sup>, T.R.; Souza<sup>2</sup>, D.G.; Teixeira<sup>1</sup>, M.M.; Russo<sup>3</sup>, R.C.; Soriani<sup>1</sup>, F.M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Fisiologia Pulmonar.

E-mail: [nathalialuisa2@gmail.com](mailto:nathalialuisa2@gmail.com)

---

**Resumo:** *Aspergillus fumigatus* é um fungo ubíquo que tem relevância ambiental e clínica. A infecção se dá após inalação de conídios e indução desencadeamento de uma resposta inflamatória robusta, incluindo uma grande produção de quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos. Dentre os receptores de quimiocinas, há o receptor ACKR2, que é responsável por regular negativamente quimiocinas inflamatórias do tipo CC. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do receptor ACKR2 na aspergilose pulmonar. Para isso, foram utilizados camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> e WT de 10 a 12 semanas infectados com *A. fumigatus*. Os resultados mostraram que os camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> são susceptíveis a infecção por *A. fumigatus*. Esses animais também apresentaram maior carga fúngica em comparação aos animais WT. A análise de células no sítio infecciosos mostrou que animais ACKR2<sup>-/-</sup> tiveram aumento significativo nos leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos após a infecção. Em relação à liberação de quimiocinas, foi observado que há um aumento significativo nos níveis de CCL2, CCL3 e CCL5 nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> em comparação aos animais WT após infecção. Além disso, o antagonismo farmacológico do receptor CCR5 por met-RANTES em camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> foi capaz de reduzir a inflamação no foco infeccioso após a infecção por *A. fumigatus*. Como conclusão, os resultados demonstram que o receptor ACKR2 tem um papel protetor na aspergilose pulmonar, sendo responsável por limitar a resposta antifúngica, a inflamação e o recrutamento de leucócitos.

**Palavras-chave** *Aspergillus*; aspergilose; ACKR2; quimiocinas; receptor atípico de quimiocinas.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

**O CONSUMO CRÔNICO DO ÁLCOOL PELOS DOADORES DE MEDULA ÓSSEA AFETA A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS RECEPTORES NA INFECÇÃO CONTRA *Aspergillus Fumigatus***

**Martins, F.R.B. <sup>1</sup>; Malacco, N.L.S.O. <sup>1</sup>; Rezende, B. M. <sup>2</sup>; Pinho, V. <sup>3</sup>; Teixeira, M.M. <sup>4</sup> e Soriani, F.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução.

<sup>2</sup> UFMG, Escola de Enfermagem, Departamento de Enfermagem Básica.

<sup>3</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia.

<sup>4</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

E-mail: [flaviarayssa133@gmail.com](mailto:flaviarayssa133@gmail.com)

---

**Resumo:** O consumo do álcool é considerado um fator de risco para pneumonias, principalmente, por diminuir a função e migração de neutrófilos nos pulmões. O objetivo deste trabalho foi avaliar quais dessas alterações causadas pelo consumo do álcool seriam mantidas após transplante de medula óssea para camundongos não expostos ao álcool. Para isso, os camundongos doadores foram tratados por 12 semanas com etanol e sua medula óssea foi transplantada para animais receptores. Após recuperação, os camundongos receptores foram infectados com conídios de *Aspergillus fumigatus*. Os resultados demonstraram que os animais receptores de medula óssea de doadores tratados apresentaram menor quantidade de células totais no lavado broncoalveolar e uma menor quantidade de neutrófilos nos alvéolos e no parênquima pulmonar após dois dias de infecção. Os neutrófilos de animais receptores de medula óssea de doadores tratados com álcool também apresentaram menor capacidade fagocítica e, conseqüentemente, um aumento de carga fúngica no pulmão. Além disso, o consumo do álcool diminuiu a quantidade de plaquetas no sangue e essa alteração se manteve nos animais que receberam a medula óssea dos animais tratados. As plaquetas são essenciais para a migração, fagocitose e contenção do crescimento de conídios no pulmão, e sua diminuição observada nos animais receptores pode contribuir para o fenótipo de susceptibilidade encontrado nos animais consumistas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, álcool, neutrófilo, migração, inflamação e susceptibilidade.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## A INFECÇÃO POR *Cryptococcus gattii* AGRAVA A DOENÇA CAUSADA POR *Streptococcus pneumoniae* EM MODELO MURINO

Miranda<sup>1</sup>, B. A.; Emídio<sup>1</sup>, E. C. P.; Ribeiro<sup>1</sup>, N.Q.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Paixão<sup>1</sup>, V.M.; Freitas<sup>1</sup>, G. J. C.; Hubner<sup>2</sup>, J.; Fagundes<sup>3</sup>, C. T.; Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Imunofarmacologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia Laboratório de Interação Micro-organismo-Hospedeiro.

E-mail: barbara.miranda@yahoo.com.br

---

**Resumo:** *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) são microrganismos que podem causar pneumonia, alcançar diversos órgãos e chegar ao Sistema Nervoso Central (SNC) e causar meningite, podendo levar o indivíduo à morte. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a coinfeção de *S. pneumoniae* e *Cryptococcus gattii* em modelo murino. Nossos resultados demonstraram que, em um processo de coinfeção com *C. gattii*, a infecção secundária causada por *S. pneumoniae* piora significativamente o estado neuropsiquiátrico, o comportamento motor e a função autônoma dos animais, levando à morte precoce. Esses resultados foram associados ao aumento da translocação bacteriana do pulmão para outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central. A quantidade de leucócitos no lavado broncoalveolar aumentou, sendo as células mononucleadas o tipo celular predominante. No momento, estudos de elucidação da resposta inflamatória estão em andamento para propiciar melhor entendimento sobre os mecanismos que levam à maior translocação bacteriana na presença de *C. gattii*.

**Palavras-chave:** coinfeção; *Cryptococcus gattii*; *Streptococcus pneumoniae*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## OS IMPACTOS DA ADIÇÃO DE *Lactobacillus casei* NO METABOLISMO DO BIOFILME DE *Candida albicans*.

Paschoaleto<sup>1</sup>, P.M.; Dias<sup>1</sup>, A.M.; Silva<sup>1</sup>, C.L.; Silva<sup>1</sup>, N.C.; Dias<sup>1</sup>, A.L.T.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Microbiologia e Imunologia.

E-mail: [pietropaschoaleto@gmail.com](mailto:pietropaschoaleto@gmail.com)

---

**Resumo:** Candidíases compreendem uma extensa diversidade de síndromes clínicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, que apresentam cerca de 200 espécies descritas, dentre elas, *Candida albicans*. Em condições normais, *Candida* spp. atua como organismo comensal, porém, na presença de fatores favoráveis podem causar a infecção fúngica. Fatores associados à virulência, como a capacidade de formação de biofilmes, dificultam o tratamento das infecções, agravando ainda mais o quadro clínico do paciente. *Lactobacillus* spp. são bactérias lácticas predominantes na microbiota vaginal e intestinal saudável. Esse estudo teve como objetivo avaliar os impactos da presença de *Lactobacillus casei* na formação de biofilme por *Candida albicans*. A obtenção do biofilme de *C. albicans* ocorreu em placas de microtitulação de 96 poços, por inoculação na ordem de  $1 \times 10^7$  células/mL, seguido de incubação anaeróbica a 37°C e 75 rpm por 24 horas. Determinou-se atividade metabólica do biofilme através da análise da redução da solução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilina (XTT)/Menadiona. Foi possível observar diminuição de aproximadamente 45% na atividade metabólica do biofilme multiespécie em relação ao biofilme formado apenas por *C. albicans*. A observação do biofilme associado, em microscópio invertido, evidenciou, ainda, alterações morfológicas em *C. albicans*, especialmente no que tange à filamentação, visivelmente reduzida quando comparado ao biofilme não associado. Essa mudança morfológica pode ser significativa, uma vez que a filamentação é importante no processo de formação de um biofilme fúngico íntegro. Assim, esse estudo destaca um alvo terapêutico potencial no combate à candidíase, além de corroborar com o entendimento das interações desses microrganismos no organismo humano.

**Palavras-chave:** Biofilme; *Candida albicans*; *Lactobacillus casei*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE TRÊS DIFERENTES REINOS: ENTENDENDO A COMPLEXIDADE DA COINFEÇÃO ENTRE A BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* E O FUNGO *Cryptococcus gattii* EM MODELO MURINO

Peres-Emidio, E. C. P.<sup>1</sup>; Costa, M. C.<sup>1</sup>; Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Brito, C. B.<sup>3</sup>; Arifa, R. D. N.<sup>3</sup>; Carmo, P.H.F.<sup>1</sup>; Gouveia-Eufrasio, L.<sup>1</sup>; Silva, L. M. V.<sup>1</sup>; Santos, A. P. N.<sup>1</sup>; Ribeiro, N. Q.<sup>1</sup>; Oliveira, L. V. N.<sup>1</sup>; Bastos, R. W.<sup>1</sup>; Paixão, T. A.<sup>2</sup>; Fagundes, C. T.<sup>3</sup>; Souza, D. G.<sup>3</sup>; Santos, D. A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia / Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Patologia / Laboratório de Patologia Celular e Molecular.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia / Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro.

E-mail: eluziaperes@yahoo.com.br

---

**Resumo:** A criptococose, uma micose invasiva causada por *Cryptococcus* spp., acomete pulmões e o sistema nervoso central (SNC) e é considerada mundialmente como a quinta doença infecciosa mais letal. Pode ocorrer concomitantemente com outros patógenos, caracterizando uma coinfeção. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) é um patógeno oportunista, também causador de pneumonias. Neste trabalho foi avaliada a progressão da criptococose murina causada por *C. gattii* (Cg) durante coinfeção com Pa. *In vitro*, Pa reduziu o crescimento de Cg pela secreção de moléculas inibitórias. *In vivo*, a infecção prévia por Pa reduziu a morbidade e atrasou a letalidade da criptococose. O mesmo não ocorreu quando a infecção por Pa ocorreu após a de Cg. Essas alterações podem ser explicadas pela redução da carga fúngica nos pulmões e no cérebro, mostrando um atraso na translocação de Cg para o SNC. Esses achados foram justificados pelo aumento do recrutamento e da atividade fungicida de macrófagos previamente estimulados por Pa. Além disso, a presença prévia de Pa nos pulmões promoveu aumento da produção de mediadores como IL-1 $\beta$ , CXCL-1 e IL-10. Esses dados revelam a alteração do ambiente de instalação inicial de Cg, dificultando a disseminação e transmigração do fungo para o SNC. A inibição da enzima iNOS no processo de coinfeção promoveu a reversão (em 60%) do fenótipo, demonstrando sua importância no processo. Pa é capaz de reduzir a morbidade e letalidade da doença causada por Cg por um mecanismo que envolve recrutamento de macrófagos e produção de espécies reativas de nitrogênio.

**Palavras-chave:** Criptococose; Coinfeção; *Cryptococcus gattii*; *Pseudomonas aeruginosa*.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

***Ruta graveolens* e *Pelargonium graveolens* COMO INIBIDORES NATURAIS DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans***

Reis<sup>1</sup>, C. M.; Azevedo<sup>2</sup>, L. M. S. e Casteluber<sup>3</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Ibirité, LAMAP

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia

<sup>3</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Ibirité, Professora do Departamento de Ciências Biológicas.

E-mail: camilamareis@gmail.com

---

**Resumo:** A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie que mais causa a doença no Brasil. O Fluconazol é o medicamento convencional utilizado para o tratamento dessas infecções, no entanto, causa reações adversas no paciente e o uso contínuo pode favorecer a resistência do patógeno ao fármaco. As plantas medicinais podem ser muito eficientes no tratamento alternativo de doenças e tem sido utilizada na medicina popular há muitos anos. Nesse estudo, foi avaliado *in vitro* a atividade antifúngica dos extratos de *Ruta graveolens* e *Pelargonium graveolens* contra o crescimento fúngico de *Candida albicans*. Os extratos foram preparados na concentração de 1g da planta para cada 5 mL de álcool 70% (v/v), obtendo-se a tintura mãe dos vegetais. Os dados foram obtidos através de Teste de Difusão em Ágar, e posteriormente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima. Os resultados mostraram que *R. graveolens* é eficaz na inibição de *C. albicans* com CIM de 100 mg.mL<sup>-1</sup>, quando comparado ao controle positivo (Fluconazol). Esse extrato poderá ser utilizado como um tratamento alternativo ou associado ao convencional. O extrato de *P. graveolens* foi capaz de inibir a propagação fúngica de *C. albicans* porém de forma menos eficiente quando comparado ao medicamento comumente utilizado no tratamento. Desse modo, os resultados sugerem que o extrato de *R. graveolens* possa ser testado em futuros estudos *in vivo* a fim de propor sua utilização em tratamento alternativo ou simultâneo a droga sintética já utilizada.

**Palavras-chave** Antifúngico; Plantas medicinais; Resistência fúngica; Candidíase.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## O PAPEL DO EOSINÓFILO NA CANDIDÍASE ORAL INDUZIDA EM ANIMAIS SIBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTINEOPLÁSICO

Santos, B.M.A.<sup>1</sup>, Gaggino, J.C.P.<sup>1</sup>; Brito, C.B.<sup>1</sup>, Queiroz-Junior, C.M.<sup>2</sup>; Baltazar, L.M.<sup>1</sup>; Soriani, F.M.<sup>3</sup>, Santos, P.C.<sup>1</sup>; Souza, D.G.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

E-mail: bmamorims@gmail.com

---

**Resumo:** A candidíase oral, causada por *Candida albicans*, é a infecção oportunista mais prevalente em pacientes em uso de drogas com atividade imunossupressora. Este uso está associado a um importante quadro de imunossupressão e estudos demonstram que esta infecção é uma das principais causas de abandono do tratamento. Neste contexto, nosso objetivo foi estabelecer um modelo de candidíase oral em camundongos submetidos ao tratamento com o 5-fluoracil (5-FU) e avaliar o efeito do eosinófilo na patogênese da infecção. Camundongos BALB/c selvagens (WT) ou deficientes para eosinófilo ( $\Delta db/Gata1^{-/-}$ ) foram tratados com 3 doses de 5-FU, no 5º dia foram inoculados com o fungo, sublingual e, eutanasiados no 2º dia pós-infecção para análises clínicas e inflamatórias. Nossos resultados mostram que a infecção em animais pré-tratados com o 5-FU associa-se a uma maior recuperação da carga fúngica, aumento da lesão tecidual, do infiltrado inflamatório e perda de peso quando comparada ao grupo infectado e não tratado. Houve um aumento significativo de CXCL-1 e CCL-11 na língua do primeiro grupo e aumento sistêmico de TNF- $\alpha$  e CXCL-1. De maneira interessante, a deficiência em eosinófilos foi associada a melhora dos parâmetros descritos anteriormente e, ela foi acompanhada de alterações histopatológicas mais discretas e menor recuperação da carga fúngica na língua destes quando comparados aos WT. Assim, os resultados sugerem que o pré-tratamento com antineoplásico aumentou a gravidade da infecção por *Candida albicans* quando comparado aos não tratados e, que os eosinófilos apresentam importante papel na patogênese da doença.

**Palavras-chave:** Candidíase oral; *Candida albicans*; antineoplásico; 5-FU; eosinófilo.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## INTERAÇÃO DA GENTAMICINA COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL CONTRA LINHAGENS DE *CRYPTOCOCCUS*

Silva<sup>1</sup>, L. M. V; Freitas<sup>1</sup>, G. C; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F; Santos<sup>1</sup>, D. A

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais Departamento/Laboratório Micologia

E-mail: lviavitorino@yahoo.com.br

---

**Resumo:** A criptococose é uma micose sistêmica que causa danos aos pulmões e cérebro. Objetivou-se neste estudo avaliar a atividade do antibacteriano (gentamicina isolada e associada aos antifúngicos clínicos fluconazol e anfotericina B) contra linhagens de *Cryptococcus* spp. Foram realizados ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos isolados, bem como a interação da gentamicina entre os antifúngicos por meio do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF). Ainda realizou-se adaptação de linhagens do fungo ao antibacteriano para avaliar a possibilidade de indução a resistência cruzada com antifúngicos. A CIM para fluconazol testadas nas linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* obtiveram uma variação de 0,5-8µg/mL e 0,25-1µg/mL e para anfotericina B a variação foi de 0,5-8µg/mL e 0,25-0,5µg/mL respectivamente. Para gentamicina a CIM para todas as linhagens de *C. gattii* foi de 512µg/mL e as cepas de *C. neoformans* variou de 128µg/mL a >512µg/mL. Os resultados para ICIF foram observados que a interação da gentamicina entre antifúngicos foram classificadas como indiferente para as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*. Durante o processo de adaptação ao antibacteriano, verificou-se que uma linhagem de *C. gattii* foi capaz de crescer cerca de 3 vezes maior que a linhagem não adaptada. No momento estão sendo realizados testes para o entendimento do processo de adaptação e suas consequências para o fungo e para a progressão da criptococose em modelo murino.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana; infecções fúngicas; mecanismos de resistência.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## COINFEÇÕES POR LEVEDURAS EM PACIENTES COM COVID-19: IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Silva<sup>1</sup>, D.L.; Lima<sup>1</sup>, C.M.; Magalhães<sup>1,4</sup>, V.C.R. Baltazar<sup>3</sup>, L.M., Johann<sup>2</sup>, S.; Peres<sup>1</sup>, N.T.A.; Carvalho<sup>4</sup>, J.; Rabelo<sup>4</sup>, Caligorne<sup>5</sup>, R.B.; L.F.; Santos, D.A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro.

<sup>4</sup> Hospital Eduardo de Menezes. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

<sup>5</sup> Hospital Santa Casa de Belo Horizonte.

E-mail: daninetbh@yahoo.com

---

**Resumo:** A doença causada por SARS-CoV-2 (COVID-19) se tornou pandemia em 2020. Ainda não há tratamentos eficazes contra COVID-19, e o manejo dos pacientes envolve uso de antibacterianos, antivirais e corticóides, o que favorece o surgimento de coinfeções fúngicas. Neste estudo foram incluídos 20 pacientes com coinfeções por leveduras. A taxa de mortalidade foi de 55%. As leveduras isoladas (n=28) foram identificadas por diferentes métodos e seu perfil de sensibilidade a antifúngicos foi avaliado. *C. albicans* foi a espécie mais frequente, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. O método molecular identificou isolados não identificados pelo fenotípico. Os isolados de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos testados. Já os de *C. tropicalis* apresentaram sensibilidade intermediária ao voriconazol e os de *C. glabrata* apresentaram resistência a esse antifúngico. Monitorar o perfil de sensibilidade é importante na detecção de resistência cruzada e da emergência de linhagens resistentes pelo uso de tratamentos empíricos. Identificar precocemente as coinfeções e monitorar o perfil de sensibilidade dos seus agentes causadores torna possível um tratamento individualizado, o que impacta diretamente na sobrevivência destes pacientes.

**Palavras-chave:** coinfeção; *Candida*; COVID-19; antifungograma; levedurose.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE E/OU HIV EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO MARANHÃO

**Silva<sup>1</sup>, T. O.; Fontenelle<sup>1</sup>, P. H. C.; Macedo<sup>1</sup>, A. T.; Furtado<sup>1</sup>, H. L. A.; Costa<sup>1</sup>, E. V. S.; Silva<sup>1</sup>, S. L.; Santos<sup>1</sup>, J. R. A.**

<sup>1</sup> Universidade Ceuma, Laboratório de Microbiologia Ambiental

E-mail: thayomara10oliveira@gmail.com

---

**Resumo:** O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema de saúde pública recorrente, principalmente em países subdesenvolvidos, como o Brasil. Essa infecção causa um desequilíbrio imunológico, possibilitando infecções oportunistas, como tuberculose (TB), devido a relação direta com a quantidade de células CD4+ e a candidíase, doença fúngica. Tendo como objetivo de estudo, avaliar o perfil de virulência e de susceptibilidade antifúngica de fungos isolados de pacientes com TB e/ou HIV no Estado do Maranhão. As amostras biológicas foram coletadas em uma Unidade Hospitalar em São Luís – MA no período de dezembro de 2018 a agosto de 2020 e realizada a identificação de cada espécie fúngica, por meio da técnica automatizada MALDI-TOF. Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi realizado o teste de fosfolipase com a medição do diâmetro do halo. A avaliação da atividade da enzima fosfolipase mostrou que 77,8 % dos isolados apresentaram atividade moderada a muito forte. A análise de susceptibilidade *in vitro* foi realizada pela técnica de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), frente a antifúngicos, como o fluconazol, anfotericina B, itraconazol e voriconazol. Identificando assim, um perfil de virulência de espécimes fúngicas aparentemente, oportunistas, assim com um perfil de susceptibilidade, que auxilia também na terapêutica antifúngica de cada paciente.

**Palavras-chave:** Infecções oportunistas; resistência fúngica; virulência.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## TAXONOMIA DE FUNGOS ASSOCIADOS À MACROALGAS ANTÁRTICAS

Souto<sup>1</sup>, M. F.; de Paula<sup>2</sup>, M. T. R.; Da Silva<sup>1</sup>, T. H.; Coelho<sup>1</sup>, L. C.; Pellizzari<sup>3</sup>, F. M.; De Carvalho<sup>4</sup>, C. R. E.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Paraná, Laboratório de Ficologia e Qualidade de Água Marinha

<sup>4</sup> Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz

E-mail: matheus.5011@hotmail.com

---

**Resumo:** A Antártica é caracterizada por ser uma das regiões mais inóspitas do planeta. Sob a influência da corrente circumpolar antártica (ACC), esse ambiente é marcado por padrões físico-químicos e biológicos únicos. Os diferentes micro-habitats existentes no Oceano Antártico já são conhecidos como potenciais substratos para colonização de micro-organismos. Na Antártica, os fungos podem ser encontrados na forma livre ou associados a diferentes substratos, como madeira, animais invertebrados e macroalgas. O presente estudo objetivou por caracterizar a distribuição e taxonomia de fungos filamentosos associados a três macroalgas antárticas: *Monostroma grevillei*, *Adenocystis utricularis.*, e *Prasiola* sp., coletadas nas ilhas Deception, Rei George e Pinguim. Obteve-se um total de 211 fungos filamentosos, dos quais 22 foram identificados até o momento por meio de técnicas morfológicas e moleculares. Entre os táxons obtidos, *Microdochium* sp. é o mais frequente, seguido por *Antarctomyces* sp. Os resultados obtidos até o momento sugerem que as macroalgas antárticas atuam como um substrato natural para a associação de comunidades de fungos filamentosos, que podem apresentar adaptações ecológicas e evolutivas para a sobrevivência em condições extremas.

**Palavras-chave:** Antártica; Macroalgas; Fungos; Taxonomia; Ambientes extremos.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO INTESTINO DE BESOUROS EM ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA

Souza<sup>1</sup>, G. F. L.; Barros<sup>1,2</sup>, K. O.; Santos<sup>1</sup>, A. R. O; Fonseca<sup>3</sup>, C. R. V., A. B.; Abegg<sup>4</sup>, M. A e Rosa <sup>1</sup>, C. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>2</sup> Laboratory of Genetics, University of Wisconsin-Madison, WI 53706, USA.

<sup>3</sup> Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

<sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

E-mail: giseleflsouza@gmail.com

---

**Resumo:** Espécies de leveduras têm sido descobertas a partir de amostragens de materiais encontrados em diferentes ecossistemas. O estudo da associação de leveduras com besouros tem revelado a presença de espécies desconhecidas desses microrganismos. Os insetos entram em contato com as leveduras que estão amplamente distribuídas em seu *habitat*. Os besouros vivem e se alimentam de madeira em decomposição, e seus intestinos são ricamente colonizados por leveduras. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras provenientes do intestino de besouros da família Passalidae coletadas a partir da floresta amazônica brasileira no município de Itacoatiara/AM. Para tanto, foram coletados 35 espécimes de besouros pertencentes a família Passalidae em 3 (três) pontos na floresta Amazônica. A partir do conteúdo intestinal destes insetos, foram obtidos 413 isolados sugestivos de leveduras. A identificação molecular de 150 isolados de levedura mostrou a ocorrência 13 espécies. Estas informações mostram a importância de estudar leveduras de fontes das mais diversas, reafirmando que o intestino de besouros são um *hotspot* de novas espécies.

**Palavras-chave:** Besouros; Passalidae; Amazônia Brasileira; Diversidade; Leveduras.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## FUNGOS DE SOLO RIZOSFÉRICO EM *Citrus sinensis* (L.) Osbeck PARA BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Speltri<sup>1</sup>, N. F. B; Andrade<sup>1</sup>, C. J., Alves<sup>1</sup>, F. C. e Attili-Angelis<sup>1,2</sup>, D.

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *campus* Rio Claro, Centro de Estudos Ambientais/Laboratório de Microbiologia Ambiental – Táxon.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

E-mail: natalia.speltri@unesp.br

---

**Resumo:** O objetivo desse trabalho foi triar isolados de fungos de solo rizosférico de *Citrus sinensis* para avaliar seu potencial de biocontrole frente a fitopatógenos que acometem os cultivares. Um total de 54 fungos filamentosos foram reativados, purificados e preservados pelo método *Castellani*, sendo 24 selecionados para os testes de antagonismo. Foi observado que o gênero *Trichoderma* destaca-se no teste inibindo/diminuindo o crescimento dos fitopatógenos. O gênero *Chaetomium* representou um microrganismo promissor para ser explorado, uma vez que retardou o crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides*

**Palavras-chave** Citros; Biocontrole; Fungos de solo Rizosférico; Bioeconomia.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Candida albicans*

Valério<sup>1</sup>, A. D.; Fernandes<sup>2</sup>, B. e Rosa<sup>1</sup>, C. A., Johann<sup>1</sup>, S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos

<sup>2</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa de Belo Horizonte

E-mail: alinediasvalerio@gmail.com

---

**Resumo:** *Candida albicans* é um fungo ubíquo, podendo ser encontrado em diversos ambientes na natureza e vivendo como comensal na microbiota de animais, inclusive no homem. Em situações de desequilíbrio do sistema imune humano, este fungo pode se comportar como patógeno oportunista. Apesar da característica ubíqua, pouco se sabe sobre sua ecologia, fatores de virulência e resistência na natureza já que a maioria dos estudos focam nos aspectos clínicos deste fungo. Neste trabalho avaliamos aspectos de virulência e resistência de isolados ambientais de *C. albicans*. Treze isolados ambientais obtidos em locais com baixa influência antrópica e 9 isolados ambientais obtidos em locais com elevada influência antrópicas foram avaliados quanto sua termotolerância, produção de enzimas hidrolíticas, morfogênese, susceptibilidade antifúngica e virulência *in vivo* no modelo *Tenebrio molitor*. Os dois grupos avaliados apresentaram capacidade de crescer até 45°C. Quanto a produção de enzimas hidrolíticas e morfogênese, os isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram ligeiramente superiores na produção enzimática e filamentação. Os isolados ambientais com alta influência antrópica foram resistentes a fluconazol e ao itraconazol. A virulência em *T. molitor* mostrou que os isolados ambientais com baixa influência antrópica apresentam taxa de virulência alta nas primeiras 24 horas experimentais, mas esta se estabiliza no decorrer do experimento. Já os isolados com alta influência antrópica aumentam sua letalidade durante o transcorrer do período experimental. É importante conhecer as características de virulência e resistência dos isolados ambientais de *C. albicans* pois os nichos que eles ocupam na natureza podem ser possíveis fontes de contaminação humana.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; virulência; resistência; *Tenebrio molitor*.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## OTIMIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE DERMATOMICOSSES ANALISADAS NO LABORATÓRIO DO POSTO MÉDICO DE GUARNIÇÃO DE BELO HORIZONTE-MG

Vieira, L.P.S.<sup>1,2</sup>; Costa, M.C.<sup>2</sup>; Resende-Stoianoff, M.A.<sup>2</sup>; Santos, D.A.<sup>2</sup>; Peres, N.T.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posto Médico de Guarnição de Belo Horizonte/Laboratório de Análises Clínicas.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

E-mail: [lpsvieira@yahoo.com.br](mailto:lpsvieira@yahoo.com.br)

---

**Resumo:** As infecções fúngicas causam grande comprometimento à população, com tratamentos insatisfatórios, visto como um problema estético e muitas vezes negligenciado. Há um aumento na prevalência destas infecções, pela incidência de imunodeficiências e idade da população, aliados aos cuidados médicos em geral. Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as metodologias utilizadas no diagnóstico micológico e realizar um estudo epidemiológico das dermatomicoses, em atendimento ambulatorial no Laboratório de Micologia do Posto Médico de Guarnição de Belo Horizonte. Através da anamnese, foi possível traçar o perfil epidemiológico relativo à idade, gênero e patologia de base, bem como a localização da lesão, resultado do exame direto e cultura fúngica. Das amostras suspeitas, no período de setembro de 2019 a agosto de 2020, 33,7% apresentaram cultura negativa. Dentre os isolados fúngicos, foram encontrados 42,6% de casos positivos para dermatofitoses, principalmente tinea unguium dos pododáctilos. Com relação às espécies de dermatófitos encontradas, 24,8% foram causadas por *Trichophyton mentagrophytes*, 15% por *Trichophyton rubrum* e 1% por *Epidermophyton floccosum*. Candidíase em 16,8% dos casos, sendo 12,9% por *Candida albicans*, 1% *Candida tropicalis* e 3% *Candida* spp. Dermatomicose não dermatofítica em 4,9%, sendo 4% por *Scytalidium dimidiatum* e 1% por *Fusarium* spp. Pitiríase versicolor por *Malassezia* em 2% dos casos. O conhecimento dos casos de infecções fúngicas nos pacientes atendidos neste Posto Médico, associando à clínica, hábitos e atividades proporcionou a prospecção dos dados epidemiológicos com impacto para a comunidade acadêmica e divulgação científica de incidência de espécies fúngicas em pacientes a nível ambulatorial.

**Palavras-chave** Diagnóstico micológico; Dermatomicoses; Epidemiologia; Belo Horizonte MG.

## RESUMOS EDUCAÇÃO

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

### **O uso de humor gráfico pelo “Clube da Biologia” como estratégia de ensino e divulgação científica no contexto da virologia**

**Barbosa<sup>1</sup>, C.C.; Silva<sup>2</sup>, R.M. e Di Azevedo<sup>3</sup>, M.I.N.**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento de Ciências Exatas e Biológicas/ Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microorganismos.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina.

<sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Bacteriologia Veterinária.

E-mail: [contatoclubedabiologia@gmail.com](mailto:contatoclubedabiologia@gmail.com)

---

**Resumo:** Vivemos atualmente uma era digital baseada em redes sociais e tecnologia da informação, sem dúvidas caracterizada por intensa interconectividade entre pessoas, serviços e informação. Cabe a nós, como pesquisadores, aproveitar os atuais meios digitais e promover a popularização da ciência, visto que as redes sociais podem constituir importante ferramenta para divulgação de conhecimento científico. Diante disso, no ano de 2015, é fundado o “Clube da Biologia”, com o objetivo de promover a divulgação científica de qualidade e transmitir o conhecimento sobre inúmeros assuntos relacionados à ciência através de uma linguagem acessível e divertida. O objetivo desse trabalho foi identificar o alcance das publicações da página “Clube da Biologia”, com a temática “Vírus” utilizando o humor como estratégia. Foram analisadas quatro publicações e, para a obtenção do cálculo do engajamento, utilizamos o algoritmo da agência de marketing digital Emedia Agência Digital. Todas as publicações tiveram alcance maior que 15.000. Os resultados obtidos demonstram que o humor através de memes usados pelo “Clube da Biologia” é uma ferramenta eficaz para conscientizar e esclarecer o público em geral. O “Clube da Biologia” é um excelente exemplo de como a comunidade científica pode utilizar o humor gráfico como ferramenta de aproximação com a sociedade. Além disso, pode-se afirmar que o canal, por meio das suas publicações humorísticas, contribui significativamente para a popularização da ciência utilizando uma linguagem simples e acessível através de uma rede social.

**Palavras-chave:** popularização da ciência; ensino; mídias sociais; pandemia.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DO INSTAGRAM COMO FERRAMENTA DE DIVULGAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**Martelo<sup>1</sup>, N. C.; Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Rodrigues<sup>1</sup>, M. F. R.; Teixeira<sup>1</sup>, C. W.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.**

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais (Unidade Ibirité), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP)

E-mail: natiellecm@gmail.com

---

**Resumo:** As redes sociais permitem uma grande interatividade entre os usuários, ampliando o acesso às informações. Em momento de combate às "fake news", o papel dos meios digitais é essencial para disponibilizar informações confiáveis e de qualidade. Com o intuito de divulgar trabalhos científicos com linguagem acessível, foi criado pelo grupo um Instagram. Durante a pandemia da Covid-19, cativamos o interesse dos usuários pela ciência, que interagem por meio de direct e compartilhamento de publicações.

**Palavras-chave:** Rede social; Divulgação científica; Microbiologia.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## **ADAPTAÇÃO METODOLÓGICA DAS AULAS PRÁTICAS NA DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA FRENTE À NOVA REALIDADE CAUSADA PELA COVID-19**

**Resende<sup>1</sup>, J. G. O. S.; Resende<sup>2</sup>, J. D. S. A.**

<sup>1</sup> Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves – Curso de Enfermagem

<sup>2</sup> Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves – Curso de Enfermagem

E-mail: [jaine.resende@uniptan.edu.br](mailto:jaine.resende@uniptan.edu.br)

[jaine.resende@uniptan.edu.br](mailto:jaine.resende@uniptan.edu.br)

---

**Resumo:** O atual panorama vivenciado pelo mundo, causado pela COVID-19, e a consequente necessidade do isolamento social fez com que a educação se reinventasse na forma de ensinar. O ensino deixou de ser presencial e passou a ser remoto (síncrono). Isto pode ser observado através da realização de aulas práticas experimentais na disciplina de Microbiologia, realizada com os alunos do 2º período do Curso de Enfermagem do Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves (UNIPTAN). Este estudo teve como objetivo realizar aulas práticas em casa e apresentá-las on-line, utilizando materiais acessíveis e de baixo custo encontrado no ambiente domiciliar e registrar cada etapa da atividade através de fotos e vídeos. Para tanto, dividiu-se os discentes em 07 (sete) equipes com, aproximadamente, 06 alunos cada, os quais confeccionaram em suas residências, meios de cultura caseiros para crescimento bacteriano. Após a coleta das amostras e semeadura, os resultados encontrados foram discutidos e comparados com os outros grupos, uma vez que alguns grupos apresentaram resultados negativos e outros resultados positivos para o crescimento bacteriano, utilizando o mesmo procedimento metodológico. Concluiu-se que houve uma mudança significativa na forma de aprendizagem dos estudantes com a introdução das aulas remotas e que os experimentos apresentaram diferentes resultados em relação ao crescimento bacteriano. Os alunos também observaram que os micro-organismos estão presentes em todo lugar.

**Palavras-chave** Microbiologia; aulas práticas; materiais alternativos, ensino remoto.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido.

## O USO DE UM MODELO 3D DE BACTERIÓFAGO PARA O ENSINO SOBRE VÍRUS

Rodrigues<sup>1,2</sup>, M. F. R.; Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Santos<sup>3</sup>, J. R. E.; Viana<sup>2</sup>, A. V. R.; Amaral<sup>4</sup>, S. S.; Costa<sup>2</sup>, F. J.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibirité, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP).

<sup>2</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibirité, Departamento de Ciências Biológicas, Grupo de Ensino de Biologia e Tecnologias Digitais de Informação e Comunicação Aplicadas à Educação (BIOTEC).

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia (LabMic).

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

E-mail: [matheusfelipe2552@gmail.com](mailto:matheusfelipe2552@gmail.com)

---

**Resumo:** O presente trabalho foi desenvolvido com acadêmicos de licenciatura em Ciências Biológicas de uma Universidade Pública do Estado e objetivou verificar as contribuições da utilização de um modelo em 3D de bacteriófago para o ensino da Virologia. Os dados foram obtidos por meio da observação e sugerem que houve contribuições no processo de ensino-aprendizagem. Isso permite inferir que a utilização de outros modelos em 3D pode favorecer o aprendizado nos demais grupos de microrganismos.

**Palavras-chave:** Microbiologia; Vírus, Modelo em 3D.

## RESUMOS ÁREA AMBIENTAL

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido com autorização para publicação no formato expandido.

### CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DA VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE *PSEUDOGYMNOSCUS* ISOLADOS DA ANTÁRTICA

Gomes<sup>1</sup>, E. C. Q.; da Silva<sup>1</sup>, T. H.; Fernandes<sup>1</sup>, B.; Valério<sup>1</sup>, D. A.; Gonçalves<sup>1</sup>, V. N.; Costa<sup>2</sup>, M.; Santos<sup>2</sup>, D. A.; Johann<sup>1</sup>, S.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – MicroPolar.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

E-mail: eldonqueres@gmail.com

**Resumo:** O gênero *Pseudogymnoscus* é relatado na Antártica, e também é responsável pela redução da população de morcegos em diferentes continentes, através da Síndrome do Nariz Branco. Até o momento, não há informações sobre o potencial de virulência *in vitro* de *Pseudogymnoscus* na Antártica. Onze isolados Antárticos do gênero *Pseudogymnoscus* foram selecionadas para avaliar o potencial patogênico. Todos os isolados foram capazes de crescer em temperaturas de 5 a 28 °C; oito isolados cresceram em pH 4 (vaginal), 7 (sangue humano) e 9 (intestinal); dez isolados apresentaram atividade fosfolipídica, indicando a capacidade de degradar os fosfolipídios da membrana celular; sete isolados apresentaram atividade de esterase, podendo causar lesões na pele; nove isolados apresentaram atividade hemolítica, indicando uma possível capacidade do fungo de romper hemácias e adquirir ferro do hospedeiro; oito isolados demonstraram atividade de urease, influenciando no pH do fungo; seis isolados apresentaram crescimento na condição de hipóxia, podendo levar a morte de indivíduos; dois isolados cresceram na condição de halotolerância, facilitando sua esporulação; o tamanho dos esporos variaram de  $2,16 \pm 0,44 \times 2,57 \pm 0,65 \mu\text{m}$  a  $3,20 \pm 0,79 \times 3,98 \pm 1,33 \mu\text{m}$ , indicando grande potencial de penetração nos alvéolos pulmonares. Quatro isolados foram resistentes ao Fluconazol. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variaram de 0,25 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para o Itraconazol e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para Anfotericina B. Os resultados obtidos indicam que os fatores de virulência presentes no gênero *Pseudogymnoscus* são relevantes, suscitando grande preocupação quanto à sua possível disseminação diante do aquecimento global.

**Palavras-chave** Antártica; *Pseudogymnoscus*; potencial de virulência; fungo patogênico.

#### 1. Introdução

A Antártica possui cerca 14 milhões de  $\text{km}^2$ , o que corresponde a 10% de toda a superfície terrestre (Brasil, 2006). As condições extremas que a Antártica possui, a tornam um ambiente singular onde os micro-organismos, dentre eles os fungos, são de grande relevância.

Encontrado na Antártica, *Pseudogymnoscus destructans* é fungo filamentosos responsável por reduzir a população de morcegos por meio da Síndrome do Nariz-branco, onde (Blehert, 2012). Os morcegos infectados com *P. destructans* podem desenvolver, dentre outras características, o crescimento fúngico visível no focinho e na membrana da cauda, despertar precoce da hibernação (Blehert, 2012) e esgotamento prematuro dos estoques de gordura, causando sua morte entre 70 a 120 dias após a infecção (Hoyt et al, 2015).

Os morcegos infectados por *P. destructans* podem dispersar conídios por meio de sua saída antecipada da hibernação e, desta forma, os esporos podem ficar disponíveis e infectar outros morcegos (Wilson et al, 2017).

Diante da aparente vulnerabilidade da Antártica em relação às mudanças climáticas, referente ao atual e futuros efeitos do aquecimento na região, diferentes espécies de micro-organismos, podem se dispersar para outros continentes.

Estes fenômenos podem contribuir para que propágulos fúngicos de isolados potencialmente patogênicos possam ser dispersados por meio do ar, vetores animais, correntes marítimas e percorrer grandes distâncias até chegar na América do Sul, Oceania ou adiante.

Considerando a patogenicidade de *P. destructans* frente a morcegos, bem como o desconhecimento sobre a patogenicidade dos isolados antárticos, é de grande importância a caracterização *in vitro* da patogenicidade dos isolados antárticos de *Pseudogymnoscus*.

## 2. Metodologias

Para os testes *in vitro* foram selecionados 11 isolados (**Tabela 1**) que se encontram depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG (UFMGCB). Os testes realizados são comumente utilizados para avaliação da patogenicidade de fungos filamentosos.

### 2.1 Determinação da termotolerância

Para a determinação do perfil de termotolerância os isolados foram crescidos em meio de cultura YM a 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30 e 37 °C por 14 dias. Os resultados foram determinados pela ausência ou presença de crescimento.

### 2.2 Crescimento em diferentes faixas de pH

Para este teste foi utilizado o meio YM com o pH ajustado: a 4 (próximo ao pH vaginal), 7 (próximo ao pH do sangue humano) e 9 (próximo ao pH intestinal), sendo incubados por 7 dias a 28 °C. Os resultados foram expressos pela presença ou ausência de crescimento.

### 2.3 Produção de enzimas hidrolíticas

Para a **fosfolipase** foi utilizado o meio base, acrescido de emulsão de ovo a 50% e incubados por 14 dias a 28 °C, já para a **esterase**, os isolados foram submetidos ao meio YM suplementado com peptona e NaCl, sendo incubados a 28 °C por 14 dias. Os isolados foram avaliados e classificados de acordo com Price et al, (1982) e Aoki et al, (1990).

### 2.4 Atividade hemolítica

Os fungos foram inoculados em Ágar Sabouraud (*Himedia*, Índia) suplementado com 7% de sangue de carneiro e cloranfenicol, a fim de verificar a capacidade hemolítica de acordo com Luo et al, (2001). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias e o tipo de hemólise foi classificado a partir da característica do halo ao redor da colônia. Como controle positivo foi utilizado *Candida albicans* (ATCC 10231) e como controle negativo *C. parapsilosis* (ATCC 22019). A atividade foi avaliada pela fórmula de Price et al, (1982).

### 2.5 Atividade de urease

Os isolados foram inoculados a 28 °C por 14 dias em ágar de Christensen. A produção de urease é indicada por uma cor rosa avermelhada, uma reação negativa corresponde a uma ausência de alteração de cor (Christensen, 1946).

### 2.6 Hipóxia

Os isolados foram adicionados ao meio YM e incubados em jarra de microaerofilia por 7 dias a 28 °C, com base no protocolo realizado por Grahl

et al, (2011). Foram considerados positivos os isolados que cresceram nesta condição.

### 2.7 Ensaio de halotolerância

Os isolados foram inoculados em placas contendo YM com 2% de NaCl, sendo incubados a 28 °C por 7 dias. Foram considerados positivos os isolados que cresceram nesta condição.

### 2.8 Tamanho dos esporos

Os isolados foram incubados em meio YM por 14 dias a 7 °C, sendo observados em microscópio óptico (*Leica* DFC425, EUA). Foram medidos 25 esporos e estabelecida a média com desvio padrão.

### 2.9 Suscetibilidade a antifúngicos

A suscetibilidade a antifúngicos foi realizada utilizando: anfotericina B (*Sigma*, EUA), itraconazol (*Sigma*, EUA) e fluconazol (*Sigma*, EUA).

## 3. Resultados e Discussão

Os resultados quantitativos foram compilados e apresentados na **Tabela 1**. Na avaliação de termotolerância, todos os isolados foram capazes de crescer de 5 a 28 °C. Verant et al, (2012) relataram o crescimento de *P. destructans* até 19 °C e Gargas et al, (2009) não obtiveram crescimento a 24 °C. Campbell et al, (2020) descreveram que *P. destructans* foi capaz de crescer a 37 °C.

Oito isolados de *Pseudogymnoascus* sp. foram capazes de crescer nos pH 4, 7 e 9. Esses resultados vão de encontro com os dados obtidos por Chaturvedi et al, (2019), em que *P. destructans* e *P. pannorum*, isolados de morcegos e solo, respectivamente, apresentaram perfil de crescimento nos mesmos pH testados, indicando uma alta plasticidade de crescimento e adaptação.

Dez isolados de *Pseudogymnoascus* apresentaram um perfil forte positivo para fosfolipase de acordo com as classificações apresentadas por Aoki et al, (1990). Esses resultados divergem do que foi encontrado por Chaturvedi et al, (2010), em que isolados de *P. destructans* não mostraram atividade para fosfolipase. No entanto, patógenos fúngicos secretam enzimas hidrolíticas e as fosfolipases hidrolisam uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios, ambos responsáveis pela expressão desses fatores de virulência (Frank et al, 2016).

Sete isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* foram de fraco? a forte positivo para esterase, conforme proposto por Aoki et al, (1990). Raudabaugh e Miller (2013) relataram atividade de esterase de *P. destructans* nos meios ágar



Sabouraud e BDA. Wibbelt (2018) também relatou que *P. destructans* é produtor de esterase *in vitro*, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Nove isolados de *Pseudogymnoascus* sp. apresentaram lise parcial das hemácias, característica conhecida como  $\alpha$ -hemólise. Reynolds e Barton (2014) observaram o perfil de  $\alpha$ -hemólise em isolados de *P. destructans* e sugerem que a atividade hemolítica apresentada por isolados obtidos de morcegos ocorre quando há limitação de nutrientes.

Oito isolados de *Pseudogymnoascus* sp. foram capazes de apresentar atividade de urease, indicando possível patogenicidade *in vitro* dos isolados testados. Esta atividade já foi relatada em *P. pannorum* e *P. destructans* (Reynolds e Barton, 2014). Reynolds e Barton (2014) demonstraram que *P. destructans* produz enzimas como a urease quando infecta morcegos ou naturalmente no ambiente. A urease relatada apresentando uma importante característica de virulência em fungos.

Seis isolados de *Pseudogymnoascus* apresentaram crescimento em condições de hipóxia. Os mecanismos de adaptação às condições de hipóxia nos fungos são variáveis. Os fungos que crescem a esta condição passam por mudanças significativas em seu metabolismo, germinação e crescimento micelial (Grahl et al, 2011). Até o momento, não há relatos de testes com isolados de *Pseudogymnoascus* para verificação da capacidade de resistir a condições de hipóxia.

As condições de halotolerância foram testadas na concentração de 2% e dois isolados de *Pseudogymnoascus* foram capazes de crescer nesta condição. Chaturvedi et al, (2019) testaram diferentes condições de halotolerância em *P. destructans* e *P. pannorum* e observaram que *P. destructans* foi capaz de crescer em 2% de NaCl, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

O tamanho dos esporos dos isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* apresentaram variação de  $2,16 \pm 0,44 \times 2,57 \pm 0,65 \mu\text{m}$  a  $3,20 \pm 0,79 \times 3,98 \pm 1,33 \mu\text{m}$ . Meteyer et al, (2009) relataram que *P. destructans* possui conídios curvos com diâmetro aproximado de  $2,5 \times 7,5 \mu\text{m}$ . De acordo com Latge (2001), os conídios que apresentam de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro podem chegar aos alvéolos pulmonares.

Quatro isolados de *Pseudogymnoascus* antárticos cresceram em todas as concentrações de fluconazol e, portanto, são resistentes, apresentando CIM > 64  $\mu\text{g/mL}$ . O perfil de suscetibilidade ao itraconazol e anfotericina B variaram entre 0,125 a 0,5 e 0,125 a 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. De acordo com Chaturvedi et al, (2011), *P. destructans* é suscetível a vários

antifúngicos, dentre eles a anfotericina B, itraconazol e fluconazol, em concentrações semelhantes, como diferentes fungos patogênicos para humanos.

#### 4. Conclusões

Os isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* estudados *in vitro*, indicam que a Antártica se mostra como um abrigo de fungos com potenciais fatores de virulência. Dessa forma, as preocupações frente às mudanças climáticas referentes ao atual e futuros efeitos do aquecimento na região nos próximos anos são de extrema relevância e justificam trabalhos que visam conhecer melhor o potencial patogênico *in vitro* e *in vivo* das espécies de fungos encontradas na Antártica.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq, Capes, Fapemig, MCTIC e FNDCT.

**Tabela 1** - Caracterização dos fatores de virulência *in vitro* de *Pseudogymnoascus* sp. provenientes de diferentes substratos da Antártica.

UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade hemolítica						CIM <sup>u</sup> a 28 °C por 7 dias (µg/mL)							
	Hi <sup>b</sup>	H <sup>c</sup>	pH 4	pH 7	pH 9	Est <sup>e</sup> (Pz <sup>d</sup> )	Fos <sup>f</sup> (Pz)	Diâmetro dos esporos (µm)	Itra <sup>g</sup>	Fluc <sup>h</sup>	AnfB <sup>i</sup>	Ure <sup>j</sup>	Hip <sup>k</sup>	Hal <sup>l</sup>
8532	0,99	γ <sup>m</sup>	+	+	+	0,72	0,60	2,68 ± 0,48 x 3,50 ± 0,61	0,25	>64	0,5	++ <sup>s</sup>	-	-
8562	0,99	γ	+ <sup>o</sup>	+	+	0,75	0,23	2,55 ± 0,80 x 2,95 ± 0,80	0,5	>64	0,125	++	+	+
10326	0,50	α <sup>n</sup>	- <sup>p</sup>	-	-	0,67	0,99	2,39 ± 0,44 x 3,08 ± 0,55	0,25	Np	Np	-	-	-
10378	0,52	α	+	+	+	0,71	0,20	2,61 ± 0,38 x 3,86 ± 0,43	0,25	16	1	++	+	-
10381	0,70	α	+	+	+	0,70	0,35	2,38 ± 0,31 x 3,38 ± 0,62	0,125	8	0,25	++	+	-
10386	0,68	α	+	+	+	0,73	0,51	2,13 ± 0,51 x 3,28 ± 0,74	0,5	0,5	0,5	+	+	-
10392	0,74	α	+	+	+	0,72	0,30	2,36 ± 0,43 x 3,42 ± 0,60	0,125	4	0,5	+ <sup>t</sup>	+	-
10394	0,57	α	+	+	+	0,90	0,54	3,20 ± 0,79 x 3,98 ± 1,33	0,5	>64	0,5	+ <sup>r</sup>	-	+
10472	0,37	α	-	-	-	CT <sup>q</sup>	0,55	2,16 ± 0,44 x 2,57 ± 0,65	Np <sup>r</sup>	Np	Np	-	-	-
10479	0,71	α	+	+	+	CT	0,16	2,59 ± 0,41 x 3,30 ± 0,42	0,25	>64	0,5	-	+ <sup>r</sup>	-
10504	0,48	α	-	-	-	0,99	0,32	2,22 ± 0,44 x 2,93 ± 0,56	0,25	16	0,5	+	-	-

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG. <sup>b</sup>Hi = Índice Hemolítico. <sup>c</sup>H = Tipo de hemólise. <sup>d</sup>Pz = Forte positivo (Pz ≤ 0,69), forte (Pz entre 0,70-0,79 mm), média (Pz entre 0,80-0,89 mm) ou fraca (Pz entre 0,90-0,99 mm). <sup>e</sup>Est = Atividade de esterase. <sup>f</sup>Fos = Atividade de fosfolipase. <sup>g</sup>Itra = Itraconazol. <sup>h</sup>Fluc = Fluconazol. <sup>i</sup>AnfB = Anfotericina B. <sup>j</sup>Ure = Atividade de urease. <sup>k</sup>Hip = Hipóxia. <sup>l</sup>Hal = Halotolerância. <sup>m</sup>γ = Gama. <sup>n</sup>α = Alfa. <sup>o</sup>(+) = crescimento. <sup>p</sup>(-) = ausência de crescimento. <sup>q</sup>CT = Crescimento total na placa. <sup>r</sup>Np = Não foi possível determinar o resultado. <sup>s</sup>(++) = Forte positivo. <sup>t</sup>(+-) = Fraco positivo. <sup>u</sup>(CIM) = Concentração inibitória mínima.

## 6. Referências

- AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 273, n. 3, p. 332-343, 1990.
- BLEHERT, D.S. Fungal Disease and the Developing Story of Bat White-nose Syndrome. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002779, 2012
- BRASIL, M.D.E. Coleção explorando - Antártica. MEC. Disponível em: <http://abre.ai/brasil2006>. Acesso em: 26 mar. 20, 2006.
- CAMPBELL, L.J.; WALSH, D.P.; BLEHERT, D.S.; LORCH, J. Long-term survival of *Pseudogymnoascus destructans* elevated temperatures. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, n. 2, p. 278-287, 2020.
- CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: A resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011.
- CHATURVEDI, V.; DEFIGLIO, H.; CHATURVEDI, S. Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. **F1000Research**, v. 7665, 2019.
- CHATURVEDI, V.; SPRINGER, D.J.; BEHR, M. Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with White Nose Syndrome (WNS). **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10783, 2010.
- CHRISTENSEN, W.B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from Salmonella and Shigella Types. **Journal of Bacteriological Bacteriology**, p. 52, n. 4, p. 461-466, 1946.
- FRANK, C.L.; INGALA, M.R.; RAVENELLE, R.E.; DOUGHERTY-HOWARD, K.; WICKS, S.O.; HERZOG, C.; RUDD, R.J. The Effects of Cutaneous Fatty Acids on the Growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the Etiological Agent of White-Nose Syndrome (WNS). **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153535, 2016.
- GARGAS, A.; TREST, M.T.; CHRISTENSEN, M.; VOLK, T J.; BLEHERT, D.S. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. **Mycotaxon**, v. 108, p. 147-154, 2009.
- GRAHL, N.; PUTTIKAMONKUL, S.; MACDONALD, J.M.; GAMCSIK, M.P.; NGO, LY.; HOHL, T. M.; CRAMER, R.A. *In vivo* hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. e1002145, 2011.
- HOYT, J.R.; CHENG, T.L.; LANGWIG, K.E.; HEE, M.M.; FRICK, W.F.; KILPATRICK, A.M. Bacteria Isolated from Bats Inhibit the Growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the Causative Agent of White-Nose Syndrome. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0121329, 2015.
- LATGE, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends Microbiol**, v. 9, p. 382-389.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.
- METEYER, C. U.; BUCKLES, E.L.; BLEHERT, D.S.; HICKS, A.C.; GREEN, D.E.; SHEARN-BOCHSLER, V.E.; THOMAS, N.J.; GARGAS, A.; BEHR, M.J. Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 411-414, 2009.
- PRICE, M.F.; WILKINSON, L.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 7-14, 1982.
- RAUDABAUGH, D.B.; MILLER, A.N. Nutritional capability of and substrate suitability for *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. **PLoS One**, v. 10, p. e78300, 2013.
- REYNOLDS, H.T.; BARTON, H.A. Comparison of the White-Nose Syndrome Agent *Pseudogymnoascus destructans* to Cave-Dwelling Relatives Suggests Reduced Saprotrophic Enzyme Activity. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86437, 2014.
- VERANT, M.L.; BOYLES, J.G.; WALDREP, W.J. Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46280, 2012.
- WIBBELT, G. White-Nose Syndrome in Hibernating Bats. In: SEYEDMOUSAVI, S.; de HOOG G.; GUILLOT, J.; VERWEIJ, P. (eds) *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Springer, Cham, 2018.
- WILSON, M.B.; HELD, B.W.; FREIBORG, A.H.; BLANCHETTE, R.A.; SALOMON, C.E. Resource capture and competitive ability of non-pathogenic *Pseudogymnoascus* spp. and *P. destructans*, the cause of white-nose syndrome in bats. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0178968, 2017.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido com autorização para publicação no formato expandido.

## MICROPLÁSTICOS: UMA INVESTIGAÇÃO SOBRE OS IMPACTOS CAUSADOS NA CADEIA TRÓFICA

Paula<sup>1</sup>, K. G.; Araújo<sup>1</sup>, M. R.; Alves<sup>2</sup>, L. F. e Negreiros<sup>2</sup>, D.

<sup>1</sup> Cidade Universitária UNA.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais.

E-mail: keilagoncalvesdepaula@gmail

**Resumo:** O plástico é amplamente utilizado em nossa sociedade, porém seu uso excessivo tem resultado diversas consequências para o meio ambiente. Os plásticos não são biodegradáveis, assim, após sua fragmentação em partículas entre 5mm e 333µm, eles passam a ser denominados microplásticos. Em decorrência do seu tamanho reduzido, eles podem ser ingeridos por diversos organismos aquáticos e serem transferidos de um nível trófico inferior para o nível trófico seguinte. Porém, os materiais poliméricos que compõem os plásticos possuem também substâncias com efeitos toxicológicos nocivos aos seres vivos, mostrando-se bioacumulados e levando à suspeita de desencadear ou causar doenças. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água e inferir a presença de microplásticos nesta, e seus possíveis impactos gerados na cadeia trófica. Foram realizadas análises microbiológicas e qualitativas de microplásticos. As análises de coliformes totais e termotolerantes, no ponto controle, mostraram-se ausentes. Já nas demais regionais foi encontrada a presença dos dois grupos de bactérias. As análises de bactérias heterotróficas estão dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Saúde. Quanto às análises de microplásticos, foram encontradas partículas em todas as amostras de água. A partir dos resultados, observamos que pode estar havendo uma recontaminação da água após o seu processamento, ou ainda a existência de nutrientes que podem ter elevado o crescimento microbiano nas redes de distribuição. Os microplásticos e os efeitos que suas substâncias podem causar nos seres vivos são ainda assuntos atuais e que precisam de maior atenção da comunidade científica.

**Palavras-chave:** água; microplásticos; microrganismos; bioacumulação; cadeia trófica.

### 1. Introdução

Anualmente o mundo gera cerca de 300 milhões de toneladas de lixo plástico. Sabe-se que apenas 9% de todo plástico fabricado foi reciclado e que 14% são coletados para a reciclagem (ONU, 2019). Devido à sua alta durabilidade, o plástico demora séculos para ser degradado, acumulando-se no meio ambiente. Somado este fator a má gestão de resíduos e o despejo ilegal nos cursos hídricos, o plástico vem ocasionando sérios impactos ambientais, sendo considerado uma preocupação comum da humanidade (UNEP, 2016).

Procurando minimizar esse problema, foram criadas sacolas oxidegradáveis, que com a inclusão de um aditivo pró-oxidante, acelera a oxidação e a fragmentação do polímero em moléculas menores (KHABBAZ e ALBERTSSON, 2001). Entretanto, os plásticos não somem da natureza, pois eles não são biodegradáveis. O que ocorre é a fragmentação dos polímeros que se dispersam no ambiente gerando uma “poluição invisível” (PLASTIVIDA, 2008). Essa fragmentação de polímeros em partículas entre 5mm e 333µm são denominados microplásticos (ARTHUR, BAKER e BAMFORD, 2009).

Em decorrência do seu tamanho reduzido, os microplásticos podem ser ingeridos por diversos organismos aquáticos (THOMPSON *et al.*, 2004), podendo ficar presos no trato gastrointestinal, serem absorvidos no revestimento epitelial do intestino por fagocitose ou expelidos através das fezes, além de poderem ser transferidos de um nível trófico anterior para o nível trófico seguinte (BROWNE, GALLOWAY e THOMPSON, 2007).

Porém, os impactos ambientais não se originam apenas dos materiais poliméricos que compõem os plásticos em si. A maioria dos produtos sintéticos possuem substâncias com efeitos toxicológicos nocivos para os seres vivos, que podem se dar através da ingestão, inalação ou

contato dérmico (UNEP, 2016). Além destes fatores, os microplásticos podem ligar-se a outros agentes poluentes do ambiente, pois possuem uma alta capacidade de adsorção (WANG *et al.*, 2016).

Segundo o estudo publicado por Bila e Dezotti (2007), fármacos, desreguladores endócrinos e

Dentre estas, há um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que podem acometer o sistema endócrino de seres vivos, afetando sua saúde, seu crescimento e sua reprodução. São subdivididas em: substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas, bisfenol A e substâncias farmacêuticas) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios).

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água e inferir a presença de microplásticos nesta, e seus possíveis impactos gerados na cadeia trófica.

## 2. Metodologias

### 2.1 Análise de Água

Foi realizada uma coleta de água na Estação de Tratamento de Água (ETA) do Morro Redondo na COPASA, ponto considerado como Controle, e coletas em casas de moradores de quatro regionais da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais: Centro-Sul, Pampulha, Venda Nova e Barreiro, para a realização das análises microbiológicas e qualitativas de microplásticos.

As análises microbiológicas da água foram realizadas conforme as orientações do “Manual Prático de Análise de Água” (BRASIL, 2013). Foi adotada a metodologia de tubos múltiplos, que verificam a presença de coliformes totais e termotolerantes, e contagem de bactérias heterotróficas. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia II da Cidade Universitária Una, campus Guajajaras, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 2.2 Análise de Microplásticos

Para verificar a presença de microplásticos, as amostras de água foram coradas com Azul de Metileno, corante que possui afinidade através de adsorção com o plástico entre outros materiais que são corados na indústria têxtil (JORGE, TAVARES e SANTOS, 2015). Em cada regional, foram colocados 5 mL do corante por litro, em seguida, a água foi filtrada em filtro de papel com porosidade de 2,0 µm com velocidade de filtração lenta para precipitados finíssimos. Após a secagem, o resultado foi visualizado em microscópio, aumento 10x.

poluentes orgânicos persistentes (POP) são categorias de substâncias muito estudadas em razão dos impactos que causam no meio ambiente.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Análises Microbiológicas

Na análise que se verificou a presença de coliforme totais, foi observado no ponto Controle um valor <2 NMP/100 mL e nas regionais Centro-Sul, Venda Nova e Barreiro, apresentaram >1600 NMP/100 mL, na regional Pampulha encontrou-se 500 NMP/100 mL.

Na análise onde verificou-se a presença de coliformes termotolerantes, no ponto Controle encontrou-se <2 NMP/100 mL e na regional Barreiro encontrou-se 4 NMP/100 mL. Já as regionais Centro-Sul, Pampulha e Venda Nova, apresentaram >1600 NMP/100 mL.

Para determinar o padrão microbiológico de potabilidade, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde exige ausência de coliformes totais e termotolerantes (*Escherichia coli*) em 100 mL de amostra de água (BRASIL, 2011).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que nas amostras das regionais Centro-Sul, Pampulha, Venda Nova e Barreiro houve presença de coliformes totais, o que corrobora com resultados encontrados por Freitas, Brilhante e Almeida (2001). Estes autores relataram que das 131 amostras de água analisadas no Parque Fluminense pelo método de filtração por membrana, 55,5% apresentaram presença de coliformes totais, indicando impropriedade dessas águas para o consumo humano.

De acordo com Bastos *et al.* (2000), na análise da qualidade de águas naturais, os coliformes totais possuem valor sanitário restrito. Sua aplicação delimita praticamente a avaliação da qualidade da água tratada, onde sua presença pode apontar falha no tratamento, provável contaminação pós tratamento ou, ainda, a existência de nutrientes em excesso, por exemplo, nos reservatórios ou nas redes de distribuição.

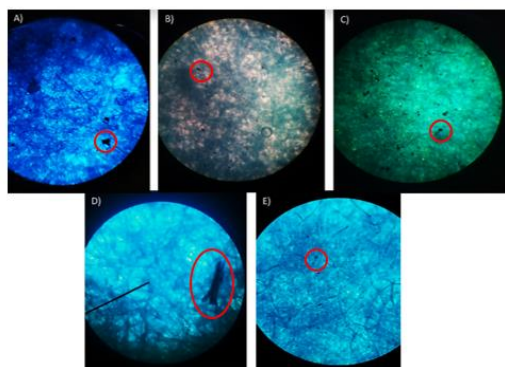
No trabalho realizado por Okura e Siqueira (2005), em residências e amostras de águas não tratadas da cidade de Uberaba, Minas Gerais, 20% das amostras coletadas manifestaram a presença de coliformes termotolerantes, atestando serem impróprias para o consumo humano, corroborando assim com o nosso trabalho.

Na análise onde verificou-se a presença de bactérias heterotróficas, o ponto Controle revelou um total de 2 UFC/mL e a regional Centro-Sul apresentou um total de 14 UFC/mL. Na regional Pampulha exibiu-se um total de 6 UFC/mL, na regional Venda Nova encontrou-se um total de 3 UFC/mL, e na regional Barreiro não expressou nenhuma formação de colônias, tendo resultado de 0 UFC/mL.

Assim todas as amostras apresentaram-se dentro do padrão admissível de acordo com a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, onde a contagem de bactérias heterotróficas não deve ultrapassar 500 UFC/mL (BRASIL, 2011).

### 3.2 Análises de Microplásticos

Após a filtragem da água, observou-se a presença de microplásticos no ponto Controle e em todas as regionais selecionadas para análise (Figura 1).



**Figura 1:** Círculos em vermelho evidenciando alguns dos microplásticos encontrados nas membranas após filtragem da água coletada. Onde A) Ponto Controle - COPASA; B) Regional Centro-Sul; C) Regional Pampulha; D) Regional Venda Nova; E) Regional Barreiro; Vista ao microscópio com objetiva no aumento de 10x.

A partir dos resultados encontrados nas análises de microplásticos, a preocupação da presença destes fragmentos na água deve-se ao fato de que os microplásticos possuem uma alta capacidade de adsorção (WANG *et al.*, 2016). Devido a essa capacidade, eles podem ser incorporados a uma variedade de organismos e podendo ser transferidos através da cadeia trófica, levando a ocorrência de bioacumulação de microplásticos e de outros agentes que sejam ecotoxicológicos. Quando foram consumidos ou agregados de outras formas, os microplásticos podem ser transferidos para o interior das células, elevando o grau de exposição aos contaminantes (WANG *et al.*, 2016).

Os microplásticos são classificados através dos seus tipos, (OLIVATTO, 2017), sendo assim

possível levantar a hipótese de que os microplásticos encontrados em nossas amostras, podem ser de filamentos liberados pela tubulação que transporta a água até as residências, através do atrito que a água causa nas paredes dessa tubulação, ao passar por elas e também de outros materiais plásticos lançados no ambiente, podendo atingir os corpos de água.

Devido ao fato de os plásticos não serem biodegradáveis (PLASTIVIDA, 2008), essas partículas possuem um ciclo infinito no meio ambiente, não sendo advindo apenas das tubulações, mas também de outros materiais lançados no ambiente, podendo atingir os corpos de água. De acordo com Carrington (2017), os sistemas existentes de tratamento de água padrão não conseguem filtrar todos os microplásticos, principalmente as fibras, que tem diâmetro de até 10  $\mu\text{m}$ .

De acordo com Harvey e Watts (2018), a Agência do Meio Ambiente da Áustria conduziu as análises de fezes de oito pessoas da Europa, Japão e Rússia. Todas as amostras continham microplásticos, onde foram identificados até nove tipos diferentes, que variaram entre 50 a 500  $\mu\text{m}$ , sendo polipropileno e polietileno tereftalato os mais encontrados. Em média, 20 partículas de microplásticos foram encontradas a cada 10g de fezes, comprovando a suspeita de que os microplásticos atingem o intestino humano. Embasado nesse estudo, foi estimado que mais de 50% da população podem ter microplásticos em seus excrementos, salientando a necessidade de se estudar o assunto em larga escala, para que se possa confirmar essa hipótese.

### 4. Conclusões

No presente estudo os resultados das análises de coliformes totais e termotolerantes sugerem que tenha ocorrido uma recontaminação da água após o seu processamento, ou ainda a existência de nutrientes que podem ter elevado o crescimento microbiano nas redes de distribuição. As análises de bactérias heterotróficas estão dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Saúde.

Em relação às análises de microplásticos, podemos perceber a importância de reduzir a produção e consumo de plásticos de uso único, e realizar o destino correto destes materiais, diminuindo a possibilidade de contaminação dos solos, recursos hídricos e dos seres vivos. Essas partículas, quando ingeridas, podem ser absorvidas pelo organismo, podem ser transferidas de um nível trófico anterior para o nível trófico seguinte e liberar toxinas, que podem ocasionar ou desencadear diversas doenças.

### 5. Apoio Financeiro

A Cidade Universitária UNA cedeu o espaço e equipamentos para a realização das análises laboratoriais.

### 6. Agradecimentos

Agradecemos a Cidade Universitária UNA e a COPASA pelo apoio técnico e logístico.

### 7. Referências

ARTHUR, Courtney; BAKER, Joel; BAMFORD, Holly. International research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris. In: Conference Proceedings. Sept. 2008. p. 9-11.

BASTOS, Rafael K.X.; BEVILACQUA, Paula Dias; NASCIMENTO, Luis Eduardo do; CARVALHO, Geisla R.M.; SILVA, Carolina Ventura Da. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 27, p. 2000, 2000.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] União. n. 239, 2011.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual Prático de Análise de Água. Vigilância Ambiental em Saúde. Brasília, 2013.

BROWNE, Mark A.; GALLOWAY, Tamara; THOMPSON, Richard. Microplastic—an emerging contaminant of potential concern? Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal, v. 3, n. 4, p. 559-561, 2007.

CARRINGTON, Damian - Plastic fibres found in tap water around the world, study reveals. The Guardian, v. 6, 2017.

FREITAS, Marcelo Bessa de; BRILHANTE, Ogenis Magno; ALMEIDA, Liz Maria de. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. Cadernos de Saúde Pública, v. 17, p. 651-660, 2001.

HARVEY, Fiona; WATTS, Jonathan. Microplastics found in human stools for the first time. The Guardian, v. 22, 2018.

JORGE, Isabella Ribeiro; TAVARES, Fernanda Peres; SANTOS, Kássia G. dos. Remoção do corante azul de metileno no tratamento de

efluentes por adsorção em bagaço de cana de açúcar. In: Anais do XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados-ENEMP, São Paulo: Blucher. p. 491-500, 2015.

KHABBAZ, F.; ALBERTSSON, Ann-Christine. Rapid test methods for analyzing degradable polyolefins with a pro-oxidant system. Journal of Applied Polymer Science, v. 79, n. 12, p. 2309–2316, 2001.

OLIVATTO, Glaucia Peregrina. Estudo sobre Microplásticos em águas superficiais na porção oeste a Baía de Guanabara. Dissertação de mestrado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, p.155, 2017.

OKURA, Mônica Hitomi; SIQUEIRA, Kassiana Barbosa. Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água de abastecimento e de minas. Higiene Alimentar, p. 86-91, 2005.

PLASTIVIDA - Mitos e fatos sobre os plásticos oxo-degradáveis. 2008. Disponível em: <http://www.plastivida.org.br/images/temas/mitos-e-fatos-%20sobre-os-plasticos-oxi-degrada-veis.pdf>. Acesso em: 15/07/2019.

THOMPSON, Richard C. OLSEN, Ylva; MITCHELL, Richard P.; DAVIS, Anthony; ROWLAND, Steven J.; JOHN, Anthony W.G.; MCGONIGLE, Daniel; RUSSELL, Andrea E. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? Science (Washington). v. 304, n. 5672, pág. 838, 2004.

UNEP. Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme, Nairobi, p. 274, 2016.

ONU. ONU Meio Ambiente aponta lacunas na reciclagem global de plástico. 2019. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/onu-meio-ambiente-aponta-lacunas-na-reciclagem-global-de-plastico/>. Acesso em: 08/07/2019.

WANG, Jundong; TAN, Zhi; PENG, Jinping; QIU, Qiongquan; LI, Meimin. The behaviors of microplastics in the marine environment. Marine Environmental Research, v. 113, p. 7-17, 2016.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido com autorização para publicação no formato expandido.

## RESULTADOS PRELIMINARES DA OCORRÊNCIA DE COLIFORMES EM RIOS E POÇOS DA CIDADE DE CURITIBANOS, SC.

Proença<sup>1</sup>, J. E.; Ribeiro<sup>1</sup>, G. F.; Kemer<sup>1</sup>, H. A.; Angelo<sup>1</sup>, N. M. M.; Cruz<sup>1</sup>, S. P.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitiba, Departamento de Ciências Naturais e Sociais/Laboratório de Microbiologia.

E-mail: julia.elizabeth@grad.ufsc.br

**Resumo:** A água é o meio pelo qual diversas doenças de origem microbiana podem se alastrar, gerando problemas de saúde pública. Esse aspecto é particularmente importante em regiões do interior que não recebem água tratada por companhias de abastecimento. Além disso, o uso de águas de rios com altos níveis de contaminação pode gerar problemas ambientais e de saúde animal, caso o uso não esteja em conformidade com níveis de poluentes estabelecidos pela legislação brasileira. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água de rios e poços através da quantificação de coliformes totais e fecais. A coleta foi realizada em Curitiba, na sub-bacia do Rio Marombas, nos Rios Pessegueirinho e Marombas, em outubro de 2020. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao Teste de Scott-Knott a um nível de probabilidade de 5%. Observou-se que, dentre os poços estudados, o maior nível de coliformes ocorreu em um poço próximo ao Centro do Rio Pessegueirinho. Em relação a água coletada diretamente dos rios, o maior nível de poluição microbiana também ocorreu no Centro do Rio Pessegueirinho. Esse local foi o único com água classificada como “Classe 2”, enquanto todos os demais enquadraram-se como Classe 1. Os dados revelam o potencial poluidor dos efluentes urbanos da cidade e seu impacto negativo na qualidade do recurso hídrico usado pela população. Políticas de tratamento de resíduos urbanos e esgotos, bem como preservação ambiental, devem ser adotadas para que ocorram melhorias na qualidade da água da cidade de Curitiba.

**Palavras-chave** recursos hídricos; saúde pública; doenças bacterianas.

### 1. Introdução

As bactérias são causadoras de algumas das doenças responsáveis pelo grande número de mortes no mundo, além de comprometer a qualidade de vida de milhões de indivíduos.

Sobretudo, a água é o meio pelo qual doenças podem se alastrar com grande velocidade e frequência, fazendo-se necessário controlar ou atenuar a poluição aquática e suas implicações biológicas, que representam séria ameaça à saúde pública (Ferreira, 2003). Segundo o relatório da ONU, mais pessoas morrem pelo consumo de água contaminada do que por violência.

As doenças relacionadas com a água possuem sua transmissão diretamente relacionada com essa substância, seja pelo consumo de água contaminada ou pela falta de higiene desencadeada pela mesma. Leptospirose, giardíase, cólera e febre tifoide, são algumas das doenças causadas por bactérias que surgem quando a água não passa por tratamentos adequados de limpeza e purificação que eliminem os organismos contaminantes deste meio. Melhorias na qualidade da água, no saneamento básico e nas condições de higiene da população poderiam reduzir os casos de doenças, sobretudo em grupos etários mais vulneráveis, como crianças e idosos (Paiva; Paz, 2018).

Bactérias do grupo dos coliformes, em particular, são importantes indicadores de poluição ambiental, inclusive de origem fecal. Os coliformes dividem-se em totais e fecais, e são usados rotineiramente em estudos de monitoramento de potabilidade e qualidade de água, inclusive como parâmetros do governo federal (BRASIL, 2006; CONAMA, 2005). Os coliformes totais e fecais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a uma temperatura de 35 a 37 e 44 a 45,5 graus Celsius, respectivamente. Neste grupo de indicadores, incluem-se exclusivamente as bactérias do gênero *Escherichia*, sendo a principal espécie neste grupo a bactéria *Escherichia coli*. Essa avaliação microbiológica da água tem um papel destacado, em vista da grande variedade de microrganismos patogênicos, em sua maioria de origem fecal, que pode estar presente na água (Bettega et al, 2006). Além disso, *E. coli* é um dos principais patógenos de origem alimentar frequentemente isolado em



superfícies variadas, como aquelas de difícil acesso que não são limpas regularmente, como por exemplo as tubulações (Milho et al, 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica da água através da quantificação de coliformes totais e fecais de água de rios e poços na região de Curitiba – SC.

## 2. Metodologias

### 2.1 Locais de coleta

As amostras de água foram coletadas na bacia hidrográfica do Rio Canoas, onde estão inseridos os rios Marombas e Pessegueirinho, respectivamente, com a avaliação de 5 pontos ao longo dos rios (3 pontos ao longo do Rio Pessegueirinho e 2 pontos ao longo do Rio Marombas). Foram também selecionados 5 pontos em propriedades próximas aos recursos hídricos que utilizavam água de poços para consumo humano. As coletas foram realizadas no município de Curitiba – SC, em outubro de 2020.

A escolha destes pontos de coleta foi definida para se observar padrões ao longo do curso do rio e para monitoramento da água dos seus respectivos poços. Sabe-se que com o deslocamento das águas em direção à sua foz, a qualidade microbiológica da água tende a melhorar pela autodepuração do próprio rio, podendo isso interferir também na qualidade da água utilizada para o consumo.

### 2.2 Quantificação de coliformes

O método utilizado para avaliação de coliformes totais e coliformes fecais foi o de tubos múltiplos (FUNASA, 2006). Para o teste presuntivo, foram utilizados 9 tubos com 10 mL de meio de cultura com um tubo de Durham invertido. O material foi incubado a 35°C por 48 horas para então realizar-se a análise do número de tubos onde o resultado foi positivo.

No teste confirmativo, utilizado para análise da água de poços, cada tubo positivo do teste presuntivo foi usado como fonte de inóculo para inoculação de tubos contendo meio de cultura Caldo Bile Verde Brilhante a 2%. Com uma alça de platina previamente flambada e fria, retirou-se de cada tubo com o resultado positivo uma porção em suspensão. Realizou-se a incubação do material durante 48 horas a 35°C para então, calcular o NMP (número mais provável) de coliformes totais com base no número de tubos positivos.

Para a realização do teste de coliformes fecais, os tubos positivos do teste presuntivo

foram utilizados como fonte de inóculo para inoculação contendo caldo E.C. Novamente, retirou-se uma porção suspensa de cada tubo com uma alça de platina previamente flambada e fria. Após esse procedimento, foi realizada a incubação do material a 44,5°C durante 24 horas, para ser então realizado o cálculo de NMP de coliformes fecais com base no número de tubos positivos.

### 2.3 Análise estatística

Em cada ponto de coleta, foram obtidas três subamostras, que consistiram em três repetições para fim de análise estatística. Os locais de coleta foram considerados como fonte de variação.

Os dados foram submetidos a Análise de Variância ( $p < 0,05$ ) e as médias foram submetidas ao Teste de Scott-Knott, com auxílio do Software Sisvar.

## 3. Resultados e Discussão

Em relação a água de poços localizados ao longo dos dois rios, observou-se diferença estatística dentro do curso do Rio Pessegueirinho. Poços localizados próximo a nascente ou a foz do rio não apresentaram contaminação por coliformes. Por outro lado, o poço próximo ao centro do curso do rio teve as maiores médias, tanto de coliformes totais como fecais (Tabela 1). O valor médio de coliformes totais foi de 16, enquanto o de coliformes fecais foi de 13,7 para cada 100mL de água.

Já a contaminação por coliformes ocorreu em ambos poços ao longo do Rio Marombas. Porém, não observou-se diferença estatística entre os dois pontos amostrais. Os valores de coliformes totais variaram entre 5,83 e 6,13.

Já o número observado de coliformes fecais foi de 1,47 em local próximo ao Centro de Captação do Rio Marombas. Após recebimento de águas do Rio Pessegueirinho, ou seja, no ponto 5, esse valor médio passa a ser de 0,73 UFC a cada 100mL de água (Tabela 1).

Tabela 1- Quantidade de coliformes totais e fecais em águas de poços adjacentes aos Rios Marombas e Pessegueirinho.

	Coliformes totais (NMP/100mL)	Coliformes fecais (NMP/100mL)
Curso do Rio Pessegueirinho		
Poço 1 – Nascente	0 b*	0 b
Poço 2 – Centro	16 a	13,7 a
Poço 3 – Foz	0 b	0 b
Curso do Rio Marombas		
Poço 4 – Centro de Captação	5,83ns	1,47ns
Poço 5 – Após encontro com Rio Pessegueirinho	6,13	0,73

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). ns = Diferença não significativa entre médias.

A ocorrência de coliformes fecais foi registrada em todos os locais de rios onde as amostras foram coletadas (Tabela 2). Porém, não houve diferença estatística entre diferentes locais de coleta ao longo do curso de um mesmo rio. O número de coliformes fecais ao longo do Pessegueirinho variou de 10,87 a 441,67 UFC/100mL. Já no Rio Marombas, os valores médios de coliformes fecais foram de 14,47 e 45,33 UFC/100mL.

Tabela 2- Quantidade de coliformes fecais em águas dos Rios Marombas e Pessegueirinho, em diferentes pontos de percurso, e respectiva classe de uso recomendado, com base no número de coliformes fecais.

	Coliformes fecais (NMP/100mL)	Classe de uso recomendado da água
Rio Pessegueirinho		
Ponto 1 – Nascente	10,87ns*	1
Ponto 2 – Centro	441,67	2
Ponto 3 – Foz	39,00	1
Rio Marombas		
Ponto 4 – Centro de Captação	15,47ns	1
Ponto 5 – Após encontro com Rio Pessegueirinho	45,33	1

\* ns = Diferença não significativa entre médias.

A quantidade de coliformes fecais da maioria dos pontos de coleta resultou em uma classificação de uso como “1”, de acordo com a Resolução 357 do CONAMA (2005). A legislação prevê que águas pertencentes a Classe 1 pode ser usada para abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário e à irrigação de hortaliças.

O único ponto de coleta que foi classificado como “Classe 2” foi o Centro do Rio Pessegueirinho. Esse ponto amostral localiza-se após recebimento de efluentes urbanos da cidade e, portanto, corresponde ao maior aporte de poluentes. Águas de Classe 2 possuem uso semelhante a Classe 1, porém podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano apenas após tratamento convencional.

A ocorrência de coliformes em águas de poços usados para abastecimento de residências e fazendas é objeto frequente de estudos em outros estados do Brasil.

FERREIRA, C.M. A importância da água e sua utilização em ranários comerciais. **Panorama da**

Ferreira e Fortuna (2014), por exemplo, avaliaram a ocorrência de coliformes totais e fecais em poços rasos na Bahia e verificaram que 27% das amostras não atendiam os padrões de potabilidade. Já na microrregião de Curitibanos (SC), Leite et al. (2018) pesquisaram a frequência de coliformes totais e fecais em 12 poços escavados. Surpreendentemente, a presença de coliformes foi verificada em todos os locais amostrados. A frequência de ocorrência de coliformes ao longo de 12 meses de coleta também foi elevada, pois variou entre 42 e 100%.

Esses dados revelam que a incidência de bactérias é frequente, o que significa que na maior parte dos casos a população usa água de má qualidade. O mesmo repete-se na cidade de Curitibanos, enfatizando a necessidade de tratamento adequado dos recursos hídricos, bem como sua preservação.

O presente trabalho compreende resultados preliminares de uma coleta realizada na estação da primavera. Coletas adicionais em outras três estações serão realizadas ao longo do período de 1 ano. Dessa maneira, pretende-se ainda obter um panorama mais amplo da ocorrência temporal de coliformes em todas as fontes de água.

#### 4. Conclusões

A contaminação microbiológica de águas, tanto de rios como poços, foi aumentada pela deposição de efluentes urbanos no Rio Pessegueirinho. Medidas públicas preventivas são necessárias para que menor poluição e melhor uso dos recursos hídricos sejam possíveis, contribuindo assim para a qualidade de vida da população de regiões do interior.

#### 5. Apoio Financeiro

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIICT (PIBIC/CNPq) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 6. Agradecimentos

Aos proprietários dos locais que dão acesso aos rios e poços: Sr. Luciano Senem, Srta. Elaine Sartor, Sr. Nivaldo França, a U.H.E Marombas Bossardi e a empresa Santa Luzia.

#### 7. Referências

- BETTEGA, J. M. P. R.; BANISKI, G.; BARBOSA, C. A.; MACHADO, M. R.; PRESIBELLA, M. Métodos analíticos no controle microbiológico de água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**. Minas Gerais, v. 30, n. 5, p. 950-954, 2006.
- Aquicultura**, São Paulo, v.13, n. 74, p. 15-17, 2003.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 2 ed. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 2006.

BRASIL. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. **Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade de água para o consumo humano**. Brasília. 212p., 2006.

LEITE, N.K.; STOLBERG, J.; CRUZ, S.P.; *et al.* Hydrochemistry of shallow groundwater and springs used for potable supply in southern Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, p. 77-90, 2018.

MILHO, C.; SILVA, M. D.; ALVES, D. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* dual-species biofilms: interspecies interactions and antibiofilm efficacy of phages. **Scientific Reports**. v. 9, n.1, p. 1-15, 2019.

PAIVA, R. F. P.; PAZ, M. F. Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.34, n.1, p. 1-11, 2018.

REIS, S. F.; FORTUNA, J. L. Pesquisa de coliformes em água de poços rasos residenciais no município de Teixeira de Freitas – BA. **Revista Ciências do Ambiente**. São Paulo, v. 10, n.2, p. 43-47, 2014.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido com autorização para publicação no formato expandido.

## QUALIDADE DA ÁGUA E OCORRÊNCIA DE COLIFORMES FECAIS EM RECURSOS HÍDRICOS DESTINADOS PARA CONSUMO ANIMAL

Ribeiro<sup>1</sup>, G. F.; Proença<sup>1</sup>, J. E.; Angelo<sup>1</sup>, N. M. M.; Cruz<sup>1</sup>, S. P.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, Departamento de Ciências Naturais e Sociais/Laboratório de Microbiologia.

E-mail: gabrielle.f.r@grad.ufsc.br

**Resumo:** A alta carga de microrganismos patogênicos na água é um fator agravante para a disseminação de doenças de veiculação hídrica tanto para populações humanas como rebanhos. Dessa maneira, o monitoramento da qualidade microbiológica da água ofertada aos animais é muito importante, e se faz necessário para garantir a sanidade dos mesmos, especialmente em regiões de interior onde o consumo de água é feito sem tratamento prévio (Madigan et al., 2016; Correa et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de bactérias de origem fecal em águas destinadas à dessedentação de animais de produção, oriundas de propriedades no município de Curitibanos, SC. Foram selecionadas 15 propriedades em regiões abrangentes do município. Observou-se que 33% das propriedades apresentaram água com número de coliformes fecais que excede o permitido pela legislação vigente, ou seja, 1.100 UFC/100 mL (Brasil, 2005). Do total de locais amostrados, 4 propriedades apresentaram água do tipo Classe 1, com valores de coliformes abaixo de 200 ml<sup>-1</sup> de água. Outras 6 propriedades tiveram água classificada como Classe 2/3, ainda enquadradas como adequadas para consumo animal. Porém, 5 propriedades apresentaram níveis de coliformes fecais superior ao permitido para dessedentação animal. Com base nos resultados encontrados, conclui-se que a água consumida pelos animais em algumas das propriedades representa risco para a saúde dos mesmos, sendo recomendado o tratamento prévio para que sejam atendidos padrões de qualidade satisfatórios.

**Palavras-chave:** poluição hídrica; *Escherichia coli*; dessedentação animal.

### 1. Introdução

Historicamente, a preocupação primordial com a qualidade da água está intimamente atrelada à transmissão de doenças infecciosas (Tortora; Funke; Case, 2012). A análise microbiológica da água busca determinar a presença de certos

microrganismos indicadores, denominados coliformes.

Os coliformes são bactérias abundantemente presentes no trato gastrointestinal de humanos e animais, porém, não são restritas a este ambiente, com exceção dos coliformes fecais. Estes, quando detectados na água, indicam contaminação por matéria de origem fecal (Madigan et al., 2016; Santos et al., 2020).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) dispõe: “sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento”, e estabelece que a água destinada ao consumo animal não deve ultrapassar o limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros.

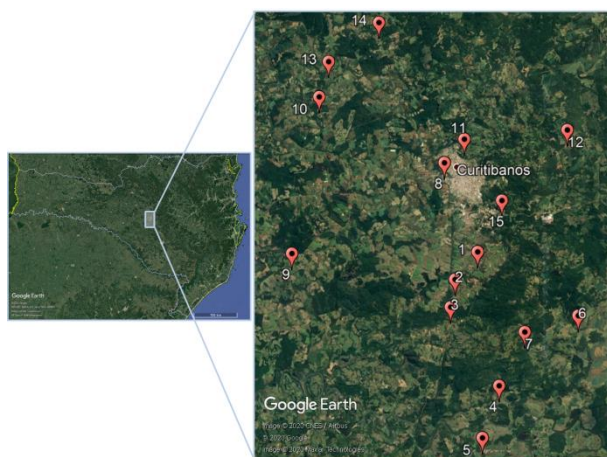
Entretanto, esse limite normalmente é negligenciado e isso acarreta em problemas de saúde vinculados ao consumo de água de má qualidade, tais como a transmissão de *Toxoplasma gondii*, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* sp. (Galvão et al., 2014).

Visto que o monitoramento da qualidade de água está diretamente relacionado com a transmissão de doenças e a saúde única, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de coliformes fecais em águas utilizadas para dessedentação animal em propriedades no interior do município de Curitibanos, SC.

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleta de amostras

Os pontos de coleta estiveram localizados 15 em propriedades com animais de produção na microrregião de Curitibanos, SC (Figura 1), especificamente de locais onde os mesmos bebem. Os locais amostrados compreenderam açudes e poços superficiais. Todas as coletas concentraram-se em julho de 2020.



**Figura 1:** Pontos de amostragem de água em propriedades rurais de Curitiba, SC.

Para cada local, no corpo d'água, foi coletada uma amostra de 100 mL água, simulando a distância, a partir da margem, que o animal alcança ao beber água.

Seguindo as recomendações da Funasa (2009), as amostras foram armazenadas em frascos de vidro graduados com tampa, previamente esterilizados, com adição de duas gotas de tiosulfato de sódio, em concentração de 10%, e acondicionadas em recipiente de isopor contendo gelo rígido até chegada das mesmas ao laboratório.

### 2.2 Avaliação de coliformes

A avaliação de coliformes foi feita através da técnica de tubos múltiplos (Funasa, 2009). No teste presuntivo, para cada amostra, foram utilizados três tubos de ensaio com tubo de Durham, cada um contendo 10 mL de Caldo Lauril Triptose em concentração dupla e seis tubos de ensaio, cada um contendo 10 mL de Caldo Lauril Triptose em concentração simples.

Nos três tubos com caldo em concentração dupla, foi adicionado um volume de 10 mL de amostra de água. Em cada um dos três tubos com caldo em concentração simples, foi adicionado um volume de 1 mL de amostra. Finalmente, nos outros três tubos adicionaram-se 0,1 mL de amostra de água. Dessa maneira, foi composta uma série de 9 tubos com 3 diluições.

A incubação foi feita a 35°C, em uma estufa bacteriológica, durante 48 horas. Transcorrido este período, procedeu-se à leitura dos resultados, através da observação de crescimento bacteriano associado à presença de gás no interior do tubo de Durham, indicando resultado positivo. Os tubos positivos no teste presuntivo foram utilizados para o teste de coliformes fecais, no qual o meio de cultura utilizado foi o caldo EC.

Nesta etapa, o conteúdo de cada tubo positivo para o teste presuntivo foi homogeneizado por

inversão previamente à inoculação dos tubos contendo caldo EC. Com uma alça de platina previamente flambada e resfriada, uma alíquota foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo EC e um tubo de Durham em seu interior. A incubação na estufa foi feita a 44,5°C, durante 24 horas. Os parâmetros utilizados para leitura do teste presuntivo foram os mesmos para o teste EC, ou seja, crescimento microbiano acompanhado da produção de gás.

Com base no número de tubos positivos para cada diluição, estimou-se o Número Mais Provável de coliformes fecais (NMP/100mL) de acordo com tabelas compreendidas em compêndios oficiais (Bacteriological Analytical Manual Online, 2001).

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados da análise de coliformes fecais encontram-se apresentados na Tabela 1. Observa-se que 33,3% das propriedades encontra-se em desconformidade de uso para dessedentação animal, ou seja, apresentaram um número maior que 1.000 UFC/100mL. Essa característica enquadra as referidas propriedades como Classe 4.

Tabela 1- Resultados da análise de coliformes fecais (NMP/100mL) em águas destinadas a consumo animal no município de Curitiba – SC.

Local	NMP/100 mL	Classe	Conformidade para dessedentação animal
1	460	2-3	Sim
2	> 1.100	4	Não
3	240	2-3	Sim
4	460	2-3	Sim
5	1.100	4	Não
6	460	2-3	Sim
7	1.100	4	Não
8	> 1.100	4	Não
9	43	1	Sim
10	< 3	1	Sim
11	11	1	Sim
12	1.100	4	Não
13	240	2-3	Sim
14	21	1	Sim
15	240	2-3	Sim

Das 15 propriedades estudadas, a maior parte (10 delas) apresenta água em conformidade de uso, com coliformes fecais em quantidade permitida pela legislação.

O monitoramento de propriedades rurais é essencial para boa saúde e produção animal. Recursos hídricos com presença de coliformes fecais indicam, obrigatoriamente, contaminação por material de origem fecal. A água contaminada

por dejetos não tratados pode transmitir agentes infecto-parasitários como *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* sp., *Salmonella* spp, *Leptospira* sp., *Giardia* sp. e *Toxoplasma gondii*. Estes agentes afetam principalmente animais jovens causando quadros de enterite, perda de peso, diminuição no crescimento e morte (Barcellos et al., 2003).

Complicações dessa natureza podem representar perda econômica para os agricultores e pecuaristas, uma vez que diminuem o peso animal e, conseqüentemente, o retorno financeiro proporcionado pela venda dos animais.

Como exemplo em relação a *E. coli*, Costa et al. (2008) caracterizaram 40 isolados clínicos de suínos com diarreia e 85% deles apresentavam característica hemolítica, indicativo de virulência. Surtos de botulismo também foram associados à ingestão de água disponibilizada em valas de captação e bebedouros artificiais (Dutra et al., 2001). A incidência dessas doenças gera gastos muitas vezes altos para tratamento, o que poderia não ocorrer caso medidas preventivas em relação a qualidade de água fossem adotadas.

Portanto, água de lagos, poços e rios, que não possuem tratamento prévio, não devem ser consumidas e nem fornecidas aos animais, sob risco de transmissão de doenças inclusive a populações humanas.

A ingestão de água com altos níveis de coliformes por animais pode contribuir também para maior poluição do solo com bactérias. Através das fezes, os coliformes podem se disseminar em lavouras, pastagens e inclusive outros rios e açudes. Portanto, a ingestão de água com níveis adequados de bactérias é importante também para minimizar a contaminação microbiana do ambiente.

#### 4. Conclusões

A maior parte das propriedades avaliadas apresenta qualidade de água satisfatória para consumo animal. Entretanto, em alguns locais a água consumida pode veicular doenças, e recomenda-se que tratamentos sejam realizados para adequação aos padrões estabelecidos por lei.

#### 5. Apoio Financeiro

Universidade Federal de Santa Catarina (Campus Curitibanos).

#### 6. Agradecimentos

Aos proprietários, por colaborarem com o trabalho, cedendo as amostras de água.

### 7. Referências

- Bacteriological Analytical Manual Online**, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>.
- BARCELLOS C. LAMMERHIRT, C.B.; ALMEIDA, M.A.B.; SANTOS, E. Distribuição da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.5, p. 1283-1292, 2003.
- BRASIL. **Resolução Conama N° 357, de 17 de Março de 2005**.
- COSTA, D.; POETA, P.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; COELHO, A.C.; MATOS, M.; ROJO-BEZARES, B.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, n. 1, p. 71-7, 2008.
- DigitalGlobe. Google, CNES. **Google Earth**, 2020.
- DUTRA I. S. DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V.; SOUZA, L.A.A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-48, 2001.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual Prático de Análise de Água**. 3. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2009. 144 p.
- GALVÃO A.L.B.; VACONCELLOS, A.L.; NAVARRO, I.T.; BRESCIANI, K.D.S. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 393-410, 2014.
- CORREA, G.; OLIVEIRA, L. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; AMERICO-PINHEIRO, J. H. P.; FRIAS, D. F. R. Microbiologia da água de poços semiartesianos da zona rural de Aparecida D'Oeste, São Paulo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, Paraíba, v. 15, n. 3, p. 330-334, jul./set. 2020.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- SANTOS, T. L.; CUNHA, C. V.; CAMPOS, A. C. V.; SANTOS, S. C. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em comunidades ribeirinhas de Itupiranga-PA, Brasil. **Brazilian Journal Of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 9005-9020, 2020.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido com autorização para publicação no formato expandido.

## PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE OXIDANTE DE FERRO ISOLADOS DE UMA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA

Spagiari<sup>1</sup>, M. S.; Bizani<sup>2</sup>, D.

<sup>1</sup> Universidade La Salle, Laboratório de Microbiologia Aplicada.

<sup>2</sup> Faculdades Integradas de Taquara, Laboratório de Microbiologia.

E-mail: souzasp@hotmaill.com

**Resumo:** Um dos grandes problemas ambientais causados pela atividade mineradora é o líquido de escoamento das minas, conhecido como Drenagem Ácida de Mina (DAM). A oxidação dos minerais sulfetados na água de drenagem forma ácido sulfúrico, e a condição ácida possibilita a solubilização dos metais, que pode ser catalisada pela atividade microbiana. Atualmente, estudos estão sendo realizados a fim de encontrar microrganismos oxidantes de ferro e alternativas para inibir a ação dos mesmos. O objetivo do estudo foi realizar a prospecção de microrganismos oxidantes de ferro isolados de uma Drenagem Ácida de Mina. Foi amostrada uma alíquota de DAM proveniente do município de Butiá/RS. Para o isolamento dos microrganismos foi preparado diluições seriadas do efluente e diluição em ágar nutriente por 24 horas a 30 °C. Para as linhagens obtidas foram caracterizados morfologia e gram. Os testes de oxidação de ferro foram desenvolvidos em duas etapas, a primeira com ferro inorgânico (meio T&K, 20 dias a 30 °C) e a segunda com ferro orgânico (meio citrato férrico amoniacal, 14 dias a 30 °C). Os resultados indicaram o isolamento de seis linhagens microbianas (DAM 1-6), com morfologias e aspectos diferentes. Para a capacidade de oxidar ferro, somente duas linhagens (DAM 1 e DAM 3) obtiveram resultado positivo no meio citrato férrico amoniacal, e nenhuma positiva para o meio T&K. Esse estudo mostra que mesmo os microrganismos estando presentes no ambiente contaminado, uma relação direta da atividade catalisadora com os isolados não pode ser estabelecida.

**Palavras-chave:** Drenagem Ácida de Mina; Microrganismos; Oxidação; Ferro.

### 1. Introdução

A utilização de metais pesados nas atividades industriais tem influenciado no aumento da quantidade de rejeitos altamente tóxicos, que na maioria dos casos, são lançados nos ecossistemas sem nenhum tratamento prévio (Bizani & Spagiari, 2016).

A Drenagem Ácida de Mina (DAM) é uma das principais causas de poluição por metais pesados nas áreas de mineração. Essas drenagens são formadas pela oxidação do dissulfeto ferroso na forma de pirita em contato com H<sub>2</sub>O, gerando um ambiente ácido e íons SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e Fe<sup>3+</sup> em solução (Soleimanifar et al, 2011).

Apesar da extrema acidez e da alta concentração de metais pesados, uma grande variedade de microrganismos são encontrados nas áreas de DAM. Esses organismos são compostos pela sua maioria de quimioautotróficos se nutrindo principalmente dos minerais sulfetados. A atividade microbiana aumenta com a formação da drenagem ácida e a reação é catalisada por bactérias acidófilas (Baker & Banfield, 2003).

O presente trabalho tem por objetivo realizar a prospecção de microrganismos com capacidade oxidativa de ferro isolados de uma Drenagem Ácida de Mina.

## 2. Metodologias

### 2.1 Amostragem

A amostragem foi realizada numa drenagem ácida de mina localizada no município de Butiá/RS. Foi coletado 1 litro de efluente em frasco esterilizado e refrigerado até o momento das análises.

### 2.2 Isolamento dos Microrganismos

Foram preparadas diluições seriadas (10<sup>0</sup> até 10<sup>-3</sup>), e posterior inoculação de 100 µL de cada diluição em ágar nutriente (peptona bacteriológica 5 g L<sup>-1</sup>, extrato de carne 3 g L<sup>-1</sup> e ágar 18 g L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 30 °C.

### 2.3 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica foi realizada através de microscopia óptica combinada com a técnica de gram, para avaliação das células, e visualmente pela observação das colônias formadas em Ágar Nutriente.

#### 2.4 Teste da Oxidação de Ferro com meio T&K

Os microrganismos foram pré-inoculados em Caldo Luria Bertani por 18 horas a 30 °C. Transcorrida a incubação, 100 µL da cultura foi transferida para solução fisiológica e homogeneizada. Posteriormente, 10 µL da solução foi adicionada em 200 µL do meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1973) em placas de polietileno de 96 poços e foram realizadas seis replicatas por amostra e um branco (meio sem microrganismo).

Os microrganismos foram incubados por 20 dias a 30°C.

#### 2.5 Teste da Oxidação de Ferro com Citrato Férrico Amoniacal

Para o teste de oxidação de ferro com o meio citrato férrico amoniacal (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>; NaNO<sub>3</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 0,2 g L<sup>-1</sup>; Citrato férrico amoniacal 10 g L<sup>-1</sup>) foram preparados pré-inoculados conforme a metodologia anterior.

Os testes foram realizados em tubos de tampa rosca esterilizados com 5 mL de meio e acrescidos de 100 µL de cultura.

Os microrganismos foram incubados por 14 dias a 30°C.

### 3. Resultados e Discussão

Foram isoladas seis linhagens microbianas no experimento, sendo denominadas de DAM 1 – 6.

As características dos isolados obtidos na primeira etapa do estudo estão descritas na tabela

Tabela 1 – Características dos microrganismos isolados da Drenagem Ácida de Mina

Isolados	Morfologia	Gram	Coloração da Colônia
DAM 1	Bastonete	Positivo	Bege
DAM 2	Cocos	Positivo	Branca
DAM 3	Bastonete	Negativo	Laranja
DAM 4	Leveduriforme	-	Bege
DAM 5	Bastonete	Positivo	Bege
DAM 6	Cocos	Positivo	Branca

O experimento demonstrou uma pequena quantidade de microrganismos obtidos, de acordo com os parâmetros propostos no estudo. As características semelhantes entre determinados

isolados podem estabelecer uma relação de predominância de certos filos nesse ecossistema.

Méndez-García et al. (2015) relataram em seu estudo a presença de bactérias, archaeas e fungos em DAM. Os grupos microbianos predominantes nesses ambientes são: *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria*.

O grupo bacteriano mais estudado e isolado dessas localidades impactadas atualmente são as *Proteobacteria*, mais especificamente os seus gêneros *Acidithiobacillus* e *Thiobacillus*.

Baker & Banfield (2003) demonstraram em seu estudo o isolamento de bactérias oxidantes de ferro do gênero *Leptospirillum* pertencentes ao grupo dos *Nitrospirae*, que são comumente associadas a catalisação da reação de formação da DAM.

Avila et al. (2013) verificaram a resistência de dois isolados de *P. aeruginosa* e *B. Subtilis* em DAM sintética. O estudo concluiu que dependendo dos substratos de que o microrganismo tem a disposição, eles tendem a se desenvolver normalmente.

Para o teste de oxidação de ferro foram utilizadas seis linhagens isoladas previamente e um branco. Os resultados da oxidação de ferro estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos testes de oxidação de ferro

Isolados	Meio T&K	Meio Citrato
DAM 1	Negativo	Positivo
DAM 2	Negativo	Negativo
DAM 3	Negativo	Positivo
DAM 4	Negativo	Negativo
DAM 5	Negativo	Negativo
DAM 6	Negativo	Negativo
Branco	Negativo	Negativo

A oxidação de ferro bivalente para trivalente foi evidenciada em apenas duas linhagens com o meio citrato férrico amoniacal. Pelas condições aplicadas no experimento, poucos microrganismos poderiam desenvolver essa capacidade, visto que a maioria das reações nas drenagens ocorrem em pH extremamente ácido.

Jones et al. (2015) realizaram uma prospecção e caracterização de microrganismos de uma DAM de mina de carvão nos Estados Unidos. No estudo foi comprovado que com baixo pH e alta concentração de ferro bivalente, o crescimento de bactérias acidófilas é beneficiado, e



consequentemente inibindo o crescimento de outros tipos de microrganismos no efluente.

O mecanismo de conversão do ferro é realizado por enzimas do grupo das oxidoredutases provenientes do citocromo P450. A ferroxidase é a principal enzima envolvida na catalise do  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  através da reação:  $4\text{Fe}^{2+} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$ .

Sandström & Mattsson (2001) através do seu estudo em planta piloto comprovaram a reação de oxidação do ferro com microrganismos em faixas de temperaturas diferentes. As bactérias mesófilas tiveram condições favoráveis para crescimento em meio com  $\text{Fe}^{2+}$ .

Para averiguar comportamentos diferentes em relação aos microrganismos, outras condições devem ser aplicadas, como: alteração da temperatura, diminuição do pH, retirada de nutrientes e tempo de incubação.

#### 4. Conclusões

A partir do estudo realizado pode-se averiguar que a maioria das linhagens isoladas da Drenagem Ácida de Mina não apresentaram capacidade de oxidar ferro, mesmo estando presentes no ambiente contaminado. Nessa perspectiva, microrganismos autóctones numa determinada área impactada, podem possuir nenhuma relação com a degradação local.

#### 5. Apoio Financeiro

Unilasalle, CNPq, Fapergs.

#### 6. Referências

- AVILA, D.C.R.J.; SPAGIARI, M.S.; FOSSATTI, J.; BIZANI, D. Análise do crescimento de microrganismos em drenagem ácida de mina com ajuste de pH. **Revista Cippus**, v. 2, n. 2, p. 179-190, 2013.
- BAKER, B.J.; BANFIELD, J.F. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS Microbial Ecology**, v. 44, n. 2, p. 139-152, 2003.
- BIZANI, D.; SPAGIARI, M.S. Behavioral kinetic evaluation and chromium reduction capacity by standard bacterial strains. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 2, p. 648-655, 2016.
- JONES, D.S.; KOHL, C.; GRETTEBERGER, C.; LARSON, L.N.; BURGOS, W.D.; MACALADY, J.L. Geochemical niches of iron-oxidizing acidophiles in acidic coal mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1242-1250, 2015.
- MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A.I.; MESA, V.; SÁNCHEZ, J.; GOLYSHINA, O.V.; FERRER, M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-17, 2015.
- SANDSTRÖM, A.; MATTSSON, E. Bacterial ferrous iron oxidation of acid mine drainage as pre-treatment for subsequent metal recovery. **International Journal of Mineral Processing**, v. 64, p. 309-320, 2001.
- SOLEIMANIFAR, H.; ARDEJANI, F. D.; MARANDI, R. Bio-remediation of acid mine drainage in the sarcheshmeh porphyry copper mine by fungi: batch and fixed bed process. **University of Tehran**, v. 45, n. 1, p. 87-102, 2011.
- TUOVINEN, O.H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Archives of Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

## RESUMOS MICROBIOLOGIA GERAL

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

### POSSÍVEL CONVERGÊNCIA EVOLUTIVA EM PROTEÍNAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM HUMANOS

Arancibia <sup>1</sup>, R. A.H.; De Freitas <sup>1</sup>, L. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia, Núcleo de Biointegração/Laboratório de Genética e Bioinformática.

E-mail:rodrigo.alex@ufba.br

**Resumo:** O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas; doença tropical negligenciada e de grande impacto para saúde pública ao redor do mundo. Durante sua história evolutiva este parasita desenvolveu sofisticados mecanismos que subvertem os componentes do sistema imunológico e garantem sua sobrevivência no hospedeiro. Entretanto há lacunas na compreensão da origem e função de grande parte desses mecanismos. Considerando o longo processo de interação molecular como agente de pressão seletiva sugerimos que a eficiência de alguns desses mecanismo de virulência, como as proteínas de superfície parasitária se deve a certa similaridade com proteínas humanas devido a uma convergência evolutiva molecular. Para verificar está possibilidade realizamos análises de similaridade entre proteínas humanas chave no processo de interação com o parasita contra os principais grupos de proteínas de superfície do parasita buscando identificar a semelhança entre as proteínas e indicar possíveis explicações quanto o seu significado o estudo da patogênese da doença de chagas. Também realizamos a comparação com proteínas homólogas em outros mamíferos do continente, com o objetivo de verificar a possível trajetória evolutiva dessa similaridade. Como resultado preliminares foram identificados fragmentos de proteínas da família trans-sialidase com similaridade com a proteínas de CARD6 e componentes da família do colágeno como também fragmento de proteínas GP63 similar a proteína USP7.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; doença de chagas; convergência evolutiva; fatores de virulência

#### 1.Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas; doença tropical negligenciada e

de grande impacto para saúde pública (BONNEY et al., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; TARLETON, 2016;OMS,2020).Atualmente, estima-se que a doença de Chagas infecte entre 6 a 7 milhões de pessoas, 28.000 novos casos por ano e cause 12.000 mortes em todo o mundo, especialmente na América Latina. Além disso, 25 milhões de pessoas correm o risco de se infectar (OMS, 2020). O *T. cruzi* tem um ciclo que infecta mamíferos, uma interação parasitária que ocorre a milhões de anos. Os humanos são hospedeiros do *T. cruzi* a aproximadamente 15-20 mil anos após a chegada na América Latina e evidências moleculares em múmias na América do Sul que apresentam DNA e traços clínicos da Doença de Chagas (AUFDERHEIDE et al., 2004).

Durante o processo de interação parasita-hospedeiro, o *T. cruzi* desenvolveu sofisticados mecanismos que subvertem os componentes do sistema imunológico e garantem sua sobrevivência no hospedeiro: fatores de virulência. Destacam inativações do sistema complemento, sobrevivência e fuga do fagossomo, desoxidação de peroxissomos em macrófagos no contexto do sistema imune inato. Além do retardo na resposta de CD8<sup>+</sup> (ACEVEDO;GIRARD;GÓMEZ,2018;CARDOSO ;REISCUNHA;BARTHOLOMEU,2016;LIDANI et al., 2017).Entre os componentes desses mecanismos se destacam as proteínas de superfície tendo entre os seus principais grupos estão a trans-sialidase (TcS), mucina, proteína de superfície associada a mucina (MASP), GP63, proteínas semelhantes a mucina (mucin-like) (FREIRE-DE-LIMA et al., 2015; PINZÓN MARTÍN; SEEBERGER; VARÓN SILVA, 2019)

Entretanto ainda há a carência de uma visão de integrada dos mecanismos de virulência e em muitos fatores de virulência falta o entendimento de sua função (OSORIO et al., 2012; PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017). A

interação do parasita com células do hospedeiro é essencial para o estabelecimento da infecção. O longo processo de interação molecular pode ser uma pressão seletiva para uma convergência molecular. Sugerimos como um possível papel de algumas proteínas de superfície do *T. cruzi* a interação com proteínas humanas que apresentam uma certa identidade, uma convergência evolutiva molecular (CEM).

Realizamos análises de similaridade entre proteínas humanas chave no processo de interação com o parasita como o sistema imunológico e de transdução de sinal contra os principais grupos de proteínas de superfície do parasita. Também realizamos a comparação com proteínas homólogas em outros mamíferos que apresentam distribuição no continente americano, com o objetivo de verificar quais proteínas são semelhantes e levantando possíveis explicações para esta semelhança e seu significado para a interação parasita-hospedeiro no contexto da doença de chagas.

## 2. Metodologias

### 2.1 Recuperação de sequências de proteínas

As sequências das proteínas humanas e suas atribuições de atuação no sistema imunológico (total de 960 proteínas) e transdução de sinal (1.790 proteínas) foram obtidas no banco de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>). As sequências de proteínas do *T. cruzi* foram obtidas do TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb>) de seis famílias de proteínas TcS (8.471 sequências), proteínas mucinas da superfície celular-TcSMUG (458 sequências) TcMUC (3,974 sequências), semelhante a mucina (172 sequências), MASP (5581 sequências) e GP63 (13,234 resultados).

### 2.2 Pesquisa pela similaridade entre proteínas humanas e parasitárias

Fizemos a comparação das proteínas de superfície do *T. cruzi* (*query*) contra as proteínas humanas (*subject*) usando o programa blastp e com a matrix BLOSUM45. O resultado foi filtrado com um percentual de identidade  $\geq 30\%$ , comprimento do fragmento similar  $\geq 100$ aa, valor mínimo de e-value  $\leq 1e^{-6}$  entre a sequência da *query* e as sequências *subject*.

### 2.3 Recuperação de sequências de proteínas de mamíferos homólogas

Fizemos a comparação por alinhamento global dos segmentos de *T. cruzi* recuperados pelo BLAST com proteínas de mamíferos do continente

americano para verificar a possível trajetória evolutiva dessa similaridade. As sequências de proteínas de outros mamíferos foram obtidas pela pesquisa dos genes ortólogos das proteínas humanas a partir do NCBIhomologene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). As sequências de proteínas dos mamíferos foram escolhidas seguindo critérios de distribuição geográfica da espécie, coincidindo com a distribuição do parasita. Foram obtidas sequências de sete ordens de mamíferos representativos para a biologia do parasita (Cingulata, Didelphimorphia, Chiroptera, Primata, Rodentia, Carnivora, e Artiodactyla).

### 2.4 Alinhamento entre as proteínas de mamíferos americanos e o parasita

O alinhamento entre as sequências de proteínas dos mamíferos com as sequências do parasita foi realizado através do programa MEGA utilizando o algoritmo MUSCLE (Cumaru et al.2018) e seus parâmetros padrões.

## 3. Resultados e Discussão

Na pesquisa BLAST das proteínas de superfície de *T. cruzi* GP63, MASP, mucin-like, TcMUC e TcMUG contra o sistema imune humano não foi encontrado segmentos similares. O único conjunto de dados que apresentou fragmentos similares e significativos foram proteínas da família TcS, seguindo os parâmetros de filtragem acima descritos. Foram encontrados 36 resultados (*hits*), todos com a mesma proteína humana CARD6 e alternando entre cinco proteínas de *T. cruzi*.

A busca em relação ao sistema de transdução de sinais nos conjuntos de dados MASP, TcMUC, e mucin-like não apresentou resultado significativo. Proteínas da família GP63 apresentou similaridade com a s USP7 com resultado significativo com e-value zero. As sequências da família TcS tiveram 15 resultados significativos com semelhanças com e-value 0 contra proteínas colágeno.

A comparação dos fragmentos de proteínas de *T. cruzi* com as proteínas homólogas humanas encontrou regiões com motivos repetitivos e maior similaridade com as proteínas dos primatas *Saimiri boliviensis* e *Callithrix jacchus* dentre todos os mamíferos pesquisados.

Os fragmentos de proteínas de *T. cruzi* similares a proteínas colágeno apresentaram similaridade com regiões ricas em aminoácidos glicina e prolina. Os mamíferos mais similares foram *Chinchilla lanígera* (roedor) e humanos.

O fragmento de *T. cruzi* similar a proteína USP7 não apresentou regiões repetitivas ou enriquecimento de amino ácidos. Entretanto não foi possível identificar qual mamífero apresenta mais similaridade porque todos apresentaram valores próximos, sem grandes diferenças nos valores.

#### 4. Conclusões

Foram identificados fragmentos de proteínas da família TcS com similaridade a proteínas de CARD6 e colágeno humano. Também foi identificado fragmento de proteínas GP63 similar a proteína USP7. Esses fragmentos podem ser evidências de convergência molecular.

#### 5. Apoio Financeiro

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

#### 6. Referências

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 17 fev. 2004.

BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421–447, 2019.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2016.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v. 25, n. 11, p. 1142–1149, 1 nov. 2015.  
KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/chagas-disease>>. Acesso em: 13 out. 2020a.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes and Infection**, Special issue on virulence factors of parasites. v. 14, n. 15, p. 1390–1402, 1 dez. 2012.

PECH-CANUL, Á. DE LA C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R.-L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jpr/2017/3751403/>>. Acesso em: 3 ago. 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.

PINZÓN MARTÍN, S.; SEEBERGER, P. H.; VARÓN SILVA, D. Mucins and Pathogenic Mucin-Like Molecules Are Immunomodulators During Infection and Targets for Diagnostics and Vaccines. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 22 out. 2019.

TARLETON, R. L. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 10, p. 835–838, 1 out. 2016

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE AMOSTRAS DE COMPOSTAGEM

Campos<sup>1</sup>, L. L.; Amorim, C. M.<sup>2</sup>; Oliveira<sup>3</sup>, J. C. M. D.

<sup>1</sup> Faculdade Ciências da Vida.

<sup>2</sup> Faculdade Ciências da Vida.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

E-mail: laradlcampos@gmail.com

**Resumo:** As enzimas são os produtos mais explorados pela indústria atualmente e possuem aplicação biotecnológica em diversos setores. A obtenção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é uma prática sustentável empregada ao desenvolvimento dos processos manufatureiros atuais. A exploração e estudo da microbiota existente na compostagem para esta finalidade ainda é escassa. Bactérias isoladas de amostras ambientais demonstram a capacidade deste grupo de microrganismos em produzir enzimas hidrolíticas. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a capacidade das bactérias obtidas de composto orgânico em produzir as enzimas hidrolíticas amilase, lipase e protease. Realizou-se o processamento da amostra de composto orgânico e, posteriormente, o plaqueamento em meio sólido a fim de caracterizar morfológicamente as bactérias isoladas. Em seguida, as estirpes foram inoculadas em meios contendo diferentes fontes de carbono, na forma de spots, para avaliação da atividade enzimática. A atividade enzimática foi avaliada semiquantitativamente por meio do índice enzimático (IE). O IE variou de 0 a 2,21, demonstrando o potencial biotecnológico de algumas cepas. Os isolados B1 e B10 apresentaram os maiores valores para amilase, enquanto que os isolados B4 e B7 para lipase e B3 e B11 para protease. Os dados apresentados neste estudo mostraram baixa variabilidade genética e morfológica entre os 12 isolados de bactérias obtidos no composto orgânico, porém existem estirpes com alto potencial de uso para produção de enzimas em escala industrial.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática; Biotecnologia; Compostagem; Enzimologia.

### 1. Introdução

A sustentabilidade dos processos industriais tornou-se uma tendência mundial, razão pela qual a introdução de métodos ecológicos alternativos nas etapas de produção intensificou-se nos últimos anos. Adicionalmente, com o avanço da enzimologia, uma maior atenção foi despendida para as enzimas, moléculas onipresentes em animais, plantas e microrganismos, que atuam como catalisadores biológicos em inúmeros segmentos industriais. Dentre os biocatalisadores de maior utilização, as enzimas amilase, lipase e protease destacam-se por sua versatilidade e ampla aplicabilidade industrial (LIU; KOKARE, 2017).

A seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é uma ferramenta biotecnológica promissora e com grande potencial para redução de custos, uma vez que as enzimas sintéticas são produtos de alto valor aquisitivo. A obtenção de enzimas, de forma sustentável e eficaz, representa um marco para o setor industrial, já que tem capacidade de otimizar os processos de fabricação e processamento de produtos hoje existentes (LAMILLA *et al.*, 2017).

Os microrganismos podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes e são importantes nos processos de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, como nos processos de compostagem, onde a decomposição de matéria orgânica origina um composto húmico rico em nutrientes e que pode ser destinado à suplementação nutricional do solo. Apesar de possuir uma matriz rica e biodiversificada de microrganismos e nutrientes, a compostagem ainda é um substrato pouco explorado, no que tange o isolamento de bactérias com atividade enzimática, o que a torna um objeto de estudo interessante para bioprospecção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial (SHARMA *et al.*, 2017).

## 2. Metodologias

O trabalho baseou-se em experimentos qualitativos e semiquantitativos. Amostras do Projeto Compostagem, da Faculdade Ciências da Vida, foram coletadas para a realização dos ensaios biológicos. Para realização dos experimentos, utilizou-se um composto orgânico pronto, o qual foi submetido ao processo de compostagem no primeiro semestre de 2019.

### 2.1 Isolamento e seleção de bactérias

Uma amostra de 5 g do composto foi coletada e acrescida de 45 mL de solução salina 0,85% estéril, com subsequente homogeneização. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi retirada e destinada às diluições seriadas decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubada a 37°C por 24-48 horas. Todo o procedimento foi realizado em triplicata (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

Após o cultivo, os microrganismos isolados foram submetidos à avaliação dos aspectos morfológicos, de acordo com Shirling; Gottlieb (1966). Em seguida, uma alíquota da colônia pura foi repicada em tubo contendo o mesmo meio de cultura, e mantido inclinado, para posterior utilização nas etapas de caracterização enzimática.

### 2.2 Caracterização morfológica de bactérias

Os isolados foram cultivados em meio BDA, a 37°C durante 24-48 horas. Para avaliação macromorfológica, considerou-se aspectos como cor, borda e elevação das colônias. Para análise micromorfológica, os microrganismos previamente identificados como prováveis bactérias foram avaliados por meio da técnica de Coloração de Gram, utilizando um microscópio ótico para visualização das estruturas morfológicas (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

### 2.3 Caracterização enzimática de bactérias

A produção de amilase foi testada de acordo com Coon *et al.* (1957), com adaptação na concentração de amido solúvel para 6,6 g/L. Os isolados foram inoculados na forma de *spots*, em triplicata, no meio ágar amido e incubados a 37°C por 48 horas. A detecção da enzima foi realizada observando-se se houve formação de zona amarela ao redor da colônia, após adição de 10 mL de solução diluída de lugol.

A produção de lipase foi realizada segundo o trabalho de Savitha *et al.* (2007), utilizando meio de cultura composto por 5g/L peptona, 1g/L de extrato de levedura, 4g/L de cloreto de sódio,

15g/L de ágar, 31,25mL/L de óleo de oliva, 0,01g/L de rodamina B; pH 7,0. Os isolados foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata, e incubados a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as culturas foram expostas à radiação ultravioleta, para verificação da atividade da enzima.

A produção de protease foi realizada conforme o estudo de Orlandelli *et al.* (2011), utilizando meio de cultura ágar-gelatina-leite. Os isolados foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata, e incubados a 37°C por 48 horas. A produção de protease foi observada pela formação de halos claros ao redor da colônia, sem a necessidade de adição de um agente revelador.

#### 2.3.1 Caracterização enzimática de bactérias

Além da análise qualitativa, as atividades hidrolíticas das enzimas amilase, lipase e protease foram estimadas semiquantitativamente através do índice enzimático (IE), conforme a relação entre o diâmetro da colônia e do halo de hidrólise, segundo a seguinte equação:  $IE = DH/DC$ , onde DH representa o diâmetro do halo de hidrólise (mm) e DC representa o diâmetro das colônias dos isolados (mm) (STAMFORD *et al.*, 1998).

### 2.4 Análise estatística

Os ensaios de atividade enzimática seguiram o delineamento inteiramente casualizado (DIC), considerando três repetições por amostra. Os resultados obtidos foram analisados individualmente e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, por meio do *software* SISVAR® 5.3 (FERREIRA, 2010).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização morfológica de bactérias

Após o processamento da amostra de composto orgânico, apenas 12 representantes de bactérias foram observados, embora um total de 40 microrganismos distintos tenha sido isolado. O baixo número de bactérias obtido pode estar relacionado à idade do composto utilizado, já que o mesmo se encontrava maturado desde o primeiro semestre de 2019. Oliveira *et al.* (2008) relatam que a idade do composto orgânico pode interferir na quantidade e na diversidade de bactérias presentes, já que estes microrganismos possuem pico de atividade nas fases iniciais do processo (mesofílica e termofílica), onde temperaturas mais

elevadas auxiliam na decomposição acelerada matéria orgânica.

Os dados referentes às características macro e micromorfológicas dos isolados, encontram-se na Tabela 1. Observou-se variação de características como: (a) cor, com predominância de colônias brancas (33,35%); (b) borda, com predominância de formato regular (58,34%) e (c) elevação, com predominância de colônias planas (58,34%). Os aspectos macromorfológicos dos isolados bacterianos não revelaram alta variabilidade. Este fato pode estar associado à modificação adaptativa ao meio ou à capacidade que esses microrganismos possuem de assumir uma morfologia em resposta às condições ambientais adversas (YOUNG, 2008).

A análise micromorfológica dos isolados selecionados (Tabela 1) foi realizada com base na observação das lâminas coradas através do Método de Gram em microscópio ótico (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Apesar de os isolados não terem apresentado grande diversidade quanto às características macroscópicas, revelou-se a presença cinco tipos de morfologia distintos, sendo bacilos (41,66%), cocos (16,67%), diplococos (16,67%), estafilococos (16,67%) e estreptococos (8,33%). Nota-se que a presença de bactérias Gram-negativas (66,66%) foi predominante neste estudo. Esses microrganismos possuem elevado potencial para degradar compostos aromáticos e xenobióticos, por isso, são frequentemente associados a processos industriais e de biorremediação (CHEN *et al.*, 2004).

Tabela 1. Classificação morfológica das colônias bacterianas isoladas da compostagem

	Características Culturais				
	Macro			Mícro	
	Cor	Borda	Elevação	Morfologia	Gram
<b>B1</b>	L	I	C	D	-
<b>B2</b>	L	R	C	C	-
<b>B3</b>	C	I	C	E	-
<b>B4</b>	A	R	P	B	-
<b>B5</b>	V	R	P	B	-
<b>B6</b>	B	R	P	ES	-
<b>B7</b>	M	R	P	C	+
<b>B8</b>	A	I	P	B	-
<b>B9</b>	B	R	C	ES	+
<b>B10</b>	B	R	P	B	+
<b>B11</b>	A	I	C	D	-
<b>B12</b>	B	I	P	B	+

Cor: L (laranja), C (creme), A (amarela), V (vermelha), B (branca), M (marrom) / Borda: I (irregular), R (redonda) / Elevação: C (convexa), P (plana) / Morfologia: D (diplococos), C (cocos), E (estreptococos), B (bacilos), ES (estafilococos) / Gram: - (negativo), + (positivo).

### 3.2 Caracterização enzimática de bactérias

Os dados da atividade enzimática da amilase, lipase e protease estão dispostos na Tabela 2. Observou-se que 91,66% dos isolados possuem capacidade para sintetizar pelo menos uma das enzimas testadas, mesmo que estes não tenham apresentado atividade enzimática eficiente (Índice enzimático < 2,0). A produção de amilase, lipase e protease foi observada em 41,67%, 41,67% e 33,33% das estirpes, respectivamente. O isolado B6 não apresentou atividade enzimática para nenhuma das biomoléculas avaliadas.

Tabela 2. Índice enzimático das bactérias isoladas

Isolado	Índice Enzimático		
	Amilase	Lipase	Protease
<b>B1</b>	2,15a	1,50c	0,00
<b>B10</b>	2,12a	0,00	0,00
<b>B7</b>	1,24b	2,08a	0,00
<b>B5</b>	1,17c	0,00	0,00
<b>B2</b>	1,13d	0,00	0,00
<b>B3</b>	0,00	0,00	2,14a
<b>B4</b>	0,00	2,21a	0,00
<b>B6</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B8</b>	0,00	0,00	1,95b
<b>B9</b>	0,00	1,07d	0,00
<b>B11</b>	0,00	1,84b	2,13a
<b>B12</b>	0,00	0,00	1,74c

#### 3.2.1 Detecção da atividade amilolítica

A formação de halo amarelo claro ao redor da colônia indicou a hidrólise do amido, após revelação das placas de Petri com solução diluída de lugol (COON *et al.*, 1957). A ocorrência de halo de degradação foi observada em apenas 5 (41,67%) isolados no presente trabalho, com valores de IE variando entre 1,13 e 2,15 (Tabela 2).

A baixa ocorrência de bactérias produtoras de amilase também foi observada por Sacco (2013), onde apenas 43,75% dos isolados obtidos de amostras de consórcios formados de solo contendo palha ou bagaço de cana-de-açúcar em decomposição foram capazes de produzir a enzima. Segundo Kim *et al.* (2006), microrganismos cultivados em cultura pura regularmente apresentam atividades enzimáticas insatisfatórias. Além disso, as enzimas de alguns isolados podem não se difundir no meio de cultivo, o que impossibilita a formação de halo de degradação.

#### 3.2.2 Detecção da atividade lipolítica

A atividade lipolítica dos microrganismos foi indicada pela formação de halo azul ao redor da colônia, após a submissão do meio de cultivo à radiação ultravioleta (SAVITHA *et al.*, 2007).

O baixo índice de isolados produtores e classificados como bons produtores de lipases pode estar associado às temperaturas de incubação e/ou especificidade do substrato utilizado, já que estas enzimas são altamente específicas e suas atividades hidrolíticas podem variar conforme a composição de triglicerídeos incorporados ao meio de cultivo (VAN DER SAND *et al.*, 2014).

### 3.2.1 Detecção da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada pela formação de halo claro ao redor das colônias bacterianas (ORLANDELL *et al.*, 2011). O IE para produção de protease (Tabela 2) variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as bactérias avaliadas, sendo que 4 (33,33%) isolados foram considerados produtores desta enzima, devido a presença de halo de degradação no meio de cultura, com valores variando de 1,74 a 2,14.

Fatores como a concentração de glicose e peptona são determinantes para aumentar a produção de proteases e podem não ter sido suficientes na suplementação do meio (COCHRAN; COX, 1992). Além disso, a repressão da produção da enzima de interesse pode ter acontecido devido a algum composto presente no meio ou até mesmo devido a fatores físicos, como pH, temperatura e tempo de incubação (NEHETE; SHAH; KOTHARI, 1985).

## 4. Conclusões

Entre as bactérias isoladas da compostagem, existe baixa variabilidade em relação às características morfológicas analisadas. A maioria dos isolados (91,66%) hidrolisa pelo menos um dos substratos utilizados para bioprospecção enzimática. As estirpes B1 e B10 apresentaram maior produção de amilase, B4 e B7 de lipase e B3 e B11 de protease ( $IE \geq 2$ ), revelando o alto potencial biotecnológico destas linhagens para síntese de enzimas em escala industrial. O composto orgânico maturado foi uma limitação no presente estudo, no que tange a diversidade das bactérias presentes no substrato avaliado. Deste modo, sugere-se que, na realização de trabalhos futuros, seja utilizado amostras de composto não maturado.

## 5. Apoio

Agradecemos à Faculdade Ciências da Vida, por ter tornado esse trabalho viável.

## 6. Referências

CHEN, W. M.; CHANG, J. S.; WU, C. H.; CHANG, S. C. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**. v. 155, p. 672-680, 2004.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. Experimental designs. **John Wiley and sons**. v. 2, p. 335-375, 1992.

COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. Manual of microbiological methods. **McGraw-Hall**. p. 239-262, 1957.

FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância. Versão 5.3. DEX. **Lavras/MG: UFLA**, 2010.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Microrganismos de importância agrícola. **Embrapa Documentos**. v. 44, 1994.

KIM, S; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 583-591, 2006.

LAMILLA, C.; PAVEZ, M.; SANTOS, A.; HERMOSILLA, A.; LANQUINAO, V.; BARRIENTOS, L. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**. v. 40, p. 719-726, 2017.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. p. 267-298, 2017.

NEHETE, P. N.; SHAH, V. D.; KOTHARI, R. M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**. v. 7, p. 413-418. 1985.

OLIVEIRA, E. C. A.; SARTORI, R. H.; GARCEZ, T. B. Compostagem. Centro de



Agricultura Luiz de Queiroz, **Universidade Federal de São Paulo**, Piracicaba, 2008.

ORLANDELLI, R.C.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. **Anais Eletrônico VII Encontro Internacional de Produção Científica do Centro Universitário de Maringá**. 2011.

SACCO, L. P. Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos. **Universidade Estadual Paulista**, Jaboticabal/SP. p. 68, 2013.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G.W.; ROSHINI, K.T.; SHANTALA, Y.M. Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 564-568, 2007.

SHARMA, A.; SAHA, T. N.; ARORA, A.; SHAH, R.; NAIN, L. Efficient Microorganism Compost Benefits Plant Growth and Improves Soil Health in *Calendula* and Marigold. **Horticultural Plant Journal**. v. 3, 2017.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 16, p. 313-340. 1966.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, J. M. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, p. 382-385, 1998.

VAN DER SAND, S. T.; MINOTTO, E.; MILAGRE, L.P.; OLIVEIRA, M.T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**. v. 5, p. 16-23, 2014.

YOUNG, K. D. Bacterial morphology: why have different shapes?. **Current Opinion in Microbiology**. v. 6, p. 596–600, 2007.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ESTUDO DE CASO: ANÁLISE DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTE COM SEPSE EM HOSPITAL PRIVADO DE MINAS GERAIS

Carvalho, M.S.<sup>1</sup>; Nogueira, I. M. C. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FaSaR- Faculdade Santa Rita, autora

<sup>2</sup>FaSaR- Faculdade Santa Rita, coautor

E-mail:[mariana07031998@gmail.com](mailto:mariana07031998@gmail.com)

**Resumo:** A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do organismo devido a infecção. Analisando sinais e sintomas, pode-se observar anormalidade celular, circulatória, metabólica, assim como também alterações laboratoriais. No Brasil, as UTIs são tidas como infecções bacterianas mais comuns, que podem desencadear a uma sepse, sendo responsáveis por 80 em cada 1.000 consultas clínicas. O presente estudo terá como objetivo avaliar os parâmetros laboratoriais e clínicos de paciente com sepse em hospital privado de Minas Gerais. O estudo será realizado a partir de resultados levantados no banco de dados do laboratório co-participante situado em Ouro Branco, MG.

**Palavras-chave:** Sepse; *Proteus sp*; *Clostridium difficile*; *Klebsiela sp*; *Serratia sp*

### 1. Introdução

A sepse é estabelecida pelo Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), como uma ampla alteração celular, causada por uma infecção desregulada, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos. Pode ser definida como, a resposta sistêmica a uma doença infecciosa, que pode ser desencadeada pelos microrganismos: bactérias, vírus, fungos ou protozoários (ILAS, 2015).

Segundo a Sociedade de Medicina Intensiva (SCCM), como espectros da doença, a mesma pode ser classificada em: sepse não complicada, sepse grave e choque séptico, que é resultante de uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro proveniente de uma infecção (BARROS; MAIA; MONTEIRO, 2016).

Para uma provável infecção, são analisados pelo menos dois sinais ou sintomas recentes e presentes no momento do diagnóstico inicial. Dentre estes sintomas, se caracterizam a temperatura maior que 38,3°C (hipertermia); temperatura menor que 36°C (hipotermia); frequência cardíaca superior a 90

bpm (batimentos por minuto), (taquicardia); frequência respiratória maior que 20 irpm (taquipnéia), pressão arterial sistólica menor que 90 mmhg ou pressão arterial média menor que 65 mmhg, alteração aguda do estado mental, calafrios ou tremores, leucócitos totais maiores que 12000/mm<sup>3</sup> e leucócitos totais menores que 4000/mm<sup>3</sup>(ZOPPI,2017).

O choque séptico ocorre principalmente por bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, levando a um subconjunto de causas patológicas nos pacientes. O choque séptico aumenta gradualmente a cada ano (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL., 2012).

É incontestável o fato de que a sepse constitui problema de saúde pública e, por isso, o seu controle e prevenção devem ser priorizados, uma vez que, é responsável por importante causa de mortes em todo o mundo. De acordo com o Instituto ILAS, a sepse constitui a segunda principal causa de mortalidade em Unidades de terapia intensiva (UTI), tendo a sua incidência acrescida de 82,7 casos para cada 100.000 habitantes em 1979, para 240,4 habitantes para cada 100.000 habitantes em 2000 (GARRIDO, 2017).

Um estudo de prevalência em cerca de 230 UTIs em hospitais, aleatoriamente selecionados, assinala que aproximadamente 30% dos leitos de UTI no Brasil estão ocupados por pacientes acometidos por sepse grave ou choque séptico. Nesse mesmo estudo, conduzido pelo ILAS, apresenta resultados iniciais alarmantes, com letalidade em cerca de 50% dos acometidos (ILAS, 2015).

Acometendo pessoas imunossuprimidas e sensibilizadas, ou em UTI, a sepse é considerada um grande problema de saúde pública, pois causa sérios prejuízos ao organismo. Esse trabalho possui o objetivo de ressaltar a importância dos exames laboratoriais e os fatores clínicos envolvidos através de um estudo de caso único de paciente com o diagnóstico de sepse em Hospital Privado de Minas Gerais. Além de, conhecer as consequências

dessa disfunção, um fator extremamente preocupante, uma vez que acarreta diversos prejuízos em seu desenvolvimento. E assim, buscar o auxílio e a união à profissionais de saúde, dessa patologia que acomete muitos indivíduos imunossuprimidos.

## 2. Metodologia

### Coleta de dados por meio de software do hospital

O presente trabalho consiste em um estudo de caso único. O estudo se baseou em uma pesquisa de um paciente apresentando sepse, com suas evoluções clínicas e laboratoriais, em um determinado hospital privado de Minas Gerais. Foram analisadas as evoluções médicas e os exames laboratoriais, como hemograma, hemocultura, antibiograma, exames bioquímicos e imunológicos.

Anteriormente a coleta de dados, será direcionado ao responsável legal do laboratório um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), solicitando-o autorização para realização da pesquisa, no qual estarão explicitados os objetivos e técnicas para coleta de dados, bem como os aspectos éticos da pesquisa, além da garantia do sigilo e o anonimato para com o paciente participante da pesquisa. Será então solicitada à assinatura do TCLE em duas vias, autorizando a execução da pesquisa pelo responsável legal do laboratório.

Realizou-se uma análise de dados diretos e indiretos, onde eles foram obtidos de um software (Tasy) usado pela empresa para controle de dados e resultados de exames dos pacientes. O presente estudo analisou as principais amostras e resultados de sangue do paciente, realizada no período de janeiro a março do ano de 2020, e as evoluções clínicas respectivas também a esse período. Referente aos dados coletados no software foi realizada a análise com duplo observador.

Após obter os resultados laboratoriais, foi separado o número de prescrição e prontuário de cada cadastro do respectivo dia do paciente, e separado em arquivo Word com seus resultados laboratoriais e manifestações clínicas do dia.

Os resultados obtidos irão revelar se há uma correlação nos exames relacionando com o quadro clínico de sepse do paciente.

### Coleta de Sangue e análise clínica da amostra

A coleta de sangue do paciente foi realizada por enfermeiros ou técnicos de enfermagem, e levadas para o laboratório imediatamente. Juntos com as

amostras de sangue, é direcionado um pedido médico com os exames para serem realizados. As coletas de sangue foram coletadas por via punção venosa ou arterial, em tubos a vácuo no período estipulado pelo médico (manhã, tarde ou noite).

Após a centrifugação do sangue para amostra bioquímica, o soro foi inserido no aparelho ADVIA® de bioquímica para a realização das análises do resultado. Assim como foram realizadas as análises do hemograma e dos respectivos exames de microbiologia, gasometria e exames de coagulação.

### Testes Laboratoriais

#### Perfil Bioquímico

As dosagens de ácido láctico, creatinina, ureia, eletrólitos, PCR e glicose, foram realizadas no aparelho automatizado de bioquímica ADVIA®.

#### Perfil Hematológico

As amostras de sangue do paciente também foram coletadas por via venosa em tubo de EDTA. Após o cadastro dos exames no software do hospital, foram passados no aparelho de hematologia **Coulter LH 750 Hematology Analyzer®**

#### Exames de Coagulação

Os exames de coagulação como TAP e TTPA, também foram coletados em tubos específicos de citrato de sódio, para a realização da análise da amostra. Estes foram analisados no aparelho **Huma Clot Junior**.

#### Exames Microbiológicos

Para análise das hemoculturas, foi utilizado o aparelho **BD BACTECT™**, com o sistema automatizado, com a finalidade de detecção do crescimento de microrganismos em amostras de sangue. Os demais exames de cultura foram estabelecidos meio de cultura apropriado para este fim.

#### Exames de Gasometria

Para os resultados de gasometria arterial e venosa foi utilizado o sistema de Gasometria **RAPID Point® 500**, liberando os resultados com 60 segundos, para uma análise médica mais flexível e rápida.

#### Controle Interno

Todas as amostras de sangue foram passadas nos aparelhos após o controle interno do laboratório, passado durante a manhã, tarde e noite. Exames alterados foram repetidos e confirmados para a liberação do resultado.

### 3. Resultados e discussões

#### Evolução Clínica do paciente

Paciente 80 anos, sexo masculino, hipertenso, coronariopata, tabagista, e há seis meses em tratamento de TEP (Tromboembolismo pulmonar). Deu entrada em janeiro de 2020 no pronto atendimento apresentando quadro confusional em evolução há três dias. Em uma análise resumida, de janeiro a março de 2020, o paciente apresentou agitação psicomotora, crises convulsivas de longa e curta duração e rebaixamento do sensório, piores neurológicas decorrentes, picos febris, quadro de dor abdominal aguda intensa, micção com dificuldade e polaciúria, quadros decorrentes de constipação intestinal e diarreia, vômitos, hemorragia subconjuntival no olho direito, sem lesões na mucosa oral, pequena hemorragia em região temporal mesial a esquerda com edema adjacente.

#### Resultados laboratoriais

Esse estudo analisou os principais resultados laboratoriais do paciente (sexo masculino, 80 anos) durante o período compreendido entre janeiro a março de 2020. Durante esse período, foram realizados: 6 (seis) hemogramas, 11 (onze) exames de coagulação, 2 (dois) exames parasitológicos, e 3 (três) resultados microbiológicos, incluindo gram da gota de exame de urina rotina. No setor de bioquímica, foram realizados 53 (cinquenta e três) exames. Em uma análise hematológica, foi observado um comprometimento dos eritrócitos, variando de 2,4 a 4,27 (valor de referência: 4,5 a 6,7 milhões/mm<sup>3</sup>), alterações significativas nas dosagens de hemoglobina, variando de 8,5 a 14,0 (valor de referência: 14 a 18 g/dl), assim como também, comprometimento do hematócrito do paciente, podendo afetar seu desenvolvimento eritropoiético, variando de 24,8 a 43,4 (valor de referência: 41,5 a 54,7%). O paciente apresentou oscilação da global de leucócitos, ora apresentando uma leucopenia, ora apresentando uma leucocitose, variando de 2.100 /mm<sup>3</sup> a 14.400/mm<sup>3</sup> (valor de referência: 3.500 a 11.000/mm<sup>3</sup>). Em uma relação de neutrófilos, linfócitos e bastonetes, foi analisado uma neutrofilia e linfopenia durante os meses. Em uma análise das plaquetas, houve uma oscilação constante de janeiro a março, observado uma trombocitopenia e plaquetas normais, variando de 88.000 a 154.000 (valor de referência: 130.000 a 450.000/mm<sup>3</sup>). Em uma análise bioquímica houve pequenas alterações nos eletrólitos (cloreto, potássio e sódio, magnésio e fósforo), e elevações no resultado de PCR (proteína C reativa). Assim como uma alteração das escuras nitrogenadas. Na

gasometria apresentou acidose mista. Em uma análise da tabela 1- Resultado de bactérias positivas de janeiro a março de 2020, mostra a confirmação de resultados microbiológicos do paciente.

Tabela 1- Resultado de bactérias positivas de janeiro a março de 2020

Dia/Mês	Material	Bactéria	Característica (Gram)
31/01	urina	<i>Proteus sp</i>	Gram negativo
21/02	fezes	<i>Clostridium difficile</i>	Gram positivo
28/02	Sonda vesical	<i>Klebsiela sp</i>	Gram negativa
04/03	Secreção traqueal	<i>Serratia sp</i>	Gram negativa

Fonte: (autor próprio)

#### 4. Conclusão

A sepse é um problema de saúde pública mundial e o Brasil faz parte desse cenário. Vários estudos realizados demonstram que a sepse acarreta diversos prejuízos ao paciente. Diante do estudo de caso único desenvolvido, espera-se que este trabalho promova o auxílio para diversos profissionais de saúde para o diagnóstico mais rápido possível da sepse, proporcionando para a equipe hospitalar uma melhor elaboração e execução para o atendimento em conjunto de um paciente já debilitado com as possíveis características e sintomas da doença.

Nessa pesquisa, pode-se analisar através da observação do paciente estudado e através de artigos científicos, o quanto a sepse pode se tornar agravante. Tanto por problemas de falta de utensílios laboratoriais como reagentes ou ausência de meios de cultura, assim como também a precariedade da UTI, e materiais de meios de trabalho da enfermagem. Outro fator que também afeta o paciente é a demora para o diagnóstico de sepse.

Contanto, sabe-se o quanto é necessário o domínio do auxílio imediato pelos profissionais de saúde, tanto da parte médica, triagem e laboratorial, sendo necessário da parte clínica a implantação de protocolos únicos de sepse, podendo assim favorecer fatores amenizantes para uma possível sepse mais agravante

Conclui-se assim, que a sepse é uma disfunção de alto risco não só para os pacientes imunossuprimidos, mas como também para outras classes de pessoas no qual podem desenvolver a sepse. A prior, a sepse possui uma maior

prevalência em países em desenvolvimento, sendo cerca de mais de 80%, segundo estudos desenvolvidos pela revista americana, onde o autor Fleischam faz uma avaliação de sepse no mundo.

Os exames laboratoriais são de extrema importância para o auxílio de diagnóstico da sepse, sendo estes de grande valia para indício de alguma disfunção nos órgãos e sistemas, e até mesmo para identificação bacteriana, assim como a liberação dos devidos antibióticos específicos para o tratamento da sepse.

A prevenção e cuidados rotineiros com a saúde é a melhor forma de evitar essa patologia, sendo estes por meio de avaliações e consultas clínicas, e realizações de Check-up de exames laboratoriais. Dessa forma, reduzem-se as chances para o surgimento da sepse, sendo esta, podendo ocorrer até mesmo através de uma pequena infecção bacteriana no trato urinário por exemplo. Em razão da relevância do tema, torna-se imprescindível a importância que este estudo seja aprofundado ou seja dado um contínuo no referido assunto, como também, a reavaliação dos protocolos hospitalares iniciais e posteriores das atividades desenvolvidas pela equipe desde a recepção, até mesmo pelos serviços dos profissionais de saúde

### 5. Apoio financeiro

Apoio realizado pela instituição de origem do laboratório hospitalar FOB- Hospital Fundação Ouro Branco, onde obteve a colaboração de coleta de dados para o estudo de caso único.

### 6. Referências

Barros, L.; Maia, C.; Monteiro, M. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. *Cad. Saúde Colet.*, 2016, Rio de Janeiro, 24 (4): 388-396

Daniel Zoppi. Médico Assistente da Divisão de Emergências Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP, **Sepse e choque séptico na emergência**, 2017

FLEISCHMANN, Carolin et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2016

GARRIDO, Felipe et al. Ações do enfermeiro na identificação precoce de alterações sistêmicas causadas pela sepse grave. **ABCS Health Sciences**, v. 42, n. 1, 2017.

Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse (ILAS), **IMPLEMENTAÇÃO DE PROTOCOLO GERENCIADO DE SEPSEPROTOCOLO CLÍNICO**. Revista Eletrônica, 2018. Acesso em: 07/04/2020

Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse (ILAS), Sepse: um problema de saúde pública. Revista Eletrônica, p. 19-25,2015. Acesso em: 27/02/2020

PERIN, Christiano et al. Epidemiologia e perfil de sensibilidade dos germes isolados de hemoculturas de pacientes hematológicos com neutropenia febril. **Clinical&BiomedicalResearch**, v. 26, n. 1, 2006.

SILVEIRA, S.R., FERREIRA, L.F.L. e LAGE, M.H.H. Fisiopatologia da sepse: revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 9, Ed. 258, Art. 1709, Maio, 2014

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## PROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS A PARTIR DA EPIDERMIS DE ANUROS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO – MG

Fernandes, C. H. P.<sup>1</sup>; Cordeiro, I. F.<sup>1</sup>; Sanchez, A.B.<sup>1</sup>; Matos, R. C.<sup>1</sup>; Moreira, L. M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

E-mail: camilahenriquesp@gmail.com

**Resumo:** O controle biológico utilizando bactérias como antagonistas é uma maneira eficiente para o controle de pragas causadas por fungos. Neste cenário, o objetivo geral deste trabalho foi prospectar o potencial antifúngico de isolados bacterianos cultiváveis obtidos a partir da pele de quatro espécies de anuros coletados na Estação Ecológica do Tripuí. Assim, 192 isolados bacterianos foram investigadas quanto à capacidade de atuarem como biocontroladores de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Para o ensaio inicial, todos os isolados foram avaliados contra *F. oxysporum*, por meio de ensaio de inibição direta. Destes, 15 foram capazes de inibir em até 60% do crescimento do fungo. Estes 15 isolados foram então selecionados para o ensaio de inibição direta contra o *C. lindemuthianum*, seguindo o mesmo protocolo. Oito apresentaram taxa de inibição superior a 80%, dentre eles, dois com inibição de 100% do crescimento. Esses 8 isolados foram submetidos a outros ensaios de inibição e apresentaram resultados equivalentes aos testes anteriores. Porém, nenhum foi capaz de inibir por meio da produção de compostos voláteis. Além disso, foram realizados ensaios de produção de enzimas, produção de biofilme, auto-agregação, fixação de N e solubilização de fosfato para estes 8 isolados, dos quais apresentaram resultado positivo para produção de enzimas, produção de biofilme, auto-agregação, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Além disso, os gêneros dos 8 isolados foram identificados. Desta forma, conclui-se que estes isolados bacterianos apresentam potencial antagonico até então desconhecido com características fisiológicas que os apontam como potenciais agentes biocontroladores contra fungos de importância agrícola.

**Palavras-chave:** antagonismo; anurofauna; controle biológico; microrganismos; prospecção.

### 1. Introdução

A Estação Ecológica do Tripuí (EET) está localizada no Quadrilátero Ferrífero, Ouro Preto, MG e destaca-se por sua elevada biodiversidade, com destaque para a anurofauna (MYERS et al., 2000).

Em paralelo, as bactérias possuem capacidade de perceber a presença de outros organismos ao seu entorno, bem como alterações no meio em que estão inseridas, sendo essa característica primordial para sua sobrevivência. Para que as mesmas se estabeleçam em um ambiente, é necessário que seus genes sejam expressos em resposta a sinais de possíveis ameaças do ambiente e a microbiota presente (ROMEIRO, 2007).

Recentemente, nossa equipe demonstrou que a microbiota associada a diferentes espécies de anuros desta região apresentam elevada tolerância a metais pesados (CORDEIRO et. al., 2019). Neste trabalho, esta mesma microbiota cultivável foi investigada quanto a seu potencial antifúngico. Para isso, 192 isolados bacterianos obtidos a partir da pele das espécies *Boana albopunctata*, *Boana faber*, *Rhinella crucifer* e *Ischnocnema izecksohni* foram investigadas como potenciais controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, agentes causais da fusariose e da antracnose, respectivamente, e que acometem diversas culturas agrícolas de interesse comercial, acarretando prejuízos severos.

O objetivo geral deste trabalho foi prospectar o potencial antifúngico de isolados bacterianos obtidos a partir da epiderme de quatro espécies de anuros citadas anteriormente. E os específicos

foram verificar características microbiológicas fundamentais dos isolados bacterianos; verificar se as possíveis inibições são decorrentes de produtos difusíveis ou voláteis; e identificar os isolados bacterianos com maior potencial biotecnológico.

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleta e cultivo da microbiota

A coleta da microbiota cutânea dos anuros foi realizada com o auxílio de um SWAB estéril e cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (CORDEIRO et. al., 2019). Para cada SWAB impregnado, foram realizadas diluições em até 10<sup>8</sup>. Para o isolamento das bactérias, foi realizada a técnica de esgotamento, o que permitiu a obtenção de colônias isoladas. Desta forma, foram obtidos 192 isolados bacterianos (CORDEIRO et. al., 2019).

### 2.2 Cultivo dos patógenos alvos

Discos miceliais foram coletados com auxílio de canudos de plástico estéreis, de 6 mm de diâmetro, os quais foram transferidos, com auxílio de um palito estéril, para placas de Petri contendo o mesmo meio. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 28°C por 7 dias para o *Fusarium oxysporum* e a 26°C por 14 dias para o *Colletotrichum lindemuthianum*.

### 2.3 Avaliação da atividade antagonista por inibição direta contra os fitopatógenos

Para caracterização inicial de ação antagônica, os 192 isolados foram avaliados contra o *F. oxysporum*, por meio de ensaio de inibição direta. Para isso, as bactérias com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) padronizada em 0,1, foram semeadas na forma de um quadrado de aresta de 3 cm, no centro de placas de Petri de 90x15 mm, contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Posteriormente, um disco micelial de 6 mm de diâmetro, de uma cultura de fungo em meio BDA, foi inserido na porção central do quadrado e incubado a 28°C, até que o crescimento do fungo na placa controle (sem bactéria) atingisse 30 mm de diâmetro.

Os isolados que apresentaram um melhor desempenho foram avaliados contra o *C. lindemuthianum*, nos mesmos modelos metodológicos estabelecidos para *F. oxysporum*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.4. Avaliação da atividade antagonista por inibição indireta por compostos difusíveis contra fitopatógenos

Inicialmente, acondicionou-se o papel celofane P45 estéril sobre o meio BDA previamente vertido em placas de Petri de 90x15mm. Sobre a superfície deste papel celofane 200µl da cultura de bactérias com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) ajustada em 0,1, foram pipetadas, e a suspensão homogeneamente distribuída por toda a superfície.

Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h, a 26°C para *C. lindemuthianum* e 28°C para *F. oxysporum*. Após esse período, retirou-se o papel celofane contendo colônia de bactéria, e sobre a superfície do meio BDA foi inserido no centro da placa um disco micelial de 6 mm de diâmetro, derivado de uma cultura de fungo em meio BDA previamente cultivado. As placas foram novamente incubadas até que o crescimento do fungo na placa controle (sem bactéria) atingisse 30 mm de diâmetro, diâmetro este verificado com auxílio de um paquímetro digital.

### 2.5. Avaliação de termoestabilidade dos isolados e compostos difusíveis

Inicialmente, 200 µL dos isolados bacterianos foram acondicionados em termobloco à 80°C por 5 min. Em seguida todos os passos metodológicos estabelecidos com uso de papel celofane, anteriormente descritos, foram realizados.

### 2.6. Avaliação da atividade antagônica indireta mediada por compostos voláteis

Este ensaio foi adaptado de Bomfim et. al., 2010. Foram utilizadas placas de Petri de 90x15mm septadas de 3 câmaras contendo meio BDA. Um disco de micelial foi inserido em uma das câmaras, 10 µL de uma cultura com OD<sub>600</sub> = 0,1 da potencial bactéria controladora em outra câmara, ficando a terceira câmara vazia. As placas foram incubadas até que o crescimento do fungo na placa controle (sem bactéria) atingisse 30 mm de diâmetro.

### 2.7. Avaliação dos ensaios de Inibição

Após o período de incubação, a taxa de inibição foi calculada medindo-se o diâmetro de crescimento do fungo, seguido da exclusão da medida de 6 mm referente ao disco micelial previamente inoculado.

### **2.8. Ensaios de produção de amilase, celulase e protease**

Os isolados foram crescidos em meio LB por 24 h a 28°C, e tiveram a OD ajustada para 0,1. Em seguida, 2µl da suspensão de bactérias foi aplicado no centro da placa, com meios específicos para cada enzima, que por sua vez foi incubada por 48 h a 28°C. Para revelar o ensaio, cobriu-se o meio de cultura com soluções específicas para cada enzima (STRAUSS et al., 2001 & MENEGATTO, 2019).

### **2.9. Avaliação dos ensaios de produção de enzimas**

A avaliação desses ensaios consistiu na medição do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo transparente formado após incubação, o que indica resultados positivos. Foi realizado o cálculo de Índice Enzimático (Hankin e Anagnostakis et. al.,1975) para determinar a atividade enzimática dos isolados (Diâmetro do halo/ diâmetro da colônia). (STRAUSS et al., 2001).

### **2.10. Ensaios de produção de biofilme**

Este ensaio foi adaptado de Muzzolón (2010). A cultura dos isolados bacterianos em meio LB previamente mantidos a 28°C tiveram suas OD<sub>600nm</sub> ajustadas a 0,1. Em seguida, 200 µL desta suspensão foram rearranjados em placa estéril de 96 poços e armazenadas em BOD a 28°C. Após esse período, a placa foi enxaguada em água por duas vezes e deixada secar por uma hora invertida na bancada e sobre papel absorvente. Em seguida, acrescentou-se 125 µl de cristal violeta, deixando agir por 45 min. Posteriormente, as placas foram lavadas e deixadas para secar por uma hora em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 125 µl de álcool a 95%, deixando agir por 45 min. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro das soluções a 550 nm e, com os dados obtidos foram gerados os gráficos.

### **2.11. Ensaios de auto-agregação**

Este ensaio foi adaptado de Muzzolón (2010). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio LB durante 24 h, após esse período, centrifugou-se a cultura a 15000 *xg*, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de PBS. As culturas foram padronizados com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) em 0,1, diluindo-as com PBS e deixadas em repouso por duas horas, a 37°C. O sobrenadante foi utilizado para medição da OD.

### **2.12. Ensaio de solubilização de fosfato**

Este ensaio foi adaptado de Katznelson & Bose (1959). Os isolados bacterianos foram padronizados com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) em 0,1 meio LB, previamente mantidos a 28°C. Em seguida, foram inoculados 2 µl das culturas no centro das placas de Petri de 90x15 mm de diâmetro contendo meio sólido fosfato. As placas foram acondicionadas em BOD a 28°C por 10 dias. Este ensaio visou a observação de um halo translúcido ao redor do crescimento das colônias.

### **2.13. Ensaio de fixação de nitrogênio**

Este ensaio foi adaptado de Rennie, 1981. Os isolados bacterianos previamente crescidos em meio LB a 28°C foram padronizados com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) em 0,1 e adicionados em microtubos contendo meio específico, incubando por 5 dias a 28°C. Esse ensaio visou observar a formação de película na superfície do meio.

### **2.14. Extração do DNA genômico**

A metodologia usada para a extração do DNA dos isolados bacterianos foi previamente descrita por Queipo-Ortuño et al. (2008) e Diana et al. (2012). Um volume de 1,5 mL de meio líquido contendo células bacterianas, crescidas por 24 h, a 26°C em meio LB, foram centrifugadas a 15000 *xg* por 15 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água ultra pura, e centrifugado em 15000 *xg* por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspensionado em 40 µL de água ultra pura, e assim as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 min e logo depois foram colocadas no freezer a -20°C por 10 min. Depois foram centrifugadas a 15000 *xg* por 20s, e retirado o sobrenadante contendo o DNA genômico.

### **2.15. Amplificação da região 16S e Análise das sequências obtidas**

Os isolados foram submetidos a reações de PCR, as amostras foram quantificadas e a reação de sequenciamento foi realizada pelo Método de Sanger (Altschul, 1990).

As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn, no banco de dados 16 S, disponível no portal NCBI. Para isso, as sequências Fastas passaram por uma avaliação de qualidade e os nucleotídeos indefinidos (N) foram eliminados de ambas as extremidades. A partir daí, foram analisadas pela ferramenta Blast



contra o banco de sequências de RNAs ribossomais.

O perfil filogenético, baseado na sequência do gene ribossomal 16S foi determinado pelo programa Phylogeny-Fr usando os parâmetros padrão para análises a partir de um único clique.

### 3. *Resultados e Discussão*

Dos 192 isolados bacterianos testados inicialmente, 15 apresentaram resultado positivo para antagonismo direto contra *F. oxysporum*, com taxas entre 24 e 60%. Destes, 8 isolados se destacaram por inibir *C. lindemuthianum* pelo mesmo ensaio, com taxas entre 80 e 100%.

Diante disso, 2 destes isolados foram selecionados para testes posteriores contra *F. oxysporum* e 7 contra *C. lindemuthianum*. Estes apresentaram resultado positivo para inibição indireta por compostos difusíveis com taxas entre 40 e 73% contra *F. oxysporum* e 96 a 100% contra *C. lindemuthianum*.

Quanto ao teste de inibição indireta por compostos difusíveis e termoestáveis, os isolados apresentaram taxas de inibição entre 30 e 50% contra *F. oxysporum* e 72 e 100% contra *C. lindemuthianum*.

Em relação ao ensaio de inibição indireta por compostos voláteis, os resultados foram negativos, evidenciando que essas bactérias não produzem substâncias voláteis inibitórias.

Além disso, 6 dentre os 8 isolados testados, foram capazes de produzir as três enzimas e todos eles apresentam capacidade de se autoagregar e formar biofilme. Ademais, 6 destes isolados foram capazes de solubilizar fosfato e 4 de fixar nitrogênio.

No presente estudo, os isolados bacterianos apresentaram diferentes gêneros tais como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pantoea sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Raoultella sp.*

Estudos mostram que alguns fatores importantes para a supressão de fitopatógenos podem estar relacionados a metabólitos como antibióticos, enzimas e compostos voláteis produzidos por bactérias (HAAS; DEFAGO, 2005; FERNANDO et al., 2005; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; LI et al., 2012; AL-MUGHRABI et al., 2013). Além disso, metabólitos biológicos são muito menos danosos ao meio ambiente, contrapondo o uso de compostos químicos, os quais são os mais utilizados para o tratamento de fitopatologias.

Em paralelo a este cenário de importância da descoberta de novas biomoléculas de interesse biotecnológico, nas últimas décadas, muitas

espécies de anfíbios vêm sofrendo declínio (LIPS et al. 2006). Neste contexto, a utilização de anfíbios como fonte de bactérias a serem utilizadas como controladores biológicos, gera significado econômico à importância da conservação, agregando não apenas valores a serviços ecossistêmicos, mas também destacando uma área até então não estudada sob esta perspectiva no território nacional.

### 4. *Conclusões*

Ainda não existem formas de manejo eficazes contra a fusariose e antracnose, sendo assim, torna-se necessário a criação de estratégias eficientes para o controle de tais doenças. O controle biológico, utilizando microrganismos, é uma maneira eficiente e sustentável para o manejo de fitopatologias.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que os isolados bacterianos apresentados neste trabalho apresentam potencial antagônico contra fungos de importância agrícola até então desconhecido, apresentando-se como uma possibilidade promissora para o controle de doenças causadas pelos fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* em plantas.

### 5. *Apoio Financeiro*

UFOP, Capes, CNPq, Fapemig.

### 6. *Referências*

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215:403-410.
- BERLEMAN, J. E.; KIRBY, J. R. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiology Review*, v. 33, p. 942-57, 2009.
- BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Antagonic effect in vitro and in vivo of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.61- 67, 2010.
- CORDEIRO, I. F. et al. Arsenic resistance in cultured cutaneous microbiota is associated with anuran lifestyles in the Iron Quadrangle, Minas Gerais State, Brazil. *Ouro Preto*, 2019.

- DUELLMAN, W. E., & TRUEB, L. (1986). *Biology of amphibians*. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 670p.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.
- HAAS, D.; DEFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 307-319, Apr. 2005.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.5, p.79-85, 1981.
- LIPS, K. R.; BREM, F.; BRENES, R.; REEVE, J. D.; ALFORD, R. A.; VOYLES, J.; CAREY, C.; LIVO, L.; PESSIER, A. P.; COLLINS, J. P. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2006).
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.; Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*, v. 63, p. 541-556, Oct. 2009.
- MENEGATTO, M. B. S. Avaliação do potencial celulolítico e fermentativo de bactérias do gênero *Clostridium* e da microbiota autóctone na fermentação do bagaço de cana bruto. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 87p, 2019.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA G. A., & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D. D., Macias, M., Bravo, M. J., and Morata, P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15(2), 293-296.
- RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review Phytopathology*, v. 50, p. 403-424, 2012.
- RENNIE, R.J. A single médium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogenfixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.27,p.8-14, 1981.
- ROMEIRO, R. da S. Controle biológico de doenças em plantas: Fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 2007b. 269p.
- ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas*. Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 85-99, 2009.
- STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.;VAN RESEMBURG,P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by nonSaccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001. 182–190.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA SERRA DA CANASTRA

**Ferraz<sup>1</sup>, K. S.; Gonçalves<sup>2</sup>, S. M.; Monteiro<sup>3</sup>, L. J. M.; Valentini<sup>4</sup>, H. S.; Rocha<sup>5</sup>, B. A. R.; Almeida<sup>6</sup>, A. A. P.**

<sup>1</sup> Kamylle Silva Ferraz, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>2</sup> Sara Maria Gonçalves dos Santos, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>3</sup> Luanna Jessie Moreira Monteiro, Biomédica, Universidade FUMEC

<sup>4</sup> Helena Salles Valentini, acadêmica do curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

<sup>5</sup> Bernardo Alonso Ribeiro Rocha, acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

<sup>6</sup> Ana Amélia Paolucci Almeida, Doutora em Ciência de Alimentos, Professora/Pesquisadora do Curso de Biomedicina, Universidade FUMEC

E-mail: aamelia@fumec.br

**Resumo:** A produção artesanal do queijo representa uma alternativa bem sucedida de conservação e aproveitamento da produção leiteira regional. O objetivo do presente estudo foi acompanhar a maturação com as alterações microbiológicas e análises físico-químicas de um queijo produzido de forma artesanal. Neste trabalho foram realizadas análises microbiológicas de coliformes a 30°C e identificação de *Escherichia coli* e análises físicas de pH, medidas do diâmetro, altura e massa da amostra; análises químicas de umidade e cinzas. Foram também isoladas culturas de fungos filamentosos responsáveis pela maturação, em uma amostra de queijo do tipo Canastra, produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, durante o segundo semestre de 2019. Foi observado que os resultados de pH, cinzas, extrato seco total e coliformes estavam dentro dos parâmetros desejados para esse tipo de amostra, exceto a umidade, que obteve resultados abaixo dos parâmetros, além de comprovado o crescimento de *E. coli*. Pretende-se, em uma segunda etapa identificar os fungos isolados do queijo responsáveis pelo seu aroma, textura e sabor, bem como os processos através dos quais eles se desenvolvem no queijo.

**Palavras-chave:** queijo; Canastra; artesanal; físico-química; coliformes; maturação .

### 1. Introdução

A produção artesanal do queijo representa uma forma alternativa, conveniente e bem-sucedida de conservação e aproveitamento da produção leiteira regional, transformando-o em um produto estável,

palatável, cujas qualidades são mantidas. Em cada uma das regiões há um modo de preparo, desde a manipulação do leite, dos coalhos e das massas, até a prensagem e tempo de maturação (cura), conferindo a cada queijo aparência e sabor específicos (IPHAN, 2008). A qualidade do queijo está diretamente ligada a qualidade do leite, sendo necessário rígido controle de qualidade durante as fases de processamento.

O Parque Nacional da Serra da Canastra é uma importante região produtora de queijo artesanal no Brasil. A região situa-se no domínio fitogeográfico do Cerrado, com clima predominantemente tropical sazonal, de inverno seco, com temperatura média anual em torno de 22-23° C e precipitação média anual em torno de 1.200 e 1.800mm (ICMBIO, 2005).

Devido ao clima, a altitude, os pastos nativos e as águas da Serra da Canastra o queijo Canastra tem um sabor único: forte, um pouco picante, denso e encorpado. É o produto típico mais importante da região da Serra da Canastra, em Minas Gerais, produzido há mais de duzentos anos, recebendo título de patrimônio cultural imaterial brasileiro, pelo IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional), em 2008.

No Brasil, há uma grande diversidade de queijos e parte dessas características é proveniente de ação microbiana, principalmente em queijos artesanais do estado de Minas Gerais. Esses microrganismos são responsáveis por proporcionar características como aroma, sabor, cor e textura únicas ao alimento (UFLA, 2019).

A partir do queijo várias espécies de fungos foram sendo utilizadas pelo homem ao longo do tempo, visando a produção de novos tipos e

melhores queijos. Características como sabor, odor, textura, cor e outras propriedades conferidas aos queijos são resultado da ação dos fungos sobre o leite utilizado na produção, que desempenha papel importante especialmente na maturação inicial do queijo (UNESP, 2015).

No queijo Canastra artesanal produzido na região da Serra da Canastra, a ação do fungo confere uma casca branca de mofo, firme ao toque e um interior extremamente macio, com aroma marcante e um sabor que pode ser delicado ou intenso (TRIBUNA DE MINAS, 2017).

O estudo visou pesquisar a qualidade microbiológica e físico-química do queijo do tipo Canastra, produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, Minas Gerais. Procedimentos baseados em técnicas de análises de alimentos, foram realizados com o objetivo de se isolar e caracterizar os fungos que fazem parte do processo de maturação do queijo, e observar as mudanças ocorridas no produto ao longo do tempo.



**Figura 1:** Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra

## 2. Metodologia

Para a realização do estudo, foi coletada amostra de queijo tipo Canastra, produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, disponibilizado por um produtor local (FIG.1). A amostra foi coletada com 20 dias de maturação, em temperatura ambiente, na própria embalagem do fabricante e foi analisada durante o período de agosto/2019 a dezembro/2019 no Laboratório de Análises Clínicas e Complementares I, da Universidade FUMEC. O experimento integrou três etapas distintas: a) coleta de queijo para análise; b) análises físico-químicas; c) análises microbiológicas.

Durante quatro semanas, iniciando-se no 28º dia até o 43º dia de maturação, semanalmente a amostra foi pesada, medida (diâmetro e altura) e analisada em duplicata com leitura de pH, umidade, cinzas e coliformes. A amostra foi mantida em estufa com umidade estável e temperatura média de 26°C. Os microcultivos dos fungos, presentes na casca do queijo, foram realizados nas duas últimas semanas de maturação do queijo, período esse em que o fungo havia se desenvolvido. Em seguida, foram observados em microscópio ótico para a caracterização dos fungos presentes na superfície do queijo.

A presença de coliformes foi realizada pela técnica do número mais provável pela formação de gás devido a fermentação da lactose. A análise de *Escherichia coli* foi também realizada (SILVA *et al.*, 2017).

Foram realizados microcultivos a partir do 36º dia de maturação da amostra de queijo com o objetivo de isolar os fungos, em várias partes diferentes da amostra.

Os fungos isolados foram inoculados em placas de Ágar Batata e Ágar Fubá, para observar se o meio de cultura interferia no crescimento dos fungos.

## 3. Resultados e Discussão

Durante os 23 dias de análise, que compreenderam entre o 20º ao 43º dia de maturação do queijo, a amostra foi mantida em estufa, com temperatura média de 26°C e umidade estável.

Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos da amostra de queijo do tipo Canastra encontram-se apresentados na Tabela 1. Observa-se uma diferença nos resultados durante os 23 dias de maturação para alguns dos parâmetros avaliados. Sabe-se que a maturação representa em uma série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem em todos os queijos, e estes processos são responsáveis por alterar a composição química dos queijos (ROCHA, 2004).

Devido às amostragens semanais, a massa do produto foi sendo alterada ao longo do estudo, mas foi possível observar também uma perda de massa entre  $P^f$  (peso final) de uma semana e  $P_i$  (peso inicial) da semana seguinte, constatando alteração da amostra. Os parâmetros de altura e diâmetro não apresentaram alteração durante o período de maturação.

Tabela 1- Valores médios das análises físico-químicas realizadas em uma amostra de queijo do tipo Canastra, produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, com 20 dias de maturação, durante quatro semanas.

Variações	Dias de Maturação		
	28° e 29° dia de maturação	36° dia de maturação	43° dia de maturação
Peso (g)	P <sub>i</sub> = 909,0 g P <sub>f</sub> = 794,0 g	P <sub>i</sub> = 775,6 g P <sub>f</sub> = 649,8 g	P <sub>i</sub> = 638,2 g P <sub>f</sub> = 514,9 g
Altura (cm)	5	5	5
Diâmetro (cm)	16	16	16
pH	5,84	5,96	6,14
Umidade - % média	32,95%	25,83%	15,91%
Extrato seco total -% média	67,04%	74,16%	84,07%
Cinza total -% média	4,11%	4,15%	4,47%

Foi observado que, com o passar dos dias de maturação do queijo, o pH foi tornando-se mais alcalino, com uma média final de pH de 6,14.

Os valores de umidade foram decrescendo com o passar dos dias de maturação, com média final de 15,91%. Segundo Oliveira (1981), o teor de umidade varia e está correlacionado com o tempo de conservação do queijo. A umidade interfere na atividade da água e ações metabólicas de microrganismos ao longo da maturação, e com suas possíveis consequências no pH, na textura, no sabor e no aroma do produto (FREITAS FILHO *et al.*, 2009).

A análise de cinzas determina a porcentagem de minerais presentes nos alimentos e apresentou média de 4,24%.

Na análise de coliformes totais da amostra de queijo, o resultado apresentou 40 NPM/mL como resultado final de acordo com tabela de Número Mais Provável de Hoskins.

De acordo com a RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), para cada processo de produção e manipulação de alimentos, existem diferentes grupos de microrganismos que devem ser analisados de forma mais atenta, não sendo permitida a presença de alguns, mesmo em pequenas quantidades, pois representam perigo à saúde humana. No estudo, foi analisada a bactéria *E. coli*, e nesse caso em específico para queijo com umidade abaixo de 46%, obtendo resultado de 40 NPM/ml, está dentro do valor de referência estipulado pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Os coliformes são utilizados nos alimentos como indicadores de contaminação de origem fecal, pois a bactéria *E. coli* possui como habitat o trato intestinal de homens e outros animais endotérmicos segundo Mello e Armachuk, 2013. A

pesquisa de coliformes fecais revelou resultado positivo para *E. coli*.

A partir da observação macroscópica do queijo pôde-se visualizar em sua casca a presença de mais de um tipo de colônia de fungos de colorações distintas: uma de coloração esbranquiçada e outra de coloração mais rósea.

Com a inoculação em duplicata de fungos, pôde-se verificar que houve crescimento de colônias de fungos com aspectos viscoso.

A partir do isolamento dessas colônias, pôde-se verificar que houve crescimento de colônias de coloração e aspecto distintos.

Para complementação, foram realizados também a inoculação dos fungos em placas contendo meios Ágar Batata e Ágar Fubá observando-se novamente diferença entre a coloração das colônias. Pode ter ocorrido uma possível contaminação por outras espécies de fungos ou os meios de cultura possuíam nutrientes que possibilitaram o crescimento de outras espécies de fungos.

Ao observar o queijo macroscopicamente, verificou-se mais de um tipo de fungo. Em microscópio ótico observou-se a presença de mais de um tipo de fungo com características de fungos filamentosos, com hifas não septadas, confirmando o achado. Observou-se ainda a presença de estruturas de reprodução, porém não foi possível identificar a espécie, pois para isso é necessário a realização de estudos aprofundados, a partir dos fungos isolados, empregando-se testes bioquímicos e moleculares.

Apesar do crescimento de colônias distintas nas placas, as estruturas observadas foram vistas em todas as lâminas dos fungos isolados. Entretanto, apenas algumas apresentam todas as estruturas de reprodução.

No momento da coleta de amostras para o isolamento dos fungos, foi notado o surgimento de um pó de aspecto fino e coloração marrom que se depositava na embalagem do queijo. Ao observar as placas de isolamento e microcultivo dos fungos notou-se o aparecimento de uma contaminação e durante a visualização das lâminas de fungos ao microscópio foi constatado que havia a presença de ácaros no material isolado. Estes organismos tem sido observados durante o processo de maturação. Acredita-se que esta condição esteja associada à exposição do queijo em um ambiente contaminado por ácaros, segundo Deong e Roadhouse (1922).

Alguns dos ácaros são micófagos e sua capacidade de digerir fungos são determinadas de acordo com as propriedades das enzimas digestivas de cada espécie de ácaro (HUBERT *et al.*, 2015). Além disso, segundo Marcellino e Benson (2013), durante a maturação, uma relação de simbiose é

observada entre ácaros e fungos tendo em vista que os ácaros realizam fissuras no queijo, permitindo a penetração dos fungos no interior da peça.

A amostra de queijo foi analisada do 28º ao 43º dia de maturação, e os parâmetros físico-químicos, medidas e peso obtiveram variações devido a maturação. A baixa alteração de pH durante a maturação pressupõe que o queijo não sofreu uma fermentação excessiva por bactérias ácido lácticas adicionadas na formulação por meio do pingo (soro extraído da produção do dia anterior) ou ação de microrganismos contaminantes.

A umidade decaiu conforme o tempo de maturação do queijo, o que pode ser explicado pelas variações de temperatura da estufa. A umidade é o principal fator para os processos microbiológicos, como o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias. Para produtos perecíveis, o frio é normalmente utilizado como inibidor do processo microbiológico. Assim, as variações na umidade podem ter contribuído para o aparecimento dos ácaros a partir do 34º dia de maturação.

O aumento nos valores de cinzas está ligado ao valor da umidade de forma inversamente proporcional, pois à medida que o queijo perde água, a concentração de analitos aumenta. Dessa forma, com a queda da umidade, o valor de cinzas aumentou de acordo com o esperado.

#### 4. Conclusões

Com relação ao queijo produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, foram isolados fungos filamentosos característicos do produto, entretanto há necessidade de se conhecer mais detalhadamente, além de identificar os fungos isolados. Foi constatado, que os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estavam dentro dos padrões da legislação para esse tipo de amostra, exceto a umidade, que obteve resultados abaixo dos parâmetros regulamentados. Além disso, ficou comprovado o crescimento de *E. coli* na amostra, dentro do padrão permitido.

Por fim, foi observado que com o passar dos dias de maturação a umidade da amostra foi diminuindo, o extrato seco total aumentando, e o pH foi ficando mais básico, o que é característico do processo de maturação do queijo.

Após as análises realizadas, pode-se constatar a importância das análises microbiológicas e físico-químicas para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos que são produzidos artesanalmente. É importante que cada processo da fabricação seja fiscalizado para garantir padronização e melhoria da qualidade, agregando maior valor ao produto nacional.

#### 5. Apoio Financeiro

Apoio financeiro ProPIC – Universidade FUMEC e CNPq.

#### 6. Referências

BRASIL, ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em < [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012\\_02\\_01\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html)>. Acesso em: 9 de maio de 2020.

DEONG, E. R.; ROADHOUSE, C. L. **Cheese Pests and Their Control**. Disponível em: < <https://ia801605.us.archive.org/13/items/cheesepests/their343deon/cheesepests/their343deon.pdf>> Publicado em maio de 1922. Acesso em: 3 de maio 2020.

FREITAS FILHO *et al.* **Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em jucati – pe**. Disponível em <https://periodicos.ufsc.br/index.php/extensio/article/view/1807-0221.2009v6n8p35> Publicado em 2009. Acesso em 2 de abr de 2020.

ICMBIO: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade: **Plano de manejo do parque nacional da serra do canastra**. Disponível em < [http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/pm\\_parna\\_serra\\_canastra\\_1.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/pm_parna_serra_canastra_1.pdf) > Publicado em 2005. Acesso em: 19 fev. 2020.

IPHAN: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Modo artesanal de fazer queijo de minas**. Disponível em < <http://portal.iphan.gov.br/mg/pagina/detalhes/65>>. Acesso em: 1 out. 2019.

MARCELLINO, S. N.; BENSON, D. R. **The Good, the Bad, and the Ugly : Tales of Mold-Ripened Cheese**. Disponível em: <<https://www.asmscience.org/docserver/fulltext/microbiolspec/1/1/CM-0005-12.pdf?expires=1589741150&id=id&accname=guest&checksum=181D7A77E48432AD89B1DC15DBC9A149>>. Publicado em: 31 out. 2013. Acesso em: 3 de maio 2020.

MELLO, E. Z; ARMACHUK, M. A. **Avaliação do queijo colonial durante a maturação: modificações físico-químicas e microbiológicas**. Disponível em <<http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2087/1>>

/FB\_COALM\_2013\_1\_02.pdf>. Publicado em set. 2013. Acesso em: 03 Mar. 2020.

OLIVEIRA, J.S. **QUEIJO: FUNDAMENTOS TECNOLÓGICOS**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia / Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1981. 233 p.

ROCHA. **Controle de fungos durante a maturação de queijo minas padrão**. Disponível em <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5637>>. Publicado em jul. 2004. Acesso em: 3 de mar. 2020.

SILVA *et al.* **Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher, 5 ed, 2017, 560p.

STEJSKAL, V.; HUBERT, J.; AULICKY, R.; KUCEROVA, Z. **Overview of present and past pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective**. Disponível em: file:///C:/Users/55319/Downloads/PROOFStejskalHubertAulickyKucerova2015JSPRdoiEmergingpests.pdf Publicado em 2012, Acesso em: 3 de maio de 2020.

TRIBUNA DE MINAS. **Conheça o queijo de fungo branco da canastra**. Disponível em <<https://tribunademinas.com.br/blogs/na-cozinha-com-claudinha/11-08-2017/conheca-o-queijo-de-fungo-branco-da-canastra.html>> Publicado em 11 ago. 2017. Acesso em: 2 de abr. 2020.

UFLA: Universidade Federal de Lavras. **Queijos artesanais**. Disponível em < <https://ufla.br/noticias/pesquisa/13290-pesquisado-res-da-ufla-utilizam-fungos-tipicos-da-serra-da-canastra-para-melhorar-a-qualidade-do-queijo-artesanal>>. Publicado em 24 set.2019. Acesso em: 15 fev. 2020.

UNESP: Universidade Estadual Paulista. **Fungos e queijos**. Disponível em < <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2015/Fungos%20e%20queijos.pdf>>. Publicado em 2015. Acessado em: 15 fev. 2020.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Myrciaria cauliflora* E DA *Eugenia uniflora* L.

Magalhães<sup>1</sup>, R. S.; Stewart<sup>1</sup>, S. S. e Crispim<sup>1</sup>, J. S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Colégio Técnico/Setor de Biologia.

E-mail: rafaelasmagalhaes@hotmail.com

**Resumo:** A resistência antimicrobiana nos ameaça e uma possibilidade para a produção e pesquisa de novos antibióticos é o uso de plantas com atividades antimicrobianas. Em vista disso, o objetivo do projeto foi determinar *in vitro* a atividade antibactericida dos extratos hidroalcoólicos misto das folhas e cascas da *Myrciaria cauliflora* e das folhas da *Eugenia uniflora* L. sobre culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para o preparo do extrato, o material botânico foi seco e posteriormente triturado. A extração dos princípios ativos foi realizada com o álcool e concentrou-se a solução em um rotaevaporador. Para determinação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana em placas e da Concentração Inibitória Mínima do extrato, utilizou-se o método de difusão em meio sólido. Para isso, as bactérias foram ativadas em caldo nutriente e inoculadas em meio de cultura de sólido, onde depositou-se soluções do extrato bruto e suas diluições. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição bacteriana foram medidos e foi realizada análise estatística no programa BioEstat 5.3. Como resultado obtivemos que o extrato hidroalcoólico das folhas da jabuticaba e da pitanga. (EHF) sobre cultura de *E. coli* e o misto das folhas de pitanga e da casca da jabuticaba (EHFC) sobre cultura de *S. Aureus* tiveram uma atividade antimicrobiana maior quanto comparado aos extratos aquosos sobre estas bactérias. Conclui-se que o EHF apresentou uma atividade antimicrobiana *in vitro* maior sobre as bactérias estudadas, sugerindo assim, mais pesquisa dessa substância para a sua utilização no tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana; Extrato; Bactérias; Pitanga; Jabuticaba;

### 1. Introdução

Uma das maiores conquistas da medicina moderna foi o desenvolvimento de antibióticos e antivirais, porém agora, a eficácia de algumas dessas drogas está acabando. A resistência antimicrobiana nos ameaça a voltar em uma época que não conseguíamos tratar facilmente infecções como pneumonia, tuberculose e gonorreia, e essa incapacidade de prevenir infecções pode comprometer seriamente cirurgias e dentre outros procedimentos. (OPAS/OMS, 2019)

Dentre bactérias de interesse médico, por serem principais agentes infecciosos destacam-se a *Staphylococcus aureus* pois está constantemente relacionada com diversas infecções em seres humano, principalmente aquelas adquiridas nos hospitais (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005). Enquanto isso, segundo Chioda et al. (2007), a bactéria *Escherichia coli* faz parte da microbiota anaeróbica facultativa normal e é considerada um dos maiores patógenos entéricos predominantes no cólon dos animais e homem, também sendo responsável por mais de três quartos de infecções urinárias principalmente na gravidez (DUARTE G, 2002 apud DUARTE G, 1997).

Uma possibilidade para a produção e pesquisa de novos antibióticos é o uso de plantas com atividades antimicrobianas, por exemplo, as espécies nativas como a *Myrciaria cauliflora* conhecida, popularmente, como jabuticaba paulista e jabuticaba assú (Ascheri et al., 2006), que já demonstrou atividade antimicrobiana frente a diversas cepas de *Staphylococcus* (MACEDO-COSTA, 2009) e também a *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira) que segundo Auricchio (2003) é uma planta de frutos comestíveis muito conhecida e apreciada no Brasil, e o chá de suas folhas tem aplicação na medicina popular dentre elas, ação antimicrobiana (BRUN; MOSSI, 2007).

Baseado neste contexto, torna-se de grande importância a realização deste estudo, para a avaliação da atividade bacteriana do extrato misto



de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. e *Eugenia uniflora* L. sobre culturas de *S. aureus* e *E. coli*., com o intuito de desenvolver novos medicamentos fitoterápicos, uma vez que esses produzem menos agressões ao organismo (MACEDO-COSTA, 2009) e acreditamos que com a junção dos dois extratos poderá haver um efeito sinérgico na inibição desses microrganismos.

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleta e preparo do extrato

O material botânico (folhas e as cascas da jabuticaba, e folhas de pitanga) foram coletados no Município de Betim-MG (19°56'40.5"S 44°10'33.3"W). As amostras foram preparadas e testadas conforme Macedo-costa et al. (2009), com modificações. As folhas foram lavadas com água, em seguida, foram levadas à secagem permanecendo, durante 8 dias em temperatura ambiente e entre 3 a 5 dias em estufa à 33°C para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático.

Posteriormente, o material foi triturado a pó em um liquidificador. A extração dos princípios ativos foram realizadas com adição de álcool 70% na proporção de 1:10, na ausência de luz e sob agitação por 24 horas. A concentração da solução foi realizada em rotaevaporador a uma temperatura constante de 45 °C por 30 minutos. Os extratos forma acondicionados em frascos protegidos da luz e estocado a 4°C. Depois foram realizadas diluições do extrato bruto para 1:2; 1:4; 1:8 e 1:16.

### 2.2 Linhagens bacterianas e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As linhagens bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* utilizadas, foram obtidas no Setor de Biologia do Coltec, e posteriormente foram reativadas. Para determinação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana em placas e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, será utilizado o método de difusão em meio sólido. O experimento será realizado em triplicata para cada cepa ensaiada, sendo considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de ocasionar inibição completa de crescimento bacteriano.

### 2.3 Cultivo das bactérias, diluição dos extratos e método de difusão em meio sólido

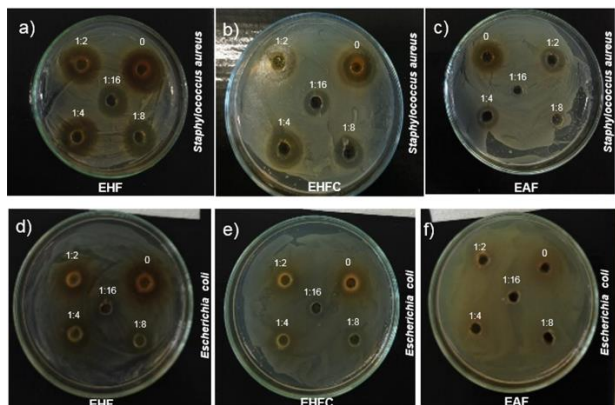
As linhagens bacterianas foram cultivadas em caldo nutriente (ágar simples) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Depois perfurações de, aproximadamente, 6 mm de diâmetro foram feitas no meio de cultura (Ágar nutriente), com numerações que variavam de 1 a 5 onde foi depositado 50 µL das soluções do extrato diluído em água destilada (Extrato Bruto até 1:16). Posteriormente, as placas foram incubadas, em estufa a 37 °C, por um período de 24 horas. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição do desenvolvimento bacteriano foram medidos, em milímetros, da beira da perfuração ao início do desenvolvimento bacteriano. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle, água destilada esterilizada.

### 2.4 Análises estatísticas

Para verificar diferenças no tamanho dos halos de inibição relacionados aos diferentes extratos utilizou-se o teste ANOVA. Em caso de diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. As análises, ao nível de 5% de probabilidade, foram realizadas no Programa BioEstat 5.3.

## 3. Resultados e Discussão

Os extratos que obtiveram maiores halos de inibição foram o hidroalcoólicos das folhas da *Myrciaria cauliflora* e da *Eugenia uniflora* L. (EHF) e o misto das folhas de pitanga e da casca da jabuticaba (EHFC) sobre a cultura de *S. aureus* (figura 1a e 1b). Contudo, sobre a cultura de *E. coli*, somente o EHF obteve uma inibição (figura 1d) e o EAF sobre *S. aureus* teve inibição somente no extrato bruto (0) e nas diluições 1:2 e 1:4 (figura 1c).



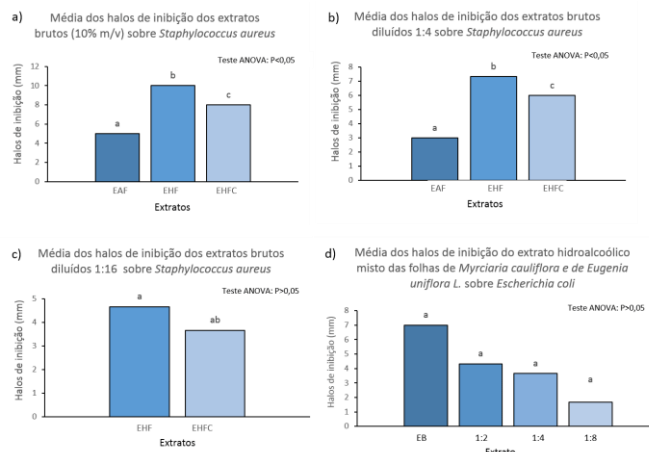
**Figura 1:** Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos e aquosos sobre o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*.

EAF - Extrato aquoso das folhas de *Myrciaria cauliflora* e de *Eugenia uniflora L.*

EHF - Extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrciaria cauliflora* e de *Eugenia uniflora L.*

EHFC - Extrato hidroalcoólico das folhas *Eugenia uniflora L.* e das cascas da *Myrciaria cauliflora*

Foram registadas diferenças significativas no tamanho dos halos de inibição quando comparado os EAF, EHF e o EHFC tanto no extrato bruto quanto na diluição 1:4 sobre a *S. aureus* (figura 2a e 2b). Já em comparação dos halos do EHF e do EHFC na diluição 1:16 sobre *S. aureus* e também nas diluições do EHF sobre *E. coli*, não foi registrado uma diferença significativa (figura 2c e 2d). O teste de Tukey indicou halos com tamanhos diferentes entre todos estes tratamentos (figura 2a e 2b). Não foram registradas variações nos tamanhos dos halos quando comparado os EHF, EHFC na diluição de 1:16 sobre a *S. aureus* e o EHF nas diluições até 1:8 sobre a *E. coli* (figura 2c e 2d).



**Figura 2:** Tamanho médio dos halos de inibição observados nas placas com culturas de *S. aureus* e *E. coli* tratadas com extratos hidroalcoólicos e aquoso de *Myrciaria cauliflora* e da *Eugenia uniflora L.* (médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

#### 4. Conclusões

Conclui-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de pitanga e jabuticaba apresentou uma atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, sugerindo assim, mais pesquisa dessa substância para a sua utilização como meio alternativo e economicamente viável para o controle e tratamento de infecções causadas por estas bactérias.

#### 5. Apoio Financeiro

Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 6. Agradecimentos

Agradecemos ao laboratório de bioengenharia e ao Ideareal pelo apoio em relação ao uso de equipamentos para a realização do projeto, além da doação de alguns materiais. Agradeço também aos Professores Doutores Daniel Maroneze e Joscilli Souza Crispim, além das pessoas do setor de biologia do Colégio Técnico da UFMG pelo apoio e ajuda no projeto.

## 7. Referências

AURICCHIO, M. T., e BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.1, p. 55 - 61, 2003.

BRUN, G. R e MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p.135-142, 2007.

CASSETTARI, V.c.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.a.s.. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.70-76, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s141386702005000100012>.

CHIODA, Tammy Priscilla et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p.583-585, mar. 2007.

DUARTE, Geraldo et al. Infecção Urinária na Gravidez: Análise dos Métodos para Diagnóstico e do Tratamento. **Rgbo**, Betim, p.471-477, 2002.

MACEDO-COSTA, Maria R. et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p.565-571, jun. 2009.

OPAS/OMS (Brasil). **Dez ameaças à saúde que a OMS combaterá em 2019**. 2019. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5848:dez-ameacas-a-saude-que-a-oms-combatera-em-2019&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5848:dez-ameacas-a-saude-que-a-oms-combatera-em-2019&Itemid=875)>. Acesso em: 23 set.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## INVESTIGAÇÃO BACTERIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA EM AMOSTRAS DE ÁGUA ORIUNDAS DE UM RESERVATÓRIO LOCALIZADO NO INTERIOR DO CEARÁ - BRASIL

Prado<sup>1</sup>, J. C. S.

<sup>1</sup>Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR

E-mail: cesarprado55@gmail.com

**Resumo:** O dado trabalho teve objetivo de analisar a qualidade microbiológica e parasitológica da água do açude São Vicente que está localizado no Município de Santana do Acaraú – CE. Para as análises microbiológicas quantificou e qualificou as bactérias do grupo dos coliformes, sendo estes coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (CTT), através da técnica dos Tubos Múltiplos para se quantificar o Número Mais Provável dos microrganismos presentes nas amostras. Já para as análises parasitológicas utilizou a técnica de Hoffman, que tem como princípio a decantação das partículas sólidas em amostras líquidas, confeccionou-se lâminas com as amostras e analisou-se em microscópio para detecção de possíveis estruturas parasitárias. Os resultados das 9 amostras analisadas para CT variaram de  $2,7 \times 10$  a  $9,0 \times 10^2$  CT/100mL, já para CTT variaram de  $1,7 \times 10$  a  $>1,6 \times 10^3$  CTT/100mL. Os resultados parasitológicos apresentaram *Ascaris lumbricoides* presente em 36,1% das amostras, o protozoário *Giardia lamblia* representado por 22,2%, *Entamoeba coli* (16,7%), *Balabtidium coli* (13,9%) e *Entamoeba histolyca* (11,1%). Com isso, conclui-se que os parâmetros microbiológicos e parasitológicos das águas do açude São Vicente presente no Município de Santana do Acaraú – CE, estão totalmente fora dos critérios de potabilidade estabelecidos pela Resolução Nº 5, de 5 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde.

**Palavras-chave** Açude; Água; Coliformes Totais; Coliformes Termotolerantes; Parasitas; Santana do Acaraú.

### 1. Introdução

No Brasil, a região Nordeste concentra-se a menor porção dos recursos hídricos do país, representando 3,3% deste recurso natural, ficando atrás do Sudeste (6%), Sul (6,5%), Centro-Oeste (15,5%) e Norte (68,5%) (PENA, 2019). Já o

semiárido que ocupa boa parte do Nordeste brasileiro é caracterizado pelos baixos índices de precipitação e irregularidade das chuvas, onde os índices pluviométricos são inferiores a 900 mm ao ano, as altas temperaturas fazem com que ocorra uma rápida evapotranspiração contribuindo para a escassez hídrica (ANA, 2019).

A seca prolongada no semiárido requer alternativas de captação e acumulo de água para a sobrevivência das comunidades nessas áreas, principalmente para a população que vive nas zonas rurais que não dispõem de um sistema de abastecimento de água para o consumo humano, assim surgem alternativas de captação e armazenamento de água para o consumo humano que pode se resumir em ferramentas como açudes, cisternas, barragens, cacimbas, poços e olhos d'água (SANTOS, 2020).

Segundo a FUNASA (2019), açudes ou reservatórios de água são nomes dados a uma espécie de barreira artificial feita no intuito de reter água tanto de origem das chuvas como água corrente de um rio existente, e seu principal objetivo é abastecer com água as áreas agrícolas, residenciais e industriais. No Ceará há 247 reservatórios, apresentando tanto de pequeno porte como grande, os maiores açudes são Castanhão com capacidade de 6,7 bilhões de m<sup>3</sup> de água, Orós com capacidade 2,1 m<sup>3</sup> de água e o Banabuiú que tem capacidade de 1,7 bilhões de m<sup>3</sup> de água (SIRH-CE, 2019).

A RESOLUÇÃO Nº 5, de setembro de 2017 do Ministério da Saúde que atualiza a portaria 2914/2011 também do Ministério da Saúde, declara que para a água seja considerada potável, deva estar dentro dos parâmetros de potabilidade que envolvem a padronização de valores referentes a parâmetros físicos, químicos, microbiológicos, organolépticos, cianobactérias/cianotoxinas e radioatividade (BRASIL, 2011).

Os parâmetros microbiológicos envolvem a contagem de bactérias do grupo dos coliformes, pertencentes à família Enterobacteriaceae, que são divididas em Coliformes Totais e Coliformes

Termotolerantes. Os Coliformes Totais são bacilos gram-negativo, aeróbios ou anaeróbio facultativos, não formadores de esporos, fermentam na presença de lactose com a produção de gás em 24-48 horas, onde a maioria dos representantes pertencem ao gênero *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Já os Coliformes Termotolerantes é um subgrupo das bactérias do grupo dos coliformes que fermentam lactose a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em 24h, tendo como principal representante *Escherichia coli*, de origem fecal (FUNASA, 2006). A *Escherichia coli*, são bactérias normalmente inofensivas, mas certas cepas podem ser patogênicas. As infecções podem estar associadas principalmente a alimentos e água contaminada, onde as toxinas causam distúrbios gastrointestinais (TORTORA, 2000).

O açude do presente estudo fica localizado no Município de Santana do Acaraú no Estado do Ceará – Brasil. A população que vivem próximas ao açude faz a captação da água do açude quando suas cisternas secam, onde essa água é utilizada principalmente para o uso doméstico, com isso este estudo contribuiu com informações acerca da qualidade da água para o uso doméstico.

Nesse entendimento, o presente estudo tem por objetivo avaliar a qualidade microbiológica e parasitológica da água do reservatório São Vicente que está localizado no Município de Santana do Acaraú – CE, por meio da técnica dos Tubos Múltiplos e Número Mais Provável (NMP), para determinação de coliformes totais e termotolerantes e a identificação de possíveis parasitas através do método de Hoffman, Pons e Janer.

## 2. Metodologias

### 2.1 Dados da Amostragem

O município de Santana do Acaraú está localizado no Norte do Estado do Ceará, entre as coordenadas geográficas  $3^{\circ} 27' 39''$  latitude ao Sul e  $40^{\circ} 13' 4''$  longitude ao Oeste. Apresenta uma área territorial 969,326 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em 29.946 pessoas. Santana do Acaraú está a 236,7 km da capital Fortaleza, e apresenta basicamente duas estações climáticas: a chuvosa, compreendida entre os meses de janeiro a maio, e a seca compreendida entre os meses de julho a dezembro. O clima é tropical quente, com temperaturas anuais em torno de  $26^{\circ}\text{C}$  à  $28^{\circ}\text{C}$ , com média  $27^{\circ}\text{C}$  (IBGE,2019). Já o reservatório é conhecido como açude São Vicente, concluído sua

construção em 1923, o açude é construído no tipo de terra homogênea, tem capacidade de volume de 9.845.200 m<sup>3</sup> de água, possui uma extensão de 76.592.000 km<sup>2</sup> e uma altura máxima de 13,90 metros de altura (SIRG-CE, 2019).

### 2.2 Coleta

Foram coletadas 3 amostras de pontos distintos (A, B e C), os quais foram selecionados considerando o acesso da população para captação de água do açude, respeitando o intervalo de 30 dias para cada coleta, nos meses de julho, agosto e setembro de 2020, do açude São Vicente no Município de Santana do Acaraú – CE. Para a metodologia de coleta, transporte, estocagem e posteriores análises, foi seguido o Manual de Coleta e Envio de Amostras de Vigilância Ambiental, elaborado pelo Governo do Estado do Paraná (Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, 2014). Para a coleta das amostras, foi realizada a limpeza de um balde de aço inox devidamente lavado e submetido à fervura por 20 minutos, então submergido para captação da água do açude. Após a coleta, os frascos foram devidamente vedados, identificados e acondicionados em caixas isotérmicas e então encaminhados ao Laboratório de Microbiologia.

### 2.3 Método dos Tubos Múltiplos

Para a quantificação dos índices de coliformes totais e termotolerantes na água, foi utilizado a técnica dos Tubos Múltiplos e o Número Mais Provável NMP, o método é composto por 3 etapas: teste presuntivo, teste confirmatório para coliformes totais e teste confirmatório para coliformes termotolerantes. Para o teste presuntivo, foram feitas 3 séries de 5 tubos contendo caldo Lactosado, concentração dupla para a primeira série contendo 5 tubos, todos os tubos apresentavam Tubos de Durham invertidos, na primeira série foi inoculado 10 mL da amostra, já para a segunda série, foi homogeneizado 1 mL da amostra em salina, após foram inoculados na segunda série de 5 tubos com caldo lactosado em concentração simples. Para a terceira diluição, 1 mL da salina com amostras da segunda série foi inoculado em 9 mL de nova salina e só então distribuído na terceira série, resultando em diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Após os procedimentos, os tubos foram incubados em estufa a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48h, após foi realizado a leitura dos resultados. Mostrando positivo os tubos que apresentaram

turvação do meio ou a presença de gás no interior dos tubos de Durham. Para o teste confirmatório para coliformes totais, foram retiradas alíquotas das amostras positivas do caldo lactosado, com o auxílio de uma alça de repique, então inoculado em tubos contendo caldo lactosado verde brilhante e bile (CLVBB) com tubos de Durham invertidos, incubados por 35°C/48h. Para o teste confirmatório para coliformes termotolerantes, alíquotas dos tubos positivos também foram inoculados em tubos contendo caldo EC com tubos de Durham invertidos, então incubados a 45°C em banho-maria por 48h, seguindo com a leitura dos resultados e quantificação através da tabela do Número Mais Provável – NMP.

#### 2.4 Método de Hoffman, Pons e Janer

Para as análises parasitológicas foi utilizado o método de Hoffman, Pons e Janer, que consiste em colocar as amostras em um cone Imhoff e aguardar 24h para que haja sedimentação espontânea. Findo esse tempo, desprezou-se o sobrenadante e então colheu 10 mL do sedimento em tubos Facon, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Posteriormente, preparou-se lâminas com o sedimento, corando-a com Lugol. Então as lâminas foram levadas ao microscópio para serem analisadas em objetivas de 10x/40x para identificação de possíveis cistos de protozoários e larvas/ovos de helmintos, tendo como referência para identificação o atlas de parasitologia de Neves et al. 2005.

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da quantificação dos valores do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (CTT) das 9 amostras analisadas do açude São Vicente localizado em um distrito de Santana do Acaraú – CE estão apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Número Mais Provável de Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (CTT) nas águas do açude São Vicente localizado no Município de Santana do Acaraú – CE.

AMOSTRAS/ PONTOS	Número Mais Provável – NMP	
	CT*/100 MI	CTT**/100 MI
<b>PONTO A</b>		
A 1	2,7x10	1,7x10
A 2	3,4x10	5,0x10
A 3	5,0x10	8,0x10
<b>PONTO B</b>		
B 1	3,3x10	3,0x10
B 2	3,5x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>
B 3	3,4x10	2,3x10
<b>PONTO C</b>		
C 1	3,5x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>
C 2	2,4x10 <sup>2</sup>	3,0x10 <sup>2</sup>
C 3	9,0x10 <sup>2</sup>	>1,6x10 <sup>3</sup>

**FONTE:** Dados da Pesquisa, 2020.

\*CT: Coliformes Totais

\*\*CTT: Coliformes Termotolerantes

Os valores do NMP de CTT das 9 amostras analisadas variaram de 1,7x10 a >1,6x10<sup>3</sup> CTT/100mL. Comparando os resultados com os parâmetros estipulados pela portaria de consolidação N° 5, de setembro de 2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), as amostras apresentaram-se inadequadas para ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, visto que a legislação vigente estabelece as regras de potabilidade das águas para consumo humano deva estar isenta de CTT. Resultados semelhantes para CTT foram encontrados nos trabalhos de NEVES et al. (2016), ao analisarem os parâmetros microbiológicos da água de um açude localizado no Município de Morrinhos – CE, onde os autores atribuíram os valores a má gestão e ao descarte incorreto de resíduos próximos ao reservatório. Onde o açude apresenta-se como a principal fonte de abastecimento de água para a população e, conseqüentemente tem importância relevante na manutenção da qualidade de vida local.

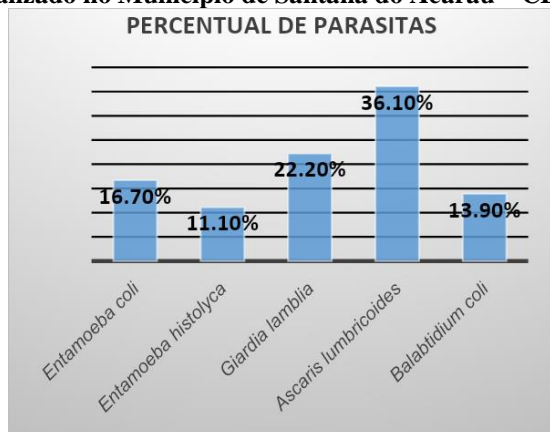
Os valores do NMP de CT das 9 amostras analisadas variaram de 2,7x10 a 9,0x10<sup>2</sup> CT/100ML. Os 3 pontos apresentaram positividade quanto a presença de CT, apesar de não haver um limite definido pela portaria N° 5, de setembro de 2017, o documento estabelece que quando presente, mesmo em testes presuntivos, seja adotado medidas de caráter preventivo e novas amostras devam ser coletadas em dias imediatamente sucessivos até que revelem resultados satisfatórios. Nos trabalhos de Cruz (2019), ao realizar o monitoramento microbiológico das águas do reservatório Dionísio

Machado localizado no Município de Lagarto – SE, foram observados valores para CT acima dos encontrados nesta pesquisa, onde o autor atribui insatisfatória para o consumo humano, baseando-se na legislação vigente. Prado et al. (2019) e Fellepe e Junior (2012), ao estudarem a qualidade microbiológica da água, ressaltaram em seus estudos que quanto há presença de CT não necessariamente haverá contaminação de origem fecal, pois os CT se apresentam mais bem distribuídos em função das classes estipuladas, já que são coliformes ambientais, naturalmente encontrado no meio ambiente.

Em contrapartida com os resultados positivos para CTT e CT apresentados na TABELA 1, Filho et al. (2020) ao verificarem a qualidade da água do açude Epitácio Pessoa localizado no Município de Boqueirão – PB, verificaram que nenhuma das amostras analisadas apresentaram presença de CTT e CT, apesar dos altos níveis de bactérias heterotróficas acima do valor permitido, necessitando, portanto, de tratamento prévio antes de serem fornecidas para o consumo humano.

Os resultados obtidos das análises parasitológicas são qualitativos e quantitativos, atestando a detecção de parasitas humanos de veiculação hídrica nas amostras analisadas, onde os 3 pontos (A, B e C) apresentaram a presença de protozoários e helmintos. Os dados obtidos estão apresentados na FIGURA 1.

**FIGURA 1. Percentual de parasitas observados em amostras de água do açude São Vicente localizado no Município de Santana do Acaraú – CE.**



**FONTE: Dados da Pesquisa, 2020.**

Observa-se na figura 2 que os parasitas mais frequentes foram *Ascaris lumbricoides* presente em 36,1% das amostras, o protozoário *Giardia lamblia* representado por 22,2%, *Entamoeba coli* (16,7%), *Balabtidium coli* (13,9%) e *Entamoeba histolyca* (11,1%). Resultados semelhantes foram achados em estudos realizados por Silva (2015), Cordeiro et al. (2015) e Silva et al. (2017) ao estudarem o perfil parasitológico das águas de abastecimento

em estado bruto, onde os autores atribuíram a alta taxa parasitaria à poluição dos corpos d'água gerado ppelo descarte incorreto dos resíduos, ocasionando assim os impactos no meio ambiente.

Os parasitas mais comuns observados nas análises foram ovos de *Ascaris lumbricoides* (36,1%) e cistos de *Giardia lamblia* (22,2%). Segundo Junior et al. (2020), a infecção com esses organismos se dão principalmente em locais que não possuem saneamento básico, por meio de água ou alimento contaminado com fezes de indivíduos doentes. Diante das doenças causadas por protozoários e helmintos, faz-se necessário a ação de medidas preventivas, afim de evitar os prejuízos causados a população pelas doenças infecciosas e parasitarias. As enfermidades ocasionadas por estes organismos geram grandes impactos sociais, afetando tipicamente países em desenvolvimento acometendo principalmente a classe mais baixa e que, segundo a OMS afetam mais de 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo (Neves et al. 2016).

#### 4. Conclusões

Assim, conclui-se que os parâmetros microbiológicos e parasitológicos das águas do açude São Vicente presente no Município de Santana do Acaraú – CE, estão totalmente fora dos critérios de potabilidade estabelecidos pela Resolução Nº 5, de 5 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, apresentando risco de contaminação com sua ingestão. Salienta-se a necessidade da implantação de políticas públicas para a melhoria da qualidade da água, um eficiente sistema de saneamento básico e a sensibilização da população sobre a importância da não poluição dos corpos d'águas.

#### 5. Apoio Financeiro

UNICESUMAR,

#### 6. Referências

ANA – Agência Nacional das Águas, Reservatórios do Nordeste e Semiárido. Disponível em: <https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/acudes-do-semiarido/saiba-mais> Acesso em: 06 de Novembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 5 de 5 de Setembro de 2017. Diário oficial da União, Brasília, 2011.



- CORDEIRO, L.; OLIVEIRA TAVELA, A.; LEITE, N. K.; EXTERKOETTER, R.; OLIVEIRA, L. J. G. G.; KLEIN, D.; SÁ, L. S. Avaliação Parasitológica das águas subterrâneas da região do rio marombas. Águas subterrâneas, 2014.
- CRUZ, A. C. B. Análise microbiológica da água do reservatório Dionísio Machado localizado no município de Lagarto – SE. 2019.
- FELLIPE, M. F.; JÚNIOR, A. P. M. Impactos ambientais macroscópicos e qualidade das águas em nascentes de parque municipais em Belo Horizonte – MG. Revista Geografias, 8-23, 2012.
- FILHO, E. D. S.; SILVA, A. B.; SANTOS, J. S. I.; SILVA, M. V. A.; NEVES PEREIRA, M.; SILVEIRA GONZAGA, F. D. A.; SILVEIRA, P. L. N. Verificação da qualidade da água do açude Epitácio Pessoa, Boqueirão, PB, BRASIL. Interfaces Científicas – Saúde e Ambiente, 8 (2), 215-229, 2020.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água. 2. Ed. Brasília, DF
- IGBE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019.
- LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná. Manual de Coleta e Envio de Amostras de Vigilância Ambiental. Curitiba, 2014.
- NEVES, A. M.; COUTINHO, M. G. S.; SILVA, A. S.; LOPES, L. M. A.; SANTOS FONTENELLE, R. O. Análise microbiológica da água de um açude localizado no município de Morrinhos – CE. Enciclopédia Biosfera, 13, 1100-1110, 2016.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2005.
- PENA, R. F. Distribuição da água no Brasil. Disponível em: <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/geografia/distribicao-agua-no-brasil.htm> Acesso em: 02 de Novembro de 2019.
- PRADO, J. C. S.; dos SANTOS FONTENELLE, R. O.; COUTINHO, M. G. S.; NEVES, M. A. Avaliação microbiológica e parasitológica da água proveniente de chuvas armazenadas em cisternas localizadas em uma zona rural do município de Santana do Acaraú – CE. REVISTA UNINGÁ, 56 (3), 141-150, 2019.
- SANTOS, E. A. V.; et al. (2020). Metodologia de captação de água utilizada no semiárido Nordeste Brasileiro. **II CONIDIS – II Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido.** Disponível em: [http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO\\_EV074\\_MD1\\_SA\\_ID870\\_22082017103306.pdf](http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO_EV074_MD1_SA_ID870_22082017103306.pdf). Acesso em: 15 de Novembro de 2019.
- SILVA, D. A. Análise microbiológica e parasitológica da água do distrito de Vale Verde, Minas Gerais. ÚNICA CADERNOS ACADÊMICOS, 1 (1), 2014.
- SILVA, E. A. F.; SILVA, L. A.; GONÇALVES, N.; OLIVEIRA, T. F. D. A.; MANHANI, M. N. Análise parasitológica da água de abastecimento do município de Nova Serrana – MG. 2017.
- SIRG/CE – Secretaria dos Recursos Hídricos do Ceará. Atlas Eletrônico dos Recursos Hídricos do Ceará, 2019. Disponível em: <http://atlas.srh.ce.gov.br/infraestrutura/acudes/index.php?status=1> Acesso em: 18 de Novembro de 2019.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R; CASE, C. L. Microbiologia. 6º. Ed. Porto Alegre, Artmed, 2000; 669p.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ANÁLISE COMPARATIVA DA MICROBIOTA DA MUSCULATURA DA *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1896) E *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) ENTRE AMBIENTES EUTROFIZADO E DE PISCICULTURA.

Silva<sup>1</sup>, K. F. A; Araújo<sup>1</sup>, M. R.; Leal<sup>2</sup>, L. L. O. C; Soares<sup>1</sup>, L. F; Duarte<sup>1</sup>, I. A; Scoggin<sup>3</sup>, M. B; Casali<sup>4</sup>, A. K. e Silva<sup>3</sup>, A. R. M.

<sup>1</sup>Centro Universitário UNA.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E-mail: kleber.felipe2997@gmail.com

**Resumo:** Este trabalho apresenta uma análise comparativa da microbiota da musculatura da *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1896) e *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) entre ambientes eutrofizado (Lagoa da pampulha, Belo Horizonte, MG) e de piscicultura (BeGreen). Devido ao consumo de peixe do ambiente eutrofizado, a análise foi feita para avaliar uma possível contaminação que poderia inviabilizar o consumo desta carne. Para tanto, foram recolhidas amostras do músculo de dez peixes da espécie *Tilapia rendalli* coletados da Lagoa da Pampulha e dez peixes da espécie *Oreochromis niloticus* que foram obtidos por doação da empresa BeGreen. Estes peixes foram triados e analisados no laboratório de microbiologia localizado na Cidade Universitária Una. Foi realizada a contagem de coliformes a 45° (NMP/g), a contagem total de bactérias heterotróficas (UFC/g), além da avaliação de presença ou ausência de *Salmonella* sp. Verificou-se que, em média, foram encontradas 23 bactérias de coliformes a 45°C (NMP/g) e 2.100 na contagem total de bactérias heterotróficas (UFC/g) no *pool*, ou seja, no agrupamento feito com as amostras da Lagoa da Pampulha, e ausência de *Salmonella* sp. Já nas amostras da BeGreen, a média foi de < 7,1 bactérias de coliformes a 45°C (NMP/g) e 5.690 na contagem total de Bactérias Heterotróficas (UFC/g) e também houve a ausência de *Salmonella* sp.. Com base nos resultados e no Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos imposto pelo Ministério da Saúde brasileiro, ambos os peixes são viáveis para o consumo humano, não crus.

**Palavras-chave:** bactérias; peixe; musculatura; BeGreen; lagoa; Pampulha.

### 1. Introdução

Os peixes são grupos de animais aquáticos do Filo Chordata que estão presentes na Superclasse Agnatha e em várias classes inseridas na Superclasse Gnathostomata (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Estima-se que existam mais de 27.000 espécies distribuídas em uma grande variedade de habitats no mundo (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Os peixes são uma das principais fontes de proteínas do ser humano e estão entre os alimentos com maior possibilidade de deterioração. O desenvolvimento microbiano é favorecido nesta carne devido à grande quantidade de água e ao pH próximo ao neutro (FRANCO E LANDGRAF, 2003). A microbiota do pescado é influenciada pelo seu habitat, sendo ele um fator determinante, podendo influenciar o desenvolvimento de bactérias de acordo com a temperatura (FRANCO E LANDGRAF, 2003). Dentre espécies mais importantes para a deterioração dos peixes estão as do gênero *Pseudomonas* e *Shewanella putrefaciens* (GRAM & HUSS, 1996).

A *Tilapia rendalli* foi introduzida no Brasil para criação, entretanto foi substituída pela *Oreochromis niloticus*, ambas originárias do continente Africano, devido ao melhor crescimento, ganho de peso e pela melhor qualidade da carne da *O. niloticus* (FIGUEIREDO, 2008). Entretanto, sua introdução compromete as espécies nativas (AZEVEDO; ROGOLIN; PELICICE, 2011).

A contagem de coliformes totais e de *Salmonella* spp. é uma importante medida para determinar a qualidade do pescado visando o consumo humano (LIUSON, 2003).

Diante disso, o que impulsionou a realização desse trabalho foi a importância de estudar os peixes da Lagoa da Pampulha, que é uma lagoa urbana e eutrofizada dentro de Belo Horizonte, onde há a atividade de pesca e de consumo da *T. rendalli*.

Portanto, o objetivo do trabalho foi comparar a microbiota da musculatura da tilápia de dois ambientes: um eutrofizado e um de piscicultura, e tentar investigar, a partir desse ponto, a possível contaminação por microrganismos, que podem tornar essa carne inviável para o consumo.

## 2. Metodologia

### 2.1 Análises Laboratoriais

Foram comprados dez indivíduos de *T. rendalli* de pescadores da Lagoa da Pampulha e foram doados dez indivíduos de *O. niloticus* pela empresa BeGreen. Os 20 peixes foram sacrificados e triados com o auxílio de ferramentas para a retirada do músculo.

Foi medida uma quantidade de dez gramas com auxílio de balança de precisão para cada indivíduo de *O. niloticus*. Já para *T. rendalli*, foi feito um pool de amostras, somando a musculatura de todos os indivíduos para se obter uma medida de dez gramas.

Após estes procedimentos, as amostras foram levadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos da Cidade Universitária Una, Campus Guajajaras, onde as análises foram feitas de acordo com a Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Saúde – ANVISA (BRASIL, 2001).

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita de forma qualitativa, sendo o resultado expresso como presença ou ausência do microrganismo em 10g de alimento. Os Coliformes a 45°C foram analisados de forma quantitativa, com os resultados expressos em Número Mais Provável por grama (NMP/g). E a Contagem total de Bactérias Heterotróficas foi analisada também de forma quantitativa, com os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g).

### 3. Resultados e Discussão

No total de dez amostras de músculo de *O. niloticus*, sete amostras apresentaram resultado menor que 3,0 NMP/g para coliformes a 45°C, uma amostra apresentou 4,0 NMP/g e duas amostras apresentaram 23 (2,3 x 10) NMP/g. *Salmonella* spp. estava ausente nas dez amostras. A contagem de bactérias heterotróficas nas dez amostras variou de menos que 100 (1,0 x 10<sup>2</sup>) UFC/g a 45.000 (4,5 x 10<sup>4</sup>) UFC/g.

Para a amostra da Lagoa da Pampulha, foram identificados os valores de 23 NMP/g para coliformes a 45°C, ausência de *Salmonella* spp. e 2.100 UFC/g de bactérias heterotróficas.

Na **Figura 1** estão os resultados das análises das amostras dos peixes da Lagoa da Pampulha (*T. rendalli*) e da BeGreen (*O. niloticus*), representando a quantidade de coliformes a 45°C (NMP/g), a presença ou ausência de *Salmonella* spp. e a contagem total de bactérias heterotróficas (UFC/g).

Tabela 1 - Resultados das análises do músculo das amostras dos peixes da Fazenda Urbana BeGreen (BG) e da Lagoa da Pampulha.

Amostra	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. (presente/ausente)	Total de Bactérias Heterotróficas (UFC/g)
Músculo 1 - BG	23	Ausente	45.000
Músculo 2 - BG	<3,0	Ausente	1.500
Músculo 3 - BG	<3,0	Ausente	600
Músculo 4 - BG	<3,0	Ausente	3.600
Músculo 5 - BG	<3,0	Ausente	200
Músculo 6 - BG	23	Ausente	1.800
Músculo 7 - BG	<3,0	Ausente	300
Músculo 8 - BG	<3,0	Ausente	2.000
Músculo 9 - BG	4,0	Ausente	<100
Músculo 10 - BG	<3,0	Ausente	1.800
<b>Média de amostras - BG</b>	<b>&lt;7,1</b>	<b>-</b>	<b>5.690</b>
<b>'Pool' - Pampulha</b>	<b>23</b>	<b>Ausente</b>	<b>2.100</b>

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve uma maior presença de coliformes nas amostras da Lagoa da Pampulha do que nas da BeGreen. Isso provavelmente se deve, porque existe o despejo de resíduos urbanos e industriais sem o devido tratamento em seu curso d'água, o que favorece a eutrofização da Lagoa (TUNDISI; MATSUMARA; ROCHA, 2002).

Segundo a Resolução RDC número 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001), a ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de amostra é o padrão estabelecido.

Ainda segundo esta Resolução, não há limite máximo para coliformes a 45°C em pescados crus, nem em ovas de peixes, crustáceos e moluscos considerados "in natura", resfriados ou congelados. Portanto os peixes analisados são viáveis para consumo, exceto na forma crua.

Conforme observado no trabalho de Neves (2009), a contaminação de peixes é algo comum. Os peixes analisados da BeGreen, são mantidos em tanques de 10 mil litros sendo a água dos tanques tratada pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA) e as excretas destinadas para a adubação de hortaliças na própria empresa, segundo Graziano (comunicação pessoal, abril de 2018). Existe a possibilidade de os peixes terem se contaminado através desta água ou, menos provável, durante a triagem, já que a triagem das amostras de *T. rendalli* foram feitas ao mesmo tempo, porém não obtiveram valores tão altos de bactérias heterotróficas.

Em um trabalho feito por Silva *et al.* (2016) em mercados públicos na cidade de Mossoró, no Rio Grande do Norte sobre a qualidade higiênico - sanitária da tilápia *Oreochromis* sp. congelada e fresca, também não foi encontrada contaminação de *Salmonella* spp. nas 10 amostras analisadas. Ademais, no mesmo estudo, os valores de coliformes a 45 °C tiveram como resultado as variações de 0,477 a 1,509 NMP por grama analisado (SILVA *et al.*, 2016.). Podemos observar que estes valores são menores que os obtidos nas análises deste trabalho.

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo apontaram que não foram encontradas *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de peixes dos dois ambientes escolhidos. A média da contagem de coliformes nas amostras da BeGreen apontou que ela foi menor que a contagem total de coliformes nas amostras da Pampulha, possivelmente devido ao despejo de efluentes na lagoa. Esta observação

se atenta à necessidade de projetos que visem a melhoria da qualidade da água da Lagoa da Pampulha.

Foram encontrados uma maior quantidade de bactérias totais heterotróficas na microbiota da musculatura do *O. niloticus*, vinda da piscicultura da BeGreen, do que na microbiota da musculatura do *T. rendalli* da Lagoa da Pampulha que é um ambiente eutrofizado.

Portanto, de acordo com a Resolução RDC número 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA os peixes analisados são próprios para o consumo, não consumidos crus, considerando a quantidade de coliformes totais e ausência de *Salmonella* spp..

#### 5. Agradecimentos

Aos técnicos do laboratório de microbiologia pelo apoio nas análises e aos professores Agnes e André pela orientação.

#### 6. Apoio Financeiro

A Cidade Universitária UNA por ter cedido o espaço e os equipamentos e à empresa BeGreen pela doação dos peixes.

## 7. Referências

AZEVEDO-SANTOS, Valter Monteiro de; RIGOLIN-SÁ, Odila; PELICICE, Fernando Mayer. Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p. 915-919, 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 2001.

FIGUEIREDO, Carlos Alberto Junior; VALENTE, Airtton Saboya Junior. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. 2008.

FRANCO, B. D. G. M. ; LANDGRAF, M. .Microbiologia de Alimentos. **Editora Atheneu**, São Paulo. v 1, 2003.

GRAM, Lone; HUSS, Hans Henrik. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International journal of food microbiology**, v. 33, n. 1, p. 121-137, 1996.

GRAZIANO, Pedro. Comunicação pessoal. Belo Horizonte, 12 abr. 2018

LIUSON, Esequiel. Pesquisa de coliformes totais, fecais e Salmonella spp em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. 2003. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. A vida dos vertebrados. **Editora Atheneu**. São Paulo. v. 4, 2008.

SILVA, Renata Xavier et al. Qualidade higiênico-sanitária da tilápia (*Oreochromis spp.*) fresca e congelada em mercados públicos. **Ciência animal brasileira**, v. 17, n. 4, 2016.

TUNDISI, José Galazia et al. Limnologia de águas interiores: impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**, v. 3, p. 203-240, 2006.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS DE LEITE HUMANO ÁCIDO DE UM BANCO DE LEITE

Stela<sup>1</sup>, M. V. L. e Falconi<sup>1</sup>, F. A.

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas/Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Medicamentos

E-mail: mariavitoriasstela@hotmail.com

**Resumo:** O leite materno é um alimento importante para os recém-nascidos e é recomendado seu uso exclusivo até os 6 meses de idade. Quando a mãe não pode amamentar, ou tem leite excedendo, o Banco de Leite Humano torna-se responsável por amparar essa mãe. A doação de leite é de extrema importância, porém, durante a coleta do leite materno para doação, pode ser que ocorra contaminação, principalmente por coliformes, que irá afetar a qualidade do mesmo e será descartado. O objetivo do trabalho foi realizar a identificação e contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes em amostras de leite humano ácido do banco de leite de um hospital universitário. Baseado em 23 amostras de leite humano cru e ácido, obtidos através do Banco de Leite Humano de um Hospital Universitário, foram realizadas análises e contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, pelo método do Número Mais Provável. A partir de diluições das amostras, houve inoculação em tubos de ensaio com Caldo Lauril Sulfato Triptose e tubos de Durhan invertidos. Os tubos com resultados positivos, foram transferidos uma alíquota para prova da presença de *Escherichia coli*. Como resultado, observou-se presença de Coliformes Totais 13 em amostras e presença de Coliformes Termotolerantes em 7 amostras. Concluiu-se que é de extrema importância os cuidados higiênicos-sanitários no momento de ordenha e coleta do leite materno que será doado, a fim de evitar a contaminação e posterior descarte.

**Palavras-chave:** Aleitamento Materno; Bancos de Leite; Técnicas Microbiológicas; Segurança Alimentar; Contaminação de Alimentos.

### 1. Introdução

O leite materno é uma fonte alimentícia muito importante e essencial para crianças recém nascidas e, é fundamental que seja mantido como

alimento exclusivo até os 6 meses de idade (WHO et al, 2020). Além disso, o leite humano conta com mais de 250 constituintes, que são capazes de atuar na formação do sistema imune e no desenvolvimento fisiológico (OLIVEIRA et al, 2016).

O Banco de Leite Humano, sempre anexo a um hospital com ala infantil ou materna, tem a finalidade de promover, proteger e apoiar o aleitamento (SOUZA; SILVA, 2010), como também se responsabilizar pelas análises de qualidade do leite, para que ele possa ser distribuído para neonatos posteriormente (SILVEIRA et al, 2012).

As análises que compreendem o processo de controle de qualidade do leite humano cru recebido no banco de leite humano, envolve análise das condições da embalagem, presença de sujidades, cor, off-flavor e acidez Dornic (SANTOS, 2018). Quando as amostras não são aprovadas nos processos de análises, o leite precisa ser descartado (SOUZA; SILVA, 2010) e, o principal motivo de reprovação da amostra é por contaminação no momento da coleta, devido ao não cumprimento da higiene necessária.

Serafini e colaboradores (2003) relatam que o grupo coliforme podem ser os responsáveis pela contaminação de origem fecal do leite, afetando, portanto, a qualidade microbiológica.

Com isso, o objetivo do trabalho foi realizar a contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, em amostras de leite humano cru e ácido, provenientes do banco de leite de um hospital universitário

## 2. Metodologias

### 2.1 Obtenção da amostra

O projeto teve seu início em setembro de 2019 e seguiu até julho de 2020.

A coleta das amostras de leite do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário do Oeste

do Paraná, foi realizada até o período de março de 2020, após esse período, foi necessário encerrar as coletas devido ao isolamento social pelo Covid-19.

A coleta domiciliar do leite humano e todos os procedimentos técnicos foram realizados normalmente pela equipe do Banco de Leite. Após a análise de acidez Dornic pela equipe, o leite coletado que não atendeu aos requisitos de qualidade, ou seja, acidez Dornic fora do estabelecido pela RDC nº 171, foram selecionados para análise de micro-organismos que indicam a qualidade higiênico-sanitária da ordenha e coleta do leite humano.

As amostras foram transportadas, sob refrigeração, para o laboratório de microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para análise Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, segundo metodologia preconizada pela legislação (BRASIL, 2001).

### 2.2 Processamento da amostra

Para o preparo de cada amostra foram realizadas diluições, onde a amostra obtida corresponde à diluição 10<sup>0</sup>. A partir desta, foi transferido, 25mL para um Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1%, correspondendo a diluição 10<sup>-1</sup>. Em seguida, foi realizada diluições consecutivas.

### 2.3 Análise e contagem de Coliformes Totais

Para a Contagem de Coliformes Totais pelo método do Número Mais Provável (NMP), foi realizado o procedimento através de 1,0 mL de cada diluição que foi inoculado em série de três tubos contendo 9 mL do meio Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durhan invertidos, sendo incubados a 35-37°C por 24-48 horas.

### 2.4 Prova para *Escherichia coli*/Coliformes Termotolerantes

Dos tubos que apresentaram resultado positivo para coliformes totais – crescimento (turvação) e produção de gás em meio LST –foi transferida uma alçada para tubos contendo 10,0 mL de caldo *Escherichia coli* (EC) e tubos de Durhan invertidos, sendo incubados em banho-maria a 44,5-45,5°C por 24 horas.

O resultado positivo foi caracterizado novamente pelo crescimento (turvação) e produção de gás no tudo de Durhan. A partir dos tubos positivos, foi determinado o NMP

(Número Mais Provável) de coliformes termotolerantes/mL de amostras, utilizando-se tabela específica.

## 3. Resultados e Discussão

Em 13 amostras (56,5%) foi encontrada a presença de Coliformes Totais, sendo que 2 amostras (8,7%) apresentou alta contagem com valores acima de 1100 NMP/mL, indicando condições de higiene inadequada. E 7 amostras (30,4%) a presença de Coliformes Termotolerantes. Os coliformes termotolerantes sugerem a presença de *Escherichia coli* em 30,4% das amostras.

Tabela 1- Resultados da análise de Contagem de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes, em 23 amostras de leite humano ácido

Amostras	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)
1	<3,0	<3,0
2	<3,0	<3,0
3	<3,0	<3,0
4	<3,0	<3,0
5	<3,0	<3,0
6	43	<3,0
7	<3,0	<3,0
8	>1100	<3,0
9	<3,0	<3,0
10	>1100	<3,0
11	<3,0	<3,0
12	23	<3,0
13	<3,0	<3,0
14	43	<3,0
15	43	<3,0
16	23	9,2
17	1100	150
18	<3,0	<3,0
19	460	15
20	75	15
21	210	43
22	210	28
23	75	23

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das análises para Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes pelo método do Número Mais Provável (NMP), de amostras de leite humano ácido coletadas do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário.

Novak e Almeida (2002) embora não tenham seguido a mesma metodologia do presente trabalho, obteve 30% de presença de coliformes entre as 343 amostras analisadas.

Oliveira e colaboradores (2016) realizaram duas etapas para análise de coliformes, uma fase presuntiva e outra, confirmativa, partindo de 29 amostras já consideradas impróprias para o consumo. A fase presuntiva teve um resultado de 82,76% de presença de coliformes. Enquanto na fase confirmativa, a presença positiva foi de 54,16% para coliformes totais e 33,33% para coliformes termotolerantes.

Borges, da Silva e Pereira (2020) realizaram análise com a amostra crua e a amostra pasteurizada. A análise com a amostra crua, foi dividida ainda em análise presuntiva e confirmativa. De 25 amostras, 28% apresentaram resultados positivos para coliformes totais, tanto no teste presuntivo, quanto no confirmativo. Já o teste confirmativo para termotolerantes foi de 16% de amostras positivas. Já a análise com a amostra pasteurizada, não foi mais encontrado o grupo coliforme. Entretanto, Sousa e Silva (2010) quando realizaram a mesma análise com a amostra pasteurizada, ainda foi possível encontrar a presença do grupo coliforme, alertando que a pasteurização as vezes não é um método efetivo.

Serafini e colaboradores (2003) apontam que a contaminação por coliformes pode ocorrer de acordo com o ambiente em que se é realizado a coleta do leite. Mas a contaminação também pode ocorrer a partir do frasco em que se armazena o leite ou pelas mãos dos manipuladores (SOUSA; SILVA, 2010).

Em relação à presença de *Escherichia coli*, Silveira et al (2012) obtiveram 17% de presença a partir da análise de 6 amostras. A presença de *E. coli* indica a presença de coliformes fecais, apresentando um perigo para os neonatos consumir esse leite, por risco de desenvolverem graves complicações, uma vez que o sistema imunológico nessa fase da vida está em processo de formação.

Ainda, Silveira e colaboradores (2012) fazem alertas para a necessidade do controle higiênico-sanitário, a fim de manter a integridade das amostras de leite materno recebidas pelo banco de humano e poupar o descarte.

#### 4. Conclusões

Os resultados das amostras de leite humano do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário apontam presença de Coliformes Totais e Termotolerantes com 56,5% e 30,4%, respectivamente. Essas altas porcentagens de contaminação por Coliformes, de modo geral, evidencia a necessidade do controle higiênico durante o processo de ordenha e armazenamento do leite materno pelas mães doadoras.

Uma vez que a principal fonte de contaminação, é o próprio manipulador, reforça a importância de medidas educativas a respeito da forma ideal de coleta, visando todos os aspectos higiênicos-sanitários, para que dessa forma, tenha-se um maior aproveitamento do leite materno, preservando a vida e nutrição do neonato que irá receber o leite e, evitando o descarte e desperdício.

#### 5. Apoio Financeiro

Projeto financiado pela Fundação Araucária e realizado através da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

#### 6. Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa recebida para o desenvolvimento do projeto, assim como a Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Também agradeço a equipe do Banco de Leite do HUOP.

#### 7. Referências

BORGES, Natália Rodrigues; DA SILVA, Juliana Fonseca Moreira; PEREIRA, Renata Junqueira. SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO DESCARTADO POR SUJIDADE, NO BANCO DE LEITE HUMANO DE PALMAS-TOCANTINS. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 9, n. 1, p. 162-171, 2020.

BRASIL; BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 139, n. 7-E, 2001.

NOVAK, Franz R.; ALMEIDA, João Aprígio Guerra de. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 3, p. 193-196, 2002.

OLIVEIRA, Claudete de et al. Qualidade microbiológica do leite humano cru e pasteurizado em banco de leite humano na cidade de São Carlos. 2016.

SANTOS, Maressa. Análise do leite materno de recém-nascidos a termo e prematuros internados em UTI neonatal. In: **Análise do leite materno de recém-nascidos a termo e prematuros internados em UTI neonatal**. 2018. p. 43-43.

SERAFINI, Álvaro B. et al. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 775-779, 2003.

SILVEIRA, Luciano Alves Matias da et al. Controle microbiológico do leite humano de um hospital universitário. **Rev. baiana saúde pública**, 2012.

SOUSA, Patrícia Pinheiro Rafael de; SILVA, João Andrade. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 1, p. 07-14, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Protecting, promoting and supporting breastfeeding: the baby-friendly hospital initiative for small, sick and preterm newborns. 2020.



## RESUMOS VIROLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

### PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL EM EXTRATOS DE *Tontelea* sp. (CELASTRACEAE) CONTRA O CHIKUNGUNYA VIRUS

Corrêa<sup>1</sup>, B. H. B. C.; Hauck<sup>2</sup>, M. S.; Coutinho<sup>1</sup>, J. E.; Magalhães, C. L. B.<sup>3</sup> Magalhães<sup>1</sup> J. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), Laboratório de Virologia e Tecnologia Celular (LAVITEC).

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Física, Laboratório de Pesquisas Aplicadas ao Câncer.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Ciências Exatas e Biológicas, Centro de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM).

E-mail: brenobooz@hotmail.com

**Resumo:** O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, sendo transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, que causa a Febre Chikungunya. As arboviroses possuem sintomatologias muito semelhantes, o que dificulta o diagnóstico da doença. Não há vacinas ou tratamento específico contra o CHIKV, portanto, a busca por compostos antivirais torna-se necessária. Nesse contexto, os compostos isolados de membros da família Celastraceae são bons atrativos para pesquisa de antivirais pela sua diversidade de moléculas bioativas relatadas. Este trabalho investiga o efeito citotóxico, a atividade antiviral e índices de seletividade em extratos de *Tontelea* sp., da família Celastraceae. Em células VERO, foram realizados os ensaios citotóxico e antiviral. A concentração citotóxica dos extratos para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi determinada pela técnica colorimétrica do metil-tiazol-tetrazólio (MTT). Em seguida, foi determinada a concentração efetiva/protetora para 50% das células infectadas (CE<sub>50</sub>) e, finalmente, o índice de seletividade (IS). Os valores encontrados de CC<sub>50</sub> foram de 157,20; 351,47; 224,96; 181,91 e 370,78 µg.mL<sup>-1</sup> para os extratos TFH, TFM, TFAE, TGH, TGC, respectivamente. Quanto à ação antiviral, os valores de CE<sub>50</sub> foram de 34,31; 54,33; 79,43; 70,40 e 46,52 µg.mL<sup>-1</sup> para os respectivos extratos. Os IS foram determinados e se mostraram acima de 4 apenas para os extratos TFM e TGC com valores de 6,47 e 7,97, respectivamente, conforme recomenda a literatura. Os resultados evidenciam presença de ação antiviral em compostos da planta investigada e estimulam a busca tanto dos princípios ativos quanto dos mecanismos da ação antiviral.

**Palavras-chave:** Chikungunya; *Tontelea* sp; antivirais; citotoxicidade.

### 1. Introdução

Os arbovírus (*Arthropod-borne vírus*) estão globalmente distribuídos e são responsáveis por milhões de casos de doenças em humanos a cada ano, sendo considerados, portanto, de grande importância em termos de saúde pública (FASSBINDER-ORTH et al., 2014).

Pertencente ao grupo dos arbovírus e classificado na família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, o *Chikungunya virus* é o causador da Febre Chikungunya, caracterizada por dores articulares de forte intensidade que podem se tornar crônicas em alguns casos, febre, dor de cabeça, dores musculares, erupções na pele e conjuntivite, relatada pela primeira vez em 1953, no sudeste da Tanzânia (DONALISIO, et al., 2014). O CHIKV é transmitido por mosquitos artrópodes, em específico os mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Aeges aegypti* e o *Aedes albopictus* (CDC, 2020).

No Brasil, os primeiros casos autóctones foram identificados em Oiapoque, Amapá e Feira de Santana, Bahia, em setembro de 2014 (NUNES, et. al., 2015). Após análise genética dos vírus, foram detectadas duas linhagens: a asiática, constatada no primeiro município; e a linhagem - Eastern, Central and Southern Africa (ECSA) - detectada em Feira de Santana.

Nos últimos 3 anos, o panorama da doença ainda continua a preocupar a saúde pública brasileira. De acordo com informações do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2017, da semana epidemiológica (SE) 1 à SE 52, foram registrados 184.694 casos prováveis de Febre de Chikungunya. No mesmo período, em 2018, foram registrados 85.221 casos prováveis no país, com uma incidência de 40,9 casos/100 mil

habitantes. Em 2019, no mesmo período, foram registrados 132.205 casos prováveis de Febre Chikungunya com 92 óbitos confirmados no país e no período de 29/12/2019 a 30/05/2020 são contabilizados 37.387 casos. No entanto, a partir da Semana Epidemiológica 12 de 2020, observa-se uma diminuição dos casos prováveis em relação ao ano de 2019 devido à mobilização das equipes de vigilância epidemiológicas estaduais no enfrentamento da emergência da pandemia da COVID-19, ocasionando atraso e grande subnotificação de casos de arboviroses.

Até o momento, não há vacina ou tratamento específico contra o CHIKV. O tratamento empregado durante a infecção é o uso de analgésicos e drogas anti-inflamatórias não esteroides para tratamento sintomático dos pacientes (FIGUEIREDO, et. al., 2014). Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos se torna necessário, ao considerarmos a gravidade da infecção, além da possibilidade dos sintomas se tornarem crônicos e permanecerem por anos.

Nesse contexto, as plantas se destacam por sintetizarem grande variedade de metabólitos secundários ou de substâncias bioativas, muitas delas portadoras de propriedades farmacológicas e assim os produtos naturais são ótimos atrativos como fitoterápicos, uma vez que a maioria deles possui baixa citotoxicidade, são de rápida degradação no ambiente, e por causa da sua complexidade química, podem limitar a resistência e aumentar a aplicabilidade de utilização (SPINDOLA et. al., 2014).

Um projeto mais abrangente por nosso grupo de pesquisa com antivirais detectou em membros da família Celastraceae, extratos de *Tontelea* sp. uma promissora atividade antiviral. Conhecida popularmente como “rufão”, segundo Mercadante-Simões e colaboradores (2014), a espécie *Tontelea* sp. apresenta em suas folhas os grupos químicos esteroides, triterpenoides, alcaloides, fenólicos totais, taninos, flavonoides, xantonas, catequinas, depsídeos e depsonas, além de açúcares redutores. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de atividade antiviral em extratos de *Tontelea* sp. (Celastraceae) contra o vírus Chikungunya.

## 2. Metodologias

### 6.1 Compostos derivados de *Tontelea* sp

Extratos e compostos derivados a partir de folhas, galhos e raízes de *Tontelea* sp., foram cedidos pelo grupo de estudo em plantas medicinais NEPLAM (UFMG/UFOP/UFESJ). Foram utilizados no estudo os extratos de folhas [hexânico (TFH), metanólico (TFM) e acetato

etílico (TFAE)], os extratos de galhos [hexânico (TGH) e clorofórmico (TGC)] e o extrato de raízes [hexânico (TRH)].

### 6.2 Vírus e células

O Chikungunya virus, fornecido pela Prof<sup>a</sup>. Cintia Lopes de Brito Magalhães/UFOP, cepa 527-African, foi multiplicado em células C6/36, mantidas em meio L-15, com 5% de SFB e um coquetel de antibióticos, contendo estreptomicina ( $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), penicilina potássica ( $200\text{U.mL}^{-1}$ ) e anfotericina B ( $2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em seguida, por se tratar de um vírus liberado no sobrenadante, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 6000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e alíquotado e armazenado em freezer. As células Vero foram mantidas em DMEM, com 5% de SFB e os mesmos antibióticos, mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e foram repicadas, em média, com intervalos de 2 a 3 dias.

### 6.3 Ensaio de citotoxicidade

Antes dos ensaios antivirais, os compostos candidatos foram submetidos ao teste de citotoxicidade referência, o qual determina a concentração trabalho, citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{L}$  por poço) e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$ /poço de meio completo com 2% de SFB e diferentes concentrações dos compostos e em triplicata. As placas foram incubadas por 48h e, após, foram adicionados 25 $\mu\text{L}$  da solução de MTT, incubando-as novamente a 37°C por 90 min. Apenas 130 $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados por poço mantendo-se as culturas sob agitação a 150 rpm por 15 minutos. As absorbâncias em cada poço foram determinadas em espectrofotômetro de ELISA ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ). A toxicidade celular foi expressa em termos CC<sub>50</sub>. A % de células viáveis foi calculada como  $(B \div A) \times 100$ , em que A e B são as absorbâncias a 492 nm das cavidades com células não tratadas (A) e células tratadas (B), respectivamente.

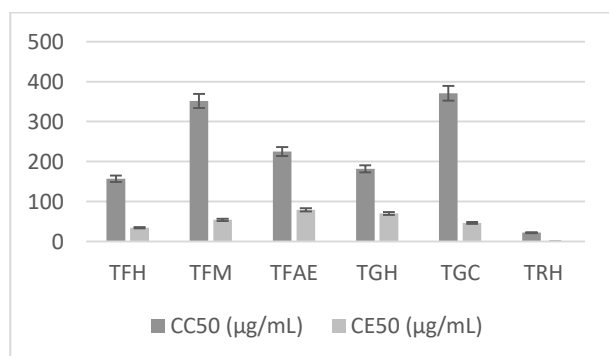
### 6.4 Ensaio de atividade de antiviral global

As maiores concentrações, tóxicas para 50% das células (CE<sub>50</sub>) ou não citotóxicas, dos diferentes compostos foram testadas quanto à atividade antiviral. Para isso, células foram distribuídas em microplacas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{L}$  por poço) e incubadas por 24h. Posteriormente, as células ficaram em contato com os extratos por 30 minutos e uma placa espelho com vírus em contato com os extratos permaneceram também incubado por 30 minutos. Após esse tempo, foi transferido 100 $\mu\text{L}$  da

suspensão viral já em contato com os extratos para os poços correspondentes da placa de teste, com o controle de células, controle viral e controle. Após 40-48h de incubação, a metodologia acima, utilizando-se o MTT, foi aplicada. A concentração eficaz, com 50% de efeito antiviral, ou seja, concentração efetiva a 50% (CE<sub>50</sub>) foi expressa como a concentração que promover a proteção de 50% das células tratadas. A porcentagem de proteção foi calculada  $[(A-B) \div (C-B)] \times 100$ , sendo que A, B e C representam a densidade ótica (DO) (492 nm) das cavidades nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B) e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente. A pesquisa foi feita conforme descrito por Barrows *et al.*, 2016, com algumas modificações. Uma análise microscópica foi feita para monitorar mudanças na morfologia das células infectadas em resposta aos tratamentos. Foram registradas fotografias utilizando um microscópio invertido Olympus, e as mudanças morfológicas identificadas.

### 3. Resultados e Discussão

A citotoxicidade para as células Vero e a atividade antiviral global dos extratos hexânico (TFH), metanólico (TFM) e acetato etílico (TFAE) de folhas; hexânico (TGH) e clorofórmico (TGC) de galhos; e hexânico de raízes (TRH) contra CHIKV foram avaliados para a concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) e a concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) (Figura 1). A viabilidade celular foi calculada em termos da concentração citotóxica para 50% das células, pois uma viabilidade celular inferior a esse valor torna-se inviável para a busca de um fármaco. Em um estudo de Ramos e colaboradores (2008), valores maiores que 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indicam que o extrato provavelmente não possui toxicidade. Além disso, pelo fato de sua composição ser oriunda de metabólitos vegetais, é esperado que a citotoxicidade dos extratos seja baixa, e varie de acordo com o solvente empregado na extração conforme as polaridades que apresentam.



**Figura 1** – Concentração dos extratos que apresenta citotoxicidade para 50% das células Vero (CC<sub>50</sub>), concentração dos extratos que apresenta proteção antiviral para 50% das células Vero infectadas pelo CHIKV (CE<sub>50</sub>).

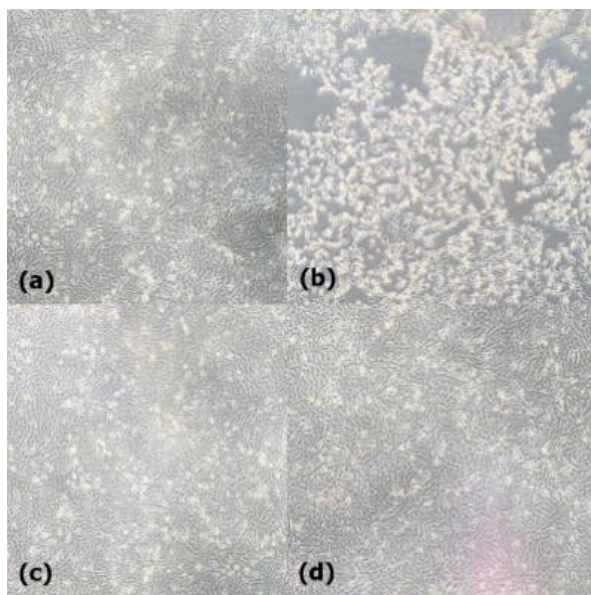
Os valores encontrados de CC<sub>50</sub> foram de 157,20; 351,47; 224,96; 181,91, 370,78 e 22,08  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os extratos TFH, TFM, TFAE, TGH, TGC e TRH respectivamente. Tais valores que encontram-se superiores a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inferem que os extratos possuem baixa citotoxicidade, exceto o extrato hexânico de raízes, configurando alta toxicidade. Isso se deve ao fato do hexano extrair metabólitos secundários apolares tóxicos. Moraes e Nakamura (2015), com o objetivo de testar a espécie *Tanacetum parthenium*, conhecida como crisântemo de jardim, da família Asteraceae e popularmente empregada em infusões aquosas na medicina popular, encontraram valores de citotoxicidade maiores que 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , onde as frações de solventes utilizadas para obtenção dos extratos que, nesse caso, foram extratos aquosos, podem influenciar na citotoxicidade.

A próxima abordagem foi a avaliação da atividade antiviral para os extratos. Para isso, foi utilizada uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 vírus/célula. Os valores da concentração protetora para 50% das células foram calculados para cada extrato conforme mostrado na Figura 1. Para o extrato hexânico de raízes, entretanto, não foi possível o cálculo de sua CE<sub>50</sub>, pela elevada toxicidade. Os valores de CE<sub>50</sub> foram de 34,31; 54,33; 79,43; 70,40 e 46,52  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os extratos TFH, TFM, TFAE, TGH e TGC, respectivamente

Em seguida, a partir da razão entre a concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) e a concentração protetora (CE<sub>50</sub>), foi calculado o Índice de Seletividade (IS<sub>50</sub>), que consiste na ação de um composto contra o patógeno sem causar danos à viabilidade das células hospedeiras. Os valores para o IS<sub>50</sub> dos extratos TFH, TFM, TFAE, TGC foram 4,58; 6,47; 2,83; 2,58 e 7,97, respectivamente. Segundo Barros e colaboradores (2011), índices de seletividade maiores que 4 indicam que a ação inibitória do vírus acontece de forma, pelo menos, duas vezes mais baixa que a ação citotóxica, e o extrato age de maneira eficaz sem a geração de resultados falso-positivos.

De acordo com a literatura, os resultados encontrados de concentração protetora para os extratos foram satisfatórios, variando de 34,31 a 79,43  $\mu\text{g/mL}$ , valores bem inferiores aos encontrados para a concentração citotóxica, implicando, portanto, em um índice de seletividade próximo ao recomendado. Os melhores IS<sub>50</sub> foram para os extratos TFM e TGC com valores de 6,47 e 7,97, respectivamente, conforme recomenda a

literatura. Na Figura 2 (C), pode-se observar que o extrato clorofórmico foi capaz de proteger 100% das células na concentração de  $46,52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 2** – (a) Controle de Células Vero, sem infecção e sem tratamento com extratos de *Tontelea* sp. após 48h. (b) Controle viral de Células Vero infectadas com CHIKV, MOI 0,1, sem tratamento com extratos de *Tontelea* sp. após 48hpi. (c) Células Vero infectadas com CHIKV, MOI 0,1, após o tratamento com o extrato clorofórmico de galhos após 48hpi. (d) Células Vero infectadas com CHIKV, MOI 0,1, após o tratamento com o extrato metanólico de folhas após 48hpi. Aumento microscópico de 400x.

A polaridade do solvente utilizado na extração está diretamente ligada à sua atividade farmacológica, e o melhor solvente para extrair substâncias antivirais devem levar em conta as propriedades da molécula-alvo. A polaridade dos álcoois diminui com o aumento da cadeia carbônica, logo o metanol confere uma elevada polaridade, com a tendência de extrair mais moléculas polares (CORDEIRO, 2018). A regra da semelhança entre solutos e solventes no caso dos haloalcanos, como o clorofórmio, é analisada diferente. Este é usado como solvente para moléculas apolares, mesmo sendo altamente polar e isto se deve ao fato da possibilidade de interação intermolecular do dipolo  $\text{HO}^-$ , levando a formação de ligações de hidrogênio que favorecem a solubilidade de moléculas apolares (CORDEIRO, 2018). Isso poderia explicar o maior índice de seletividade do TGC, pois mais substâncias antivirais estão presentes ali, sendo necessário um estudo posterior de caracterização dessas moléculas.

Ferreira e colaboradores (2019) comprovaram por um estudo fitoquímico do extrato de folhas e galhos *Tontelea* sp. a identificação de quatorze compostos conhecidos e o novo triterpeno de friedelan-1,3,21-triona. Extratos de ramos e folhas

também foram testados quanto à sua atividade contra o ZIKV nos estágios iniciais da infecção viral e efeito virucida. Os extratos que melhor apresentaram atividade antiviral foram o extrato metanólico de folhas juntamente com o hexano de folhas e o extrato clorofórmico de galhos mostraram  $\text{IS}_{50}$  mais alto exibindo um efeito inibitório viral promissor. Os valores de  $\text{CE}_{50}$  desse estudo variaram de 38,53 a 83,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Apesar dos testes terem sido realizados com um flavivírus, os resultados evidenciam uma conversão dos apresentados nesta pesquisa de atividade antiviral contra o CHIKV.

#### 4. Conclusões

A pesquisa em biologia básica por estudos *in vivo* do CHIKV é crucial para a identificação de novos alvos de antivirais. Dessa forma, os extratos de *Tontelea* sp. possuem potencial atividade antiviral contra o vírus Chikungunya, embora ainda não caracterizados os mecanismos da ação antiviral e os compostos específicos da ação. Estudos serão conduzidos em nosso laboratório com compostos isolados a partir dos extratos TFM e TGC no sentido de detectar possíveis alvos virais e/ou celulares e também diferentes etapas do ciclo multiplicativo do vírus.

#### 5. Apoio Financeiro

UFSJ, CNPq, Fapemig.

#### 6. Referências

BARROS, C. et al. Actividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de coentro, orégão e poejo, e seu potencial para a protecção das culturas em horticultura biológica. *Actas Portuguesas de Horticultura*, v. 17, p. 74-79, 2011.

ARROWS, N. J. et al. Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. 2016, *Cell Host & Microbe* 20, 259–270 August 10, 2016 a 2016 Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.004>>. Acesso em: 02 de outubro de 2020

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52 de jan de 2020; jan de 2019 e jan de 2018. *Bol Epidemiol* [Internet]. 2020 jan [data da citação]; 50(n.esp.). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins->

epidemiologicos>. Acessado em 02 de outubro de 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Virus Chikungunya. 2020. Disponível em: <http://www.cdc.gov/>. Acesso em 02 de outubro de 2020.

CORDEIRO, Maria Lúcia da Silva. Caracterização fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante e citotóxico de extratos das folhas de imburana de espinho (*Commiphora leptophloeos*)(Mart.) JB Gillett (*Burseraceae*). 2018. Dissertação de Mestrado. Brasil

DONALISIO M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. *Rev Bras Epidemiol. Associação Brasileira de Saúde Coletiva.* 283– 5, 2014.

FASSBINDER-ORTH, C. A., et al. Buggy Creek Virus (Togaviridae: Alphavirus) Upregulates Expression of Pattern Recognition Receptors and Interferons in House Sparrows (*Passer domesticus*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 14, n. 6, p. 439–446, 2014.

FERREIRA, F. L. et al. Zika Virus Activity of the Leaf and Branch Extracts of *Tontelea* sp. and Its Hexane Extracts Phytochemical Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 4, p. 793-803, 2019.

FIGUEIREDO M. L.; FIGUEIREDO L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014 Nov-Dec; 47(6):677-83.2014.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; NERY, L. A.; FERREIRA, P. R.B.; RIBEIRO, L. M.; ROYO, V. A. Structure, histochemistry and phytochemical profile of the bark of the sobol and aerial stem of *Tontelea* sp. (*Celastraceae* - *Hippocrateoideae*). *An. Acad. Bras. Ciênc.* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Sep 09]; 86(3): 1167-1179.

MORAES, C.S., NAKAMURA, T.U. Investigação in vitro da atividade anti-HSV-1 e citotoxicidade do extrato aquoso de *Tanacetum parthenium*. 24<sup>o</sup> Encontro Anual de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá, 2015.

NUNES, MR; FARIA, NR; VASCONCELOS, JM; GOLDING, N; KRAEMER, UM; OLIVEIRA, LF; et al. Emergence and potential for spread of

Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015 Apr;13:102.

RAMOS, D. F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

SPINDOLA, K. C. W. et al. Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (*Fabaceae*, *Leguminosae*). *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 537, 2014.

Patients. *The New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 12, p.1177-9. 2020.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES PERIODONTAIS INDUZIDAS PELO VÍRUS *CHIKUNGUNYA* EM CAMUNDONGOS

Cruz<sup>1</sup>, M. F. A.; Anestino<sup>1</sup>, T. A.; Moreira<sup>1</sup>, T. P.; Souza<sup>1</sup> D. G. e Madeira<sup>1</sup> M. F. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, ICB/Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro (LIMHO)

E-mail: amamfcruz@gmail.com

**Resumo:** *Chikungunya* virus (CHIKV) é um alfavírus de RNA de fita simples, agente etiológico da febre de Chikungunya. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a inoculação de CHIKV em camundongos induz a produção de diversos mediadores, como as citocinas IL-6 e TNF, indutoras da atividade de osteoclastos. Objetivou-se, assim, entender o processo infeccioso por CHIKV na homeostase óssea e em doenças que envolvem reabsorção óssea como a doença periodontal, uma vez que foi observada a presença de CHIKV em tecidos periodontais de camundongos infectados. Para isso, foram utilizados camundongos machos selvagens (WT) da linhagem C57BL/6 infectados com  $1 \times 10^6$  UFP de CHIKV e seus controles não infectados. Foi realizada uma cinética de infecção (3,7, 14 e 21 dias após a inoculação intraplantar do CHIKV) e, após a eutanásia, em cada tempo experimental, os tecidos periodontais foram removidos e processados para análise de perda óssea alveolar, detecção indireta de macrófagos (NAG), detecção indiretas de neutrófilos (MPO) e produção de mediadores inflamatórios pela técnica de ELISA. Foi observada uma perda óssea alveolar significativa em animais com 7 ou 14 dias de infecção por CHIKV e não houve um aumento significativo na quantificação de NAG e MPO na maxila dos animais infectados pelo CHIKV. Concluiu-se que a presença de CHIKV nos tecidos periodontais está relacionada a alterações teciduais, como a perda óssea alveolar. Tem-se como perspectiva analisar a produção de mediadores inflamatórios nos mesmos tempos experimentais avaliados para a perda óssea alveolar, para o entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

**Palavras-chave:** CHIKV; Perda óssea alveolar; camundongos; inflamação

### 1. Introdução

O vírus *Chikungunya* (CHIKV) é um alfavírus com genoma composto por RNA de fita simples, agente etiológico da febre de Chikungunya, uma arbovirose. CHIKV é transmitido principalmente por mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (MOREIRA, P. T., 2018). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a inoculação de CHIKV em camundongos induz a produção de diversos mediadores, como as citocinas IL-6 e TNF, conhecidamente indutoras da atividade de osteoclastos, células envolvidas na reabsorção óssea.

Além disso, osteoblastos são também células alvo na infecção pelo CHIKV, que resulta na ativação do processo de osteoclastogênese com consequente reabsorção óssea (CHEN et al., 2014), o que indica a importância do entendimento do processo infeccioso por CHIKV na homeostase óssea e em doenças que envolvem reabsorção óssea como a doença periodontal, uma vez que já foi observada a presença de CHIKV em tecidos periodontais de camundongos infectados.

O desenvolvimento de modelos que permitam estudar a interação entre o vírus e a região periodontal do hospedeiro poderão servir de base para o entendimento de fatores associados com a doença periodontal. Assim como a implementação de medidas odontológicas preventivas no ser humano infectado, com o objetivo de reestabelecer a saúde bucal.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Amostragem

Foram utilizados grupos de camundongos machos selvagens (WT) da linhagem C57BL/6 com 4 semanas de idade infectados com  $1 \times 10^6$  UFP de CHIKV. Camundongos não infectados

foram utilizados como controles. Foi realizada uma cinética de infecção (1, 3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação intraplantar do CHIKV). Após a eutanásia, em cada tempo experimental, foram removidos os tecidos periodontais

## 2.2 Quantificação da perda óssea alveolar

Após a eutanásia, as hemimaxilas direitas foram removidas e tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes, diluído em igual volume de água destilada, durante 24 horas, para remoção dos tecidos moles. Posteriormente, foram lavadas e deixadas secar em temperatura ambiente. Para a quantificação da perda óssea alveolar, as maxilas foram coradas com solução de azul de metileno 0,3% e, após 5 minutos, foram lavadas com água destilada até a total retirada do excesso de corante. A secagem foi realizada em temperatura ambiente por 24 horas. Para obtenção das imagens, as maxilas foram fixadas e uma câmera (Kodak EasyShare C743, Manaus, Brasil) foi ajustada sob a objetiva de um microscópio estereoscópico binocular 200 M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Q724S-1, Diadema, Brasil). As imagens foram obtidas da região palatina dos molares superiores. Com o auxílio do programa Image J, a área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) foi medida e os valores obtidos correspondem à perda óssea alveolar avaliada no primeiro molar superior das hemimaxilas analisadas.

## 2.3 Detecção indireta de neutrófilos (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, a hemimaxila esquerda de animais infectados ou controles foram retiradas e congeladas a -20 °C. Após descongelamento, os tecidos foram homogeneizados em tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO<sub>4</sub>; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 10000 rpm, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelado seguido da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e rehomogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Eppendorf do Brasil) e submetidas a três ciclos de

congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm e os sobrenadantes coletados.

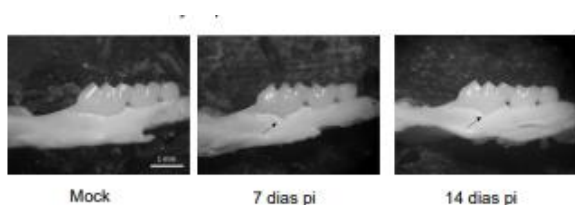
A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada em espectrofotômetro (450nm) usando tetrametilbenzidina (1.6mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5mM).

## 2.4 Detecção indireta de macrófagos (NAG)

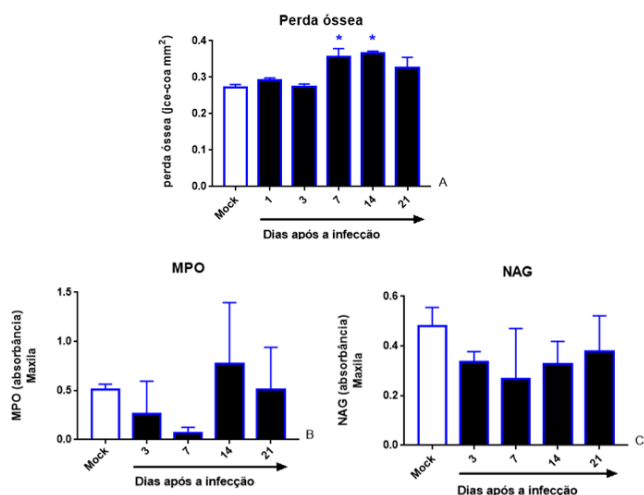
O acúmulo de macrófagos foi avaliado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Para isso, após a eutanásia, as hemimaxilas dos animais infectados ou controles foram retiradas e congeladas a -20 °C. Após o descongelamento, 100 mg do tecido foram homogeneizadoa em 2 mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO<sub>4</sub>; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125). Após centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% seguido da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,9%/Triton X-100 0,1% v/v e re-homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm e o sobrenadante utilizado para o ensaio. Alíquotas de 100 µL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, em duplicata e 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosiminida) foram adicionados. As placas foram mantidas a 37°C. Após 10 minutos, foi adicionada a solução 100 µL de tampão glicina 0,2 M e a atividade da NAG foi determinada em espectrofotômetro (400nm). Os resultados foram expressos como absorbância (ABS).

## 3. Resultados e Discussão

A ocorrência de perda óssea alveolar em camundongos foi avaliada após 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a infecção pelo CHIKV (Figura 1 e 2). Os animais infectados apresentaram perda óssea alveolar significativa com 7 ou 14 dias de infecção por CHIKV, quando comparados aos camundongos não infectados (Mock). A perda óssea alveolar é uma característica observada em indivíduos com doença periodontal e, segundo Antonini *et al.* (2013), a periodontite crônica, por exemplo, é caracterizada por ciclos de progressão e de estabilidade.



**Figura 1:** Imagens representativas de hemimaxilas para avaliação da perda óssea alveolar, de camundongos não infectados (Mock) e após 7 ou 14 dias pi.



**Figura 2:** A: Análise de perda óssea alveolar pela medida morfométrica da área entre a junção cimento-esmalte e da crista óssea alveolar na face palatina do primeiro molar superior da hemimaxila direita. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Mock. One-way Anova.  $n = 5$  B: Avaliação da atividade de mieloperoxidase nos tecidos periodontais. C: Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase nos tecidos periodontais.  $N = 4 - 5$

A infecção intraplantar pelo CHIKV não está associada com um aumento no influxo de neutrófilos ou macrófagos na maxila de camundongos. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO): Mock (0,5 ABS), 3 p.i. (0,27 ABS), 7 p.i. (0,06 ABS), 14 p.i. (0,8 ABS) e 21 p.i. (0,5 ABS). E a migração de células mononucleares foi feita pela quantificação dos níveis teciduais de N-acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos de maxila avaliados: Mock (0,48 ABS), 3 p.i. (0,34 ABS), 7 p.i. (0,27 ABS), 14 p.i. (0,33 ABS) e 21 p.i. (0,38 ABS). Para averiguar a presença ou não de neutrófilos e macrófagos, análises imuno-histoquímicas serão realizadas.

#### 4. Conclusões

A presença de CHIKV nos tecidos periodontais está relacionada a alterações teciduais, como a perda óssea alveolar. Tem-se como perspectiva analisar a produção de mediadores inflamatórios nos mesmos tempos experimentais avaliados para a

perda óssea alveolar, para o entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

#### 5. Apoio Financeiro

UFMG, ICB, LIMHO, Capes e CNPq

#### 6. Referências

CHEN, W.; FOO, S.; RULLI, N. E.; TAYLOR, A.; SHENG, K. C.; HERRERO, L. J.; HERRING, B. L.; LIDBURY, B. A.; LI, R. W.; WALSH, N. C.; SIMS, N. A.; SMITH, P. N.; MAHALINGAM, S. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 16, p. 6040–6045, 2014.

MOREIRA, P. T. **Implementação de um modelo murino de infecção pelo Chikungunya virus para o estudo da patogênese e identificação de potenciais alvos terapêuticos.** 2018. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2018.

ANTONINI, R.; CANCELLIER, K.; FERREIRA, G. K.; SCAINI, G.; STRECK, E. L. Pathophysiology of periodontal disease. *Revista Inova Saúde*, Criciúma, vol. 2, n. 2, nov. 2013.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## MULTIMERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA E SEU POTENCIAL PARA A INDUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O ZIKA VÍRUS

De SOUZA<sup>1</sup>, G. A. P.; DE CASTRO<sup>2</sup>, R. F. G.; DA SILVA<sup>1</sup>, L. C. F.; ABRAHÃO<sup>1</sup>, J. S.; COELHO<sup>2</sup>, L. F. L.

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, 31270-901, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Vacinas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, 37130-001, Minas Gerais, Brasil

E-mail:neogaps@gmail.com

**Resumo:** Desde que o Zika vírus (ZIKV) passou a ser considerado um risco para o desenvolvimento de microcefalia, o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e eficaz se tornou uma alta prioridade. Muitos grupos têm se dedicado a desenvolver estratégias para a prevenção da infecção por ZIKV e indicado o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) como um alvo promissor. Buscando superar as limitações das vacinas de subunidade, que muitas vezes são pouco imunogênicas, a multimerização de epítomos para o desenvolvimento de plataformas vacinais parece uma estratégia interessante por apresentar uma alta densidade de antígenos; apresentando-os lado a lado. Este trabalho objetiva avaliar a indução de anticorpos anti-ZIKV em animais imunizados com uma proteína quimérica de albumina sérica bovina e zEDIII, unidas por um tetrâmero de glicina. Para tal, a proteína quimérica foi expressa em *Escherichia coli* BL21, purificada por cromatografia de afinidade e a multimerização foi induzida com adição de etanol seguida de reação cruzada com glutaraldeído. Camundongos C57BL/2 foram imunizados com a proteína quimérica após a multimerização e com os monômeros quiméricos associados ou não a adjuvante completo de Freund. A avaliação da soroconversão por ensaio imunoenzimático revelou uma maior produção de anticorpos anti-ZIKV pelas proteínas multimerizadas, quando se avaliou a produção IgG específicos contra o domínio alvo, essa produção se mostrou pouco específica em comparação as outras formulações administradas.

**Palavras-chave:** Zika vírus; vacinas; proteína quimérica; multimerização de proteínas

### 1. Introdução

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Embora tenha sido isolado pela primeira vez em 1947, na Floresta de Zika, em Uganda, o ZIKV só ganhou destaque recentemente, quando passou a ser associado a desordens neuroimunológicas em adultos e à má formação de recém-nascidos (WEAVER et al., 2016; YUN; LEE, 2017). Desde que o ZIKV passou a ser considerado um risco para o desenvolvimento de microcefalia, o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e eficaz se tornou uma alta prioridade. (POLAND et al., 2018; RICHNER; DIAMOND, 2018).

Vacinas baseadas em subunidades purificadas de proteínas, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, são geralmente bastante seguras, contudo, muitas vezes podem ser pouco imunogênicas, o que traz a necessidade do uso de adjuvantes e sistemas de entrega vacinal para a indução de uma resposta imune ideal (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012).

Dentre as estratégias que parecem muito promissoras estão as vacinas de subunidades que têm como alvo o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII). Esse domínio está associado à ligação do vírus ao receptor celular, além de possuir epítomos específicos capazes de induzir fortes respostas de anticorpos neutralizantes do hospedeiro e/ou imunidade protetora (BOS et al., 2018; YANG et al. 2017).

A albumina, por sua vez, é uma proteína plasmática considerada carreadora na farmacocinética de inúmeros fármacos e que exibe uma série de propriedades interessantes como a sua estabilidade em uma ampla faixa de pHs (4 a 9),

ser solúvel em até 40% de etanol, poder ser aquecida a sem efeitos deletérios, bem como ser uma proteína biodegradável e não-tóxica (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a, 2012b).

Produzir uma proteína quimérica que associe essa proteína carreadora ao antígeno altamente imunogênico e multimerizá-la representa uma estratégia promissora. Essa multimerização de antígenos pode gerar padrões semelhantes a *viral-like particles* (VLP) e, assim, aumentar as respostas imunológicas.

A apresentação lado a lado do antígeno pode superar a baixa imunogenicidade das vacinas de subunidades proteicas que geralmente falham em interagir com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e outros receptores do sistema imunológico inato (GARCIA-SASTRE, 2013). Além disso, padrões de superfície repetitivos podem promover a ligação cruzada dos receptores das células B e levar à ativação das células (BACHMANN; JENNINGS, 2010; LÓPEZ-SAGASETA *et al.*, 2016). Outra vantagem dessa plataforma é a sua biocompatibilidade (GARCIA-SASTRE, 2013).

Para esta prova de conceito, multimerizamos uma proteína quimérica, denominada zBSA, que consiste da zEDIII fusionada a albumina sérica bovina (BSA) por um tetrâmero de glicina, e, avaliamos o seu potencial de indução de anticorpos contra o ZIKV.

## 2. Metodologias

### 2.1 Obtenção das proteínas recombinantes

A sequência de nucleotídeos referente a zEDIII foi obtida a partir do genoma do ZIKV isolado no Brasil (Número de Acesso no GENBANK: MH882541), assim como foi obtida a sequência de nucleotídeos da BSA (Número de Acesso no GENBANK: AF542068). A partir dessas sequências foram construídos dois genes sintéticos utilizando-se o vetor pET28a (+) otimizado para a expressão em procariotos. A primeira construção, foi denominada de pET28a-zEDIII. A segunda, denominada de pET28a-zBSA, representava uma proteína quimérica, que foi chamada de zBSA, pois possuía sequência de zEDIII fusionada à sequência de BSA por códons de tetrâmeros de glicina.

As bactérias quimiocompetentes (*Escherichia coli* BL21) foram transformadas com 50 ng de DNA plasmidial (pET28a-zEDIII ou pET28a-zBSA) através de choque térmico. E posteriormente plaqueadas em LB-ágar com Canamicina (50 µg/mL) para a seleção das colônias.

A produção da proteína foi induzida em duas etapas, a primeira performada por 18h a uma temperatura de 22 °C pela a adição de 0,5 mM de IPTG (indução lenta). Seguida de uma indução final por mais 3h a 37 °C, adicionando-se mais 1,5 mM de IPTG à cultura (indução rápida).

Após a indução, a bactéria foi lisada com tampão guanidina 6 M, e a fração solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Quelato de níquel. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% e a fração contendo a maior concentração da proteína de interesse (zEDIII ou zBSA) foi dialisada em membrana de 3.5 kDa e quantificadas pelo método de ácido bicinonínico (BCA). A confirmação da expressão também foi realizada por western-blot utilizando-se anticorpo anti-*HisTag*.

A proteína zBSA passou por uma concentração utilizando um kit Amicon® Millipore (MWC0), e foi ressuspensa em salina fosfatada tamponada contendo 0,1% Tween80 e pH 10.0 para a concentração de 0.6 mg/mL.

### 2.2 Indução e caracterização físico-química da multimerização da proteína quimérica zBSA

A multimerização foi pela adição contínua de etanol absoluto sobre 2 mL de uma solução de BSA comercial ou zBSA (2% m/v) em água deionizada sob agitação até a obtenção de uma solução opalescente. A ligação cruzada foi realizada com a adição de 40 µL de glutaraldeído 25%, em uma incubação a temperatura ambiente, sob agitação, por 2 h. Em seguida, a solução foi submetida e o pellet ressuspensa para a concentração de 10 mg/mL em Tampão fosfatado salino (PBS) pH 7.4 estéril.

O tamanho da partícula formada (M-zBSA), distribuição (PDI) e potencial zeta foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A morfologia das partículas foi analisada utilizando microscopia eletrônica de força atômica (microscópio TT-AFM).

### 2.3 Imunização e obtenção do soro de camundongos

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 4-6 semanas de idade (n=5/grupo) foram adquiridos do biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos em condições livre de patógenos e com acesso livre a ração e água no biotério do prédio D, da UNIFAL-MG (CEUA: 12/2016).

Os animais receberam 3 doses de 100 µL pela via subcutânea, cada uma com um intervalo de 7 dias, de cada tratamento: (a) zBSA multimerizada

(M-zBSA[100 µg/dose]); (b) zBSA associada a Adjuvante de Freund (zBSA+Adj[50 µg/dose]); (c) zBSA (50 µg/dose). Como controle negativo, camundongos foram inoculados com PBS. Após 15 dias da última dose de imunização, os animais foram anestesiados com xilasina e quetamina e o sangue coletado pela veia submandibular para avaliação da produção de anticorpos IgG totais.

#### 2.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-antígenos

O soro coletado foi submetido à ensaios de ELISA para quantificação de IgG total. Para tal, placas poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA) foram sensibilizadas com proteína zEDIII recombinante (20 µg/mL), ou o Zika vírus (5000 PFU/mL) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M, pH 9,6). As lavagens entre as etapas foram feitas com salina fosfatada tamponada contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e o bloqueio com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé). Os soros foram diluídos 1:25 em solução de PBS-T e adicionados à placa que foi incubada (1h a 37 °C). Após um ciclo de lavagens, o conjugado diluído de anti-IgG peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado aos poços e incubado novamente (1 h a 37 °C). Após uma etapa final de lavagem, as placas foram desenvolvidas com tampão citrato/fosfato (pH 4,5) contendo 0,4 mg/mL de dicloridrato de orto-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) e 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e então lida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 450 nm.

#### 2.5 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com Prism 6 (software GraphPad, EUA). Os dados foram analisados usando ANOVA de dois fatores, seguido por pós-teste de Bonferroni ou teste t para comparações múltiplas. Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os valores são relatados com valores individuais ou como a média ± dp.

### 3. Resultados e Discussão

As proteínas foram produzidas em *E. coli* BL21 (DE3) como proteínas solúveis e apresentaram a mobilidade eletroforética esperada. A expressão da proteína também foi confirmada por western-blot com anticorpos anti-HisTag.

A proteína quimérica, zBSA, foi multimerizada pelo método de coacervação. A escolha dos

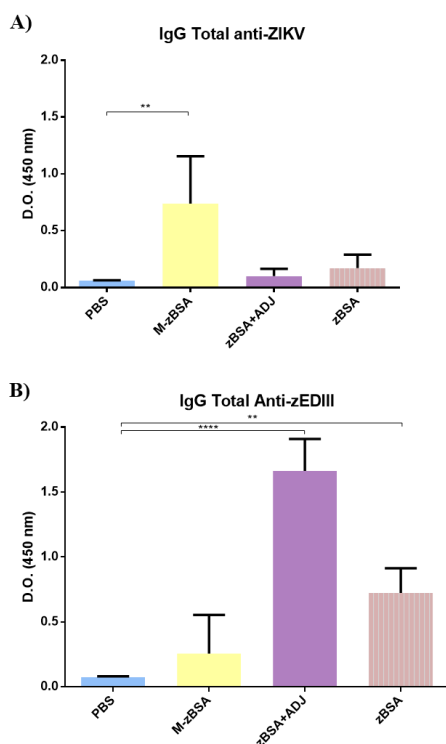
componentes da matriz polimérica é importante para se modular as características de liberação e de degradação da partícula, pois eles controlam e mantêm a liberação do antígeno durante o transporte e no local de localização, de modo a aumentar a sua eficácia (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Biomateriais naturais apresentam méritos de biocompatibilidade (NITTA; NUMATA, 2013).

Além das diversas possibilidades materiais para a construção dessas partículas, parâmetros físico-químicos devem ser avaliados para otimizar a funcionalidade das partículas, como tamanho, forma, carga e distribuição das partículas. A análise de DLS revelou partículas com um diâmetro médio de  $1388 \pm 35,1$ nm, com um PDI de  $0,426 \pm 0,044$ . Enquanto o potencial zeta de foi avaliado em PBS pH 7,2 tendo em média um valor de  $-33,9 \pm 3,2$ mV.

Partículas com tamanho em torno de 1 µm são favoravelmente fagocitadas por células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, que subsequentemente podem entrar nos vasos linfáticos (PITAKSUTEEPONG, 2005). Esse evento resulta no acúmulo de partículas nas células dendríticas residentes em linfonodos (SADRIEH; DOBROVOLSKAIA, 2010).

O potencial zeta reflete a carga superficial das partículas e é influenciado pela composição da partícula e do meio em que está disperso. Partículas com potencial zeta acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV são mais estáveis em suspensão, pois a carga superficial evita a agregação das partículas (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Além disso, partículas carregadas negativamente podem representar uma estratégia para melhor direcionamento de MPs, pois eliminam a não especificidade da interação carga-carga com os fosfolipídios da membrana celular (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011; VOIGT; CHRISTENSEN; SHASTRI, 2014). A microscopia de força atômica revelou partículas arredondadas e ao mesmo tempo alongadas.

O ELISA, avaliando IgG total anti-Zika vírus revelou uma maior soroconversão dos animais imunizados com a MP-zBSA (Figura 1A). Quando foi avaliada a produção de IgG total específicos contra a proteína zEDIII recombinante, apenas os grupos zBSA+ADJ e zBSA apresentaram uma produção significativa de anticorpos (Figura 1B).



**Figura 1:** Produção de IgG totais nos camundongos C57BL/6 imunizados avaliados por ELISA. (A) IgG total anti-ZIKV; (B) IgG total anti-zEDIII recombinante.

PBS: animais que receberam tampão fosfato-salino; M-zBSA: animais imunizados com a proteína quimérica (zBSA) multimerizada; zBSA+ADJ: Animais imunizados com zBSA em adjuvante de Freund; zBSA: Animais imunizados com a zBSA isoladamente.

Anticorpos tipo IgG tem um grande papel na prevenção de arboviroses, pois, muitas vezes, refletem uma proteção de longa duração, como é esperado para vacinas (SIEGRIST, 2012). Ao se avaliar os níveis de IgG totais contra ZIKV e contra zEDIII recombinante, foi possível observar que, embora as M-zBSA tenham gerado mais anticorpos contra o ZIKV, eles não foram específicos para o domínio alvo, o que pode sugerir uma ativação de anticorpos policlonais, mas inespecíficos.

Ainda assim, a imunização dos animais com zBSA+Adjuvante e até mesmo zBSA isoladamente produziram anticorpos específicos contra o domínio alvo (zEDIII), sugerindo um melhor direcionamento da resposta humoral gerada pela imunização com esta formulação.

#### 4. Conclusões

A imunização de camundongos C57BL/6 com a proteína quimérica zBSA gera anticorpos específicos contra zEDIII recombinante, potencializado com o uso de adjuvantes. A

imunização pelos multímeros gerados a partir dessa proteína induz uma maior produção de anticorpos contra o ZIKV, mas estes parecem ser inespecíficos. Este resultado indica o potencial dessa proteína para o desenho racional de formulações de vacinas baseadas em carreadores de albumina. No entanto, estudos futuros devem ser realizados para avaliar a atividade neutralizante dos anticorpos gerados e para verificar o potencial dessa formulação em induzir uma resposta protetora em modelo animal de infecção com ZIKV. As formulações podem ter seus parâmetros físico-químicos ajustados, para gerar formulações nanométricas, que podem ser mais eficazes. A imunogenicidade ainda pode ser melhorada ligando-se à superfície das partículas ligantes de TLR ou outros antígenos virais, como epítomos de proteínas não estruturais do ZIKV, para um melhor direcionamento da resposta imune.

#### 5. Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde (MS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Pro-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq-UFMG).

#### 6. Agradecimentos

Ao Centro de Microscopia (CEMIC) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e à FINEP (Proc. 0179/12) pelas imagens obtidas.

#### 7. Referências

- AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv Polym Sci*, v. 247, p. 31–64, 2012.
- BACHMANN, M. F.; JENNINGS, G. T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 11, p. 787–796, 2010.
- DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology*, v. 2, n. 8, p. 469–78, 2007.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal*

of **Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168–182, 2012a.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38–49, 2012b.

GARCIA-SASTRE, A.; I, M. Novel vaccine strategies against emerging viruses **Virology**, v. 3, p. 210–216, 2013.

IVERSEN, T.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176–185, 2011.

LEE, I. et al. Probing Molecular Insights into Zika Virus – Host Interactions. **Viruses**, v. 10, n. 233, p. 1–26, 2018.

LÓPEZ-SAGASETA, J. et al. Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 58–68, 2016.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

NITTA, S. K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1629–1654, 2013.

PITAKSUTTEPONG, T. Nanoparticles: A Vaccine Adjuvant for Subcutaneous Administration. **Naresuan University Journal**, v. 13, n. 2, p. 53–62, 2005.

POLAND, G. A. et al. Review Development of vaccines against Zika virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. e211–e219, 2018.

RICHNER, J. M.; DIAMOND, M. S. ScienceDirect Zika virus vaccines: immune response, current status, and future challenges. **Current Opinion in Immunology**, v. 53, n. C, p. 130–136, 2018.

SIEGRIST, C. A. **Vaccine immunology**. Sixth Edition ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012.

VOIGT, J.; CHRISTENSEN, J.; SHASTRI, V. P. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. **PNAS**, v. 111, n. 8, p. 2942–2947, 2014.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69–80, 2016.

YANG, M. et al. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4287–4294, 2017.

YUN, S.-I.; LEE, Y.-M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.

ZOLNIK, B. S. et al. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO POR PCR QUANTITATIVO (QPCR) PARA O VÍRUS DA HEPATITE D (HDV)

Lara, J. L.<sup>1</sup>; Paixão, V.M.<sup>1</sup>; Mota, B. E. F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Microbiologia Clínica.

E-mail: vivianmp95@gmail.com

**Resumo:** A infecção pelo vírus da hepatite D é diagnosticada através de anticorpos. No Brasil, o diagnóstico sorológico da infecção por HDV só é realizado nos casos em que o indivíduo reside em áreas endêmicas ou tenha um antecedente epidemiológico que o ligue a estas regiões e testes moleculares só são realizados em caráter de pesquisa. Apesar da existência de alguns “kits” comerciais para a detecção do HDV por qPCR, os mesmos apresentam algumas desvantagens, como alto custo e incapacidade de detectar alguns genótipos, como, por exemplo, o genótipo 3, circulante no Brasil. Portanto, o projeto teve o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico para o HDV baseado em qPCR que seja de baixo custo e com capacidade de detecção de todos os genótipos circulantes no Brasil. Para isso, foi realizada uma busca na literatura para identificação de testes moleculares para a detecção do HDV já publicados (denominados PAN e KARA); foram selecionados aqueles em que os iniciadores utilizados tiveram maior probabilidade de detectar diferentes genótipos do HDV e esses iniciadores foram utilizados para a padronização de uma reação de qPCR utilizando agentes intercalantes (SYBR Green). Esses valores foram comparados com os obtidos no artigo original. Os resultados iniciais obtidos mostram que foi possível obter bons resultados com os artigos base escolhidos, no entanto, ainda há o que melhorar para obter um teste 100% eficiente.

**Palavras-chave:** Hepatite; qPCR; HDV; SYBRGreen

### 1. Introdução

O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus defectivo que acomete somente indivíduos previamente infectados pelo vírus da hepatite B (HBV), pois necessita da proteína de superfície desse último (HBsAg) para sua multiplicação e patogênese. Este vírus apresenta uma grande

diversidade genética, sendo filogeneticamente classificado em 8 genótipos (denominados HDV 1-8). O genótipo 1 do HDV têm distribuição mundial, enquanto que os demais genótipos têm distribuição geográfica restrita, sendo os genótipos 2 e 4 encontrados no sudeste Asiático, os genótipos de 5 a 8 encontrados no continente Africano e o genótipo 3 encontrado na bacia Amazônica, incluindo o Brasil (Hughes, Wedemeyer, & Harrison, 2011).

Globalmente, cerca de 250 milhões de indivíduos vivem com infecção crônica por HBV, dos quais 15 milhões também são infectados pelo HDV. A dupla infecção HBV-HDV é a forma mais grave de hepatite viral conhecida, sendo que os pacientes infectados são mais propensos a desenvolver manifestações clínicas como hepatite fulminante, descompensação hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular-HCC (Rizzetto, 2015).

No Brasil, a infecção pelo HDV é bem documentada na Bacia Amazônica, onde sua prevalência é uma das mais altas do mundo e circulam os genótipos 1 e 3, sendo este último endêmico desta região (Crispim et al., 2014; Viana, Paraná, Moreira, Compri, & Macedo, 2005; Wranke et al., 2017). Por outro lado, estudos sobre a prevalência do HDV em outras partes do Brasil são escassos, levando à ideia errônea de que este vírus só circularia no Brasil na Região Amazônica. Porém, um estudo recente demonstrou a presença de anticorpos anti-HD em pacientes com hepatite B crônica em todas as regiões do país, incluindo o estado de Minas Gerais (Lago et al., 2018).

A infecção pelo vírus da hepatite D é diagnosticada pelo encontro de anticorpos contra o vírus (anti-HD total ou IgM) e/ou RNA viral no plasma (Olivero & Smedile, 2012). Ao contrário das várias opções terapêuticas efetivas disponíveis para a infecção pelo HBV, a infecção dupla pelo HDV-HBV só pode ser tratada com altas doses de interferon alfa (Lempp, Ni, & Urban, 2016).



Entretanto, no Brasil, o diagnóstico sorológico da infecção por HDV só é realizado nos casos em que o indivíduo reside em áreas endêmicas ou tenha um antecedente epidemiológico que o ligue a estas regiões, como a Região Amazônica (Ministério da Saúde, 2017) e testes moleculares só são realizados em caráter de pesquisa.

Assim, apesar da existência de alguns “kits” comerciais para a detecção do HDV por qPCR, os mesmos apresentam algumas desvantagens, tais como alto custo (todos baseados no uso de sondas de hibridização) e incapacidade de detectar alguns genótipos, como por exemplo o genótipo 3, circulante no Brasil. Portanto, existe uma demanda no país pelo desenvolvimento de um teste de diagnóstico molecular para o HDV que seja de baixo custo e que consiga detectar os genótipos circulantes no Brasil (1 e 3) para implementação no Sistema Único de Saúde. Assim, o objetivo desse projeto é desenvolver um teste diagnóstico para o HDV baseado em qPCR que seja de baixo custo e com capacidade de detecção de todos os genótipos circulantes no Brasil.

## 2. Metodologias

### 2.1 Busca na literatura

Foi realizada uma busca na literatura para identificação de testes moleculares de detecção do HDV já publicados. Foram então selecionados dois artigos que usam o sistema de qPCR TaqMan em que os iniciadores utilizados tiveram maior probabilidade de detectar diferentes genótipos do HDV (foram denominados PAN e KARA) e esses iniciadores foram utilizados para a padronização da qPCR utilizando agentes intercalantes (SYBR Green). As condições dos iniciadores foram:

KARA: [primer] = 600 nM; T<sub>m</sub> (Melting Temperature) = 84 °C; T<sub>m</sub> F (Forward) = 60,1 °C; T<sub>m</sub> R (Reverse) = 60,4 °C.

PAN: [primer] = 400 nM; T<sub>m</sub> (Melting Temperature) = 84 °C; T<sub>m</sub> F (Forward) = 55 °C; T<sub>m</sub> R (Reverse) = 60,4 °C

### 2.2 DNA molde

Uma construção sintética de DNA contendo aproximadamente 900 pb do genoma do HDV foi sintetizada para servir como DNA molde para padronização desta reação. A sequência utilizada foi

a de uma amostra de HDV considerada padrão pela OMS (genótipo 1, número de acesso Gen Bank HQ005371). Esta construção abrange a região do gene HD e a região da ribozima, duas regiões utilizadas para desenho dos iniciadores específicos. Esta síntese foi realizada pela empresa GenOne

(<http://www.genone.com.br/>) e todos os controles de qualidade foram realizados pela empresa para garantir a qualidade da construção.

### 2.3 PCR convencional

Para garantir a qualidade da construção obtida, foi realizado uma Nested-PCR convencional, utilizando os iniciadores externos 853 IU (5' CGGATGCCAGGTTCGGACC 3') e 1302 OD (5' GGATTCACCGACAAGGAGAG 3') e internos HDV-E (5' GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG 3') e HDV-A (5' GAAGGAAGGCCCTCGAGAACAAGA 3'). As condições da reação foram uma etapa inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, com uma etapa final de 72°C por 5 minutos. O produto da reação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e visualizado sob transluminador de luz UV.

### 2.4 PCR quantitativo (qPCR)

As reações de PCR quantitativo foram realizadas utilizando o reagente RealQ Plus 2X Master Mix Green (Ampliqon, Dinamarca), segundo as condições originais de cada artigo, avaliando o controle e os iniciadores. Inicialmente, foram testadas diferentes reações contendo diferentes concentrações dos iniciadores (de 50 a 500 nM cada). As condições da reação tiveram uma etapa inicial de 95°C por 15 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95° por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72° por 30 segundos. Foram comparadas visualmente as curvas de amplificação e a eficiência de amplificação fornecida pelo equipamento.

#### 1.4.1. Avaliação do controle e iniciadores

Foram realizadas diferentes diluições do DNA (1:10/1:100/1:1000/1:10.000) para avaliar controle e iniciadores, sob as mesmas condições de cada artigo original.

#### 1.4.2. Avaliação da eficiência

Foram avaliadas as eficiências das reações, com as concentrações de iniciadores idênticas às dos artigos, utilizando kit Syber. Foram utilizadas as diluições do DNA: puro, 1:10 - 1:1.000.000. Foi feita uma curva com 7 pontos em triplicadas (Standard Curve).

Foi avaliado se concentrações diferentes de iniciadores (100 nM até 700 nM) poderiam

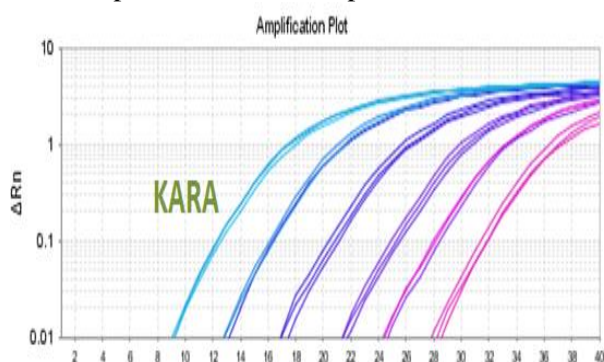
aumentar a eficiência das reações, utilizando a concentração de DNA 1:100. A concentração com o melhor resultado foi escolhida para avaliar novamente a eficiência.

De acordo com o resultado para KARA, foram avaliadas concentrações maiores (700 nM, 800 nM e 900 nM), com o objetivo de aumentar a eficiência, utilizando a concentração de DNA 1:10.

### 3. Resultados e Discussão

Ao avaliar se concentrações diferentes de iniciadores podem aumentar eficiência das reações, os melhores resultados de amplificação foram obtidos na concentração dos iniciadores de 700nM, portanto, foi a concentração escolhida para avaliar novamente a eficiência.

Ao avaliar a eficiência das reações, vimos que a amplificação de PAN foi mais tardia, assim, KARA apresentou o melhor perfil.



**Figura 1:** Avaliação da eficiência das reações, com concentração dos iniciadores de 700nM, realizado por kit Syber 16301733 Val: 23/04/2020. Diluições DNA: 1:10 – 1:1.000.000: KARA apresentou o melhor perfil

Ao avaliar concentrações maiores para KARA, com o objetivo de aumentar a eficiência, Todas as curvas ficaram da mesma forma, logo, a concentração do iniciador não teve diferença no CT.

Tabela 1- Análise de parâmetros da PCR

	SLOPE	Y-Inter	R <sup>2</sup>	Eff%
KARA 1	-4.547	16.121	0.982	65.925
KARA 2	-3.909	15.068	0.995	80.235
PAN 1	-3.185	28.094	0.856	106.068
PAN 2	-3.438	27.61	0.946	95.355

SLOPE: inclinação da fase linear de amplificação. É usado para medir a eficiência da reação. Valores próximos a -3.32 relacionam-se a 100 % de eficiência.

R2: reflete a linearidade da curva padrão, o ideal é próximo de 1. É desejável que seja maior que 0.98

EFF: desejável 100 %.

### 4. Conclusões

Avaliando os resultados obtidos, concluímos que KARA 2 obteve melhor linearidade da curva padrão e PAN 1 e 2 obtiveram melhores eficiências, portanto, é preciso aumentar a eficiência de KARA e melhorar a linearidade de PAN para obter melhores resultados.

### 5. Apoio Financeiro

UFMG

### 6. Referências

CRISPIM, M. A. E., FRAJI, N. A., CAMPELLO, S. C., SCHRIEFER, N. A., STEFANI, M. M. A., & KIESSLICH, D. (2014). Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-94>

HUGHES, S. A., WEDEMEYER, H., & HARRISON, P. M. (2011). Hepatitis delta virus. *The Lancet*, 378(9785), 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61931-9)

LAGO, B. V., MELLO, F. C. A., BARROS, T. M., MELLO, V. M., VILLAR, L. M., LEWIS-XIMENEZ, L. L., ... Brazilian Hepatitis B Research Group. (2018). Hepatitis D infection in Brazil: Prevalence and geographical distribution of anti-Delta antibody. *Journal of Medical Virology*, 90(8), 1358–1363. <https://doi.org/10.1002/jmv.25196>

LEMPP, F. A., NI, Y., & URBAN, S. (2016). Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(10), 580–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.126>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2017). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília.

Olivero, A., & Smedile, A. (2012). Hepatitis Delta Virus Diagnosis. *Seminars in Liver Disease*, 32(03), 220–227. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323627>

RIZZETTO, M. (2015). Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a021576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021576>



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DE OVITRAMPAS PARA O MONITORAMENTO DOS CASOS DE DENGUE EM IBIRITÉ - MG

Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Rodrigues<sup>1</sup>, M. F. R.; Martelleto<sup>1</sup>, N.C.; Teixeira<sup>1</sup>, C.W.; SILVA<sup>2</sup>, S.I.A.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibirité, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP).

<sup>2</sup>Centro de Controle Epidemiológico de Zoonoses do Município de Ibirité.

E-mail: [leonardopp127@gmail.com](mailto:leonardopp127@gmail.com)

**Resumo:** A dengue é uma doença viral comum em regiões tropicais e subtropicais, onde, o clima favorece a proliferação do vetor. De acordo com dados do SINAN, Minas Gerais em 2020, Minas Gerais acumulou até o mês de abril, cerca de 46.681 casos prováveis da doença. Portanto o trabalho tem como objetivo a instalação de armadilhas para captura de ovos do vetor da doença. Inicialmente foram definidos pontos nos bairros (residências) para receberem as armadilhas OVITRAMPAS. Para confecção das armadilhas foram utilizados: um vaso de planta médio, uma paleta de madeira (no formato de uma lâmina laboratorial de vidro), água, um clip grande e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diluída em água. Pode ser observar que o número de ovos capturados em maio de 2019 foi o mais alto, refletindo indiretamente o maior número de casos de dengue no Município. Ainda em maio foram capturados um total de cerca de 2 mil ovos do mosquito. Desde a colocação das armadilhas em dezembro de 2018, foi possível observar que em 2019 o número de casos registrados de dengue foi menor comparado ao ano de 2016, e em contrapartida o número de ovos coletados nas OVITRAMPAS tem aumentado de 2019 a 2020 com a intensificação do trabalho com as armadilhas para o mosquito. Esse dado reforça a importância da utilização de OVITRAMPAS como forma de monitoramento dos casos de dengue no Município.

**Palavras-chave:** OVITRAMPAS; Dengue; Monitoramento.

### 1. Introdução

A dengue é uma doença viral causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*. Quatro sorotipos do vírus são

conhecidos, DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 e um quinto sorotipo foi relatado na Malásia, o DENV5, (MUSTAFA, 2015). Todos os sorotipos podem causar desde um quadro de infecção assintomática até a formas mais graves podendo levar a óbito.

Os principais vetores dos vírus causadores de doenças emergentes são, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo responsáveis pela transmissão de doenças como Zika, Chikungunya, Mayaro e Dengue. Esses vetores possuem ampla distribuição geográfica em todo mundo, podendo sofrer influência na sua abundância por diversos fatores sendo o clima um dos principais influenciadores (JUNIOR, et al, 2019).

No Brasil, o *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão nas áreas urbanas. Ele é um mosquito de hábito diurno, atuando principalmente no início da manhã e no final da tarde; tem preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares, e alimenta-se principalmente de sangue humano (DIAS, et al, 2010).

Ele também é caracterizado pela presença de listras pretas e brancas nas pernas, um desenho em forma de lira em seu tórax, e coloração mais clara em relação ao *Aedes albopictus* (FORATTINI, 2003 apud NORONHA, JÚNIOR E COCCO, 2017).

Nos períodos chuvosos e de alta umidade a disseminação do mosquito em ambientes urbanos é maior (MARINHO, et. al, 2016).

De acordo com dados do SINAN, Minas Gerais passou por quatro anos endêmicos, os índices registraram nos anos de 2010, 2013, 2016 e 2019, respectivamente cerca de 212.539, 414.748, 517.813 e 483.733 casos prováveis da doença. Em 2020, Minas Gerais acumulou até o mês de abril, cerca de 46.681 casos prováveis da doença.

Tulin-lin e colaboradores (2010) juntamente com Resende, Silva e Eiras (2010)

defendem a necessidade de métodos de controle de baixo custo para conter essa endemia. A escolha de um método prático de prevenção ao vetor utilizando armadilhas que podem capturar o mosquito é de grande relevância visto que não existem medicamentos ou vacinas disponíveis para o tratamento das doenças transmitidas por esses mosquitos.

Neste contexto, em dezembro de 2018, o Centro de Controle Epidemiológico de Zoonoses (CCEZ) do Município de Ibitaré (MG) implementou a utilização de armadilhas chamadas OVITRAMPAS em alguns bairros do Município que apresentavam um índice de notificações de casos de dengue.

As armadilhas OVITRAMPAS, são armadilhas de baixo custo, sendo composta basicamente por um vaso de planta pequeno, uma paleta de madeira, clips, água e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta armadilha tem como foco a captura dos ovos do vetor, com intuito de destruí-los posteriormente. Desta forma, as armadilhas oferecem um ambiente propício para a fêmea do vetor fazer a postura dos ovos, conseqüentemente, são retirados do ambiente milhares de vetores que iriam eclodir dos ovos destruídos.

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo implementar esta armadilha em todo município de Ibitaré, com intuito de monitorar e controlar a quantidade de vetores circulantes no ambiente, à vista disso, contribuir com a diminuição do número de casos no município.

## 2. Metodologia

Inicialmente foram definidos pontos nos bairros (residências) para receberem as armadilhas OVITRAMPAS. Como o trabalho foi feito com o apoio do CCEZ os pontos foram selecionados de acordo com a disponibilidade e aceite do morador para a instalação e monitoramento das armadilhas. Dessa forma, foi definido ao final 26 pontos, espalhados por todo Município.

As armadilhas foram feitas no CCEZ, e para a sua confecção foram utilizados: um vaso de planta médio, uma paleta de madeira (no formato de uma lâmina laboratorial de vidro), água, um clip grande e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diluída em água. Vale ressaltar que o uso da levedura é utilizado como atrativo para fêmeas do mosquito, e a mesma passou a ser produzida no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP) da UEMG - Ibitaré.

Deste modo foram colocados 300mL de água juntamente com 6g da levedura dentro do vaso de planta. A paleta é sempre fixada no vaso

com a ajuda de um clip de maneira que fique na posição transversal, em que uma parte da paleta fica imersa na água para que a madeira fique levemente umedecida, favorecendo assim, a oviposição do mosquito.

As armadilhas uma vez colocadas, permaneceram por 7 dias nas residências definidas, e ao final do sétimo dia as mesmas foram recolhidas e encaminhadas para o Laboratório da Universidade do Estado de Minas Gerais (LAMAP) para que fossem contabilizados a quantidade de ovos presente nas paletas. Ao final da contabilização os resultados foram previamente tabulados no programa estatístico Excel para posteriores análises.

Destaca-se ainda que as armadilhas após retiradas ficaram 7 dias ausente nas residências, sendo dado um intervalo de 7 dias entre a colocação e a ausência das próximas armadilhas.

Para análise dos resultados foram usados os programas estatísticos Excel e GraphPad Prism 7. O número de ovos foram tabulados nos dois programas, sendo subdivididos em três tabelas: endereço onde a armadilha estava, as coordenadas do local, e o número de ovos capturados durante os 7 dias em que a armadilha estava instalada.

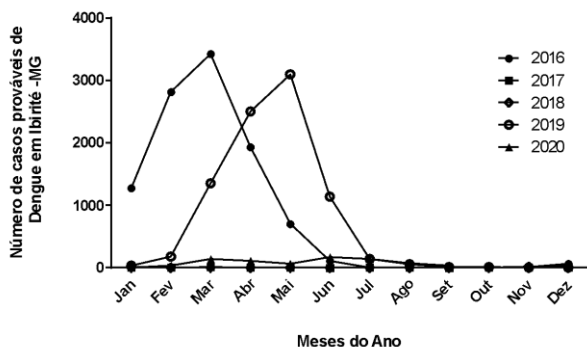
Com isso, foram plotados dois gráficos, um deles expondo a quantidade de ovos capturados e o outro o número de casos da doença no Município de Ibitaré.

## 3. Resultados e discussão

Como já é sabido, a notificação de dengue sofre aumentos mais significativos a cada 3 anos, quando ocorre a troca de soroprevalência de dois subtipos principais do vírus circulando na população. Na figura 1 pode ser observado no gráfico claramente o aumento do número de casos nos anos de 2016 e 2019 e espera-se um aumento dos casos também em 2022.

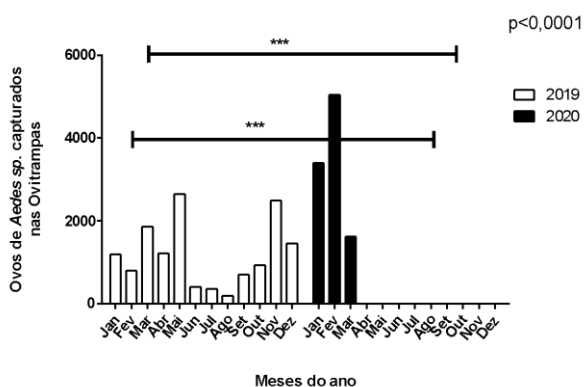
No ano de 2019, pode ser observado um aumento no número de casos prováveis de dengue entre os meses de março e julho, após esse período o número de casos foi reduzindo cada vez mais em Ibitaré.

Essa diminuição pode ter sido influenciada pelo período de seca e pouca umidade do ar, reduzindo assim os criadouros naturais do vetor da doença. No entanto, quando analisados estatisticamente os casos de dengue em 2016 e comparados à 2019 observa-se uma redução de cerca de 20% dos casos de dengue no Município em 2019 o que pode ter sido causado pela utilização das OVITRAMPAS durante todo o ano de 2019 como forma de monitoramento do número de ovos de *A. aegypti* capturados.



**Figura 1:** Gráfico do número de casos prováveis de dengue no município durante os seis anos anteriores.

Em relação a quantidade de ovos capturados durante o estudo, pode ser observado no gráfico da figura 2, que o número de ovos capturados em maio de 2019 foi o mais alto, refletindo indiretamente o maior número de casos de dengue no Município que pode ser comprovado na figura 1.



**Figura 2:** Número de ovos capturados no município durante a execução do projeto.

Ainda em maio foram capturados um total de cerca de 2 mil ovos do mosquito. Esses ovos coletados refletiram em um aumento ainda maior dos valores circulantes e com isso no número de casos de dengue se não tivessem sido retirados de circulação pelas OVITRAMPAS. Pode ainda ser observado na figura 2 que o número de ovos capturados nos meses de junho e julho reduziram, o que também pode ter ocorrido pela captura de ovos no mês de maio somado ao período do inverno.

Quando observados o número de ovos capturados de janeiro a março de 2020 observa-se que nesse período o número de ovos foi bem maior do que aqueles constatado para o ano de 2019. Nesse período do ano houve muitas chuvas, o que contribuiu para o aumento do número de mosquitos. No entanto, o número de casos

prováveis de dengue foi muito baixo, o que pode ser visto na figura 1.

Essa diminuição pode também ter sofrido influência pelo período de distanciamento social que fez com que as pessoas permanecessem um tempo maior em casa o que favorece uma maior atenção com a saúde e cuidados de higiene local, levando ao baixo número de casos registrados. Além disso, a coleta de ovos pelas OVITRAMPAS foi muito alta o que contribuiu para retirar muitos mosquitos que poderiam transmitir a dengue.

Os dados até agora coletados apontam que as OVITAMPAS podem contribuir para que o número de casos da doença seja reduzido no Município, uma vez que retirando os ovos que eclodiriam e se tornariam mosquitos circulantes menos pessoas na população serão picadas e menos mosquitos poderão realizar seu ciclo biológico completo.

#### 4. Conclusão

O número de casos prováveis de dengue na população de Ibirité gera preocupação por ser uma doença que depende mais do combate ao vetor, medidas que requerem contribuição de todo o Município.

O ano de 2016 apresentou alto número de casos e em 2018 o CCEZ iniciou a colocação de armadilhas chamadas OVITRAMPAS e iniciou uma colaboração com a UEMG - Ibirité que desde então vem colaborando para o acompanhamento dos casos de dengue no Município e da captura de ovos de *A. aegypti* nas armadilhas.

Desde a colocação das armadilhas em dezembro de 2018, foi possível observar que em 2019 o número de casos registrados de dengue foi menor comparado ao ano de 2016, e em contrapartida o número de ovos coletados nas OVITRAMPAS tem aumentado de 2019 a 2020 com a intensificação do trabalho com as armadilhas para o mosquito.

O que pode ser observado é que houve uma redução do número de casos de dengue em 2019 de cerca de 20% quando comparado ao ano de 2016, mesmo com o crescente aumento na população do município.

Esse dado reforça a importância da utilização de OVITRAMPAS como forma de monitoramento dos casos de dengue no Município e ao mesmo tempo é uma evidência de que a utilização de tais armadilhas podem contribuir ao longo dos anos para a redução dos casos de arboviroses em Ibirité.

### 5. Apoio financeiro

O trabalho recebeu apoio financeiro da agência de fomento PAEX.

### 6. Referências

DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T. M.; MOTA, L. M.; RORIZ-FILHO, J. S. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. In: Simpósio: Condutas em enfermagem de clínica médica de hospital de média complexidade - Parte 1 Capítulo VI. Medicina (Ribeirão Preto) 2010; 43(2): 143-52. Acesso em: 06/03/2019. Disponível em: [http://revista.fmrp.usp.br/2010/vol43n2/Simp6\\_Dengue.pdf](http://revista.fmrp.usp.br/2010/vol43n2/Simp6_Dengue.pdf)

FORATTINI, O. P.; FERNANDEZ, Z. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva. Rev. Saúde Pública, v.37 n.3, São Paulo, 2003. apud NORONHA, L. F.; JÚNIOR, E. O. C.; COCCO, D. D. A. Avaliação da Ocorrência do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Município de Coromandel-MG. Getec, v.6, n.14, p.149-158, 2017.

JÚNIO, D. P. F.; SERPA, L. L.N.; BARBOSA, G. L.; PEREIRA, M.; HOLCMAN, M.M.; VOLTOLINI, J.C.; MARQUES, G. R. A. M. M. Vetores de arboviroses no estado de São Paulo: 30 anos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Revista de Saúde Pública**. 2019; 53:84

MARINHO, R. A.; BESERRA, E. B.; BEZERRA-GUSMÃO, M. A.; PORTO, V. d.; OLINDA, R. A.; DOS SANTOS, C. A. Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 41: 1-10. 2016.

MUSTAFA, M.S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GRUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**. Volume 71, Issue 1, Janeiro de 2015, páginas 67-70.

RESENDE, Marcelo Carvalho de; SILVA, Ivoneide Maria da; EIRAS, Álvaro Eduardo. Avaliação da operacionalidade da armadilha MosquiTRAP no monitoramento de *Aedes aegypti*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 19, n. 4, Dezembro. 2010.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEY, A.; RICO-HESSE, R. SMITH, D. B.; STAPLETON, J. T. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**. 2017 Jan; 98(1): 2–3.

TUN-LIN W, KAY B. H, BARNES A. Critical examination of *Aedes aegypti* indices: correlations with abundance. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 54, n.5, p. 543-547, 2010.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## APLICAÇÃO DA TRANSFUSÃO DE PLASMA CONVALESCENTE EM PACIENTES ACOMETIDOS PELA COVID-19: REVISÃO SISTEMÁTICA

Silva<sup>1</sup>, L. F.; Gomes<sup>2</sup>, T. N.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GEHMED).

<sup>2</sup> Universidade Federal do Piauí., Biomédico e Mestre em Ciências Biomédicas (UFPI).

E-mail: lucasflorenci@gmail.com

**Resumo:** O presente trabalho objetivou expor os principais trabalhos desenvolvidos que utilizam a TPC como via terapêutica em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, visando demonstrar possíveis impactos desta abordagem imunoterápica. Trata-se de uma revisão sistemática, a partir da busca por publicações indexadas nas bases de dados EMBASE, PubMed e SCOPUS, as quais estivessem disponíveis para *download*, redigidas em Inglês e publicadas no recorte bienal de 2019-2020, auxiliada pelo Protocolo PRISMA. Verificou-se que 77,2% (n=17) são trabalhos de cientistas da China, enquanto 22,8% (n=5) pertencem a pesquisadores da Coreia do Sul. Apurou-se cinco trabalhos com delineamento quantitativo e qualitativo abordando a intervenção terapêutica da TPC perante a Doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19). Nulidade no índice de mortalidade, opacidade pulmonar exaurida e reações adversas minimamente inócuas foram observadas em pacientes submetidos à TPC. Contudo, a dose ideal e o tempo de tratamento permanecem incertos, as quais precisam ser investigadas em estudos clínicos randomizados.

**Palavras-chave** COVID-19; Imunoterapia; SARS-CoV-2.

### 1. Introdução

O surto de Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), originário de Wuhan, na China, tornou-se uma grande preocupação em todo o mundo, se alastrando de forma abrupta a exibir status de pandemia decretado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2020. Este microrganismo induz manifestações clínicas diversas, a galgar o desenvolvimento da Doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19). A apresentação desta pode variar desde quadros de pneumonia e síndrome respiratória aguda grave (SARS) até

mesmo casos assintomáticos/oligosintomáticos, desta forma, caracterizando-se como uma patologia de extensões profusas em suas sintomatologias diversificadas (CHEN et al., 2020; YANG et al., 2020).

A origem do vírus é desconhecida, no entanto, estudos evidenciaram que o patógeno compartilha 88% de identidade com o Coronavírus do tipo SARS (SARS-CoV) derivados de morcego, denominados bat-SLCoVZC45 e bat-SLCoVZXC21, indicando que estes mamíferos são o reservatório mais provável. Embora a situação atual defenda estratégias imediatas de vacinação, foi sugerido que seria mais seguro testar a reatividade cruzada de diferentes antígenos virais com os humanos, para reduzir a probabilidade de reações autoimunes (mimetismo molecular), especialmente em indivíduos com herança genética para tal (LU et al., 2020; SHOENFELD, 2020).

Nessa conjuntura, em virtude da escassez de evidências concretas para o tratamento e a prevenção vacinal frente à COVID-19, intervenções clássicas emergem como opções para o controle da doença. É o caso da Transfusão de Plasma Convalescente (TPC), uma estratégia de imunização passiva usada na prevenção e tratamento de patologias infecciosas desde o início do século XX. A amostra é obtida por aférese em sobreviventes com infecções anteriores causadas por microrganismos de interesse nos quais são desenvolvidos anticorpos contra o agente causal da doença, a ser o principal objetivo a neutralização do patógeno para sua erradicação. Curiosamente, supõe-se que o plasma de doadores saudáveis proporcione efeitos imunomoduladores através da infusão de citocinas anti-inflamatórias e anticorpos que bloqueiam o sistema complemento, citocinas pró-inflamatórias e autoanticorpos. Todos esses fatores podem influenciar o efeito imunomodulador da TPC em pacientes com COVID-19 (ROJAS et al., 2020; MARANO et al., 2015).

Diante desse cenário, o presente trabalho objetivou expor os principais trabalhos desenvolvidos diante da pandemia da COVID-19, os quais utilizam a TPC como via terapêutica em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, a fim de demonstrar possíveis impactos deste recurso imunoterápico.

## 2. Metodologias

A presente pesquisa trata-se de um estudo retrospectivo, com revisão sistemática abordando a aplicação do plasma convalescente em pacientes acometidos pela COVID-19. A busca por publicações para a composição deste estudo foi realizada através de três bases de dados: EMBASE, PubMed e SCOPUS. Para a busca nas referidas bases, foram utilizados os termos “COVID-19” e “SARS-CoV-2”, associando-os com a palavra de busca “*convalescent plasma*”, sendo os mesmos cadastrados no *Medical Subject Headings* (MeSH) e nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS).

Como critérios de inclusão, foram escolhidas publicações que contemplassem estudos de cunho experimental e observacional, abordando características clínicas dos pacientes, disponibilizando os métodos empregados, posologia, quantidade de indivíduos analisados e resultados obtidos, as quais estivessem disponíveis para *download*, redigidas no idioma Inglês, além de terem sido publicadas no recorte bienal de 2019-2020. Desta forma, como critérios de exclusão, foram desconsideradas publicações em duplicata, de revisão, editoriais, trabalhos *in silico*, monografias, dissertações, teses e outros que não atendiam aos objetivos da presente revisão. A seleção de artigos e sua organização foi realizada através do Protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).

Após a seleção das publicações, os dados foram inclusos em planilhas de estudo construídas para análise estatística, utilizando o programa *Microsoft Office Excel 2019* (Windows®). Posteriormente foram elaboradas tabelas, as quais serviram de base para apresentação dos resultados e sua discussão com base na literatura disponível.

## 3. Resultados e Discussão

Inicialmente foram identificados 52 artigos indexados nas bases de dados. Ao qual, 29 trabalhos foram lidos integralmente para avaliação de elegibilidade, ao final da etapa um total de 7 artigos de texto completo foram excluídos, sendo 6 revisões e 1 estudo *in silico*. Ao final do processo foi observado que 17 trabalhos atendiam a 80%

dos requisitos impostos e 5 artigos a todos os critérios estabelecidos da pesquisa e assim, essas 22 publicações constituíram a amostra final.

Após leitura criteriosa dos 22 artigos selecionados, verificou-se que 77,2% (n=17) são trabalhos produzidos por cientistas da China, enquanto 22,8% (n=5) são usufruto de pesquisadores da Coreia do Sul. Por volta de 81,2% (n=18) são estudos observacionais do tipo série de casos, e em contrapartida, 18,2% (n=4) são pesquisas experimentais classificadas como ensaio clínico. Na totalidade dos trabalhos (n=22), a técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) foi o método empregado no diagnóstico confirmatório da COVID-19. Desta forma, os estudos contabilizam a análise de 167 pacientes que foram submetidos à TPC, ao passo que cerca de 72,5% dos indivíduos (n=121) apresentavam comorbidades.

Em virtude da exiguidade no campo de terapêuticas curativas, o gerenciamento da COVID-19 se concentra principalmente na prevenção de infecções, detecção e monitoramento de casos e cuidados de suporte. Dado o exposto, nenhum tratamento anti-SARS-CoV-2 específico ainda é recomendado devido à ausência de evidências comprovadas. Entretanto, alguns estudos têm sugerido que a TPC pode ser um meio de tratamento benéfico a se constituir como um ramo de imunização adaptativa. Concomitantemente, de forma genérica, tal terapia fulgura como uma via indireta de proteção de indivíduos susceptíveis a doenças infecciosas, fornecendo imunidade contra um determinado patógeno (ZHAO; HE, 2020).

Diante disso, estima-se que o plasma de pessoas que se recuperaram da COVID-19 possa conter anticorpos contra o SARS-CoV-2 e ser eficaz contra a infecção causada pelo vírus. Anteriormente, o plasma convalescente foi estudado em surtos de outras infecções respiratórias, como Influenza A subtipo H1N1, na Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e na Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Esse recurso imunoterápico deve ser coletado de pacientes recuperados da COVID-19 e aptos a doar sangue, que não apresentem manifestações clínicas da doença há pelo menos 14 dias, e que apresentem resultados negativos nos exames laboratoriais de diagnóstico (CHEN et al., 2020; TANNE, 2020).

Nesse contexto, no estudo elaborado por Anh et al. (2020), em ambos os casos acompanhados pelos pesquisadores, a carga viral estimada pelos valores de CT (ciclo threshold) mostrou uma tendência crescente imediatamente antes da infusão plasmática, mas começou a diminuir logo após a utilização do plasma

convalescente. Embora a melhora do marcador inflamatório e da oxigenação possam contribuir para o uso combinado de corticosteroide, os autores relatam que a diminuição da carga viral de SARS-CoV-2 pode significar a eficácia da TPC no tratamento de COVID-19 como estratégia terapêutica isolada.

Todavia, no estudo sul-coreano de Ahn et al. (2020) não foram avaliados os títulos de anticorpos neutralizantes presentes no plasma convalescente dos pacientes com a COVID-19. É provável que o plasma com altos títulos de anticorpos neutralizantes esteja disponível nos pacientes recuperados de infecções graves como demonstrado em casos semelhantes, porém em indivíduos sob tratamento da MERS na Arábia Saudita, conforme relatado por Choe et al. (2017).

Diferentemente de outros estudos, Ye et al. (2020) utilizaram o plasma convalescente em um curso relativamente tardio da COVID-19, obtendo êxito em todos os seis casos acompanhados. Outro achado importante trata-se da alteração dinâmica de anormalidades radiológicas, em que a adoção da TPC levou a uma resolução das opacidades em vidro fosco e consolidação em cinco dos seis pacientes com a doença analisados. Em dois indivíduos com detecção do SARS-CoV-2 a partir do swab da garganta, a terapia em questão provocou uma eliminação imediata do vírus, e também, a análise sorológica indicou um aumento imediato nos títulos de anticorpos anti-SARS-CoV-2 nos pacientes.

Nesse sentido, o estudo engendrado por Shen et al. (2020) demonstrou que doadores recuperados da COVID-19 apresentavam títulos de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 variando entre 1.800 e 16.200, e títulos de anticorpos neutralizantes entre 80 e 480. Ademais, o plasma obtido dos doadores e transfundido nos receptores no mesmo dia implicou no decremento da carga viral. Após a TPC, os títulos de IgG e IgM nos receptores aumentaram de maneira dependente do tempo. Vale frisar que a referida pesquisa foi realizada com cinco indivíduos, e dessa forma, a limitação amostral e o desenho do estudo impedem ainda uma afirmação definitiva sobre a eficácia potencial desse tratamento. Desse modo, essas observações descritas até então requerem uma melhor avaliação por meio de ensaios clínicos mais rigorosos.

Constatações de reações adversas graves associadas à TPC não foram reportadas no trabalho realizado por Zhang et al. (2020). Os pesquisadores acompanharam quatro casos com COVID-19, onde três pacientes receberam 200–400 mL em uma ou duas transfusões seguidas, e um paciente recebeu 2.400 mL dividido em oito

transfusões consecutivas. Do mesmo modo, o estudo de Duan et al. (2020) mencionou a ocorrência de somente um efeito colateral, com visualização de uma mancha vermelha evanescente facial em um paciente que recebeu o plasma convalescente, porém sem a ocorrência de outros eventos adversos significativos.

Vale ressaltar que existem estudos mínimos para relatar os eventos adversos causados pela terapia com plasma convalescente, sendo que um desses incidentes ocorreu durante o surto de Ebola na Guiné. Dos 99 pacientes estudados, 8% expuseram problemas menores (como cefaleia e tontura), 5% apresentaram elevação da temperatura, e 4% relataram o surgimento de prurido/erupção cutânea (KUMAR; SHARMA; PRIYA, 2020; VAN GRIENSVEN et al., 2016).

Interessantemente, no trabalho de Duan et al. (2020) transfundiram-se 200 ml de plasma convalescente com um título de neutralização acima de 640, enquanto que no estudo de Shen et al. (2020), transfundiram-se 400 ml desta amostra com um título de neutralização acima de 1.000. Dosagens altas foram observadas no estudo de Zhang et al. (2020), com uma posologia de 2.400 mL de plasma convalescente administrado a um paciente do sexo masculino com 73 anos de idade. Em ambos os estudos, os pacientes tiveram avanços clínicos positivos. Diante disso, fica evidenciado que as doses descritas nas intervenções da TPC são amplamente variadas nos diferentes estudos.

Nessa perspectiva, a dose ideal ainda precisa ser definida para ajudar a reduzir o volume de plasma convalescente a ser utilizado e tratar mais pacientes. Em suma, nenhum estudo descreveu a gravidade anterior dos doadores que tiveram a COVID-19, especificações quanto à concentração de anticorpos neutralizantes são exíguas, e ainda, não foi investigado se o plasma convalescente destes doadores com diferentes níveis de gravidade apresenta efeitos terapêuticos distintos. Ademais, unanimemente os estudos relataram resultados positivos, além de mortalidade zero naqueles pacientes submetidos à TPC (RAJENDRAN et al., 2020; ZENG; CHEN; DENG, 2020).

#### 4. Conclusões

Tendo em vista o arcabouço de estudos analisados, até o momento os resultados obtidos por tais demonstram positividade em amplos aspectos frente à infecção pelo SARS-CoV-2, exemplificados pelos níveis de nulidade da mortalidade de pacientes submetidos à TPC, opacidade pulmonar exaurida, e ocorrência de

reações adversas minimamente inócuas. Diante das perspectivas promissoras, a TPC poderá se confirmar como uma estratégia segura, com impacto expressivo e potencialmente eficaz para o tratamento de patógenos emergentes, em cenários ainda sem a existência de agentes antivirais ou vacinas.

Entretanto, a realização de trabalhos explorando a utilização da TPC frente à COVID-19 se restringe atualmente a série de casos e ensaios clínicos, contudo não randomizados. Estes reverberam limitações importantes e potenciais erros metodológicos, que podem acarretar em interpretações errôneas e em tomadas de decisões equivocadas no manejo dos pacientes com a doença. Ademais, a dosagem ideal da TPC e a duração do tempo de tratamento permanecem incertas, as quais precisam ser amplamente investigadas a partir de estudos clínicos randomizados.

### 5. Apoio Financeiro

Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

### 6. Referências

- AHN, Jin Young et al. Use of Convalescent Plasma Therapy in Two COVID-19 Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome in Korea. **Journal Of Korean Medical Science**, [S.l.], v. 35, n. 14, p. 1-8, abr. 2020.
- CHEN, Long et al. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 398-400, abr. 2020.
- CHOE, Pyoeng Gyun et al. MERS-CoV Antibody Responses 1 Year after Symptom Onset, South Korea, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v. 23, n. 7, p. 1079-1084, jul. 2017.
- DUAN, Kai et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 117, n. 17, p. 9490-9496, 6 abr. 2020.
- KUMAR, Saurabh; SHARMA, Vinit; PRIYA, Kanu. Battle Against COVID-19: Efficacy of Convalescent Plasma as an Emergency Therapy. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 6, n. 12, [S.l.], p. 1-3, jun. 2020.
- LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S.l.], v. 395, n. 10224, p. 565-574, fev. 2020.
- MARANO, Giuseppe et al. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool?. **Blood Transfusion**, [S.l.], v. 22, n. 7, p. 152-157, 2015.
- RAJENDRAN, Karthick et al. Convalescent plasma transfusion for the treatment of COVID-19: systematic review. **Journal Of Medical Virology**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 1-9, 12 maio 2020.
- ROJAS, Manuel et al. Convalescent plasma in Covid-19: possible mechanisms of action. **Autoimmunity Reviews**, [S.l.], v. 19, n. 7, p. 1-9, jul. 2020.
- SHEN, Chenguang et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. **Jama**, [S.l.], v. 323, n. 16, p. 1582-1589, 28 abr. 2020.
- SHOENFELD, Yehuda. Corona (COVID-19) time musings: our involvement in covid-19 pathogenesis, diagnosis, treatment and vaccine planning. **Autoimmunity Reviews**, [S.l.], v. 19, n. 6, p. 1-3, jun. 2020.
- TANNE, Janice Hopkins. Covid-19: fda approves use of convalescent plasma to treat critically ill patients. **Bmj**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 1256-1257, 26 mar. 2020.
- VAN GRIENSVEN, Johan et al. Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. **New England Journal Of Medicine**, [S.l.], v. 374, n. 1, p. 33-42, 7 jan. 2016.
- YANG, Xiaobo et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 475-481, maio 2020.
- YE, Mingxiang et al. Treatment with convalescent plasma for COVID-19 patients in Wuhan, China. **Journal Of Medical Virology**. [S.l.], p. 1-8, 29 jun. 2020.
- ZENG, Furong; CHEN, Xiang; DENG, Guangtong. Convalescent plasma for patients with COVID-19. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 117, n. 23, p. 1-1, 12 maio 2020.
- ZHANG, Bin et al. Treatment With Convalescent Plasma for Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. **Chest**, [S.l.], p. 1-8, mar. 2020.
- ZHAO, Qian; HE, Yong. Challenges of Convalescent Plasma Therapy on COVID-19. **Journal Of Clinical Virology**, [S.l.], v. 127, p. 1-3, jun. 2020.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## PROSPECÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM MAMÍFEROS SILVESTRES DE REMANESCENTES FLORESTAIS URBANOS

SILVA, P. H. B.<sup>1</sup>; DUTRA, A. G. S.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, J. S.<sup>1</sup>; DOMINGOS, I. J. S.<sup>1</sup>; TRINDADE, G. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus.

E-mail: pedrohebastos@gmail.com

**Resumo:** As doenças infecciosas emergentes (DIE) representam uma ameaça para a saúde pública mundial. O Brasil é considerado um “hotspot” para a emergência de patógenos infecciosos. As zoonoses correspondem a aproximadamente 60% de todos os eventos de emergência de DIE, e dentre essas 70% estão relacionadas a patógenos de origem silvestre, onde os roedores podem atuar como amplificadores e hospedeiros de diversas zoonoses. Dentre os vírus de maior importância para a saúde pública estão os flavivírus, como o Dengue vírus, o Zika vírus e o vírus da Febre amarela, que são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar flavivírus circulantes em roedores, marsupiais e procionídeos inseridos em remanescentes florestais nos Parques das Mangabeiras e Jacques Cousteau na cidade de Belo Horizonte, MG. Amostras de fígado e rim provenientes desses mamíferos foram submetidas à investigação molecular de flavivírus por PCR em tempo real. Não foram detectadas amostras positivas para RNA viral de flavivírus, portanto, não foi detectada evidência de circulação desses vírus nos mamíferos inseridos na área investigada. A manutenção dos flavivírus na natureza em ciclos silvestres é comprovada e impede a erradicação desses arbovírus. Diante disso, e da evidência de circulação de flavivírus em outros hospedeiros vertebrados a investigação molecular desses vírus em animais inseridos em áreas de mata próximas a grandes centros urbanos é uma importante ferramenta de vigilância que possibilita antecipar a ocorrência de possíveis ciclos silvestres que podem originar ciclos de transmissão urbana.

**Palavras-chave** Flavivírus; Zoonoses virais; Doenças infecciosas emergentes.

### 1. Introdução

Doenças infecciosas emergentes são caracterizadas por serem doenças que apresentam um aumento repentino em sua patogenicidade ou virulência, nos números de casos ou distribuição geográfica, podendo ter emergido pela primeira vez ou apresentado casos anteriores na população (Jones et al., 2008; Morse, 1995). As DIE são ameaças globais, causam grandes impactos na economia e na saúde pública, com prejuízos bilionários e milhões de mortes todos os anos (Pike et al., 2014).

A ação antrópica na modificação de ecossistemas, como exemplo, a caça de animais silvestres, o desmatamento de diferentes habitats naturais para o cultivo agrícola e criação de animais domesticados, mudaram a dinâmica do contato de populações humanas com a vida silvestre, se aproximando de diversos animais e patógenos que anteriormente não teriam contato com as pessoas (Karesh et al., 2012). O Brasil é considerado um “hotspot”, ou seja, uma região propensa à emergência de uma nova doença infecciosa, pois evidencia diversas características que propiciam esses eventos (Allen et al., 2017).

Doenças infecciosas emergentes são caracterizadas por serem doenças que apresentam um aumento repentino em sua patogenicidade ou virulência, nos números de casos ou distribuição geográfica, podendo ter emergido pela primeira vez ou apresentado casos anteriores na população (Jones et al., 2008; Morse, 1995). As DIE são ameaças globais, causam grandes impactos na economia e na saúde pública, com prejuízos bilionários e milhões de mortes todos os anos (Pike et al., 2014).

A ação antrópica na modificação de ecossistemas, como exemplo, a caça de animais silvestres, o desmatamento de diferentes habitats naturais para o cultivo agrícola e criação de animais domesticados, mudaram a dinâmica do contato de populações humanas com a vida

silvestre, se aproximando de diversos animais e patógenos que anteriormente não teriam contato com as pessoas (Karesh et al., 2012). O Brasil é considerado um “hotspot”, ou seja, uma região propensa à emergência de uma nova doença infecciosa, pois evidencia diversas características que propiciam esses eventos (Allen et al., 2017).

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleção de pequenos mamíferos

Nesse estudo foram analisadas amostras de uma coleção biológica composta por vísceras (rim, fígado, coração, baço etc.) de pequenos mamíferos. A coleção compreende amostras de roedores, marsupiais e procionídeos capturados em remanescentes florestais de parques urbanos da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Todas as amostras foram armazenadas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  com adição de RNA Later® no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 2.2 Áreas de Captura

A captura dos pequenos mamíferos foi realizada entre os anos de 2018 e 2019, no Parque das Mangabeiras e no Parque Jacques Cousteau, inseridos no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 2.3 Coletas

As capturas foram aprovadas pelo CEUA/UFMG sob o número 347/2017 e realizadas mediante à Licença Permanente emitida pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) em nome do Dr. Adriano Paglia, colaborador do projeto e docente do Departamento de Evolução, Ecologia e Genética da UFMG. Os animais coletados em cada área foram depositados na Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia da UFMG.

Para as capturas, foram estabelecidos três transectos de amostragem de pequenos mamíferos nos dois parques, cada um com 10 estações de coletas com distanciamento de 20 metros entre elas. Foram alocadas duas armadilhas por estação de coleta, sendo uma do tipo Sherman (dimensões: 8x8x26 cm), específica para a coleta de mamíferos pequenos, e uma gaiola com isca suspensa, para a captura de animais maiores. As armadilhas montadas perto de construções foram ambas alocadas no chão e as armadilhas montadas em áreas de mata nativa foram colocadas uma no

chão e a outra no estrato médio da mata. Cada transecto foi vistoriado uma vez por dia nas primeiras horas da manhã, foram colocadas as iscas durante as vistorias. Foram utilizados como iscas abacaxi e algodão embebido em óleo de bacalhau, para contemplar animais herbívoros e onívoros.

Para a eutanásia dos animais foram utilizadas técnicas de eutanásia, especificamente o deslocamento cervical ou a administração de anestésicos, como o pentobarbital sódico. Dos animais sacrificados, foram coletados vários tipos de amostras, sendo que as de interesse desse projeto foram fígado e rim. Durante a coleta biológica, os órgãos foram retirados e fracionados em duas porções e armazenados em tubos criogênicos. Em um dos tubos foi adicionado RNA later (Ambion, USA) para a preservação do material genético, e foram armazenados imediatamente em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Todas as amostras foram mantidas em freezers  $-70^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Vírus da UFMG.

### 2.4 Extração de RNA e detecção molecular

Para a obtenção de RNA viral das amostras biológicas de fígado e rim dos pequenos mamíferos, foi utilizado o kit de extração RNeasy Mini Kit (QIAGEN®, USA).

O processo de lise tecidual das amostras foi realizado através de trituração em *bead beater* (BioSpec, SoniBeast™ Cell Disrupter), usando três esferas por microtubo por 2 minutos. O protocolo de extração de RNA foi executado conforme recomendação do fabricante. Para investigação de vírus pertencentes ao gênero *flavivírus* foi realizada triagem molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). A metodologia foi baseada no protocolo descrito por Patel e colaboradores (2013), com modificações. Essa reação utiliza iniciadores que possuem como alvo um fragmento de 265pb do gene NS5, conservado entre os vírus do gênero *flavivírus*. Assim, estes iniciadores permitem a detecção de vários vírus do gênero *flavivírus* de forma simultânea. Como controle positivo da reação foi utilizada amostra de RNA do vírus da Febre Amarela vacinal YFV 17DD, cujos estoques foram produzidos no Laboratório de Vírus. Com o objetivo de assegurar a qualidade do processo de extração de ácidos nucleicos, as amostras de pequenos mamíferos foram submetidas à qPCR utilizando iniciadores para a detecção do gene da  $\beta$ -actina murina.

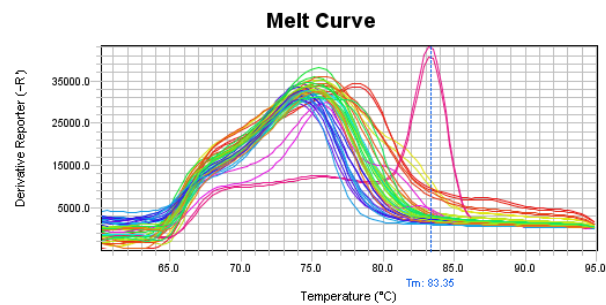
### 3. Resultados e Discussão

Ao todo foram triadas por PCR em tempo real amostras de rim e fígado correspondentes a 20 animais coletados no Parque das Mangabeiras e 108 animais do Parque Jacques Cousteau. Os mamíferos incluídos na coleção pertenciam aos gênero *Cerradomys* spp., *Necomys* spp., *Rattus* spp., *Didelphis* spp. e *Marmosops* spp.

Evidências anteriores indicam a contribuição dos roedores como hospedeiros e reservatórios de diversos vírus do gênero *flavivirus* (Olival et al., 2017). Porém as análises por RT-qPCR realizadas nas amostras de fígado e rim desses pequenos mamíferos inseridos em remanescentes florestais da cidade de Belo Horizonte, não foram encontradas evidências da circulação de vírus do gênero *flavivirus*. Os resultados foram obtidos através de análises comparativas das temperaturas de dissociação das amostras analisadas em relação ao controle positivo (RNA do Vírus da Febre Amarela) (Figura 1).

A ausência de evidência molecular da circulação de flavivírus nesses mamíferos pode estar associada a fatores como a ausência de viremia no momento da coleta, e a não susceptibilidade das espécies analisadas. Além disso, a grande disponibilidade de hospedeiros humanos em áreas próximas aos locais de estudo, podem coibir a necessidade do vetor *Aedes aegypti*, que é sinantrópico, de utilizar esses roedores como hospedeiros, ficando majoritariamente restritos à parasitar humanos. Outro fator que pode estar associado ao resultado seria uma baixa circulação de animais infectados das áreas silvestres para as áreas periurbanas, mantendo a população das regiões amostradas afastada de diversos patógenos infecciosos que circulam na natureza. A metodologia de diagnóstico por RT-qPCR é capaz de identificar infecções em curso no momento da coleta, mas não é capaz identificar uma possível infecção anterior, necessitando estudos complementares de diagnóstico através da identificação de anticorpos específicos.

Esse trabalho evidencia a ausência da circulação de flavivírus em roedores residentes de remanescentes florestais da cidade de Belo Horizonte, mas ressalta a necessidade de mais estudos de investigação e vigilância da circulação de flavivírus nesses animais para resultados mais conclusivos.



**Figura 1:** Gráfico exibindo a temperatura de dissociação das amostras analisadas. É indicado o controle positivo (vírus da Febre Amarela) com temperatura de 83,35 °C. Este gráfico é representativo de todos os resultados obtidos no trabalho.

### 4. Conclusões

A manutenção dos flavivírus na natureza em ciclos silvestres é comprovada e impede a erradicação desses arbovírus. Diante disso, e da evidência de circulação de flavivírus em outros hospedeiros vertebrados, a investigação molecular desses vírus em animais inseridos em áreas de mata próximas a grandes centros urbanos é uma importante ferramenta de vigilância que possibilita antecipar a ocorrência de possíveis ciclos silvestres que podem originar ciclos de transmissão urbana. A compreensão desses ciclos em áreas urbanas também sinaliza para o risco de exposição humana a infecções zoonóticas e contribui para ações de controle diante de eventos de emergência.

### 5. Apoio Financeiro

UFMG, Capes, CNPq, Fapemig.

### 6. Referências

- ALLEN, T., MURRAY, K. A., ZAMBRANA-TORRELIO, C., MORSE, S. S., RONDININI, C., DI MARCO, M., BREIT, N., OLIVAL, K. J., & DASZAK, P. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature Communications**, 2017.
- JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J. L., & DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, 2008.
- KARESH, W. B., DOBSON, A., LLOYD SMITH, J. O., LUBROTH, J., DIXON, M. A., BENNETT, M., ALDRICH, S., HARRINGTON, T., FORMENTY, P., LOH, E. H., MACHALABA, C. C., THOMAS, M. J., & HEYMANN, D. L. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. **The Lancet**, 2012.

MEERBURG, B. G., SINGLETON, G. R., & KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical Reviews in Microbiology**, 2009.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases**, 1995.

OLIVAL, K. J., HOSSEINI, P. R., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ROSS, N., BOGICH, T. L., DASZAK, P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, 2017.

PATEL, P., LANDT, O., KAISER, M., FAYE, O., KOPPE, T., LASS, U., SALL, A. A., NIEDRIG, M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, 2013.

PIKE, J., BOGICH, T., ELWOOD, S., FINNOFF, D. C., & DASZAK, P. Economic optimization of a global strategy to address the pandemic threat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014.

## RESUMOS BACTERIOLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Staphylococcus aureus* PELO ALFA-PINENO

Araújo Neto<sup>1</sup>, J. B.; Freitas<sup>1</sup>, P. R.; Araújo<sup>1</sup>, A. C. J.; Silva<sup>1</sup>, M. M. C.; Nunes<sup>2</sup>, R. G. S. Tintino<sup>1</sup>, S. R.; Coutinho<sup>1</sup>, H. D. M.

<sup>1</sup> Universidade Regional do Cariri - URCA, Departamento de Química Biológica – DQB, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM

<sup>2</sup> Universidade Regional do Cariri - URCA, Departamento de Ciências Biológicas – DCBio, Laboratório de Biologia e Toxicologia - LABTOX

E-mail: jose.bezerra456@gmail.com

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo do composto alfa-pineno frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Para isso, foram utilizadas as cepas RN-4220 e IS-58, que portam as bombas de efluxo MsrA (resistente à eritromicina) e TetK (resistente à tetraciclina), respectivamente. Para avaliar a atividade antibacteriana intrínseca do produto, este foi microdiluído em caldo BHI a 10% contendo o inóculo bacteriano, e após 24 h de incubação a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através da variação colorimétrica da resazurina sódica. Nos ensaios de inibição do efluxo o brometo de etídio (EtBr) e os antibióticos foram microdiluídos em caldo BHI a 10% contendo o inóculo bacteriano e o alfa-pineno em concentração sub-inibitória (CIM/8). O mesmo processo foi realizado com o carbonilcianeto-m-clorofenil hidrazona (CCCP), inibidor padrão de efluxo. A análise estatística foi realizada através do GraphPad Prism 5.0, com  $p < 0,05$  considerado significativo. A CIM do produto para ambas as cepas foi  $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$ , concentração considerada clinicamente irrelevante. Nos testes de associação com EtBr e antibióticos, houve inibição do efluxo em ambas as cepas. Todavia, o alfa-pineno foi mais eficaz contra a bomba TetK (IS-58), reduzindo a CIM do EtBr de 16 para  $5,03 \mu\text{g/mL}$ , e da tetraciclina de 128 para  $64 \mu\text{g/mL}$ , sendo mais eficaz que o CCCP. Logo, conclui-se que o alfa-pineno não possui eficácia na atividade antibacteriana por ação direta contra as cepas testadas, mas modifica a atividade de bombas de efluxo.

**Palavras-chave:** Resistência Bacteriana; Terpenos; Sinergismo; Tetraciclina; Eritromicina.

### 1. Introdução

O crescente número de doenças causadas por agentes infecciosos é responsável por altas taxas de mortalidade em todo o mundo. Esse fator se dá principalmente em decorrência da capacidade das bactérias de adquirirem resistência a múltiplas drogas, contribuindo para uma maior dificuldade no tratamento de doenças causadas por estes microrganismos (MOTA et al., 2018).

Em relação à espécie *Staphylococcus aureus*, esta é uma importante bactéria encontrada no meio comunitário e nosocomial, sendo responsável, principalmente, por casos de infecções de pele mas podendo ocasionar até mesmo endocardites, pneumonias ou bacteremia, associadas a elevados casos de morbidades (HAMILTON et al., 2017; MCGUINNESS et al., 2017).

Desse modo, a utilização de produtos naturais na reversão da resistência bacteriana tem se demonstrado como uma alternativa promissora, assim, o alfa-pineno, classificado como um monoterpeno bicíclico que está presente em óleos voláteis de diversas plantas, possui propriedades biológicas relacionadas à atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica e antioxidante (DHAR et al., 2014; RUFINO et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo do composto alfa-pineno frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

### 2. Metodologias

#### 2.1 Preparo de substâncias

O alfa-pineno, a tetraciclina, a eritromicina e o carbonilcianeto-m-clorofenil hidrazona (CCCP) foram diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 8,765 mL de água destilada estéril para atingirem a concentração de 1.024 µg/mL. O brometo de etídio (EtBr), substrato universal de bombas de efluxo, foi diluído em 9,765 mL de água destilada estéril para atingir a mesma concentração (GOMES et al., 2018).

## 2.2 Preparo do inóculo bacteriano

As cepas RN-4220 (bomba MsrA) e IS-58 (bomba TetK) de *S. aureus*, após 24 h de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C tiveram amostras de suas culturas diluídas em 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) até atingir uma turbidez equivalente a 10<sup>5</sup> Unidades Formadoras de Colônias, de modo que os inóculos foram comparados com a escala de McFarland 0,5 (GOMES et al., 2018).

## 2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram preparados *ependorfs* contendo 900 µL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 10% e 100 µL dos respectivos inóculos. Esta solução foi distribuída em placas de microdiluição de 96 poços (100 µL/poço). A microdiluição seriada foi realizada com 100 µL do alfa-pineno, com concentração variando nas placas de 512 a 8 µg/mL.

Os testes foram feitos em triplicata e as placas incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A leitura dos resultados se deu através da adição de 20 µL de resazurina sódica em cada poço e, após 1 h, observando-se sua variação colorimétrica (azul=inibição/rosa=crescimento) (COUTINHO et al., 2008).

## 2.4 Inibição do efluxo

Os *ependorfs* foram preenchidos com 150 µL dos respectivos inóculos, um volume do alfa-pineno correspondente à sua concentração sub-inibitória (CIM/8) e caldo BHI a 10% até completar o volume de 1,5 mL. Esta solução foi distribuída em placas de microdiluição de 96 poços (100 µL/poço). A microdiluição seriada foi realizada com 100 µL do EtBr e antibióticos, com concentração variando nas placas de 512 a 0,5 µg/mL.

Os testes foram feitos em triplicata e as placas incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A leitura dos

resultados se deu através processo descrito anteriormente (COUTINHO et al., 2008).

## 2.5 Análise estatística

Utilizou-se o *GraphPad Prism* 5.0, onde as médias aritméticas foram analisadas por uma ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

O alfa-pineno apresentou para as cepas RN-4220 e IS-58 uma CIM  $\geq 1.024$  µg/mL. Este resultado é considerado como clinicamente irrelevante, tendo em vista que a concentração demonstrada é bastante elevada e poderia causar efeitos tóxicos no organismo humano (HOUGHTON et al., 2007).

Corroborando com o presente estudo, Limaverde et al. (2017) demonstraram que a atividade do alfa-terpineno, caracterizado também como um monoterpeno, frente à cepa IS-58 não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante. Da mesma forma, foi demonstrado com o terpeno alfa-bisabolol contra a cepa IS-58, apresentando o resultado da CIM  $\geq 1.024$  µg/mL (CRUZ et al., 2020).

Como demonstrado no estudo de Freitas et al. (2020), o composto alfa-pineno apresentou uma CIM não significativa contra as cepas de *S. aureus* testadas, apresentando resultados significativos apenas quando associado aos antibióticos norfloxacin e gentamicina. Sendo o presente estudo o primeiro que demonstra o efeito do composto alfa-pineno como inibidor de efluxo de antibióticos.

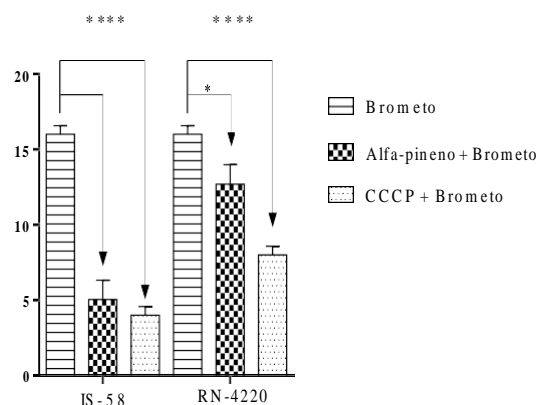
É importante destacar que o EtBr e CCCP são necessários para observar a presença ativa de bomba de efluxo nas bactérias testadas. A partir disso, foi realizado a associação da concentração sub-inibitória do composto ao EtBr e ao antibiótico, em que foi possível observar uma redução significativa da CIM.

Como observado na Figura 1, contra a cepa IS-58, o alfa-pineno quando associado ao EtBr apresentou redução da CIM do brometo de 16 µg/mL para 5,03 µg/mL, sendo considerada uma redução significativa. Enquanto o CCCP reduziu a CIM do EtBr para 4 µg/mL contra a mesma cepa.

Por outro lado, contra a cepa RN-4220 foi possível observar uma redução da CIM do EtBr 16



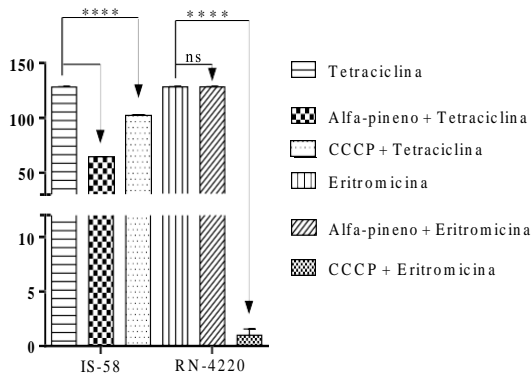
$\mu\text{g/mL}$  para  $12 \mu\text{g/mL}$ , também sendo considerada significativa. E o CCCP apresentou uma redução para  $8 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 1:** Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do brometo de etídio isolado e associado ao alfa-pineno e CCCP contra *Staphylococcus aureus* IS-58 e RN-4220 (\*\*\*\* Valor estatisticamente significativo para  $p < 0,0001$  / \* Valor estatisticamente significativo para  $p < 0,0188$ )

Já em relação à associação do composto e do CCCP com os antibióticos utilizados para as cepas de *S. aureus* IS-58 e RN-4220, foi possível observar uma redução da CIM da tetraciclina de  $128 \mu\text{g/mL}$  para  $64 \mu\text{g/mL}$  contra IS-58, sendo esta CIM com efeito maior que a associação do CCCP com o antibiótico.

Para a cepa RN-4220, foi possível observar que não houve redução significativa para a atividade do antibiótico, como demonstrado na Figura 2.



**Figura 2:** Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos isolados e associados ao alfa-pineno e CCCP contra *S. aureus* IS-58 e RN-4220 (\*\*\*\* Valor estatisticamente significativo para  $p < 0,0001$  / ns: não significativo).

Da mesma forma do presente estudo, frente às cepas bacterianas IS-58 e RN-4220 outros compostos apresentaram atividade sinérgica quando associado ao brometo de etídio (SANTOS et al., 2018).

Em relação a inibição da bomba de efluxo com

antibióticos, foi demonstrado a partir de estudo do  $\alpha$ -terpineno, que o composto associado ao antibiótico tetraciclina permitiu uma redução na CIM de pelo menos 4 vezes quando comparado a CIM apenas do antibiótico utilizado contra a cepa IS-58 (LIMAVERDE et al., 2017).

Em conformidade com o estudo de Oliveira-Tintino et al. (2018), que demonstrou a atividade do mesmo monoterpreno contra cepa de SA 1199B que codifica a proteína NorA, apresentou um efeito

sinérgico tanto para o brometo de etídio quanto para o antibiótico norfloxacin.

De acordo com a literatura, é possível que a atividade dos terpenos relacionada à inibição do mecanismo de bomba de efluxo esteja associada à característica lipofílica dos compostos que podem alterar as propriedades das proteínas dispostas na membrana bacteriana (BAKKALI et al., 2008).

#### 4. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o alfa-pineno não possui eficácia na atividade antibacteriana por ação direta contra as cepas *S. aureus* RN-4220 e IS-58. Todavia, é capaz de modificar a atividade das bombas de efluxo MsrA e TetK, gerando inibição das mesmas.

Estes dados sugerem que o composto alfa-pineno é capaz de modular a atividade antibiótica revertendo a ação do mecanismo de efluxo. A partir da realização do presente estudo sugere-se que ainda são necessários estudos que visem elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a inibição de bombas de efluxo pelo alfa-pineno.

#### 5. Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brasil.

#### 6. Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do

Cariri (URCA) pelos recursos materiais para execução dos testes.

### 7. Referências

- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.
- CRUZ, R. P. et al. Effect of  $\alpha$ -Bisabolol and Its  $\beta$ -Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus aureus* Strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 2020.
- DHAR, P. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure–activity relationship of  $\alpha$ -pinene derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3548-3552, 2014.
- FREITAS, P. R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and  $\alpha$ -pinene. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112106, 2020.
- GOMES, F. M. S. et al. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 175-178, 2018.
- HAMILTON, S. M. et al. High-level resistance of *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by penicillin-binding protein 4 (PBP4). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e02727-02716, 2017.
- HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.
- LIMAVERDE, P. W. et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 957-961, 2017.
- MCGUINNESS, W. A. et al. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 269, 2017.
- MOTA, F. S. D. et al. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 270-277, 2018.
- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food chemistry**, v. 262, p. 72-77, 2018.
- RUFINO, A. T. et al. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- $\alpha$ -pinene: structural and enantiomeric selectivity. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 2, p. 264-269, 2014.
- SANTOS, J. F. S. et al. *In vitro* e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, p. 22-28, 2018.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS DE ISOLADOS AMBIENTAIS CAPAZES DE LISAR LINHAGENS MULTIRRESISTENTES PARA USO EM CONTROLE BACTERIANO

**Barbosa<sup>1</sup>, R. A.; Santos<sup>2</sup>, V. L.**

<sup>1,2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Aplicada - LMA

E-mail: abrachell@hotmail.com

E-mail: verabio@gmail.com

**Resumo:** Nos últimos anos, um grande número de estratégias para minimizar o consumo de antibióticos e agentes antimicrobianos em geral tem sido explorada. A utilização de Bacteriófagos (Fagos), que são classes de vírus exclusivamente bacterianos, capazes de reduzir ou eliminar populações bacterianas de forma sustentável tem sido altamente empregada. Neste contexto, exploramos o uso de fagos isolados de lagoas aeradas de uma estação de tratamento de efluentes industriais quanto à eficácia bacteriolítica contra 7 linhagens isoladas neste ambiente e posteriormente, isolados clínicos multirresistentes das mesmas espécies (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). A partir do isolamento e propagação viral foram obtidos 4 Fagos de *P. aeruginosa*, 4 fagos de *S. marcescens* e 2 fagos de *S. maltophilia*, sendo 2 líticos em linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa* e 2 em linhagem multirresistente de *S. marcescens* (dados sujeitos à confirmação). Ensaio de atividade lítica *in vitro* também foram empregados. Os resultados parciais sugerem que bacteriófagos podem ser utilizados como opção de tratamento contra bactérias de forma eficiente em ambientes industriais, bem como meio preventivo e complementar com antimicrobianos em geral.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos; Antimicrobianos; Formulações biofarmacêuticas; Terapia fágica; Bactérias multirresistentes.

### 1. Introdução

A falta de disponibilidade de recursos hídricos e a alta demanda de consumo em relação a captação de água direta de lagoas e rios para fins industriais, fazem com que elaboradas técnicas de tratamento e reuso dessas águas sejam utilizadas (MATSUMURA; MIERZWA, 2018). A frequente exposição à agentes antimicrobianos como cloro e outros químicos, assim como o uso indiscriminado de antibióticos que são descartados em efluentes domésticos, aumenta drasticamente a troca de genes (resistência horizontal) e a aquisição de resistência através da multiplicação exponencial das bactérias (resistência vertical), dificultando o tratamento das águas e disseminando linhagens resistentes no meio ambiente (AISHA M. *et.al* 2020). Tal preocupação no ambiente industrial, se estende à ambientes hospitalares e de serviços associados a assistência à saúde, por este motivo, neste estudo foram selecionadas linhagens comumente encontradas em ambos ambientes, hospitalar e industrial, a fim de encontrar uma alternativa de tratamento segura e também sustentável, ambientalmente e economicamente. A natureza específica dos fagos para bactérias é de interesse particular, não agressiva e como tratamento direcionado pode limitar os impactos adversos não intencionais, comuns no microbioma de pessoas em antibioticoterapia, além disso, fagos possuem a habilidade de driblar os mecanismos de resistência bacteriana e coevoluir, contrabutando as barreiras impostas (HADDAD, 2019). É notório que a descoberta de meios alternativos para o tratamento de microrganismos resistentes a agentes biocidas é demasiadamente baixa quando comparado à capacidade e velocidade de adaptação desses seres vivos, o que torna a resistência bacteriana um problema de saúde pública a nível global. Aqui,

procuramos empregar um dos mais antigos predadores das bactérias como método alternativo.

Para o sucesso da aplicação biotecnológica os fagos necessitam estar em maior número e exercer boa atividade lítica, incluindo a infectividade, velocidade do ciclo e polivalência. Diante de nosso objetivo, nesse estudo isolamos, enriquecemos, propagamos fagos líticos de *S. marcescens*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*, que foram capazes de lisar linhagens multirresistentes das bactérias hospedeiras em estudo, demonstrando ser uma possível alternativa para controle bacteriano nos cenários industrial e clínico.

## 2. Metodologias

### 2.1 Estirpes bacterianas

As linhagens ambientais utilizadas no estudo foram retiradas do estoque do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) (-80°), anteriormente isoladas (~2017) no mesmo ambiente aquático de onde os bacteriófagos foram isolados. As linhagens clínicas foram cedidas, parte pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (LMOA) (HC66; JXXIII366; U1-KPC) isoladas em amostras de ferida por queimadura e urina respectivamente (~2012-2017), e parte pelo Laboratório de Interação Microrganismo-hospedeiro (LIMHO) (PAO1; PA103), isoladas anteriormente em amostras derivadas de escarro (~2019). Ambos laboratórios também pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no departamento de Microbiologia.

### 2.2 Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos

Os bacteriófagos foram isolados a partir da água coletada em ambientes aquáticos de uma Refinaria de Petróleo. A amostra foi centrifugada a 3.000 x g por 20min (Thermo Fischer Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Alemanha) e a seguir filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore, 60Hz, Billerica, Estados Unidos). Uma cultura de cada bactéria hospedeira foi incubada overnight, 2,5mL da cultura obtida foi adicionada a frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 20mL de caldo LB enriquecido com 0,1mol/L de MgSO<sub>4</sub> e 0,01 mol/L de CaCl<sub>2</sub> (Becton Dickinson) simultaneamente acrescido de 20mL da fonte de fago e os frascos Erlenmeyer foram então incubados a 37°C em Shaker sob

agitação de 100rpm overnight (Marconi, Incubadora Refrigerada MA 830, São Paulo, Brasil). Os frascos foram acrescidos de clorofórmio 1% (v/v) mantidos em repouso 30min, dispensados em Falcons de 50mL e então centrifugados a 10.000x g por 20min. O sobrenadante foi aspirado com uma seringa estéril de 5 ml e passado através de um filtro de membrana de 0,45 µm. O lisado foi então distribuído em gotas através da técnica de spot, onde 4 µL foram depositados sobre um tapete uniforme de bactérias. As áreas claras correspondentes as áreas de lise foram recortadas com auxílio de uma ponta de pipeta estéril, armazenadas em tampão SM (5,8g de NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 50mL de Tris-HCl 1mol/L pH 7,5; 5 ml de gelatina 2%; e H<sub>2</sub>O para 1000mL) descrito por Andrews-Pfannkoch *et al.*, 2010. Os microtubos foram agitados vigorosamente com o uso de vórtex (INBRAS-AG230AT) para desprender as partículas do ágar. Uma alíquota de 100µL de cada isolado viral obtido foi transferida para microtubo contendo 100µL da bactéria hospedeira de origem. Os microtubos contendo fago e bactéria foram então incubados por 30min a 37°C. Em seguida, o conteúdo dos microtubos foi homogeneizado a 3,5mL de meio LB semi-sólido (com 0,6% p/v de ágar) fundido e resfriado a ~50°C, e a mistura obtida vertida imediatamente sobre uma placa contendo meio LB sólido e então incubados a 37°C overnight. As placas que apresentaram o mesmo aspecto, tamanho e intensidade de lise, foram recortadas e armazenadas em microtubos contendo tampão SM separadamente. Para a purificação dos bacteriófagos obtidos foram realizadas quatro passagens sucessivas, afim de identificar placas de lise uniformes (mesma morfologia), através do método de sobrecamada descrito acima. Para titulação das suspensões de fagos foram realizadas diluições seriadas em proporções de 1:10 até a ordem de 10<sup>-7</sup>, cada diluição foi plaqueada usando o método de sobrecamada. A titulação (número de unidades virais infecciosas) foi expressa como unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL).

Para propagação dos fagos, uma alíquota de 100µL de cultura das bactérias hospedeiras em caldo LB na fase exponencial (D.O.600nm de 0,5) foram transferidas para Falcons de 50mL, contendo 10 mL do mesmo meio e incubadas a 37°C até alcançar a fase exponencial (D.O. 0,5) e então adicionados de 0,5mL de cada fago obtido purificado, seguida de nova incubação a 37°C por 24 horas ou até a observação da lise celular

evidenciada pela limpidez da cultura. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de 0,22µm de diâmetro de poro (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha). O filtrado obtido foi armazenado a 4°C e utilizado nas etapas seguintes.

### 2.3 Avaliação do espectro de hospedeiros

Uma suspensão de fagos foi distribuída em gotas através da técnica de spot, onde 4 µL de cada suspensão foram depositados sobre um tapete uniforme de bactérias. Para determinar especificidade ou polivalência foram testadas 5 linhagens de *Pseudomonas*, 4 linhagens de *Staphylococcus*, 2 linhagens de *Acinetobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e 1 linhagem de *Stenotrophomonas*. As áreas claras correspondentes as áreas de lise foram indicativas de atividade contra a linhagem.

### 2.4 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas

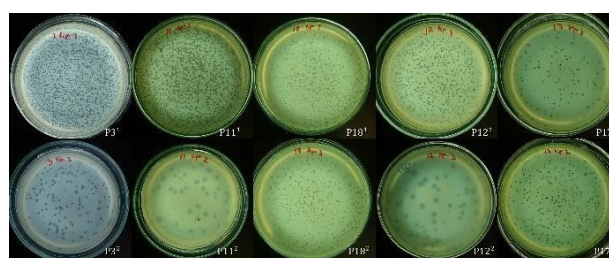
Para avaliar a atividade dos fagos contra células planctônicas em suspensão, uma alíquota de 1mL de cultura das bactérias hospedeiras em caldo LB na fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5) foram transferidas para Falcons de 50mL, contendo 20 mL do mesmo meio enriquecido com 0,1mol/L de MgSO<sub>4</sub> e 0,01 mol/L de CaCl<sub>2</sub> e aguardado atingir uma D.O. de 0,1. O conteúdo foi adicionado de 1mL de cada bacteriófago à 10<sup>8</sup>UFP/mL equivalente a uma MOI=1. Foram então realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu, CPS 240-A, Kyoto, Japão) nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 28, 32 e 48 horas. O controle positivo consistiu em um tubo adicionado somente com 1mL de cultura das bactérias hospedeiras em caldo LB na fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5) e o controle negativo de um tubo contendo somente caldo LB.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos

Foi possível o isolamento de 10 bacteriófagos, diferenciados por visualização óptica das placas de lise, distribuídos conforme a *figura 1*. Os fagos de *P. aeruginosa* P17<sub>1</sub> e P17<sub>2</sub> e os fagos de *S. marcescens* P11<sub>1</sub> e P11<sub>2</sub> foram isolados de uma

lagoa artificial aerada utilizada no processo de remoção de matéria da água de uma refinaria de petróleo. Os fagos P18<sub>1</sub> e P18<sub>2</sub> também de *P. aeruginosa*, P12<sub>1</sub> e P12<sub>2</sub> de *S. marcescens* e P3<sub>1</sub> e P3<sub>2</sub> de *S. maltophilia* foram isolados de uma lagoa/represa destinada à captação de água bruta para processos industriais de uma refinaria de petróleo. Ambos foram isolados utilizando o método de ágar de sobrecamada utilizando linhagens ambientais *P. aeruginosa* RLI17, *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94, isoladas nos ambientes citados acima e identificadas através da classificação pelo método de MALDI-TOF. As placas de lise demonstraram diferenças no tamanho e limpidez diante a cultura, sendo cada placa isolada e propagada até um alto título (~10<sup>10</sup>) para estoque e caracterização.



**Figura 1:** Placas de lise na purificação.

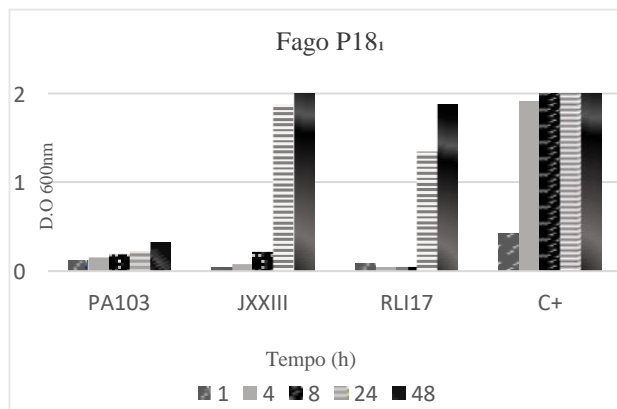
Identificação dos fagos purificados na 4ª passagem. As placas de lise dos fagos de *S. maltophilia* (P3<sub>1</sub> e P3<sub>2</sub>); de *P. aeruginosa* (P17<sub>1</sub>, P17<sub>2</sub>, P18<sub>1</sub> e P18<sub>2</sub>) e fagos de *S. marcescens* (P11<sub>1</sub>, P11<sub>2</sub>, P12<sub>1</sub> e P12<sub>2</sub>).

### 3.2 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas

A avaliação foi realizada a partir da leitura da D.O. das culturas líquidas a partir de uma concentração inicial de 1,5x10<sup>8</sup> UFC (escala de Mc Farland, D.O.<sub>600nm</sub> 0,1), ao longo de 48h. Os fagos isolados no estudo apresentaram atividade bacteriolítica expressa pela redução na multiplicação bacteriana tanto de linhagens ambientais como em linhagens clínicas com diferentes perfis de resistência.

Em cada linhagem bacteriana houve ao menos um fago que apresentou atividade lítica significativa, foram então selecionados bacteriófagos com melhor atividade lítica e para representação dos dados três linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* sob infecção do fago P18<sub>1</sub> (*Figura 2*). A linhagem PA103 de *Pseudomonas aeruginosa* gera uma intensa resposta inflamatória e produz a toxina *ExoU*, que parece ser

fundamental neste processo inflamatório, modulando a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais infectadas (SALIBA *et al.*, 2003). Foi observada uma redução de 85,7% na população dessa linhagem após 48h de multiplicação na presença do bacteriófago P18<sub>1</sub> quando comparada ao controle.



**Figura 2:** Atividade lítica em células planctônicas de *P. aeruginosa*.

A linhagem multirresistente JXXIII produtora de  $\beta$ -lactamases, apresentou uma redução de 71,9% na população após 8h de multiplicação na presença do bacteriófago P18<sub>1</sub> quando comparada ao controle.

Já na linhagem ambiental RLI17 isolada no mesmo ambiente que os bacteriófagos em estudo, foi observada uma redução de 97,4% na população após 8h de infecção com P18<sub>1</sub> em relação ao controle.

Quando analisamos a atividade do fago P18<sub>1</sub> nas três linhagens representadas, conseguimos prever que a eficácia da ação bacteriolítica na linhagem ambiental RLI17 é mais acentuada, ainda assim, os resultados das análises nas linhagens clínicas demonstraram ótima atividade com grandes reduções, enquanto a absorvância na condição normal aumentou continuamente dentro de 48 horas e se manteve inalterada no controle negativo.

A MOI=1 inicial foi aplicada a todas as culturas. Entretanto, oscilações na D.O. bacteriana podem ocorrer devido a interferentes no momento da infecção ou à formação de partículas defectivas, incapazes de concluir um ciclo, reduzindo então o número de novos vírions e consequentemente a morte de células. Muitos autores descrevem o aumento da resistência bacteriana em culturas líquidas no decorrer do ensaio, o que explicaria em partes, variações na curva (LOUREIRO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2012). Parte dessa variação pode ser

também explicada pelas diferentes formas de adsorção viral, não aprofundadas neste trabalho.

### 3.3 Avaliação do espectro de hospedeiros

A visualização macroscópica das placas de lise demonstrou a presença de 1 fago polivalente e a especificidade dos demais bacteriófagos foi a nível de espécie entre as diferentes linhagens.

Os fagos de *P. aeruginosa* isolados na linhagem ambiental RLI17 e propagados na linhagem JXXIII, se mantiveram específicos quanto à espécie, infectando todas as 5 linhagens do estudo incluindo as multirresistentes (RLI17, JXXIII, HC, PAO1, PA103), evidenciadas por halos translúcidos como fenótipo. O fago P11<sub>2</sub> isolado e hospedeiro da linhagem ambiental de *Serratia marcescens* PLA5 infecta e forma halo de lise na linhagem ambiental de *P. aeruginosa* RLI17, demonstrando sua polivalência ao infectar bactérias de ordens diferentes, sendo PLA5 pertencente à Enterobacteriales e RLI17 à Pseudomonadales, no entanto ambas pertencem à classe Gammaproteobacteria. O mesmo não ocorre com os demais bacteriófagos frente as espécies testadas. Os fagos de *Stenotrophomonas maltophilia* P3<sub>1</sub> e P3<sub>2</sub> não infectaram outras espécies, mesmo as que compartilham sua classe, Gammaproteobacteria.

Os demais gêneros *Klebsiella*, *Staphylococcus* e *Acinetobacter* não apresentaram nenhum halo de lise e foram considerados como não-hospedeiros.

## 4. Conclusões

Os dados confirmam o potencial de aplicação dos bacteriófagos isolados no ambiente industrial tanto contra amostras ambientais, quanto contra clínicas como forma de tratamento biológico, alternativo a agentes químicos. Como perspectivas devemos caracterizar morfológica e geneticamente os fagos aqui isolados e aprofundar os estudos com ensaios *in vivo*. Alguns fatores devem ser otimizados para ensaios futuros como estudos em larga escala, a fim de facilitar o entendimento acerca da dinâmica no combate a bactérias por agentes biológicos.

## 5. Apoio Financeiro

Agradecemos ao apoio da UFMG, das instituições de fomento Capes, CNPq e Fapemig, que direta ou indiretamente tornaram possível a concretização desta pesquisa.



## 6. Referências

- AISHA M. ALAMRI; AFNAN A. ALSULTAN; MOHAMMAD A. ANSARI; AMANI M. ALNIMR. Biofilm-Formation in Clonally Unrelated Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. **Pathogens, Journal from MDPI**, 9, 630; August 2020.  
doi:10.3390/pathogens9080630 2020
- ANDREWS-PFANNKUCH, C.; FADROSH, D.W., THORPE, J.; WILLIAMSON, S.J. Hydroxyapatite mediated separation of dsDNA, ssDNA and RNA genotypes from natural viral assemblages. **Applied and Environmental Microbiology**. 76, 5039-5045, 2010.
- HADDAD, LYNN EL, CYNTHIA P HARB, MARC A GEBARA, MARK A STIBICH, ROY F CHEMALY. A Systematic and Critical Review of Bacteriophage Therapy Against Multidrug-resistant ESKAPE Organisms in Humans. **Clinical Infectious Diseases**, Vol. 69, Ed.1, pp. 167–178. Jul., 2019.
- LIMA, C. P.; BRUNO, L. M.; FIGUEIREDO, E.A.T.; QUIBERONI, A.L.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, A. K. F. Resistência de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos provenientes de unidades de processamento de queijo Coalho. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.6, p.1117-1122, ISSN 0103-8478, jun, 2012.
- LOUREIRO, R.J; ROQUE F; TEIXEIRA RODRIGUES A; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA,E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública** 34:77–84, 2016.  
doi.org/10.1016/J.RPSP.2015.11.003
- MATSUMURA, E.M.; MIERZWA, J.C. Water conservation and reuse in poultry processing plant— A case study, **ScienceDirect- Elsevier**. Vol. 52, Issue 6, pp. 835- 842., April., 2008.
- SALIBA, ALESSANDRA MATTOS *et al.* ExoU contributes to late killing of *Pseudomonas aeruginosa* - infected endothelial cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, supl. 1, p. 25-26, Nov. 2003.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE EM UM MODELO MURINO DE PNEUMOSEPSE INDUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa*

Bezerra, R.O<sup>1</sup>; Brito, C.B<sup>1</sup>; IGÍDIO, C.E.D<sup>1,2</sup>; ARIFA R.D.N<sup>1</sup>; FAGUNDES C.T<sup>1,2</sup>; SOUZA D.G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiologia/Laboratório de interação microrganismo-hospedeiro

<sup>2</sup>Centro de pesquisa e desenvolvimento de fármacos

E-mail: rafaolibe97@gmail.com

**Resumo:** A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno extracelular oportunista, que infecta as vias aéreas de hospedeiros imunossuprimidos podendo levar a pneumonia grave e, em alguns casos, sepse. Sua condição oportunista, além da alta capacidade de adaptação a ambientes inóspitos justifica a relevância clínica do patógeno, especialmente em ambientes hospitalares. Após a infecção, o hospedeiro reconhece padrões moleculares presentes na *P. aeruginosa*, desencadeando uma cascata de sinalização que induz a produção de mediadores inflamatórios e o influxo de neutrófilos ao sítio de infecção.

A PI3K é uma família de enzimas envolvidas no recrutamento e ativação celular. A PI3K<sup>γ</sup> é a isoforma presente em leucócitos e regula diversas etapas da resposta inflamatória.

O objetivo desse trabalho é avaliar o papel da fosfatidilinositol-3-cinase<sup>γ</sup> em um modelo murino de pneumosepse induzido por *P. aeruginosa*. Para tal, infectamos camundongos C57Bl/6 WT e PI3K<sup>kd/kd</sup> com a cepa PA103 e, 6h ou 24h após a infecção, o pulmão, lavado broncoalveolar e o sangue foram coletados para análises de MPO e ELISA, além da contagem total e diferencial de leucócitos. Nossos resultados demonstram que animais WT não apresentam alteração na carga bacteriana quando comparados a animais PI3K<sup>kd/kd</sup> 6h após a infecção. No entanto, há menor influxo de leucócitos e maior expressão de citocinas. De forma interessante, 24h após a infecção podemos observar menor carga bacteriana em animais PI3K<sup>kd/kd</sup> em relação a animais WT, além de maior influxo de neutrófilos e expressão de citocinas no pulmão e no BAL. Logo, o estudo indica que a enzima PI3K<sup>γ</sup> tem papel importante na infecção

por *P. aeruginosa*, e sua ausência pode levar a uma resposta inflamatória mais rápida.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; PI3ky; inflamação; sepse.

### 1. Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa oportunista, infectando principalmente pacientes imunossuprimidos e hospitalizados. O genoma da *P. aeruginosa* garante versatilidade e alta adaptação a mudanças ambientais (Klockgether et al, 2011). Estas características são fundamentais para que a *P. aeruginosa* seja considerada uma bactéria com grande importância clínica. Além da imunossupressão do hospedeiro, a infecção por *P. aeruginosa* depende da eficiência de seus fatores de virulência como, por exemplo, o sistema de secreção do tipo III (T3SS). Sua expressão está associada a infecções agudas, além de ter sido relacionada ao aumento de mortalidade em pacientes infectados (Sadikot et al. 2005). O T3SS funciona como uma espécie de agulha, capaz de formar um poro na barreira celular, permitindo a translocação de proteínas efetoras (exotoxinas) para o citosol das células do hospedeiro. Somente 4 exotoxinas - Exo Y, Exo T, Exo S e Exo U - foram identificadas na *P. aeruginosa*, sendo que ExoU e ExoS raramente são expressas na mesma amostra (Shaver & Hauser, 2004). A citotoxina Exo U é uma potente fosfolipase caracterizada por provocar uma rápida perda de integridade na membrana plasmática, além de induzir a produção

de mediadores inflamatórios. Amostras como a PA103, que expressam a exotoxina U, são consideradas amostras invasivas, uma vez que podem levar ao rompimento da barreira epitelial e consequente disseminação da bactéria pelo organismo, caracterizando um quadro de sepse (Hauser, 2009). Após a infecção, os fatores de virulência da *P. aeruginosa* podem ser reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs), que irão orquestrar uma resposta inflamatória a partir da produção de mediadores inflamatórios, recrutando leucócitos ao local da infecção, podendo levar à resolução do processo

inflamatório. A enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) é uma grande família de enzimas intracelulares que apresentam importante papel na sinalização de diversas vias. A ativação da PI3K é mediada por quimiocinas e seu estímulo resulta na fosforilação do peptídeo Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), para formar Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), gerando um sítio de ligação para proteínas na parte interna da membrana, levando à sinalização de variadas funções celulares. A PI3K $\gamma$  é a isoforma que se encontra presente em leucócitos e está envolvida no recrutamento e ativação celular a partir da ativação de subunidades  $\beta\gamma$  de receptores acoplados à proteína G e consequente fosforilação da proteína AKT, gerando diversas respostas inflamatórias como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Hawkins & Stephens, 2015; Campa et al., 2018). Diversos modelos, especialmente infecciosos, demonstram atividades pró-inflamatórias da enzima, como recrutamento e ativação celular, apoptose e coagulação (Hirsch et al., 2000; Schabbauer et al., 2004; Barber et al., 2005;). A PI3K tem papel importante em modelos de sepse, nos quais a sua inibição previne a falência múltipla dos órgãos, além de garantir aumento na sobrevivência. Esse efeito protetor é secundário ao influxo efetivo de neutrófilos para o sítio de infecção e consequente diminuição da carga bacteriana (Martin et al., 2010). Sendo assim, o objetivo do trabalho é avaliar o papel da enzima PI3K $\gamma$  em um modelo murino de pneumosepse, induzido por *P. aeruginosa*.

## 2. Metodologias

### 2.1 Animais

Utilizamos camundongos C57BL/6 selvagens (WT), fêmeas de 8 semanas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e camundongos C57BL/6 deficientes para as subunidades catalíticas da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K<sup>KD/KD</sup>) fêmeas, obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG

### 2.2 infecção por *Pseudomonas aeruginosa*

Para a infecção murina pulmonar por *P. aeruginosa* camundongos C57/BL6 fêmeas de 8 semanas foram anestesiados e infectados de forma intranasal com 20 $\mu$ L de solução com inóculo de 10<sup>4</sup> UFC de *P. aeruginosa* PA103. Após 6h ou 24h da realização da infecção os camundongos foram eutanasiados por sobredose de anestésico e foi realizado o lavado bronco alveolar e os pulmões e sangue foram retirados para a avaliação dos seguintes parâmetros: Determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. aeruginosa*; Lavado bronco-alveolar, Atividade de enzimas mieloperoxidase nos pulmões (MPO) e avaliação dos níveis de citocinas e quimiocina (nóstecidos).

### 2.3 Análises estatísticas

Teste de análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Neuman Keuls. Alternativamente, o teste t de Student foi utilizado para comparar dois grupos. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Nos experimentos avaliando a taxa de sobrevivência, o teste Log-Rank será utilizado.

## 3. Resultados e Discussão

Após 6 h de infecção com a linhagem PA103, observamos que animais WT apresentam carga bacteriana de 4,25log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,35 no BAL e 4,88log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,35 no pulmão. De maneira similar, camundongos PI3K<sup>kd/kd</sup> apresentaram carga bacteriana de 3,76log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  3,9 no BAL e de 4,24log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,42 no pulmão. Neste mesmo tempo não foi observado presença de bactérias no sangue. Ainda, foi possível observar influxo de leucócitos para o BAL (6,5x10<sup>5</sup>/ml  $\pm$  1,9) e



neutrófilos para o pulmão (1,18 unidades relativas/100mg  $\pm$  0,6) de camundongos WT, além das seguintes concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  (1607 pg/100mg  $\pm$  309) e CXCL-1 (0,83 OD/100mg  $\pm$  0,6) no pulmão, e CXCL-1 (466,7 pg/mL  $\pm$  936) e IL-12 (530,8 pg/mL  $\pm$  176) no BAL. Em contrapartida, ainda após 6h de infecção, camundongos PI3K<sup>kd/kd</sup> apresentaram um aumento no influxo de leucócitos para o BAL (14x10<sup>5</sup>/ml  $\pm$  15,6) e de neutrófilos para o pulmão (2,51 unidades relativas /100mg  $\pm$  1,5), além de um aumento nas concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  (6323 pg/100mg  $\pm$  2790) e CXCL-1 (1,8 OD/100mg  $\pm$  1,23) no pulmão e CXCL-1 (3147 pg/mL  $\pm$  1015) e IL-12 (598 pg/mL  $\pm$  506) no BAL. Estes dados indicam que, apesar de não promover alterações significativas na carga bacteriana, os animais PI3K<sup>kd/kd</sup> induzem o recrutamento de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios de forma mais rápida no tempo inicial da infecção.

O próximo passo foi avaliar os mesmos parâmetros no protocolo de infecção com tempo de 24h; nesse tempo, observamos carga bacteriana de 4,7log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,30 no pulmão e 4,9log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,34 no BAL de animais WT. No entanto, observamos menor carga bacteriana no pulmão (3,5log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,76) e no BAL (3,3log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,72) de animais PI3K<sup>kd/kd</sup>. De forma interessante, observamos presença de bactérias no sangue em animais WT (6,6log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  1,2) e PI3K<sup>kd/kd</sup> (4,75log<sub>10</sub> UFC  $\pm$  0,77). Ainda 24h após a infecção, observamos influxo de neutrófilos para o pulmão (11,75 OD/100mg  $\pm$  4,3) e leucócitos para o BAL (78x10<sup>5</sup>/mL  $\pm$  25,8) de animais WT, além das seguintes concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  (297x10<sup>6</sup>/mL  $\pm$  135) e CXCL-1 (782,2 pg/mL  $\pm$  638) no BAL, e IL-1 $\beta$  (10492,1 pg/100mg  $\pm$  3960) no pulmão. Em contrapartida, observamos menor influxo de neutrófilos para o pulmão (6,33 OD/100mg  $\pm$  2,64) e leucócitos para o BAL (33x10<sup>5</sup>/mL  $\pm$  9,4) de animais PI3K<sup>kd/kd</sup>, além de uma menor concentração das citocinas IL-1 $\beta$  (30,3pg/mL  $\pm$  58) e CXCL-1 (357,9 pg/mL  $\pm$  254) no BAL, e IL-1 $\beta$  (3607,2 pg/100mg  $\pm$  4034) no pulmão.

Os baixos níveis de citocina e influxo de neutrófilos, além da manutenção da baixa carga bacteriana, indicam que os animais PI3K<sup>kd/kd</sup> responderam ao processo infeccioso de forma mais rápida que camundongos WT.

#### 4 Conclusões

Diante dos resultados encontrados podemos concluir que a enzima fosfatidilinositol-3-cinase desempenha papel importante na infecção por *P. aeruginosa* a partir do recrutamento de leucócitos ao local da inflamação, levando a uma resolução mais rápida do processo infeccioso. No entanto, os mecanismos envolvidos na participação dessa via ainda precisam ser elucidados.

#### 5 Apoio Financeiro

UFMG, CNPQ, CAPES e FAPEMIG.

#### 6 Referências

- SHAVER, Ciara M, HAUSER ALAN R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. **Infect Immun**, v. 72, p. 6969-6977, 2004.
- HAUSER, Alan R; *et al.* The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 654-65, 2009.
- HAWKINS, P.T.; STEPHENS, L.R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, p. 882-897, 2015.
- CAMPA, Carlo C; SILVA Rangel L; MARGARIA, Jean P.; TEIXEIRA, Mauro M; *et al.* Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. **Nat Commun**, v. 9, p. 1-16, 2018.
- HIRSCH E, *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science**, v. 287, p. 1049-53, 2000.
- SCHABBAUER, Gernot; *et al.* PI3KAkt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1963-1969, 2004.
- BARBER, Domingo F; *et al.* PI3K gamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. **NatMed**, v. 11, p. 933-935, 2005.
- SADIKOT R.T.; *et al.* Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, 2005.
- Martin EL, Souza DG, Fagundes CT; *et al.*

Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment. **Am J Respir Crit Care Med**, 2017.

FRUMAN, David A.; *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, p. 605-635, 2017.

KLOCKGETHER, Jens; *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Front Microbiol**, 2011.

---

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO PELA MICROBIOTA INTESTINAL NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PULMONAR POR *Pseudomonas aeruginosa*

Brito, C.B.<sup>1</sup>; Igídio, C.E.D.<sup>1,3</sup>; Bezerra, R.O.<sup>1</sup>; Arifa, RDN<sup>1</sup>; Fagundes, M.<sup>1,3</sup>; Batista, R.R.A.<sup>1,3</sup>; Cassiano, L.M.G.<sup>2</sup>; Kohlhoff, M.<sup>2</sup>; Coimbra, R.S.<sup>2</sup>; Fagundes, C.T.<sup>1,3</sup>; Souza, D.G.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Interação microrganismo-hospedeiro (ICB/UFMG)

<sup>2</sup> Instituto René Rachou, FIOCRUZ

<sup>3</sup> Centro de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (ICB/UFMG)

E-mail: [cbbrito.farma@gmail.com](mailto:cbbrito.farma@gmail.com)

**Resumo:** O triptofano é um aminoácido essencial que é metabolizado tanto pelo hospedeiro, gerando as kinureninas, através da enzima IDO1, quanto pela microbiota intestinal, gerando derivados indólicos. Ambos funcionam como agonistas do receptor AHR, que desempenha diversas funções imunomoduladoras. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal na infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*. Induzimos a disbiose em camundongos selvagens (WT) com coquetel de antimicrobianos por 14 dias, quando os animais foram inoculados intranasalmente com  $10^7$  UFC de *P. aeruginosa*. Camundongos que receberam os antimicrobianos apresentaram disbiose intestinal com redução de bactérias totais, incluindo produtoras de indol. A disbiose foi acompanhada do aumento da concentração sérica de triptofano e da redução de kinurenina. Camundongos WT disbióticos infectados apresentaram maior letalidade quando comparados a camundongos eubióticos, bem como maior carga bacteriana no lavado broncoalveolar e no pulmão e menor expressão da enzima iNOS e da produção de ROS em neutrófilos quando comparados a camundongos eubióticos infectados. Diferente do que ocorre com camundongos WT, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos não apresentaram aumento da carga bacteriana quando comparados a animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos. A disbiose em camundongos WT foi acompanhada do aumento da expressão de AHR em neutrófilos recrutados o que não ocorreu em camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos. Além disso, o bloqueio do receptor AHR durante a disbiose resultou na reversão do fenótipo de animais WT disbióticos após a infecção. Assim, a disbiose por antimicrobianos interfere no metabolismo de trp, levando a maior ativação do receptor AHR e maior susceptibilidade dos animais a infecção.

Palavras-chaves: microbiota; inflamação; triptofano; *P. aeruginosa*; IDO1.

### 1. Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo aeróbico e ubíquo, que, em humanos, pode causar bacteremia, infecções do trato urinário e pneumonia, principalmente em pacientes imunossuprimidos hospitalizados e com uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (GELLATLY & HANCOCK, 2013; HUBER *et al.*, 2016). Devido a sua variedade de fatores de virulência juntamente com sua ubiquidade, a *P. aeruginosa* representa um grande risco dentro da UTI, sendo a terceira bactéria mais prevalente em infecções neste ambiente (CHOUDHURI *et al.*, 2017). Dentro das UTIs, 64% a 71% dos pacientes internados recebem antibioticoterapia (ROBAK *et al.*, 2018), sendo o uso desses medicamentos um dos fatores de risco para infecção hospitalar pela *P. aeruginosa* (GOMILA *et al.*, 2018). Este fato também pode ser observado em outros hospedeiros: trabalhos em modelos murinos demonstraram que o uso prévio de antimicrobianos é um agravante para a infecção pela *P. aeruginosa*, uma vez que os antimicrobianos são capazes de alterar a composição da microbiota intestinal (ROBAK *et al.*, 2018; TSAY; CHEN; CHEN, 2019).

Uma microbiota intestinal saudável, em eubiose, é importante para uma série de funções fisiológicas do hospedeiro, como maturação do sistema imune e o metabolismo de nutrientes (IEBBA *et al.*, 2015). Entretanto, o desequilíbrio da microbiota intestinal, denominado disbiose, pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, como, por exemplo, as doenças inflamatórias intestinais (IBDs), a asma, a diabetes e a obesidade (LEVY *et al.*, 2017). Assim, a disbiose pode ser definida como uma alteração na

composição e na função da microbiota que pode ser causada por um conjunto de fatores ambientais (por exemplo, a exposição a antimicrobianos) ou relacionados ao hospedeiro (estilo de vida e fatores genéticos) que perturbam o ecossistema microbiano (LEVY *et al.*, 2017).

O uso de antimicrobianos é um dos principais indutores da disbiose intestinal, podendo alterar as características taxômicas e funcionais da microbiota (CHAI *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2018). Dentro das alterações funcionais, a disbiose após o uso de antimicrobianos reduz ou elimina a maioria dos produtos do metabolismo bacteriano como os ácidos graxos de cadeia curta e ácidos biliares secundários e levam ao acúmulo de seus precursores (incluindo oligossacarídeos, poliois e ácidos biliares primários), bem como vários compostos das vias metabólicas dos ácidos biliares, esteróides e de triptofano (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016)

O triptofano é um aminoácido essencial adquirido somente através da dieta devido a incapacidade de síntese pelo hospedeiro (ZHANG; DAVIES, 2016). No corpo humano, o triptofano é principalmente utilizado para a formação de proteínas. No entanto, o triptofano ainda pode ser catabolizado por duas principais vias: a via da serotonina e a via das kinureninas (Kyn). No primeiro passo dessa via, o triptofano é metabolizado pelas enzimas triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) ou indolamina-2,3-dioxigenase 1 (IDO1) em kinurenina (DEHHAGHI *et al.*, 2019). Além do metabolismo do hospedeiro, o triptofano também pode ser metabolizado pela microbiota intestinal, produzindo diversos metabólitos indólicos (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015). Tanto as kinureninas quanto alguns metabólitos de triptofano de origem microbiana são capazes de ativar o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR). O AHR é um fator de transcrição que é amplamente expresso em diversos tipos celulares, incluindo células imunes, como macrófagos, neutrófilos e células B, além de células epiteliais e algumas células tumorais, exercendo papel imunomodulador importante (TAKAMURA *et al.*, 2010; HUBBARD *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o papel do metabolismo de triptofano na patogênese da infecção pulmonar pela *Pseudomonas aeruginosa* após indução de disbiose da microbiota intestinal com antibioticoterapia.

## 2. Metodologia

### 2.1. Indução da disbiose

Para a indução da disbiose, camundongos C57/BL6 de 8 semanas receberam, por 14 dias, um coquetel de antimicrobianos, dissolvidos na água de beber, composto por: Ampicilina (1g/L), Vancomicina (500mg/L), Ciprofloxacino (200mg/L), Imipenem (250mg/L), Metronidazol (1g/L) e Nistatina (12 mg por animal). Os antimicrobianos foram trocados duas vezes por semana. Após o final da disbiose, as fezes dos animais foram coletadas para análise da composição da microbiota fecal, por plaqueamento das fezes em meio de cultura e avaliação da produção de indol pela microbiota fecal e o soro foi coletado para a dosagem de metabólitos de triptofano pela técnica de uHPLC-MS. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na utilização de animais (CEUA) sob o número de protocolo 02/2019.

### 2.2 Avaliação do efeito da disbiose na patogênese da infecção pulmonar por *P. aeruginosa*

Ao fim do protocolo de disbiose descrito no item 2.1, os antimicrobianos foram retirados e, após aproximadamente 12h, os animais foram infectados com *P. aeruginosa*. Para isso, os camundongos foram inoculados com  $1 \times 10^7$  UFC da linhagem PAO1 pela via intranasal e, após 6h ou 24h, a eutanásia foi realizada e o pulmão e o lavado broncoalveolar foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: análise do influxo de neutrófilos pela técnica de MPO, análise da produção de mediadores inflamatórios pela técnica de ELISA, análise da carga bacteriana através do plaqueamento em meio de cultura específico, análise do recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar através da técnica de contagem de células e avaliação do recrutamento celular pela técnica de citometria de fluxo. Com a finalidade de avaliar o papel do receptor AHR após a disbiose, 1h antes da infecção, camundongos receberam pela via subcutânea o antagonista seletivo CH223191 na dose de 10mg/kg. Para avaliar o papel da enzima IDO1, também durante a disbiose, os camundongos receberam por via

intraperitoneal o inibidor 1-metil-triptofano (1-MT) na dose de 70mg/kg também 1h antes da infecção. Uma outra estratégia para avaliar o papel da enzima IDO1 foi através do uso de camundongos IDO1<sup>-/-</sup>. Os camundongos foram submetidos ao mesmo protocolo descrito para camundongos WT.

### 2.3 Análise estatística

Os valores dos resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Para análise da curva de sobrevivência foi utilizado o teste Log-rank (Mantel-cox). O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

### 3. Resultados e discussão

Primeiramente, avaliamos como estaria a microbiota intestinal após o protocolo de disbiose. Após os 14 dias de administração dos antimicrobianos, pudemos observar que as fezes de animais que receberam apenas água (eubióticos) apresentam uma alta quantidade de bactérias aerotolerantes totais ( $7,83 \log_{10}$  UFC  $\pm 0,20$ ), bactérias produtoras de ácido lático ( $8,4883 \log_{10}$  UFC  $\pm 0,39$ ) e enterobactérias ( $4,34 \log_{10}$  UFC  $\pm 0,94$ ), o que é característico de uma microbiota fecal em equilíbrio. Por outro lado, animais que receberam o coquetel de antimicrobianos (disbióticos) apresentaram uma redução de todos esses grupos bacterianos ( $1 \pm 0 \log_{10}$  UFC;  $p < 0,05$ ), demonstrando que o nosso protocolo foi capaz de induzir alteração na microbiota intestinal. A microbiota intestinal é essencial para o metabolismo de triptofano. Assim, nosso próximo passo foi avaliar se o nosso protocolo de disbiose intestinal por antimicrobianos era capaz de alterar o metabolismo de triptofano no hospedeiro. Através da cultura de bactérias fecais em meio líquido rico, observamos que em animais eubióticos as bactérias fecais eram capazes de metabolizar o triptofano, produzindo indol ( $23,15 \mu\text{M} \pm 9,04$ ). No entanto, em animais disbióticos, a produção de indol foi significativamente reduzida ( $0,53 \mu\text{M} \pm 0,23$ ;  $P < 0,05$ ). Além disso, animais disbióticos também apresentaram aumento dos níveis séricos de triptofano ( $44139,88 \text{ ng/mL} \pm 7518,9$ ;  $P < 0,05$ ) e redução dos níveis de kinurenina ( $587,37 \text{ ng/mL} \pm 116,65$ ;  $P < 0,05$ ) quando comparados a animais eubióticos ( $32099,77 \text{ ng/mL} \pm$

$2130,48$ ;  $1135,4 \text{ ng/mL} \pm 297,14$ ).

Nosso próximo passo foi avaliar qual o impacto da disbiose intestinal e a alteração do metabolismo de triptofano na patogênese da infecção por *P. aeruginosa*. Nossos resultados demonstram que, após a inoculação de  $1 \times 10^7$  UFC da linhagem PAO1, animais eubióticos apresentaram aproximadamente 60% de letalidade em até 7 dias, enquanto animais disbióticos apresentaram 100% de letalidade até 48h após a infecção ( $P < 0,05$ ). Corroborando a maior taxa de letalidade, animais disbióticos apresentaram maior carga bacteriana no espaço alveolar ( $5,23 \pm 1,62$ ;  $P < 0,05$ ) e no pulmão ( $5,72 \pm 1,42$ ;  $P < 0,05$ ) 24h após a infecção quando comparados a animais eubióticos ( $2,40 \pm 1,62$ ,  $3,48 \pm 1,71$ ). Animais eubióticos submetidos a infecção com a PAO1 apresentaram importante influxo de leucócitos ( $84,84 \times 10^5 / \text{mL} \pm 63,33$ ) para o espaço alveolar 24 horas após a infecção, sendo o aumento de neutrófilos predominante. De forma interessante, em animais disbióticos, o influxo celular foi significativamente menor ( $72,05 \times 10^5 / \text{mL} \pm 56,53$ ;  $P < 0,05$ ). Ainda, através da análise por citometria de fluxo observamos que, após 6 horas de infecção, neutrófilos de camundongos disbióticos apresentaram menor expressão de iNOS ( $61522,67$  MFI  $\pm 6377,18$ ) quando comparado a animais eubióticos ( $79589$  MFI  $\pm 7842,23$ ;  $P < 0,05$ ). Além disso, no tempo de 24h, esses mesmos neutrófilos de animais disbióticos apresentaram uma queda na produção de espécies reativas de oxigênio ( $369$  MFI  $\pm 104,33$ ;  $P < 0,05$ ) quando comparados a animais eubióticos ( $1050,5$  MFI  $\pm 143,56$ ). Esses resultados podem explicar a maior carga bacteriana em animais disbióticos, uma vez que as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são importantes para a morte das bactérias pelos neutrófilos.

Uma vez que o metabolismo de triptofano está alterado durante a disbiose intestinal, fomos avaliar o papel desse metabolismo na susceptibilidade de animais disbióticos à infecção pela *P. aeruginosa*. Para isso, realizamos o protocolo de disbiose intestinal e posterior infecção em animais deficientes para a enzima IDO1. O nosso resultado demonstrou que, ao submeter camundongos IDO1<sup>-/-</sup> ao protocolo de disbiose induzido pelo uso de antimicrobianos, diferentemente de animais WT, não houve aumento na recuperação de carga bacteriana ( $2,77 \log_{10}$  UFC  $\pm 0,38$ ) quando comparado a animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos ( $2,35 \log_{10}$  UFC  $\pm 0,29$ ). Além disso, observamos pela técnica de citometria de fluxo que neutrófilos de camundongos WT disbióticos apresentaram uma maior expressão de AHR ( $1296,6$



MFI  $\pm 138$ ;  $P < 0,05$ ) quando comparados a animais WT eubióticos (926,57 MFI  $\pm 113,43$ ). De forma interessante, nenhuma diferença foi observada na expressão de AHR em neutrófilos de camundongos IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos (776,4 MFI  $\pm 88,26$ ) e disbióticos (817,6 MFI  $\pm 423,36$ ), sugerindo que uma maior ativação do receptor AHR durante o processo de disbiose pode ser importante para a maior susceptibilidade desses animais à infecção.

Nosso próximo passo foi avaliar se a ativação do receptor AHR durante o processo de disbiose era importante para o perfil de susceptibilidade de animais disbióticos. A favor de nossa hipótese, enquanto animais disbióticos que receberam veículo apresentaram aumento da carga bacteriana (6,90 Log<sub>10</sub> UFC  $\pm 1,38$ ;  $P < 0,05$ ) quando comparados com animais eubióticos (4,96 Log<sub>10</sub> UFC  $\pm 0,67$ ), não foi observada diferença entre animais disbióticos (6,18 Log<sub>10</sub> UFC  $\pm 1,55$ ) e eubióticos (5,54 Log<sub>10</sub> UFC  $\pm 1,35$ ) que receberam o antagonista seletivo de AHR (CH223191).

#### **4. Conclusão**

Diante dos nossos achados podemos concluir que a disbiose advinda do uso prolongado de antimicrobianos altera a composição da microbiota intestinal, levando a uma maior susceptibilidade do hospedeiro à infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*. Essa maior susceptibilidade dos animais disbióticos parece estar associada a uma alteração do metabolismo de triptofano, maior ativação do receptor AHR e menor capacidade de eliminação da bactéria.

#### **5. Apoio financeiro**

CNPq, CAPES, FAPEMIG, INOVA Fiocruz.

---

## 6. Referências

- BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458–478, 2016.
- DEHHAGHI, M.; KAZEMI SHARIAT PANAHI, H.; GUILLEMIN, G. J. Microorganisms, tryptophan metabolism, and kynurenine pathway: A complex interconnected loop influencing human health status. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919852996, 2019.
- GOMILA, A.; CARRATALÀ, J.; ELIAKIM-RAZ, N.; SHAW, E.; WIEGAND, I.; VALLEJO-TORRES, L., ...; GRIER, S. Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2571, 2018.
- HUBBARD, T. D.; MURRAY, I. A.; PERDEW, G. H. Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1522-1535, 2015
- HUBER, P.; BASSO, P.; REBOUD, E.; ATTRÉE, I. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. **Environmental microbiology reports**, v. 8, n. 5, p. 564-571, 2016.
- IEBBA, V.; TOTINO, V.; GAGLIARDI, A.; SANTANGELO, F.; CACCIOTTI, F.; TRANCASSINI, M., ...; SCHIPPA, S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2016.
- LEVY, M.; KOLODZIEJCZYK, A. A.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219-232, 2017.
- ROBAK, O. H.; HEIMESAAT, M. M.; KRUGLOV, A. A.; PREPENS, S.; NINNEMANN, J.; GUTBIER, B.; ...; MARATHE, V. Antibiotic treatment–induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 8, p. 3535-3545, 2018
- ROSA, C. P.; BRANCAGLION, G. A.; MIYAUCHI-TAVARES, T. M.; CORSETTI, P. P.; DE ALMEIDA, L. A. Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. **Life sciences**, v. 207, p. 480-491, 2018.
- TSAY, T. BIN; CHEN, P. H.; CHEN, L. W. Aryl hydrocarbon receptor ligands enhance lung immunity through intestinal IKK $\beta$  pathways. **Journal of Translational Medicine**, p. 1–14, 2019.
- ZHANG, L. S.; DAVIES, S. S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 46, 2016.
- ZHANG, L. S.; DAVIES, S. S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 46, 2016.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DA FOLHA DE *CURCUMA LONGA* L.

Corrêa<sup>1</sup>, A. N. R.; Moura<sup>2</sup>, J. G. L.; Matos<sup>3</sup>, C. B.; Perquim<sup>4</sup>, L. C.; Konzen<sup>3</sup>, M. P.; Mossmann<sup>2</sup>, V.; Rossi<sup>1,2,3</sup>, R. C.; Gemelli<sup>1,2,3</sup>, T.

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Departamento de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

<sup>2</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Departamento de Farmácia

<sup>3</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (Itt Nutrifor)

<sup>4</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico de Semicondutores (Itt Chip)

E-mail: aldreyc@edu.unisinos.br

**Resumo:** O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do óleo essencial de *Curcuma longa* L. em bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* e na levedura *Candida albicans*. Utilizando a metodologia de difusão em disco, as bactérias mais sensíveis ao óleo essencial foram *S. aureus* (15 mm), *B. cereus* (10 mm) e *E. coli* (10 mm). Na metodologia de MIC, *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* foram os mais inibidos, com valores de 6,25 mg/mL, seguidos de *S. typhimurium* e *C. albicans*, com concentração 12,50 mg/mL. *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram os microrganismos com menor taxa de inibição. Nos resultados obtidos através da metodologia de CBM, as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* obtiveram valores de 12,50 mg/mL, *S. typhimurium* de 25,00 mg/mL e as mais resistentes foram *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. De modo geral, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foram mais suscetíveis. Os resultados apresentados demonstram o óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* L. têm potencial para aplicação no desenvolvimento de antimicrobianos naturais, na produção farmacêutica ou de alimentos.

**Palavras-chave** Óleo essencial; *Curcuma longa* L.; Antimicrobiano; Fungicida; Bactericida.

### 1. Introdução

Obtidos através de uma matéria-prima natural de origem vegetal, os óleos essenciais (OE) podem ser definidos como uma mistura complexa de

elementos naturais polares e apolares, incluindo em sua composição terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos, compostos aromáticos e terpenóides (Freires et al., 2015).

A aplicação na promoção da saúde e no combate às doenças é certificada em múltiplos artigos mostrando o potencial terapêutico de diferentes tipos de OE, incluindo atividade anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antibacteriana (Freires et al., 2015).

Em consonância com a atividade antimicrobiana dos OE e a necessidade de busca por novas drogas antimicrobianas, o uso de compostos naturais se faz imprescindível; atualmente, existe um grave risco à saúde com o aumento no número de microrganismos multirresistentes a diferentes drogas, tendo como fatores desencadeantes o uso excessivo de antibióticos e antimicóticos de maneira indiscriminada, o emprego de doses macroscópicas pela indústria pecuária e o uso de fungicidas no setor agrícola (Blair et al., 2015).

A atividade antimicrobiana do açafrão é descrita em pesquisas envolvendo o rizoma, onde é demonstrada sua ação contra diferentes patógenos (Essien et al., 2015). Porém, pesquisas sobre o OE da folha de *Curcuma longa* L. ainda são escassas, sendo a parte aérea da planta considerada resíduo pós-colheita (Essien et al., 2015).

### 2. Metodologias

#### 2.1 Preparo da emulsão para os testes

Como o OE demonstra-se insolúvel em água, foi preparada uma solução onde, foram pesados 400 µL de OE e, posteriormente, foram adicionados 250 µL

de polisorbato 80 (*Tween*<sup>®</sup> 80) e 2,1 mL de água destilada estéril. O conjunto foi agitado durante 5 minutos em aparelho agitador Vortex.

Foi calculada a concentração inicial de OE em mg/mL e corrigida, adicionando 670 µL água destilada estéril, para a concentração de 100 mg de OE por mL de solução.

## 2.2 Microrganismos

As cepas de referência utilizadas no estudo foram de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). As cepas de bactérias foram cultivadas em ágar nutriente e a levedura em ágar YPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*), mantidas em estufa para cultivo de microrganismos, na temperatura de 37 °C ± 0,5 °C para bactérias e 28 °C ± 0,5 °C para leveduras, por 24 horas.

O inóculo de trabalho foi preparado em solução de cloreto de sódio 0,85%, ajustado na turbidez da solução comparativamente até se igualar a 0,5 na escala McFarland, confirmada por densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm com absorvância igual a 0,1 ( $\pm 0,01$ ).

## 2.3 Difusão em disco

Seguindo a metodologia de Balouiri, Sadiki e Ibsouda (2016), as placas de ágar Mueller Hinton foram inoculadas com um inóculo padronizado 0,5 da escala McFarland (1x10<sup>8</sup>UFC/mL) da bactéria testada e em seguida o disco de papel filtro (6 mm) contendo 5 µL do OE de *Curcuma longa* L. é colocado na superfície do ágar. As placas de Petri são incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas à 37 °C ± 0,5 °C. Após esse período, mediu-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada placa. O método é padronizado seguindo as normas de ponto de corte do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

## 2.4 Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (*Minimum Inhibitory Concentration* - MIC) é a menor concentração do OE que inibe completamente o

crescimento de microrganismos. A determinação da MIC foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços de fundo chato, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H), com tampa, segundo o método descrito por Balouiri, Sadiki e Ibsouda (2016).

Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 50 µL de caldo nutriente, quando testadas as bactérias, ou caldo YPD, quando testada a levedura. Em seguida, inseriu-se 50 µL da emulsão do OE para obtenção da concentração inicial de 50 mg/mL, na coluna 2. As concentrações subsequentes foram obtidas após diluição seriada dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial até 195,31 µg/mL (Coluna 11), pela transferência de 50 µL do conteúdo ao poço subsequente).

Posteriormente, foram inseridos 50 µL da suspensão dos microrganismos em todos os poços, exceto na coluna correspondente ao controle de esterilidade (Coluna 12). A Coluna 01 foi adotada como controle de crescimento.

As placas foram incubadas em estufa para cultivo de microrganismos, a 37 °C ± 0,5 °C para bactérias e leveduras a 28 °C ± 0,5 °C, por 24 horas. A MIC correspondeu à última diluição dos OE na qual não foi verificada a presença de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura após incubação, confirmada por espectrofotometria no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm.

## 2.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

As CBM e CFM foram obtidas por meio de semeadura em ágar nutriente, quando testadas bactérias, e, leveduras, em ágar YPD.

Alíquotas de 10 µL das diluições correspondentes a MIC e duas imediatamente anteriores (2MIC e 4MIC) dos conteúdos dos poços das placas de microdiluição. As placas foram incubadas em estufa para cultivo de microrganismos, na temperatura de 37 °C ± 0,5 °C para bactérias e leveduras a 28 °C ± 0,5 °C, por 24 horas.

## 2.6 Interpretação dos resultados

Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de cortes preconizados pelas normas do CLSI (2019), onde halos de até 6 mm foram

caracterizados como Resistente, de 7 até 8 mm Intermediário e acima de 9 mm Sensíveis.

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados, obtidos a partir do teste de difusão em disco, indicaram que o OE da folha de *Curcuma longa* L. apresentou melhor atividade biológica contra bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus* e na Gram-negativa *E. coli* em comparação às bactérias *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*. Todos os resultados e medidas dos halos de inibição podem ser conferidos na figura 1, onde, a classificação “S” se refere a “sensível” e “R” se refere a “resistente”.

Tabela 1- Medida do halo de inibição bacteriana

Microrganismo	Gram	Halo (mm)	Classificação
<i>B. cereus</i>	Pos	15	S
<i>S. aureus</i>	Pos	15	S
<i>E. faecalis</i>	Pos	06	R
<i>E. coli</i>	Neg	10	S
<i>S. typhimurium</i>	Neg	06	R
<i>P. aeruginosa</i>	Neg	06	R

Resultados semelhantes foram anteriormente reportados por diferentes estudos com o OE de açafração e *S. aureus*, como o de Teles et al. (2019), com halos de inibição de  $15.33 \pm 0.577$ . Pesquisas utilizando a metodologia de difusão em disco com OE das partes aéreas de *Curcuma longa* L. para a bactéria *B. cereus* atualmente são escassas, porém, Dhiman et al. (2016) relatam a atividade inibitória do extrato acetônico, metanólico e etanólico de açafração com halos de 15,7 a 23,8 mm, semelhantes aos do presente estudo.

Já a bactéria Gram-negativa *E. coli* é menos sensível à ação antimicrobiana de OE de diferentes matérias-primas naturais testadas em diversos estudos; além disso, Kamazeri et al. (2012) relataram que a espécie *Curcuma aeruginosa*, pertencente à mesma família da *Curcuma longa* L., não é capaz de inibir o crescimento de *E. coli*. A menor sensibilidade aos OE é devido ao seu envelope celular formado de uma camada externa de fosfolípidios e lipopolissacarídeos que limita a difusão de compostos hidrofóbicos na sua membrana celular.

Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo demonstram que o OE possui efeito inibidor no crescimento bacteriano de *E. coli*. Esse

resultado está de acordo com relatos de Hassan et al. (2016) Teles et al. (2019) que demonstram  $12.67 \pm 0.577$  mm e 17,5 mm de zona de inibição, respectivamente, utilizando o OE do rizoma de *Curcuma longa* como inibidor. Diante do método de difusão em disco, o OE de *Curcuma longa* L. folha possui efeito inibidor contra *E. coli* superior a diferentes OE de matérias-primas naturais.

De acordo com pesquisas anteriores de Hassan et al. (2016) e Teles et al. (2019), as bactérias *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. typhimurium* são fortemente sensíveis ao OE do rizoma de açafração, devido aos seus principais constituintes ar-turmerona,  $\alpha$ -turmerona e  $\beta$ -turmerona. Contudo, esse resultado não foi o encontrado com o OE da folha de açafração, devido à diferença nos constituintes minoritários descritos por Essien et al. (2015).

Com base nos resultados da difusão em disco, a MIC (Figura 2) esperada é relacionada aos resultados reportados por Álvarez; Ortíz e Martínez (2016), onde metodologia semelhante foi aplicada com OE de *Curcuma longa* e as menores medidas de MIC foram para bactérias Gram-positivas.

Tabela 2- Resultados de MIC, CBM e CFM

Microrganismo	MIC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	6,25
<i>E. faecalis</i>	25,00
<i>B. cereus</i>	6,25
<i>E. coli</i>	6,25
<i>P. aeruginosa</i>	25,00
<i>S. typhimurium</i>	12,50
<i>C. albicans</i>	12,50
Microrganismo	CBM (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	12,50
<i>E. faecalis</i>	50,00
<i>B. cereus</i>	12,50
<i>E. coli</i>	12,50
<i>P. aeruginosa</i>	50,00
<i>S. typhimurium</i>	25,00
	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	25,00

As bactérias Gram-positivas *B. cereus* (6,25 mg/mL) e *S. aureus* (6,25 mg/mL), juntamente com as bactérias Gram-negativas *E. coli* (6,25 mg/mL) e *S. typhimurium* (12,50 mg/mL) e a levedura *C. albicans* (12,50 mg/mL) foram os microrganismos mais suscetíveis ao OE de *Curcuma longa* L.

Resultados semelhantes para bactérias inibidas foram apresentados por Essien et al. (2015), onde o OE da folha de açafração inibiu o crescimento de

bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus* (MIC = 0,078 mg/mL) e foi concluído que atividades antimicrobianas observadas no OE de folhas de *Curcuma longa* podem ser atribuídas ao componente principal ar-turmerona.

Os valores de MIC obtidos para *E. coli* e *S. typhimurium* são diferentes dos relatados por Álvarez, Ortíz e Martínez (2016), utilizando o extrato do rizoma de açafrão em que o MIC para esses microrganismos foi consideravelmente maior em comparação aos demais testados, demonstrando que o OE da folha de açafrão possui ação antimicrobiana singular ao rizoma quando comparado a diferentes bactérias.

Para as bactérias *E. faecalis* e *P. aeruginosa* a medida de MIC obtida foi 25 mg/mL, sendo as menos suscetíveis ao OE. Em estudos anteriores dos efeitos inibidores do açafrão essas bactérias também demonstraram valores de MIC superiores aos microrganismos testados (Essien et al., 2015; Teles et al., 2019).

A ação antifúngica contra a levedura *C. albicans* já foi relatada por Essien et al. (2015) e Zhang et al. (2017), com valores de MIC de 0,312 mg/mL e 0,300 mg/mL respectivamente. Esses valores, juntamente com o valor 12,50 mg/mL obtido na pesquisa, demonstram que o OE de açafrão possui ação inibitória contra *C. albicans*. Estudos de Murugesh et al. (2019) relatam que a ação do açafrão sobre a *C. albicans* afeta formas morfológicas imaturas da levedura, interrompendo a síntese na membrana celular fúngica. Além disso, inibe intensamente a adesão da *C. albicans*, mostrando efeitos estáticos em concentrações mais baixas e efeitos fungicidas em concentrações mais altas.

Pesquisas sobre o potencial bactericida das folhas de açafrão envolvendo valores de CBM para *B. cereus* atualmente são escassas, porém, de acordo com Phanthong et al. (2013), o OE de *Curcuma longa* L. rizoma não demonstrou ação bactericida contra o microrganismo, sendo eficaz apenas para *S. typhimurium* (CBM = 0,2 mg/mL). Em Phanthong et al. (2013), o rizoma do açafrão foi bactericida contra *E. faecalis* (CMB = 2,5 mg/mL), assim demonstrando que o rizoma e as partes aéreas da planta possuem atividades antimicrobianas distintas para diferentes bactérias.

Assim como nos resultados do MIC, a bactéria *P. aeruginosa* (50,00 mg/mL) foi menos sensível ao efeito bactericida do OE. Esse resultado está de acordo com Chakraborty et al. (2014), que reportou

valores de CBM altos no extrato aquoso para *P. aeruginosa* em comparação a outras bactérias testadas.

Para CFM os valores de 1,6 mg/mL e 0,032 mg/mL foram descritos por Murugesh et al. (2019) e Freire et al. (2017) para o rizoma do açafrão. Demonstrando, juntamente com o resultado do presente estudo, que as propriedades fungicidas do açafrão estão nos constituintes tanto do rizoma quanto da folha, sendo menos presentes nas partes aéreas da planta, já que o resultado de CFM obtido com o OE da folha foi de 25 mg/mL.

#### 4. Conclusões

O OE de *Curcuma longa* L. possui ação antibacteriana e antifúngica para os microrganismos testados. De modo geral, as bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*, Gram-negativa *E. coli* e a levedura *C. albicans* foram as mais suscetíveis ao OE. Os resultados apresentados demonstram que as partes aéreas de *Curcuma longa* L. têm potencial para serem aplicadas no desenvolvimento de novos antimicrobianos naturais na produção farmacêutica ou de alimentos.

Entretanto, mais pesquisas são necessárias para determinar os compostos terapêuticos ativos e seus mecanismos de ação. Além disso, o potencial antimicrobiano *in vivo* desse OE isolado ou combinado com diferentes agentes antimicrobianos podem ser explorados em estudos futuros.

#### 5. Apoio Financeiro

Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

#### 6. Referências

- ÁLVAREZ, N. M.; ORTÍZ, A. A.; MARTÍNEZ, O. C. Actividad antibacteriana in vitro de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) frente a bacterias nosocomiales en Montería, Colombia. **Revista de Biología Tropical**, vol. 64, n. 3, p. 1201–1208, 1 Sep. 2016.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, vol. 6, n. 2, p. 71–79, 1 Apr. 2016.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

CHAKRABORTY, B.; NATH, A.; SAIKIA, H.; SENGUPTA, M. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 7, n. S1, p. S435–S441, 1 Sep. 2014.

DHIMAN, R.; AGGARWAL, N.; ANEJA, K. R.; KAUR, M. In Vitro Antimicrobial Activity of Spices and Medicinal Herbs against Selected Microbes Associated with Juices. **International Journal of Microbiology**, vol. 2016, 2016.

ESSIEN, E.; NEWBY, J.; WALKER, T.; SETZER, W.; EKUNDAYO, O. Chemotaxonomic Characterization and in-Vitro Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Leaf Essential Oil of *Curcuma longa* Grown in Southern Nigeria. **Medicines**, vol. 2, n. 4, p. 340–349, 2015.

FREIRE, J. C. P.; JÚNIOR, J. K. D. O.; SILVA, D. D. F.; SOUSA, J. P. De; GUERRA, F. Q. S.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2017, 2017.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, vol. 20, n. 4, p. 7329–58, 22 Apr. 2015.

HASSAN, W.; GUL, S.; REHMAN, S.; KANWAL, F.; AFRIDI, M. S.; FAZAL, H.; SHAH, Z.; RAHMAN, A.; DA ROCHA, J. B. T. Gas chromatography coupled with mass spectrometric characterization of *Curcuma longa*: Protection against pathogenic microbes and lipid peroxidation in rat's tissue homogenate. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, vol. 29, n. 2, p. 615–21, Mar. 2016.

KAMAZERI, T. S. A. T.; SAMAH, O. A.; TAHER, M.; SUSANTI, D.; QARALLEH, H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 5, n. 3, p. 202–209, Mar. 2012.

MURUGESH, J.; ANNIGERI, R.; MANGALA, G.; MYTHILY, Ph.; CHANDRAKALA, J. Evaluation of the antifungal efficacy of different concentrations of *Curcuma longa* on *Candida*

*albicans*: An in vitro study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, vol. 23, n. 2, p. 305, 2019.

PHANTHONG, P.; LOMARAT, P.; CHOMNAWANG, T.; BUNYAPRAPHATSARA, N. Antibacterial activity of essential oils and their active components from Thai spices against foodborne pathogens. **ScienceAsia**, vol. 39, p. 472–476, 2013.

TELES, A. M.; ROSA, T. D. D. S.; MOUCHREK, A. N.; ABREU-SILVA, A. L.; DA SILVA CALABRESE, K.; ALMEIDA-SOUZA, F. *Cinnamomum zeylanicum*, *origanum vulgare*, and *curcuma longa* essential oils: Chemical composition, antimicrobial and antileishmanial activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2019, 2019.

ZHANG, L.; YANG, Z.; CHEN, D.; HUANG, Z.; LI, Y.; LAN, X.; SU, P.; PAN, W.; ZHOU, W.; ZHENG, X.; DU, Z. Variation on Composition and Bioactivity of Essential Oils of Four Common *Curcuma* Herbs. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 14, n. 11, Nov. 2017.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM GRAVE PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA E O PAPEL DO PROFISSIONAL FARMACÊUTICO

Freitas<sup>1</sup>, L. M.; Sobrinho<sup>1</sup>, B.A. ; Lima<sup>1</sup>, L.R.C.; Brabo<sup>1</sup>, J.S.; Maia<sup>1</sup>, S.M.M.; Silva<sup>1</sup>, J.H.A.;  
Moreira<sup>1</sup>, W.F.P.; Almeida, M.G.C.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário do Estado do Pará, graduando(a) em Farmácia

<sup>2</sup>Centro Universitário do Estado do Pará, docente - Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário do Estado do Pará (LAC CESUPA)

<sup>3</sup>Universidade do estado do Pará, docente - UEPA

E-mail:liliamarquesfarm@gmail.com

**Resumo:** Para curar infecções bacterianas, os antibióticos são medicamentos eficazes e tem salvado milhões de vidas. Contudo, interferências humanas como o uso indiscriminado de antimicrobianos, têm acelerado e facilitado a ocorrência de mecanismos de resistência de microrganismos. A alta prevalência, a cada ano, das superbactérias pode estar relacionado a vários fatores. Nesse contexto, especialmente o farmacêutico que detém conhecimento sobre medicamentos, possui papel importante na execução de tarefas que visam prevenir, orientar e tratar infecções bacterianas. Este estudo teve como objetivos: Identificar as principais bactérias multirresistentes; pontuar os fatores contributivos para promoção da resistência bacteriana, avaliar qual o papel do farmacêutico dentro desse cenário e produzir um panfleto informativo ao público do LAC CESUPA e CEMEC CESUPA. Realizou-se busca de informações em artigos e sites oficiais como o portal da ANVISA e bibliotecas como a BVS e a SCIELO. Práticas realizadas pelos pacientes, ao fazer uso de antimicrobianos, assim como fatores ambientais possuem influência na aceleração da multirresistência bacteriana, principalmente o descarte incorreto de medicamentos e seu uso de forma irracional, exercendo pressão seletiva sobre cepas resistentes. Dentro da área hospitalar, o farmacêutico é um profissional qualificado técnico-cientificamente, presente em atividades técnico-gerenciais e técnico-assistenciais. Com o foco na promoção da saúde do paciente, através da produção e divulgação de materiais de impressos ou digitais, como o folheto aqui apresentado, monitoramento das prescrições, vigilância epidemiológica, atendimento na farmácia comunitária, pesquisa e

desenvolvimento, gerência hospitalar, são importantes papéis desempenhados pela categoria farmacêutica dentro desse contexto.

**Palavras-chave:** antibióticos, multirresistência, superbactérias, antimicrobianos, assistência farmacêutica

### 1. Introdução

A resistência bacteriana tem sido um grave problema de saúde, que vem evoluindo a passos largos no decorrer dos anos no Brasil e no mundo. É de suma importância que fique claro que a resistência bacteriana emerge um papel significativo na mortalidade de pacientes com infecções bacterianas (GROPPO, 2000). Segundo relatório da OMS (2019), as infecções resistentes tornar-se-ão a principal causa de mortes no mundo em 2050. Ou seja, é uma crise que ameaça o século em proporções globais.

Quando microrganismos adquirem resistência a várias classes de antimicrobianos, são referidos como “superbactérias”. Nessa ocasião, as bactérias estão protegidas dos efeitos antimicrobianos, e isso propicia uma multiplicação bacteriana que impede o tratamento e cura de doenças, principalmente em infecções nosocomiais (FRACAROLLI et al, 2017).

Para curar infecções bacterianas, os antibióticos são medicamentos eficazes e tem salvado milhões de vidas. Contudo, mesmo que a evolução seja natural dos seres-vivos, através da adaptação ao ambiente, interferências humanas como o uso indiscriminado de antimicrobianos, têm acelerado e facilitado a ocorrência de mecanismos de resistência de microrganismos (GROPPO, 2000).

A alta prevalência, a cada ano, das superbactérias pode estar relacionado a vários fatores como a má conduta na higienização das mãos, uso excessivo ou inadequado nos tratamentos farmacológicos com antimicrobianos, procedimentos e uso de dispositivos invasivos, idade avançada, hospitalização prolongada e presença de imunocomprometimento em internados em ambientes hospitalares. A disseminação intra-hospitalar de microrganismos resistentes a antimicrobianos ocorre principalmente de forma horizontal, tanto por via paciente- paciente como também via profissional de saúde- paciente (TEXEIRA, 2011). Logo, é de grande importância a abordagem deste tema dentro da saúde pública

Nesse contexto, profissionais de saúde, especialmente o farmacêutico que detém conhecimento sobre medicamentos, possuem papel importante na execução de tarefas que visem prevenir, orientar e tratar infecções resistentes. Dentre esses profissionais, há o farmacêutico.

Este estudo teve como objetivos: Identificar as principais bactérias multirresistentes; pontuar os fatores contributivos para promoção da resistência bacteriana, avaliar qual o papel do farmacêutico dentro desse cenário e produzir um panfleto informativo para disponibilizar ao público do Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário do Estado do Pará (LAC CESUPA) e o Centro de Especialidades Médicas do CESUPA (CEMEC CESUPA).

## 2. Metodologia

Como guia para a pesquisa, utilizamos a lista da Organização Mundial de Saúde de 2017 (OMS, 2017) sobre agentes patogênicos prioritários. Realizou-se busca de informações em artigos e sites oficiais como o portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e bibliotecas como a Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Scientific Electronic Library Online (SCIELO). Os artigos e matérias incluídas foram os que apresentaram abordagem dos conteúdos necessários como abordagem sobre a resistência bacteriana; antibioticoterapia e resistência; papel do farmacêutico no uso racional de antibióticos. Além disso, as informações foram condensadas para produção um folder informativo, com orientações

gerais do tema, para o público relatado, através do Microsoft Office Word.

## 3. Resultados e Discussão

Existem várias bactérias que são consideradas superbactérias, como: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter baumannii* e *Enterococcus faecalis*. Essas bactérias são as mais relatadas principalmente em ambiente hospitalar, pois vem desenvolvendo um alto poder de resistência a antibióticos (PAIVA, 2013).

Segundo a lista da OMS, as bactérias resistentes dividem-se em: prioridade 1 (crítica), prioridade 2 (alta) e prioridade 3 (média). entre as críticas estão incluídas a *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e enterobacterias, enquanto que as classificadas como prioridade alta estão os *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Neisseria gonorrhoeae* e entre as de prioridade média temos os *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. Além disso, através do Sistema Global de Vigilância Antimicrobiana da OMS (GLASS), as bactérias resistentes mais comumente relatadas pelo mundo nos mais diversos países foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguidas por *Salmonella* spp. (WHO, 2018).

A descoberta de medicamentos capazes de combater as infecções bacterianas representou um grande avanço para o tratamento das mesmas. Porém, o mau uso desses fármacos leva ao aparecimento de microrganismos resistentes, que se acumulam e disseminam-se, representando um sério risco para a população, por reduzirem as opções de fármacos efetivos para o tratamento de infecções, aumentando as complicações clínicas de pacientes (COSTA E JÚNIOR, 2017).

Práticas como o descumprimento das doses, do horário, do tempo de duração do tratamento, bem como o percentual elevado de prescrições desses fármacos, contribui para acelerar a resistência bacteriana, e essas informações são fundamentais para a equipe de saúde orientar a população sobre o uso racional desse medicamento (FEITOSA, 2006).



Além disso, o fator ambiental também consta como contributivo. Além do uso humano de antimicrobianos, de forma irracional, há o uso veterinário (animais domésticos, pecuária, piscicultura) e agrícola, de forma profilática e também irracional (REGITANO & LEAL, 2010; GOLL & FARIA, 2013). Ainda, o descarte de medicamentos de forma inadequada, em lixo comum e/ou pia, contamina rios e solos contribuindo para que o ambiente seja mais seletivo para estas bactérias, além de causarem impactos sobre ecossistemas vegetais e animais (REGITANO & LEAL, 2010).

Assim, é fundamental que os profissionais de saúde tenham conhecimento a respeito dos mecanismos e prevenção de resistência microbiana, para o melhor direcionamento de medidas preventivas. Considerando os diversos fatores e práticas que ocasionam a multirresistência bacteriana e que levam cada vez mais à falta de opção terapêutica, faz-se necessário a adoção de estratégias.

O planejamento, a organização e a execução de ações educativas em saúde, além de medidas preventivas e controladoras na disseminação de microrganismos resistentes, dependerá de fatores como: reconhecer as fontes de infecção; as vias de eliminação, como por exemplo secreções; as vias de transmissão, além de analisar condições ambientais, demográficas, socioeconômicas, e organização de políticas relacionadas à assistência médica prestada à sociedade. Também se deve considerar a vigilância e isolamento de pacientes com cepas resistentes; estratégias visando a diminuição de mutação e transferência genética (pela desinfecção adequada); uso correto de antimicrobianos para diminuir a pressão seletiva e frequente hábitos de higienização eficientes para evitar a disseminação (CAPOBIAGNO et al, 2011).

É importante também que os ambientes de serviços de saúde sejam devidamente limpos, e instrumentos de trabalho e material, esterilizado. O uso de produtos com componentes bactericidas, como sabonetes e detergentes, indevidamente utilizados, podem favorecer cepas resistentes (UNEP, 2019). Como também, são necessário alguns cuidados básicos, como o uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individuais) e adequados procedimentos de biossegurança. Todos

esses procedimentos citados, quando aplicados, colaboram para a diminuição da multirresistência bacteriana (GUEDES, 2014; ÁLVARES, 2014).

Dentro da área hospitalar, o farmacêutico é um profissional qualificado técnico-cientificamente, presente em atividades técnicas-gerenciais e técnico-assistenciais. Possui conhecimento para atuar na assistência clínica, orientando o paciente a respeito das medicações. Ademais, também é função desse profissional orientar sobre a importância da higienização das mãos de forma adequada e o uso de antissépticos corretamente, pois são medidas que interrompem a cadeia de transmissão de doenças. Também é qualificado para sugerir intervenção quando necessário, nas prescrições médicas, dentro da equipe multiprofissional. Já em gestão, pode atuar em Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) a fim de elaborar, implementar e avaliar Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) além de participar de políticas de Uso Racional de Antimicrobianos no âmbito hospitalar. Elaboração de protocolos e diretrizes de antibioticoterapia e prevenção de infecções hospitalares constam-se, também, como atividades gerenciais importantes (CAPOBIAGNO et al, 2011; REGINATO, 2015).

Outra saída para o problema, proporcionada pelo conhecimento farmacêutico, é no investimento em Pesquisa e Desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, segundo COSTA (2019) é um processo custoso e que necessita de compostos com alta qualidade, além de depender da relação entre lucratividade e custos.

Deste Modo, elaborou-se um panfleto informativo para alertar os cuidados básicos que podem ser tomados pela população e orientações sobre superbactérias.

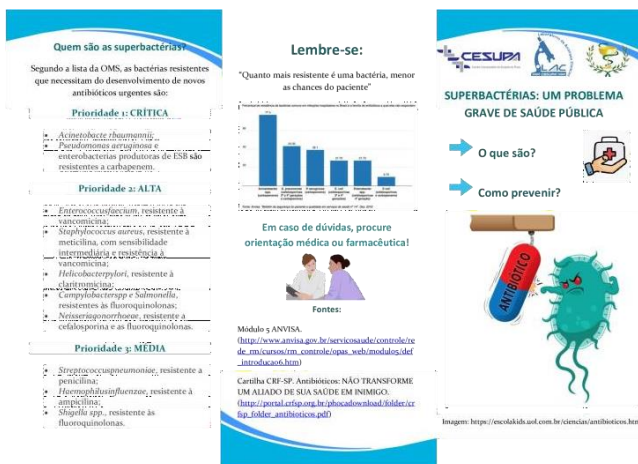


Figura 1: Frente do panfleto

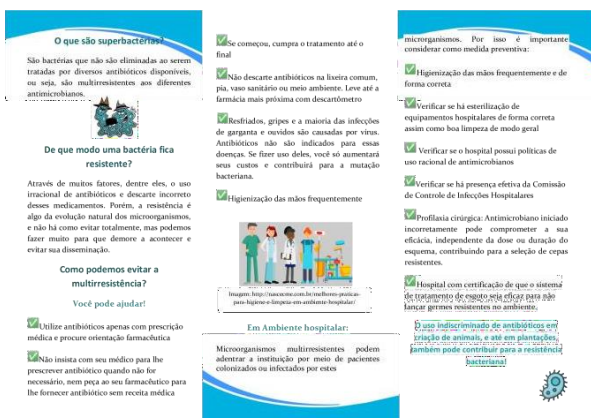


Figura 2: Verso do panfleto

#### 4. Conclusões

É fundamental que os profissionais de saúde tenham conhecimento a respeito dos mecanismos de resistência microbiana e seus impactos na saúde pública, para o melhor direcionamento de medidas preventivas. Dessa forma, é indispensável a interação de todos os profissionais de saúde, para que as ações de prevenção e controle possuam maior efetividade.

Destaca-se entre eles o papel do farmacêutico, em realizar medidas educativas à sociedade, como também na gerência da farmácia, na área clínica e na equipe multiprofissional. Com o foco na promoção da saúde do paciente, a produção e divulgação de materiais de impressos ou digitais, como o folheto aqui apresentado, monitoramento das prescrições, vigilância epidemiológica, atendimento na farmácia comunitária, pesquisa e desenvolvimento, gerência hospitalar, são

importantes papéis desempenhados pela categoria farmacêutica dentro desse contexto.

#### 5. Apoio Financeiro

Centro Universitário do Estado do Pará – CESUPA

#### 6. Referências

CAPOBIAGNO, J.D.; CARRILHO, C.M.D.M.; GARCIA, J.C.P.; TANITA, M.T.; CARNEIRO, M.; BELEI, R.A. **Antibioticoterapia e prevenção de infecções hospitalares. Protocolos e diretrizes.** Unimed Londrina, 2011. Disponível em: <[http://www.unimedlondrina.com.br/combateih/fil/es/antibioticoterapia\\_combateih.pdf](http://www.unimedlondrina.com.br/combateih/fil/es/antibioticoterapia_combateih.pdf)>. Acesso em: 12/10/2020

COSTA, A.L.P.; JÚNIOR, A.C.S.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

FEITOSA, F. P. J. **O papel do farmacêutico no controle do uso racional de antibióticos.** 2006. Monografia (Especialização) - Escola de Saúde Pública do Ceará, Crato, 2006

FRACAROLLI, I.F.L.; OLIVEIRA, S.A.; MARZIALE, M.H.P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. **Acta Paul Enferm.** v. 30, n. 6, p. 651-657, 2017.

GOLL, A.S.; FARIA, M.G.I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** V.5,n.1.,pp.69-72. 2013.

GROPPO, F.C.; FIOL, F.S.D. Resistência Bacteriana. **Rev Bras Med.** JANUARY 2000. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/257645108\\_Resistencia\\_Bacteriana](https://www.researchgate.net/publication/257645108_Resistencia_Bacteriana)>. Acessado em: 20 abr. de 2020.

GUEDES, R.A.C.; ÁLVARES, A.C.M. **O uso racional de antimicrobianos como prevenção da resistência bacteriana**, 2014. Disponível em: <<http://www.senaaires.com.br/Biblioteca/tcfacesa/arm2014/O%20USO%20RACIONAL%20DE%20ANTIMICROBIANOS%20COMO%20PREVEN%20C3%87%20C3%83O%20DA%20RESIST%20C3%84NCIA%20BACTERIANA.pdf>>. Acessado em: 10 de out. 2020.

MEIRELES, M.A.O.M. **Uso de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana: Aspectos Socioeconômicos e Comportamentais e seu Impacto Clínico e Ecológico**. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. 2017. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812)> Acessado em: 15 de mar. de 2020.

PAIVA, C.L.; ZANI, L.B.; DUARTE, I.D.; SILVA, M.A.J. **USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS E SUPERBACTÉRIAS KPC: TEMA CTS CONTROVERSO NO ENSINO DE BIOLOGIA**. *Revista Eletrônica Debates em Educação Científica e Tecnológica*. v. 3, n. 1, p. 32-40, 2013.

REGINATO, F;G. **O uso de antibióticos e o papel do farmacêutico no combate à resistência bacteriana**. Monografia (especialização) Santa Maria, RS, Brasil. 2015.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira**. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 601-616, jun. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000300002&lng=pt&nrm=iso)

[06832010000300002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000300002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 12 out. 2020.

TEIXEIRA, J.O.G. **Infecção da corrente sanguínea causada por Pseudomonas aeruginosa, Resistente aos carbapenêmicos: Fatores associados a Mortalidade e influência da terapia combinada, com polimixina B e imipênem**. Tese de mestrado apresentada à universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina, para obtenção de Título de Mestre em Ciências. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/9742/Publico-12766.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 07 de abr. de 2020.

UNEP – United Nations Environment Programme. **Relatório da ONU pede ação urgente para enfrentar poluição por substâncias químicas**. Notícia. Março, 2019. Disponível em: <<https://www.unenvironment.org/pt-br/noticias-e-reportagens/press-release/relatorio-da-onu-pede-acao-urgente-para-enfrentar-poluicao-por>> Acesso em: 12 de out. de 2020.

WHO - World Health Organization. **High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows**. Release, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>>. Acesso em: 20 de abr. de 2020.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## METABÓLITOS DE TRIPTOFANO MODULAM A VIRULÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* E INTERFEREM NO PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA EM UM MODELO MURINO

Igídio, C. E. D.<sup>1,2</sup>; Brito, C. B.<sup>1</sup>; Oliveira, S. N.<sup>1,2</sup>; Souza, D. G.<sup>1</sup> e Fagundes, C.T.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/ Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

E-mail: carloseduardobiomed@gmail.com

**Resumo:** A microbiota indígena exerce papel protetor contra patógenos, seja pela competição por nicho e nutrientes ou produção de substâncias antibacterianas. O triptofano, por exemplo, é metabolizado pela microbiota e produz metabólitos capazes de modular a virulência em bactérias oportunistas. Nesse sentido, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito de metabólitos de triptofano sobre a virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. A linhagem PAO1 foi inoculada em meios de cultura contendo os metabólitos Indol, Indol-3-acético (IAce), Indol-3-acrílico (IAcr) e Indol-3-propiónico (IPro) na concentração de 100 µM e mantida por 24h a 37 °C. A partir disso, o biofilme foi quantificado pelo método de cristal violeta. Os padrões de motilidade foram avaliados por inoculação em meios de cultura específicos e o halo de motilidade medido em milímetros. A produção de pioverdina foi avaliada a partir da inoculação da bactéria em meios de cultura que estimulam a produção do pigmento. Além disso, camundongos C57/BL6 foram infectados intranasalmente com 10<sup>7</sup> UFC de *P. aeruginosa* crescida ou não na presença dos metabólitos. Os camundongos infectados foram avaliados quanto a perda de peso e letalidade. Observou-se que o indol, IAce e IAcr foram capazes de aumentar a formação de biofilme por *P. aeruginosa*. Por outro lado, todos os metabólitos testados reduziram a motilidade. Além disso, IAce e IAcr também diminuíram a produção de pioverdina. Associado a isso, camundongos infectados com *P. aeruginosa* crescida na presença

de IAce apresentaram maior percentual de sobrevivência. Os resultados apresentados sugerem que os metabólitos de triptofano modulam a virulência de *P. aeruginosa in vitro* e interferem na susceptibilidade de camundongos à infecção.

**Palavras-chave:** triptofano; virulência; microbiota indígena; indol; indol-3-acético.

### 1. Introdução

O triptofano (trp) é um aminoácido essencial derivado da dieta rica em carnes, peixes e ovos (KALUZNA *et al.*, 2017). Além do seu papel na síntese proteica, o triptofano e seus metabólitos estão associados a inúmeras funções fisiológicas, como a homeostase imunológica e a resposta inflamatória (LE FLOCH *et al.*, 2011). Como parte da relação mutualística microbiota-hospedeiro, as bactérias que compõem o intestino podem ser responsáveis pelo catabolismo da molécula de triptofano (ZHANG & DAVIES, 2016). A via de metabolização por microrganismos inclui a transformação do trp em várias moléculas, como o indol e seus derivados (AGUS *et al.*, 2018).

Muitos estudos mostram a influência do indol e outros derivados do triptofano na patogênese bacteriana (LEE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015). Segundo Lee e colaboradores, o indol é capaz de modular a produção de ramnolipídeos, piocianina e a motilidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Ademais, alguns autores relatam a diminuição da

expressão de hemolisinas e enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, bem como a inibição da fixação de *Candida albicans* a células epiteliais intestinais pela ação do indol (LEE, J. H.; WOOD; LEE, J., 2015; MELANDER *et al.*, 2014).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, não fermentadora pertencente à classe Gama-Proteobacteria (REZAIE *et al.*, 2018). Devido à sua versatilidade metabólica, *P. aeruginosa* é um microrganismo ubíquo, podendo crescer em diversos nichos ecológicos como solo, águas superficiais, esgoto e plantas (MALHOTRA *et al.*, 2019). A *P. aeruginosa* também apresenta caráter oportunista e está frequentemente relacionada às infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), principalmente em pacientes imunocomprometidos, fibrocísticos, vítimas de queimaduras e portadores de cateteres (AGNIHOTRI *et al.*, 2004). Tais características, associadas ao seu perfil de resistência a múltiplas drogas, fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluísse *P. aeruginosa* no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae*) (BHAGIRATH *et al.*, 2019). O acrônimo reúne os principais patógenos para os quais a descoberta de novos agentes antimicrobianos é premente (OMS, 2017).

*P. aeruginosa* apresenta uma série de fatores de virulência que auxiliam na patogênese da infecção bacteriana e no processo de escape às defesas do hospedeiro. O flagelo e as pili permitem os diferentes perfis de motilidade bacteriana (*swimming*, *swarming* e *twitching*) que, associado à produção de exopolissacarídeos, contribuem para o processo de formação de biofilme. O biofilme de *P. aeruginosa*, formado por agregações celulares e coberto por substâncias poliméricas extracelulares (EPSs), confere proteção contra fagócitos, espécies reativas de oxigênio e antimicrobianos, além de permitir a troca de nutrientes entre as espécies que o compõem (MORADALI *et al.*, 2017). Além disso, *P. aeruginosa* produz os pigmentos piocianina e pioverdina, dependentes de *quorum* e secretados pelo sistema de secreção do tipo 2, que conferem a coloração azul-esverdeado às suas colônias (JIMENEZ *et al.*, 2012). Piocianina estimula a

produção de espécies reativas de oxigênio contribuindo para um estado de estresse oxidativo, enquanto que a pioverdina atua como sideróforo (HALL *et al.*, 2016).

Em conjunto, os fatores de virulência de *P. aeruginosa* contribuem para o estabelecimento de infecções e a progressão para uma infecção crônica. Logo, compreender esses mecanismos e identificar moléculas com atividade anti-virulência são passos importantes para o desenvolvimento de novas terapias para infecções por esse importante patógeno humano.

## 2. Metodologias

### 2.1 Biofilme

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme, bactérias crescidas em caldo LB foram diluídas a uma densidade óptica a 600 nm de 0,1 e incubadas em placas de 24 poços de poliestireno na presença dos metabólitos de triptofano à 100 µM durante 24 h. Após incubação, a placa foi submetida a lavagem com PBS 1X e posterior fixação com metanol. Em seguida, uma solução de cristal violeta a 0,5% p/v foi adicionada à placa durante 10 minutos. O excesso de corante foi removido com água destilada estéril. Em seguida, uma solução de etanol-acetona foi adicionada aos poços. Por fim, o conteúdo dos poços foi transferido em triplicata para placas de 96 poços de fundo chato e a absorbância foi medida a 620 nm para quantificação da massa total do biofilme.

### 2.2 Motilidade

Para a avaliação do papel dos metabólitos na modulação dos padrões de motilidade *swimming*, *swarming* e *twitching*, os metabólitos foram dissolvidos em dimetilformamida (DMF) e adicionados ao ágar de motilidade específico para cada padrão de motilidade. A solução bacteriana foi inoculada no centro da placa de Petri a uma densidade óptica a 600 nm de 1. A leitura do ensaio foi realizada através da medida do halo formado após 12h de incubação a 37 °C em aerobiose.

### 2.3 Pioverdina

Para a quantificação de pioverdina a bactéria foi crescida em 5 mL de caldo peptonado suplementado



com  $K_2PO_4$  e  $MgSO_4$  1M a 37°C. Após 24h, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante coletado para determinação da absorbância usando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 404 nm.

#### 2.4 Letalidade

Para determinação do percentual de sobrevivência, camundongos selvagens C57/BL6, fêmeas de 8 semanas, foram infectados de forma intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 crescida na presença dos metabólitos indol, IAce, IAcr e IPro. Os camundongos foram acompanhados durante 4 dias pós infecção para avaliação do peso e taxa de letalidade. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo CEUA/UFMG, número 02/2019.

#### 2.5 Análise estatística

As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste de Newman-Keuls. O teste estatístico usado para a determinação da curva de letalidade foi o Log-rank. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

### 3. Resultados e Discussão

Os metabólitos indol, IAce e IAcr foram capazes de aumentar de forma significativa a formação de biofilme por *P. aeruginosa* (tabela 1). De acordo com Lee e colaboradores, o indol age sobre o consumo de antranilato, molécula precursora da síntese de PQS (*Pseudomonas quinolone signal*), que regula negativamente a formação de biofilme por essa bactéria.

Por outro lado, os metabólitos reduziram os diferentes perfis de motilidade bacteriana (Tabela 1). As motilidades do tipo *swimming* e *swarming* são mediadas pelo flagelo, enquanto que a *twitching* é dependente do pili bacteriano. Além disso, essas estruturas estão envolvidas na adesão e formação de biofilme, o que sugere que esses metabólitos também possam interferir nesses processos.

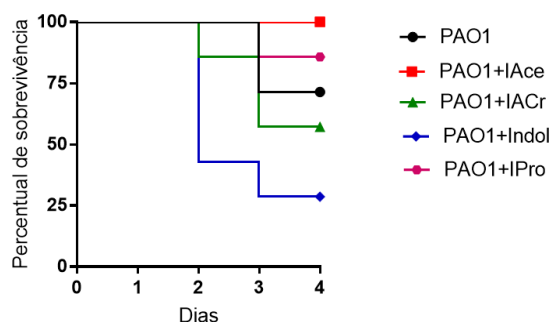
A adição dos metabólitos indol, IAce e IAcr ao meio de cultura provocou a redução de pioverdina por *P. aeruginosa* em relação ao grupo que recebeu apenas o veículo (Tabela 1). Os pigmentos pioverdina e piocianina são fatores de patogenicidade de *P. aeruginosa* dependentes de *quorum sensing*. Segundo Lee e colaboradores, o indol inativa o operon MexGHI-OpmD e, conseqüentemente, reduz a produção de ramnolipídeos, piocianina, pioverdina, diminui a motilidade do tipo *swarming* e atenua a virulência via PQS.

**Tabela 1:** Formação de biofilme, padrões de motilidade e produção de pioverdina por *P. aeruginosa* na presença de diferentes metabólitos de triptofano.

	Biofilme (DO 600)	Swimming (mm)	Swarming (mm)	Twitching (mm)	Pioverdina (DO 404)
DMF	0,16 ± 0,02*	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	0,05 ± 0,001*
PAO1 + DMF	2,27 ± 0,19	47,67 ± 2,52	46,00 ± 1,73	15,67 ± 0,58	0,24 ± 0,014
PAO1 + Indol	6,93 ± 0,42*	19,33 ± 1,15*	35,00 ± 1,00*	6,67 ± 0,58*	0,21 ± 0,012*
PAO1 + IAce	3,62 ± 0,33*	26,33 ± 2,08*	34,67 ± 1,53*	13,33 ± 0,58*	0,15 ± 0,001*
PAO1 + IAcr	3,35 ± 0,52*	27,33 ± 2,89*	36,00 ± 1,73*	6,33 ± 0,58*	0,19 ± 0,006*
PAO1 + IPro	1,33 ± 0,09*	25,67 ± 1,15*	20,67 ± 0,58*	11,33 ± 0,58*	0,24 ± 0,018

Dados expressos em média ± erro. \*Os dados apresentam diferença significativa quando comparados com o controle positivo (PAO1+DMF); DMF= Dimetilformamida; DO= Densidade óptica; mm= milímetros.

Os camundongos que foram infectados com a PAO1 crescida na presença do metabólito IAce apresentaram maior percentual de sobrevivência após 4 dias de infecção (100%). Por outro lado, os camundongos que receberam a bactéria crescida em meio de cultura suplementado com indol, apresentou menor taxa de sobrevivência (Figura 1). O perfil de letalidade acompanhou a perda de peso, visto que os grupos PAO1+IAce e PAO1+IPro voltam a ganhar peso a partir do segundo dia pós infecção, enquanto que o grupo PAO1+Indol estende a perda de peso até o quarto dia de infecção, atingindo uma redução de 30% em relação ao peso corporal inicial.



**Figura 1:** Percentual de sobrevivência de camundongos infectados com PAO1 crescida ou não na presença de diferentes metabólitos de triptofano.

De acordo com Shen e colaboradores o ácido indol-3-acético (IAce) está envolvido na regulação negativa do sistema de secreção do tipo 3 (TSS3) em *P. aeruginosa*. O TSS3 apresenta-se como um apêndice em forma de agulha responsável por transferir proteínas efetoras da bactéria diretamente para as células do hospedeiro. O efeito do IAce sobre a expressão gênica do TSS3 e na produção de pioverdina pode estar associado à menor letalidade dos camundongos infectados com a bactéria exposta a esse metabólito.

#### 4. Conclusões

Juntos, esses resultados indicam que os metabólitos de triptofano interferem na patogenicidade por *P. aeruginosa*. O IAce reduziu a produção de pioverdina e evitou a morte de camundongos infectados.

#### 5. Apoio Financeiro

CAPES

#### 6. Referências

AGNIHOTRI, N.; GUPTA, V.; JOSHI, R.M.;

Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms- a five-year study. **Burns**, v. 30 n. 3, p. 241-243, 2004.

AGUS, A.; PLANCHAIS, J.; SOKOL, H.; Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. **Cell Host Microbe**, v. 23, n. 6, p. 716-724, 2018.

BHAGIRATH, A.Y.; LI, Y.; PATIDAR, R.; *et al.*; Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1781, 2019.

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W.; *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

HALL, S.; Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236, 2016.

JIMENEZ, P.D.; *et al.*; The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.

KALUŻNA-CZAPLIŃSKA, J.; GAŤAREK, P.; CHIRUMBOLO, S.; *et al.*; How Important Is Tryptophan in Human Health? **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 1, p. 72-88, 2019.

KIM, J.; PARK, W.; Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 421-428, 2015.

LE, FLOCH N; OTTEN, W.; MERLOT, E.; Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1195-1205, 2011.

LEE, J.; ATTLA, C.; CIRILLO S.L.G.; *et al.*; Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 75-90, 2009.

MALHOTRA, S.; DON HAYES J.R.; WOZNIAK, D.J.; Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: The Host-Microbe Interface. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, 2019.



MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.;  
*Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for  
Adaptation, Survival, and Persistence.  
**Frontiers in cellular and infection microbiology**,  
v. 7, p. 39, 2017.

SHEN, D.K.; FILOPON, D.; *et al.* High-cell-  
density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa*  
type III secretion system: implications for  
tryptophan catabolites. **Microbiology**, v. 154, n. 8,  
p. 2195-2208, 2008.

WHO publishes list of bacteria for which new  
antibiotics are urgently needed. **World Health  
Organization**. Disponível em:  
<[https://www.who.int/news-room/detail/27-02-  
2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-  
new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)> Acesso em:  
09 outubro 2020.

ZHANG, D.; FRENETTE, P.S.; Cross talk  
between neutrophils and the microbiota. **Blood**, v.  
133, n. 20, p. 2168-2177, 2019.

---

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## EFEITO IMUNOMODULADOR DE *Akkermansia muciniphila* BAA-835 EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR

Miranda<sup>1</sup>, V. C.; Assis<sup>2</sup>, H. C.; Souza<sup>1</sup>, R. O.; Quintanilha<sup>1</sup>, M. F.; Gallotti<sup>1</sup>, B.; Nicoli<sup>1</sup>, J. R., Faria<sup>2</sup>, A. M. C., Cara<sup>3</sup>, D. C., Martins<sup>1</sup>, F. S.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia

<sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia

E-mail: viviancorreiamiranda@gmail.com

**Resumo:** A alergia alimentar vem causando preocupações devido as suas escassas formas de tratamento. Uma das estratégias que vem sendo investigada é o uso de probióticos, tendo em vista seu papel imunomodulador. Desse modo, esse trabalho visa avaliar o efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* em um modelo murino de alergia alimentar, avaliando parâmetros clínicos e imunológicos. Camundongos Balb/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) (dia 0). Após 14 dias eles receberam uma segunda imunização. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante com salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. A partir do dia 18, os camundongos receberam uma dose oral diária de  $1 \times 10^9$  UFC de *A. muciniphila* até o fim do experimento (dia 28). O grupo controle recebeu apenas salina. No dia 21 os camundongos foram desafiados com uma dieta contendo OVA. No dia 28 os camundongos foram sacrificados. Durante todo o experimento a perda de peso foi avaliada diariamente. Para os parâmetros imunológicos, foram avaliados IgE e IgG anti-OVA, as enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) (para avaliar indiretamente o infiltrado eosinofílico e neutrofílico, respectivamente), as quimiocinas Eotaxina-1 e CXCL1/KC e as citocinas IL4, IL6, IL9, IL13 e TNF. A administração oral de *A. muciniphila* proporcionou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da perda de peso. Além disso, *A. muciniphila* promoveu redução significativa de todos os parâmetros imunológicos pró-inflamatórios investigados. Sendo assim, *A. muciniphila* apresenta um efeito imunomodulador que atenua os sinais de inflamação no modelo murino de alergia alimentar.

**Palavras-chave** Alergia alimentar; probiótico; *Akkermansia muciniphila*.

### 1. Introdução

A alergia alimentar é desencadeada quando há a ativação exacerbada do sistema imune por proteínas presentes em alimentos como ovo, frutos do mar, leite e amendoim (Yu et al., 2016).

As reações alimentares alérgicas são basicamente classificadas em reações mediadas por IgE, não mediadas por IgE e as mistas. As reações mediadas por IgE, que são o foco do presente trabalho, ocorrem quando um indivíduo previamente exposto ao alérgeno sofre uma segunda exposição, acarretando na degranulação mediada por IgE das células imune efectoras (Yu et al., 2016).

Em quadros de inflamação, os eosinófilos são recrutados em elevados níveis por quimiocinas, como a eotaxina-1. Uma vez recrutados, os eosinófilos podem promover danos teciduais, por meio da liberação de enzimas como EPO (Chu et al., 2014).

Além dos eosinófilos, é crescente o interesse por outras células que também têm sido relacionadas com o desenvolvimento das reações alérgicas, tais como os neutrófilos. Em processos alérgicos, essas células são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e promover a liberação de proteases, como MPO, que podem promover danos teciduais, intensificando o processo inflamatório (Żbikowska-Gotz et al., 2016).

Ademais, Munoz-Cano e colaboradores (2016) sugerem que a imunoglobulina do tipo G (IgG) também está envolvida nos processos alérgicos por meio da formação de imunocomplexos com os alérgenos, que são capazes de ativar os receptores FcγRs, tais receptores estão envolvidos no desencadeamento da anafilaxia.

Os mecanismos descritos anteriormente promovem o desenvolvimento dos sintomas

característicos das reações alérgicas (Faria et al., 2013).

O tratamento da alergia alimentar consiste na remoção do alimento causador desta desordem da dieta. Em casos de contato acidental, administra-se epinefrina, evidenciando a necessidade de novas investigações para o tratamento desta condição patológica (Waserman et al., 2018). Neste sentido, uma das estratégias que vem sendo estudadas para o tratamento da alergia alimentar é o uso de probióticos (Kim et al., 2005).

Por definição, probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades suficientes conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os probióticos podem atuar nos processos alérgicos por meio de inúmeros mecanismos. Dentre eles tem-se a restauração do equilíbrio entre as repostas do tipo Th1/Th2 e ativação das células T regulatórias (Treg). Além disso, eles podem auxiliar na redução dos níveis de IgE alérgico específica. Dentre os microrganismos mais comumente empregados como probióticos têm-se espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Kim et al., 2005). Porém é crescente o interesse por novos microrganismos que possuam efeitos probióticos, como, por exemplo, a bactéria *A. muciniphila*, que vem sendo estudada como microrganismo benéfico de nova geração (Cani et al., 2017).

*Akkermansia muciniphila* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia obrigatória, pertencente ao filo Verrucomicrobia. Ela foi primeiramente isolada por Derrien e colaboradores (2004) a partir de amostras fecais de indivíduos saudáveis (Cani et al., 2017).

Os mecanismos de ação que envolvem os efeitos benéficos de *A. muciniphila* estão sendo amplamente estudados, dentre eles tem-se que a bactéria é capaz de promover a imunomodulação, o aumento de células Treg, estimular a produção de peptídeos antimicrobianos, além de regular a integridade da barreira intestinal (Derrien et al., 2017). Tais mecanismos são essenciais para o estabelecimento da tolerância oral, que geralmente está comprometida nos processos de alergia alimentar. Sendo assim, *A. muciniphila* apresenta características interessantes que a tornam um potencial candidato para o tratamento da alergia alimentar.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial probiótico de *A. muciniphila*

BAA-835 em modelo murino de alergia alimentar a ovalbumina.

## 2. Metodologias

### 2.1 Microrganismo

*Akkermansia muciniphila* foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e preservada em glicerol 20% à -80°C. Sua reativação foi procedida em caldo BHI suplementado com hemina (0,1%), menadiona (0,1%), extrato de levedura (5 g/L), L-cisteína (0,5 g/L) e mucina (0,1%), por 48 horas a 37°C, em jarra anaeróbica, utilizando o kit comercial ANAEROBAC® (PROBAC DO BRASIL) como sistema de geração de atmosfera anaeróbica. A bactéria foi concentrada até a obtenção de 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

### 2.2 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas foram utilizados. Os camundongos foram alimentados com uma dieta modificada baseada na dieta AIN-93G (Reeves et al., 1993). A dieta e água foram administradas *ad libitum*. Os camundongos foram alocados em microisoladores (Alesco®, Monte Mor, SP, Brasil) com luz, umidade (60-80%) e temperatura (22±1°C) controladas. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os padrões estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Disponível em <http://www.mctic.gov.br/concea>). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, protocolo # 110/2019).

### 2.3 Tratamento probiótico e indução da alergia Alimentar

Os camundongos foram sensibilizados por injeção subcutânea de 0,2 mL de salina contendo 10 µg de Ovalbumina (OVA) (albumina, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co. St Louis, MO, USA) adsorvida em hidróxido de alumínio (Dia 0) e receberam um reforço 14 dias depois, enquanto o grupo controle recebeu apenas o adjuvante com salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. No dia 18, os camundongos receberam diariamente por gavagem intragástrica 0,1 mL contendo A.

*muciniphila* até o fim do experimento (dia 28). A partir do dia 21 até o fim do experimento os camundongos foram desafiados com uma ração baseada na dieta AING93 (Reeves et al., 1993) contendo 20% de ovalbumina, oferecida *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6 animais por grupo): Controle (não sensibilizado e não tratado); Akk (tratado com  $9.0 \log_{10}$  UFC de *A. muciniphila*); OVA (Sensibilizado com OVA); OVA + Akk (Sensibilizado com OVA e tratado com  $9.0 \log_{10}$  UFC de *A. muciniphila*).

#### 2.4 Análises clínicas

O desenvolvimento ponderal foi determinado diariamente, desde o dia 0 até o dia 28, sempre no mesmo horário. Os resultados do último dia (Dia 28) foram expressos em porcentagem utilizando o peso dos animais do dia 0 como 100%.

#### 2.5 Avaliação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA no soro

A avaliação das imunoglobulinas IgE e IgG1 anti-OVA foi realizada por ELISA, como previamente descrito por Miranda e colaboradores (2020). E os resultados foram expressos como densidade ótica (D. O) a 405 nm.

#### 2.6 Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase

A presença de eosinófilos e neutrófilos no jejuno proximal foi medida determinando a atividade das enzimas EPO, que é uma enzima presente exclusivamente nos grânulos dos eosinófilos, e MPO (enzima presente exclusivamente nos grânulos neutrofilos). Para isso foram utilizados 100 mg de tecido para cada enzima. A determinação da atividade da EPO e MPO foi realizada de acordo com o descrito por Miranda e colaboradores (2020). Os resultados foram expressos por densidade ótica a 492 nm e 450 nm, respectivamente.

#### 2.7 Avaliação dos níveis de quimiocinas e citocinas

Para avaliação das quimiocinas e citocinas foram utilizados o jejuno proximal. Para a dosagem foi realizado o ELISA, como previamente descrito por Miranda e colaboradores (2020). A concentração de quimiocinas e citocinas foi determinada utilizando anticorpos comerciais e seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### 2.8 Análise estatística

Para a análise estatística os resultados foram submetidos ao ANOVA, seguido do pós teste de Tukey usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados significantes se  $P < 0,05$ .

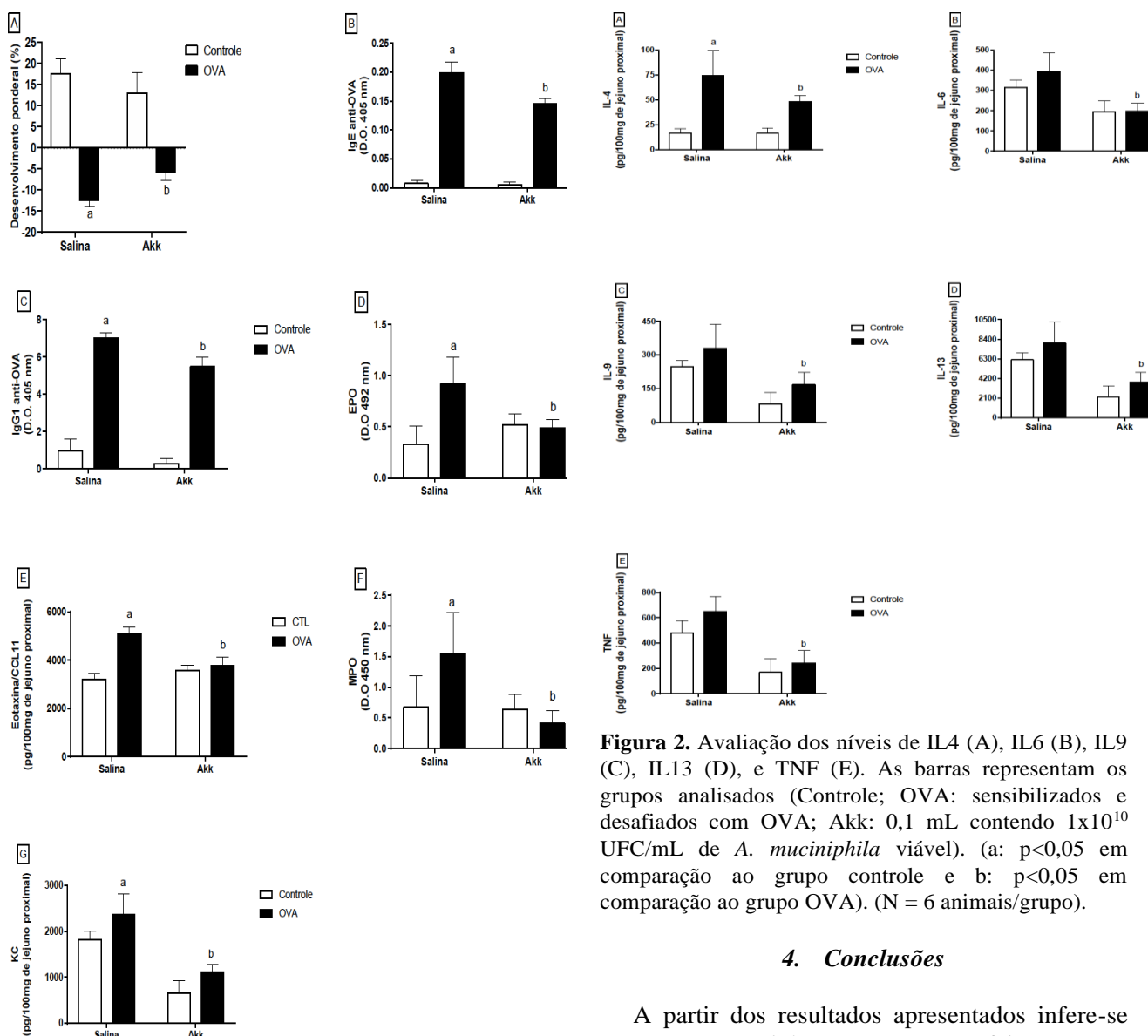
### 3. Resultados e Discussão

Nossos resultados mostram evidências concisas que o modelo investigado estava de acordo com a literatura, no qual os grupos sensibilizados apresentaram perda significativa de peso e níveis aumentados de IgE e IgG1 anti-OVA, EPO, MPO, Eotaxina-1, CXCL1/KC e das citocinas avaliadas quando comparadas ao grupo controle. Quando administrado *A. muciniphila* houve a atenuação significativa ( $p < 0,05$ ) de todos esses parâmetros investigados (Figuras 1 e 2).

A perda de peso pode ser explicada pelo aumento dos níveis de IL6, altos níveis de lipólise e diminuição do número de adipócitos. E ainda a perda de peso é consequência dos processos de aversão ao alimento, no qual o camundongo diminui seu consumo de ração devido a detecção de um estímulo prejudicial (Dourado et al., 2011).

IgE é essencial para o desenvolvimento das reações alérgicas mediadas por IgE, com a interação entre IgE, basófilos e mastócitos com consequente liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina. Além disso, em processos alérgicos a IgG1 também está envolvida por meio da interação com os alérgenos e produção de um imunocomplexo que pode auxiliar no desencadeamento da anafilaxia (Potaczek et al., 2017).

Em processos alérgicos os eosinófilos são recrutados e encontrados em maiores níveis no tecido inflamado e, uma vez ativos, liberam enzimas, como EPO e algumas citocinas e quimiocinas que podem intensificar os processos alérgicos (Hogan et al., 2009).



**Figura 1.** Avaliação do desenvolvimento ponderal (A); níveis de IgE (B) e IgG1 (C) anti-OVA; EPO (D); Eotaxina-1 (E); MPO (F) e KC (G). As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).

Tendo em vista que *A. muciniphila* foi capaz de atenuar todos esses fatores mencionados anteriormente (Figuras 1 e 2) tem-se que a bactéria possui um efeito imunomodulador regulando os sinais clínicos (amenizando a perda de peso), sistêmicos (IgE e IgG1 anti-OVA) e locais da alergia alimentar (níveis de eosinófilos, neutrófilos e citocinas pró- inflamatórias no tecido).

**Figura 2.** Avaliação dos níveis de IL4 (A), IL6 (B), IL9 (C), IL13 (D), e TNF (E). As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).

#### 4. Conclusões

A partir dos resultados apresentados infere-se que *A. muciniphila* apresenta um efeito protetor para o tratamento de alergia alimentar à ovalbumina. Tal efeito pode estar associado à capacidade da bactéria promover uma imunomodulação que reflete na melhora dos sinais clínicos da alergia.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq

#### 6. Referências

CANI, P. D., de VOS, W. M. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1765, 2017.

CHU, D.K., JIMENEZ-SAIZ, R., VERSCHOOR, C.P., WALKER, T.D., GONCHAROVA, S., LLOP-GUEVARA, A., SHEN, P., GORDON, M.E., BARRA, N.G., BASSETT, J.D. and KONG, J., 2014. Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, p. 1657-1672, 2014.

DERRIEN, M., BELZER, C., de VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 171-181, 2017.

DERRIEN, M., VAUGHAN, E. E., PLUGGE, C. M., de VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1469-1476, 2004.

DOURADO, L. P. A., NOVIELLO, M. D. L. M., ALVARENGA, D. M., MENEZES, Z., PEREZ, D. A., BATISTA, N. V., MENEZES, G. B., FERREIRA, A. V. M., SOUZA, D. G., CARA, D. C. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cellular Immunology**, v. 270, p. 198-206, 2011.

FAO/WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: World Health Organization, ON, **Canada: Food and Agriculture Organization**, 2002.

FARIA, A. M. C., GOMES-SANTOS, A. C., GONÇALVES, J. L., MOREIRA, T. G., MEDEIROS, S. R., DOURADO, L. P., CARA, D. C. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 102, 2013.

HOGAN, S.P. Functional role of eosinophils in gastrointestinal inflammation. **Immunology and**

**Allergy Clinics of North America**, v. 29, p. 129-140, 2009.

KIM, H., KWACK, K., KIM, D., JI, G. E. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 259–267, 2005.

MIRANDA, V.C., SANTOS, S.S., ASSIS, H.C., FARIA, A.M.C., QUINTANILHA, M.F., MORÃO, R.P., NICOLI, J.R., CARA, D.C., MARTINS, F.S. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine model of food allergy. **Beneficial Microbes**, v. 11, p. 255- 268.

MUNOZ-CANO, R., PICADO, C., VALERO, A., BARTRA, J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 26, p. 73-82, 2016.

POTACZEK, D. P., HARB, H., MICHEL, S., ALHAMWE, B. A., RENZ, H., TOST, J. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. **Epigenomics**, v. 9, p. 539-571, 2017.

REEVES, P., NIELSEN, F., FAHEY, G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

WASERMAN, S., BÉGIN, P., WATSON, W. IgE-mediated food allergy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, p. 55, 2018.

YU, W., FREELAND, D. M. H., NADEAU, K. C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 12, p. 751-765, 2016.

ŻBIKOWSKA-GOTZ, M., PALGAN, K., GAWROŃSKA-UKLEJA, E., KUZZMIŃSKI, A., PRZYBYSZEWSKI, M., SOCHA, E. and BARTUZI, Z. Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 29, p. 90-98, 2016.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ANÁLISE FUNCIONAL DO PANGENOMA DE *Acinetobacter baumannii*

Rodrigues<sup>1</sup>, D. L. N.; Morais-Rodrigues<sup>1</sup>, F.; Santos<sup>1</sup>, R. G.; Aburjaile<sup>1,2</sup>, F. F. e Azevedo<sup>1</sup>, V. A. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Genética Celular e Molecular.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pernambuco, Departamento de Genética.

E-mail: diego.neresr@gmail.com

**Resumo:** *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo aeróbio e um dos principais patógenos nosocomiais do mundo. Sua sobrevivência em locais incomuns tais como mecanismos de ventilação artificial, e a resistência à antimicrobianos tornaram essa bactéria um importante modelo para estudos de resistência e patogenicidade. Ao longo das últimas décadas, tem se tornado um dos principais patógenos responsáveis por casos graves de pneumonia e bacteremia. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar realizar a análise do pangenoma funcional de *A. baumannii*. Para isso foram avaliados os genomas completos e públicos de 206 linhagens da espécie através de ferramentas computacionais de pangenômica. Como principais resultados, observamos a presença de genes centrais relacionados ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e xenobióticos presentes em todas as linhagens. Em termos estatísticos, 1.373 genes foram compartilhados por todas as linhagens, 15.626 foram exclusivos de determinadas linhagens, e 10.683 foram identificados em mais de uma linhagem. Estes dados demonstram que o pangenoma da espécie ainda permanece aberto e que novos genomas precisam ser sequenciados e analisados. Deste modo, nosso trabalho abre perspectivas para a compreensão genômica e evolutiva da espécie *A. baumannii*.

**Palavras-chave** *Acinetobacter baumannii*; nosocomial; patógeno; pangenoma.

### 1. Introdução

*Acinetobacter baumannii* é uma das principais bactérias nosocomiais responsáveis por infecções graves, como pneumonia e bacteremia (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). *A. baumannii* apresenta-se em forma de um coco-bacilo Gram-negativo aeróbio não-fermentador e catalase-

positivo. É considerado o segundo patógeno nosocomial mais isolado do mundo em ambientes hospitalares (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016), sendo causador de quadros epidemiológicos em diversos países. É conhecido por ser também um dos principais agentes primários de pneumonia dentro de hospitais (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; PELEG; HOOPER, 2010).

Esse patógeno teve sua ascensão por volta da década de 70 e é atualmente uma das espécies microbianas que apresenta maior grau de multirresistência a drogas (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 1994; HOWARD et al., 2012). A resistência à antimicrobianos associada as capacidades de sobrevivência desta bactéria em aparelhos de ventilação artificial tornam o tratamento de infecções por *A. baumannii* um desafio de impacto global (SILVA, 2009; NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016).

Com o advento das ciências ômicas, novas alternativas para o estudo de microrganismos tornaram-se viáveis, uma vez que o custo por base sequenciada se declina a cada ano (MICHEEL et al., 2012). Neste momento, estudos genômicos ganharam o mercado, revolucionaram e auxiliaram, sobretudo, a condução de pesquisas voltadas à resistência e patogenicidade bacteriana (SETUBAL; ALMEIDA; WATTAM, 2018). Neste contexto, a pangenômica visa a análise de todo o repertório gênico de uma espécie ou grupo (GUIMARÃES et al., 2015; XIAO et al., 2015). Através dessa metodologia é possível uma melhor compreensão da evolução, plasticidade e adaptação dos microrganismos (MEDINI et al., 2005). Assim, este trabalho visa identificar o repertório genômico da espécie *A. baumannii*, com o intuito de compreender os genes implicados na resistência, adaptação e sobrevivência desta espécie.

### 2. Metodologias



## 2.1 Obtenção de dados e anotação genômica

Foram obtidos 206 genomas completos de *Acinetobacter baumannii* através do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007). Os arquivos disponíveis em formato fasta foram utilizados como *input* para ferramenta PROKKA (SEEMANN, 2014) para obtenção da anotação estrutural e padronização dos dados.

## 2.2 Análise pangenômica e funcional

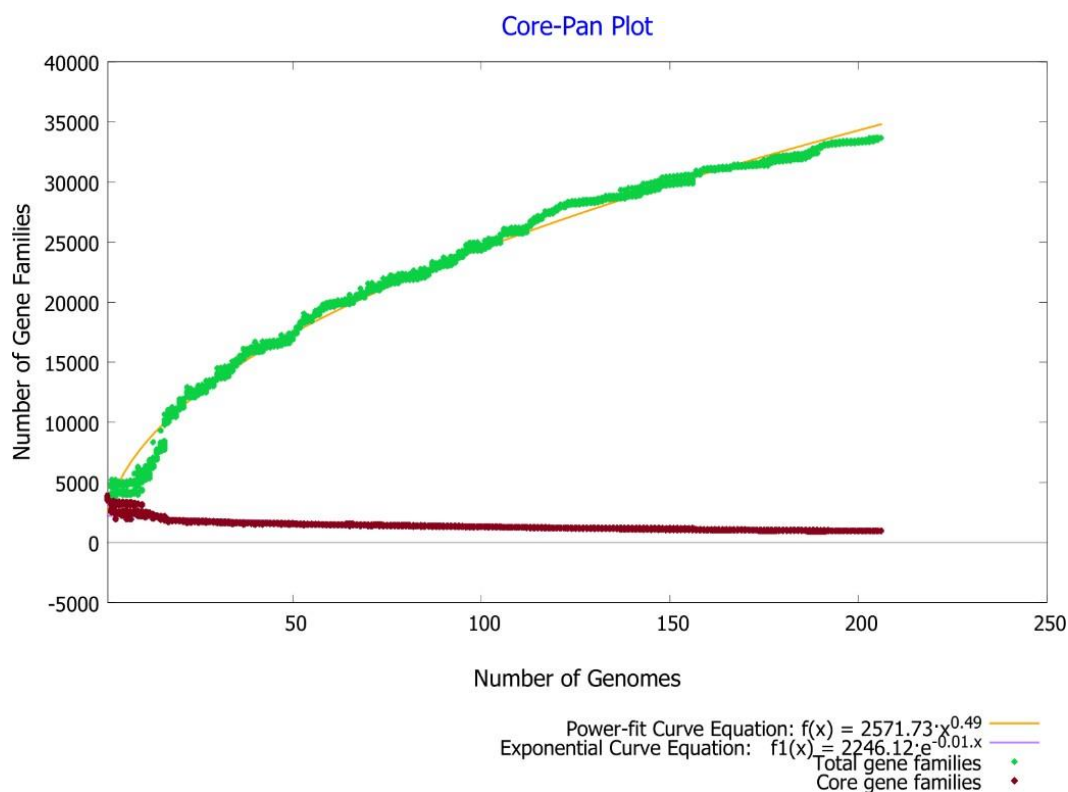
Para a análise pangenômica foi utilizado o software *Bacterial Pan Genome Analysis* (BPGA) (CHAUDHARI; GUPTA; DUTTA, 2016), com o parâmetro de ortologia de 95%. A caracterização funcional foi obtida com base no banco de dados da

Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (KANEHISA et al., 2017).

## 3. Resultados e Discussão

Em nossa análise foi possível observar que o perfil do pangenoma global de *A. baumannii*. Todas as linhagens em estudo compartilham 1.373 genes. Um total de 10.683 genes são linhagem-específica, bem como 15.626 genes constituem o chamado genoma acessório, ou seja, compartilhados por mais de uma das linhagens estudadas.

Na Figura 1 é possível visualizar a curva de desenvolvimento do pangenoma de *A. baumannii*. O valor obtido de  $\gamma = 0,49$ , o que indica que o pangenoma permanece aberto, ou seja, a medida que novos genomas são adicionados a análise, continua ocorrendo um crescimento de novos genes na análise global.



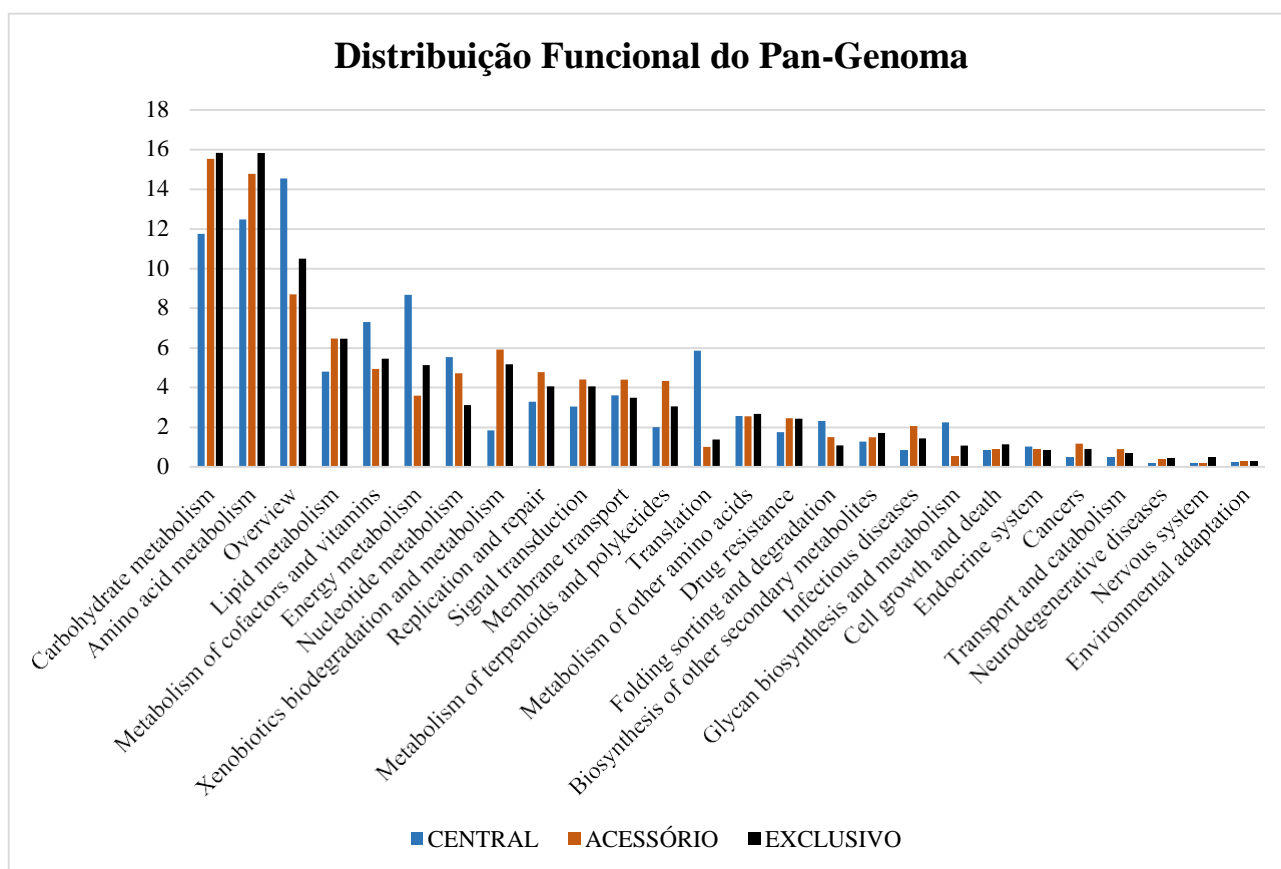
**Figura 1** - Curva de desenvolvimento do pangenoma de *Acinetobacter baumannii* considerando as 206 linhagens em estudo.

A Figura 2 apresenta a distribuição funcional dos genes dentro do pangenoma da espécie. É possível observar um elevado número de genes centrais relacionados as vias metabólicas intrínsecas e sobrevivência bacteriana, como metabolismo energético (8,68%) e tradução molecular (5,87%).

Os genes acessórios estão relacionados ao metabolismo de aminoácidos (14,78%), carboidratos (15,55%), e biodegradação e metabolismo de xenobióticos (5,93%). A maioria dos genes relacionados à resistência microbiana está presente no genoma acessório (2,45%) quando

comparado a representação desta categoria no genoma central (1,76%). Além disso, genes relacionados a infecções estão representados no

genoma central (0,80%), acessório (2,07%) e em genes específicos de linhagens bacterianas (1,44%).



**Figura 2** - Representação gráfica da distribuição funcional dos genes no pangenoma da espécie *Acinetobacter baumannii*. Os genes foram distribuídos em subgrupos sendo: genes centrais (presentes em todas as linhagens); genes acessórios (presentes em mais de uma linhagem); genes exclusivos (presentes em apenas uma das linhagens).

Na análise do pangenoma de *A. baumannii*, 1373 genes foram identificados como compartilhados por todas as linhagens. Biologicamente é tido que a porção central do pangenoma contém todos os genes essenciais para a sobrevivência da bactéria em um ambiente favorável. Nossos resultados indicaram genes relacionados a vias do metabolismo e divisão celular, processos genéticos e produção de energia (GUIMARÃES et al., 2015). Por outro lado, o genoma acessório possui genes relacionados a adaptação da espécie e, portanto, engloba genes implicados nos mecanismos de resistência e patogenicidade, os quais associam-se a plasticidade genômica da espécie (ROCHA, 2008; BLAUSTEIN et al., 2019). Em nosso estudo, o genoma acessório revelou um total de 26.309 genes que podem estar relacionados a adaptação ao hospedeiro e estão mais representados nas vias de metabolismo de carboidratos, aminoácidos,

xenobióticos e resistência a drogas (KLOTZ; STEINBRENNER, 2017). A prevalência específica destas vias, sugere que estas características conferem vantagens para a sobrevivência bacteriana no hospedeiro e/ou ambiente (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 1994; DOUGHARI et al., 2011).

#### 4. Conclusões

Nosso trabalho é o primeiro a representar o perfil global do pangenoma de 206 linhagens de *Acinetobacter baumannii*. Estes resultados podem auxiliar no direcionamento de possíveis condutas no ambiente clínico-hospitalar, bem como permitem uma melhor caracterização desta espécie.

#### 5. Apoio Financeiro

Este trabalho recebeu fomento das seguintes agências: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6. Agradecimentos

Agradecemos a Rede de Ciências Ômicas (RECOM) pela infraestrutura e apoio científico.

## 7. Referências

- BERGOGNE-BÉREZIN, E. Acinetobacter spp., saprophytic organisms of increasing pathogenic importance. **Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology**, v. 281, n. 4, p. 389–405, nov. 1994.
- BLAUSTEIN, R. A. et al. Pangenomic Approach To Understanding Microbial Adaptations within a Model Built Environment, the International Space Station, Relative to Human Hosts and Soil. **mSystems**, v. 4, n. 1, 8 jan. 2019.
- CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 13 abr. 2016.
- DOUGHARI, H. J. et al. The Ecology, Biology and Pathogenesis of Acinetobacter spp.: An Overview. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2011.
- GUIMARÃES, L. C. et al. Inside the Pan-genome - Methods and Software Overview. **Current Genomics**, v. 16, n. 4, p. 245–252, ago. 2015.
- HOWARD, A. et al. Acinetobacter baumannii - An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243–250, 1 maio 2012.
- KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 4 jan. 2017.
- KLOTZ, L.-O.; STEINBRENNER, H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. **Redox Biology**, v. 13, p. 646–654, 3 ago. 2017.
- MEDINI, D. et al. The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, Genomes and evolution. v. 15, n. 6, p. 589–594, 1 dez. 2005.
- MICHEEL, C. M. et al. **Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications**. [s.l.] National Academies Press (US), 2012.
- NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. Acinetobacter baumannii: biology and drug resistance — role of carbapenemases. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61–74, 2016.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital- Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 13 maio 2010.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, jul. 2008.
- PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database issue, p. D61–D65, jan. 2007.
- ROCHA, E. P. Evolutionary patterns in prokaryotic genomes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials/Genomics. v. 11, n. 5, p. 454–460, 1 out. 2008.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.
- SETUBAL, J. C.; ALMEIDA, N. F.; WATTAM, A. R. Comparative Genomics for Prokaryotes. In: SETUBAL, J. C.; STOYE, J.; STADLER, P. F. (Eds.). **Comparative Genomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2018. p. 55–78.
- SILVA, R. P. **A Importância do Acinetobacter baumannii na Infecção**. Dissertação de mestrado—Porto, Portugal: Universidade do Porto, 2009.
- XIAO, J. et al. A Brief Review of Software Tools for Pangenomics. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 73–76, 1 fev. 2015.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA BIOLIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE COBRE

Rodrigues<sup>1</sup>, H. F.; Júlio, A. D. L.; Silva, G. M. F. e Santos, V. L.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Aplicada

E-mail: hortencia280@hotmail.com

**Resumo:** A biolixiviação é um processo no qual se utiliza a ação microbiana para solubilizar elementos metálicos, como o cobre. Diversos microrganismos já foram isolados e identificados em ambientes ácidos de minas como potenciais agentes biolixivantes. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi o enriquecimento e identificação de dois importantes grupos de bactérias envolvidos na biolixiviação de minérios de cobre, oxidantes de ferro (BOF) e/ou oxidantes de enxofre (BOS). Para isso foram utilizadas diferentes amostras coletadas em ambientes ácidos de minas. As BOF foram enriquecidas em meio 9K-Fe e as BOS em meio 9K-S. Após 3 subcultivos as BOF foram isoladas em meio T&K-Fe e as BOS em meio T&K-S e meio sólido tiosulfato. Após essas etapas os microrganismos foram avaliados quanto a sua capacidade oxidativa de Fe e/ou S. Os resultados demonstraram que o pH se correlacionou negativamente com os íons  $Fe^{3+}$ , ORP e DO ( $p < 0,05$ ). Já os íons  $Fe^{3+}$  se correlacionaram positivamente com a ORP e a DO ( $p < 0,05$ ). Além disso, dentre os 20 isolados avaliados, 5 foram classificados como os melhores oxidantes de enxofre, devido aos resultados de pH próximos a 1 e as maiores DO, e 8 como os melhores oxidantes de ferro, por terem apresentado as maiores taxas de solubilização de Fe e valores de ORP. Conclui-se então que estes microrganismos são potenciais agentes solubilizadores de metais, podendo ser utilizados na montagem de um eficiente consórcio de biolixiviação de minério de cobre.

**Palavras-chave:** mineração; cobre; biolixiviação; bactérias; consórcio; minérios.

### 1. Introdução

O cobre é o terceiro metal mais produzido e

usado no mundo, o que se deve a um conjunto de propriedades únicas apresentadas por ele, permitindo sua aplicação em segmentos industriais diversos (DNPM, 2017). Este metal associado a diversos outros elementos químicos, forma uma vasta gama de minérios que podem ser classificados de acordo com a sua localização no depósito mineral (LUZ; LINS, 2010). O minério sulfetado de cobre é encontrado em regiões mais profundas dos depósitos e apresentam alto teor de cobre. Por outro lado, na zona de aeração, a presença de oxigênio e gás carbônico atmosféricos causam a oxidação total do minério sulfetado, havendo a formação dos minérios oxidados que apresentam baixos teores de cobre em sua composição (SILVA et al., 2019).

A fim de se extrair o cobre de minérios sulfetados e oxidados, de forma economicamente e ambientalmente amigável, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas, como é o caso da biolixiviação. A biolixiviação é um processo no qual ocorre a solubilização de metais através da ação microbiana (ARJUM et al., 2012). Mais de 40 espécies de microrganismos, incluindo bactérias, arqueas e fungos, já foram isoladas e identificadas em ambientes ácidos de minas e caracterizadas como agentes potenciais da dissolução de metais (MA et al., 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi o enriquecimento e identificação de dois importantes grupos de bactérias envolvidos na biolixiviação de minérios de cobre, oxidantes de ferro (BOF) e/ou oxidantes de enxofre (BOS), além da avaliação da atividade oxidativa desses isolados. A fim de selecioná-los para a formação futura de consórcios de microrganismos eficientes na biolixiviação de minérios de cobre.

### 2. Metodologias

## 2.1 Amostragem

Foi coletada uma amostra de Drenado Ácido de Mina (DAM) na Mina do Sossego, mina de cobre da VALE S.A. localizada em Carajás (PA). Além disso, amostras de escória rica, escória pobre, pó do filtro de manga do sistema de despoeiramento, minério de manganês sílico-carbonato, minério urucum, minério carajás e rondonita foram coletadas na Vale Manganês/Complexo Minas Gerais localizada em Ouro Preto (MG). Por fim, amostras de rocha e sedimento foram coletadas na antiga Mina de Piritita entre Ouro Preto e Mariana.

## 2.2 Enriquecimento e isolamento microbiano das amostras coletadas

Frascos *Erlenmeyer* de 125 ml com 100 ml de meios de culturas 9K-Fe (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959) ou 9K-S (GARCIA, 1989) e cerca de 10g das amostras sólidas foram usados para favorecer o crescimento das bactérias oxidantes de ferro e enxofre. Como o líquido se apresentava muito concentrado, 15 ml de solução de cada frasco foram centrifugados e os *pellets* ressuspensos em solução salina (0,85%) para serem inoculados em novos meios. A amostra de Drenado foi inicialmente filtrada em membrana 0.22 µm, a qual foi fracionada e inoculada em frascos *Erlenmeyer* com 100 ml dos meios 9K-Fe ou 9K-S. Todos os frascos foram incubados sob agitação de 130 rpm a 30°C. Um novo enriquecimento foi iniciado com 1g das amostras, a fim de possibilitar a melhor visualização das características indicativas de crescimento das bactérias. Todos os frascos foram mantidos incubados até que fosse observada a coloração vermelho-tijolo no meio 9K-Fe, indicando a presença das espécies oxidantes de ferro, ou até que o meio 9K-S apresentasse coloração acinzentada, turvação e  $\text{pH} \leq 1$ , indicando o crescimento bacteriano de espécies oxidantes de enxofre. Após essa primeira incubação, alíquotas dos frascos, nos quais observou-se crescimento, foram transferidas para novos meios estéreis com a mesma composição e incubados nas mesmas condições. Todo o procedimento foi repetido até serem totalizadas 3 passagens.

Para o isolamento das bactérias, sempre que se constatava crescimento dos microrganismos oxidantes de enxofre, alíquotas eram retiradas dos

cultivos de enriquecimento, diluídas até  $10^{-5}$  em solução salina (0,85%) e espalhadas com uma alça de Drigalsky nos meios T&K-S agarose (SANTANA, 2016) e meio sólido tiosulfato (GARCIA et al., 1992). Para os oxidantes de ferro as alíquotas eram plaqueadas no meio T&K-Fe agarose (GARCIA et al., 1992). Após o plaqueamento, os cultivos foram incubados em estufa B.O.D a 30°C até que se observasse o crescimento de colônias. Após isso, as colônias morfológicamente diferentes foram purificadas nos mesmos meios sólidos de crescimento. Os isolados foram mantidos em tubos inclinados contendo meio sólido tiosulfato (oxidantes de enxofre) e meio T&K-Fe agarose (oxidantes de ferro) a 4 °C e a -20 °C em criotubos contendo as culturas no mesmo meio líquido de crescimento acrescido de glicerol (20% v/v).

## 2.3 Avaliação da atividade oxidativa de ferro e enxofre dos isolados

Para avaliar o potencial de oxidação de Fe e/ou S dos isolados, primeiramente, foi realizado um repique das bactérias de interesse em 15 ml do respectivo meio líquido de isolamento. Após crescimento, alíquotas das culturas foram centrifugadas a 11000 rpm por 10 min em centrífuga MA 830 e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 5 ml de solução salina estéril (0,85%). Esse pré-inóculo foi ajustado e utilizado para padronização da concentração final de células nos frascos de teste, a qual correspondeu a uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,08 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). O inóculo padronizado foi adicionado a frascos de penicilina de 50 ml contendo 20 ml de meio 9K-Fe ou 9K-S, incubados a 30°C em 130 rpm. Os testes foram feitos em duplicata. Frascos sem adição de microrganismos foram utilizados como controle. O monitoramento foi realizado nos dias 0, 10 e 20 de incubação, nos quais foram retirados 1 ml dos frascos com meio 9K-S para avaliar a turbidez e pH, e dos frascos com meio 9K-Fe para monitorar turbidez, pH, potencial de oxirredução (ORP) e concentração de íons férricos.

## 2.4 Métodos analíticos

O pH e a ORP foram mensurados por meio do pHmetro Hanna-Mpa 210 com o auxílio de eletrodo combinado de vidro e eletrodo de Platina (contra



Ag<sup>o</sup>/AgCl). A turbidez foi mensurada em espectrofotômetro considerando a DO<sub>600nm</sub>. Já a concentração de íons férricos foi mensurada utilizando o método colorimétrico proposto por Karamanev (2002), modificando-se os volumes dos reagentes e amostras.

### 2.5 Análise estatística

Para estimar a correlação entre as variáveis analisadas, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r), utilizando o *software* SigmaPlot 14.0. Os isolados também foram agrupados em relação à capacidade de oxidação de Fe e S por Análises de Componentes Principais (ACPs), utilizando-se a matriz de correlação, através do *software* PAST versão 3.04.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Enriquecimento e isolamento microbiano das amostras coletadas

No total, foram obtidos 63 isolados, 34 oxidantes de enxofre e 29 oxidantes de ferro. Em relação aos morfotipos oxidantes de enxofre, a maior parte deles foram obtidos da amostra de silico-carbonato (13), seguindo das amostras de rondonita (7), escória pobre (5), DAM (5), escória rica (3) e sedimento (1). Já os morfotipos de oxidantes de ferro, de forma semelhante aos de enxofre, foram predominantemente isolados da amostra de silico-carbonato (15) e do DAM (10), seguindo das amostras de rondonita (1), escória rica (1), sedimento (1) e rocha clara (1). Como as demais não apresentaram características compatíveis ao crescimento dos microrganismos, foram descartadas.

Sendo assim, estas bactérias foram diferenciadas quanto as características macro e micromorfológicas. Observou-se que alguns dos isolados são bacilos, gram negativos, com coloração esbranquiçada (isolados de enxofre) ou alaranjada (isolados de ferro). Essas características são semelhantes às descritas para o gênero *Acidithiobacillus*, composto por bactérias quimioautolitotróficas acidófilas capazes promover a oxidação tanto de íon ferroso quanto de enxofre elementar (JOHNSON; HALLBERG, 2005). Para a confirmação desses resultados, a identificação

taxonômica dessas bactérias está sendo realizada por meio do sequenciamento das regiões V3 e V4 do gene que codifica o rRNA 16S, por meio da técnica de Sanger.

### 3.2 Avaliação da atividade oxidativa de ferro e enxofre dos isolados

A partir dos padrões de crescimento observados nos subcultivos em meio 9K adicionado das fontes FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ou S<sup>0</sup>, selecionou-se os 20 isolados que atingiram as maiores densidades celulares (DO>0,08). Foi visto que todos os isolados em meio 9K-S, decaíram o pH significativamente durante os 20 dias de monitoramento. No entanto, apenas o 3.1, 46.2, 49, 53 e 28.1, foram aqueles que além do pH do meio estar próximo de 1, também apresentaram os maiores valores de DO (>0,53). Já os melhores isolados de ferro foram o 9.1, 13, 15, 7, 4, 57, 14 e 53. Os quais apresentaram as maiores taxas de solubilização de Fe (> 13mg/L/h) e valores de ORP (>600mV). A fim de se avaliar a correlação entre os parâmetros mensurados no ensaio, foi feita uma análise de correlação utilizando o Coeficiente de Pearson (Tabela 1).

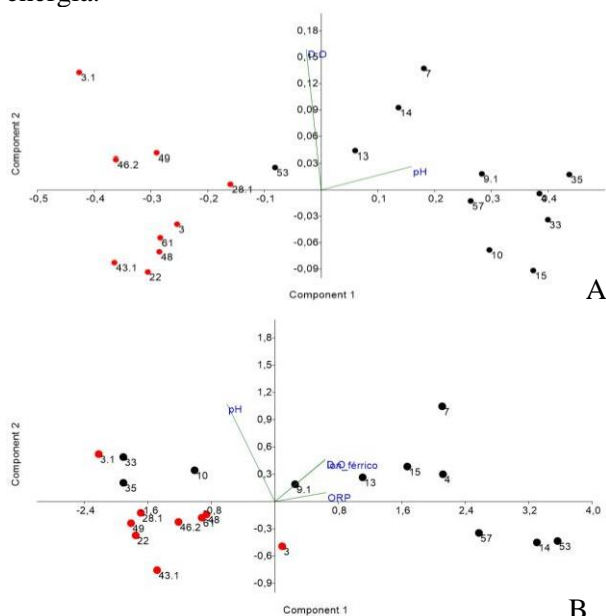
**Tabela 1:** Resultados dos Coeficientes de Correlação de Pearson obtidos na análise de correlação entre os parâmetros monitorados nos ensaios de oxidação de ferro e enxofre.

Meio 9K-Fe	pH	ORP	DO
Fe <sup>3+</sup>	-0,90 (2,46E-0,8)	0,98 (3,630E-014)	0,86 (6,72E-07)
pH		-0,94 (4,27E-010)	-0,76 (5,52E-05)
ORP			0,88 (9,55E-08)
Meio 9K-S			
DO			-0,61 (2,75E-03)

De modo geral, foi observada correlação positiva (p<0,05) entre todos os parâmetros analisados nos cultivos nos meios com Fe e S. A concentração dos íons Fe<sup>3+</sup>, ORP e DO se correlacionaram positivamente, isto é explicado pelo fato das bactérias, ao oxidarem o Fe ou S, aumentarem em número, resultando no aumento da turbidez do meio, mensurada pela DO. Além disso, o crescimento de BOF leva ao aumento da oxidação microbiana dos íons Fe<sup>2+</sup>, fazendo com que a concentração dos íons Fe<sup>3+</sup> aumente na solução e,

consequentemente, a ORP também (LIMA, 2011). Já o pH se correlacionou de forma negativa com os demais parâmetros avaliados, padrão já esperado, uma vez que a reação de oxidação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  consome  $\text{H}^+$ , o que pode causar um aumento brusco do pH e a formação da jarosita, um precipitado de ferro que forma uma película sobre o mineral, reduzindo a atividade dos microrganismos e, consequentemente, a solubilização de metais (GARCIA, 2013). As reações de formação de jarosita e da oxidação de enxofre produzem íons  $\text{H}^+$ , reduzindo o pH do meio. Por isso esse parâmetro, com o passar do tempo, tende a diminuir com o aumento desses microrganismos oxidantes (XIA et al., 2013).

Os isolados foram agrupados em relação à capacidade de oxidação de Fe e S por Análises de Componentes Principais (ACPs), considerando os parâmetros utilizados no ensaio (Figura 1A). Os isolados representados por círculos vermelhos foram obtidos do enriquecimento em meio 9K-S e os representados por círculos pretos vieram do enriquecimento em meio 9K-Fe. Como a oxidação de enxofre leva a redução de pH, os isolados que apresentaram os melhores valores de oxidação dessa fonte, além do aumento da turbidez do meio são os 3.1, 46.2, 49, 53 e 28.1. Sendo esses, com exceção do 53, todos obtidos originalmente a partir de enriquecimentos em meio contendo S como fonte de energia.



**Figura 1:** (A) Perfil de oxidação de S, mensurado através dos parâmetros DO e pH. (B) Perfil de oxidação de Fe,

mensurado através dos parâmetros DO, pH, ORP e oxidação de íons férricos.

Já a partir da análise realizada para determinar a oxidação de Fe, os melhores isolados são aqueles que apresentaram os parâmetros DO, ORP e íons  $\text{Fe}^{3+}$  mais elevados. Sendo esses, o 9.1, 13, 15, 7, 4, com destaque para os isolados 57, 14 e 53. Todos eles foram obtidos originalmente do meio 9K-Fe.

Sendo assim, a ACP confirmou que foi possível isolar microrganismos com potencial para oxidação de Fe e/ou S. Essa informação é essencial a montagem dos consórcios de biolixiviação, visto que um consórcio eficaz deve ser constituído tanto por microrganismos oxidantes de ferro quanto por oxidantes de enxofre. Garantindo a produção de íons férricos, poderosos agentes lixiviantes, além da acidez necessária ao processo de biolixiviação (AFONSO, 2017).

#### 4. Conclusões

Conclui-se, que o método de enriquecimento foi eficiente para a obtenção das bactérias de interesse e que não houve grande discrepância entre o número de morfotipos isolados em meio contendo Fe e S. As análises realizadas para determinar a capacidade oxidativa de ferro e enxofre dos isolados demonstraram que o pH se correlaciona inversamente com os íons  $\text{Fe}^{3+}$ , ORP e DO. Já os íons  $\text{Fe}^{3+}$  se correlacionam diretamente com a ORP e a DO. Sendo que a ORP e a DO também se correlacionam diretamente. Por fim, a Análise de Componentes Principais demonstrou que os isolados 3.1, 46.2, 49, 53 e 28.1 foram os melhores a oxidar o S e que os isolados 9.1, 13, 15, 7, 4, com destaque para 57, 14 e 53 foram os melhores a oxidar o Fe. Sendo estes potenciais agentes solubilizadores de metais, podendo vir a integrar um consórcio de biolixiviação eficaz.

#### 5. Apoio Financeiro

Este projeto é uma parceria entre o Instituto de Ciências Biológicas (ICB), o Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), a VALE S.A. e a FAPEMIG.



## 6. Referências

- AFONSO, L. C. **Biolixiviação de cobre a partir de rejeitos de processo de flotação de calcopirita empregando consórcio de microrganismos**. 2017. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- ARJUM, F.; SHAHID, M.; AKCIL, A. Biohydrometallurgy techniques of low grade ores: A review on black shale. **Hydrometallurgy**, v. 117-118, p. 1-12, 2012.
- DNPM. **Sumário brasileiro mineral**. Brasília, 2 p. 2017.
- GARCIA Jr., O. **Estudos da biolixiviação de minérios de urânio por Thiobacillus ferrooxidans**. 1989. 37 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética), Universidade de Campinas, Campinas, 1989.
- GARCIA Jr., O.; MUKAI, J.K.; C.B. ANDRADE. Growth of Thiobacillus ferrooxidans on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo: Microbiol Res Foundation, v. 38, n. 3, p. 279-282, Jun. 1992.
- GARCIA, Í. G. **Consórcios microbianos associados a ambientes de minas: obtenção, avaliação fisiológica e molecular**. 2013. 96 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- JOHNSON, D. B., HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of The Total Environment**, 338, 3-14, 2005.
- KARAMANEV, D.G., NIKOLOV, L.N., MAMATARKOVA, V., 2002. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. **Minerals Engineering** v. 15, p. 341–346. 2002.
- LIMA, R. D. B. **Biolixiviação de concentrado de flotação de sulfetos de cobre, em coluna, utilizando consórcios de micro-organismos mesófilos e termófilos**. 2011. 150 f. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- LUZ, A. B. da; LINS, F. A. F. **Tratamento de Minérios: Introdução ao Tratamento de Minérios**. 5. ed. Rio de Janeiro: CETEM, 2010. 963 p..
- MA, L. et al. Bioleaching of the mixed oxide-sulfide copper ore by artificial indigenous and exogenous microbial community. **Hydrometallurgy**, v. 169, p. 41-46, 2017.
- RODRIGUES, V. D. **Avaliação da Biodiversidade de Bactérias Associadas a Ambientes de Mina**. 2014. 125 f. Tese (Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- SANTANA, L. K. D. **Investigação da rota biohidrometalúrgica com Acidithiobacillus ferrooxidans/thiooxidans para recuperação do cobalto de baterias de íons lítio descartadas**. 2016. 151 f. Tese (Pós-graduação em Qualidade Ambiental), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- SILVA, L.; VICTOR, M.; LOPES, W.; CUNHA, S. COBRE: produção industrial e aplicações. **Química Nova**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 1154-1161, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 642, 1959.
- XIA, L.; URIBE, P.; LIU, X.; YU, C.; CHAI, L.; LIU, J.; QIU, W.; QIU, G. Comparison of chalcopyrite bioleaching after different microbial enrichment in shake flasks. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 275-280, 2013.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## Avaliação do papel dos receptores FcγRIIb e FcγRIII na doença periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Santos<sup>1</sup>, A. C. P. M.; Laranjeira<sup>1</sup>, A. O.; Chaves<sup>1</sup>, I. M.; Anestino<sup>1</sup>, T. A.; Souza<sup>1</sup>, D. G.; Madeira<sup>1</sup>, M. F. M.;

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro

E-mail: annacpmenezes@gmail.com

**Resumo:** O remodelamento ósseo é um processo fisiológico gerado pela produção e reabsorção de matriz. Várias doenças são causadas por um desequilíbrio nessa homeostase, incluindo a doença periodontal (DP), uma doença inflamatória e infecciosa.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) é uma das bactérias associadas à patogênese da DP e trabalhos anteriores descreveram um aumento na quantidade de IgG anti-Aa em pacientes com DP. Também há uma relação entre a ativação de FcγR com a osteoclastogênese, indicando sua importância para o metabolismo ósseo. Assim, o objetivo do projeto é avaliar o papel dos receptores FcγRIIb e FcγRIII na perda óssea alveolar, em um modelo de DP induzida com Aa em camundongos. Para isso, induzimos DP em camundongos C57BL/6 (WT) machos e camundongos deficientes para FcγRIIb ou FcγRIII pela inoculação direta de uma suspensão de Aa. Após 30 ou 60 dias, foi realizada a eutanásia e as amostras de maxilas foram extraídas para ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) e perda óssea alveolar. No experimento de 30 dias, amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de IgG total. (CEUA 89/2016). Pelo MPO, constatamos um aumento no número de neutrófilos em animais FcγRIII<sup>-/-</sup> no experimento de 30 dias. Não houve alteração no número de neutrófilos no experimento de 60 dias. A análise da perda óssea mostrou que Aa induz perda óssea e, nos animais FcγRIIb<sup>-/-</sup> e FcγRIII<sup>-/-</sup> esta perda não foi significativa, padrão que se manteve nos experimentos de 30 e 60 dias. A quantificação de IgG total no soro não mostrou alterações.

**Palavras-chave:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; doença periodontal; reabsorção óssea; IgG; FcγR; camundongos.

### 1. Introdução

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica causada por uma disbiose no biofilme subgengival, que estimula uma resposta inflamatória e consequente reabsorção óssea alveolar. Uma das principais bactérias associadas à DP, na forma agressiva, é *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), um cocobacilo Gram-negativo, microaerófilo (Gholizadeh et al, 2017). A DP atinge grande parte da população e, além de outras complicações sistêmicas, pode levar à perda dos dentes, por isso, está relacionada à redução na qualidade de vida. Compreender os processos envolvidos na patogênese da DP é essencial para buscar novas formas de tratamento e controle.

Trabalhos anteriores mostram que pacientes com DP agressiva possuem altos níveis de IgG anti-Aa no soro (Saraiva et al, 2014). A produção de IgG está relacionada à atividade de neutrófilos e a ativação dos FcγR já foi associada à osteoclastogênese, indicando um papel importante destes receptores no metabolismo ósseo (Grevers et al, 2012). Entretanto, os mecanismos relacionados ao papel de receptores Fcγ na DP ainda não são bem esclarecidos. Assim, o objetivo deste projeto é avaliar o papel dos receptores FcγRIIb (considerado inibitório) e FcγRIII (considerado ativador) na perda óssea alveolar, em um modelo de DP induzida por Aa, em camundongos.

## 2. Metodologia

### 2.1 Experimento in vivo

A DP foi induzida em camundongos C57BL/6 (wild-type – WT) machos e camundongos deficientes para os receptores FcγRIIb ou FcγRIII, pela inoculação de 100 µL de uma suspensão de *Aa* amostra FDC Y4, contendo  $1 \times 10^9$  UFC/mL, em PBS com 1,5% de carboximetilcelulose, diretamente nos tecidos periodontais. O animal do grupo controle receberam PBS com 1,5% carboximetilcelulose. Após 30 ou 60 dias, foi realizada a eutanásia e as amostras de maxilas foram extraídas para análise do infiltrado inflamatório e perda óssea alveolar. Amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de IgG total no soro, no dia 30 pós-infecção. CEUA 89/2016.

### 2.2 Avaliação a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Para a quantificação indireta de neutrófilos foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). As amostras foram submetidas a uma série de soluções e tampões de acordo com o peso das maxilas (Tampão 1, NaCl 0,2%, NaCl 1,6% + C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5%, e Tampão 2). Após o processamento as amostras foram plaqueadas e foram adicionadas a 3'3', 5'5'-tetrametilbenzidina (TMB) 3,845 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). Por fim, a placa foi lida na absorvância de 450 nm.

### 2.3 Análise da perda óssea alveolar

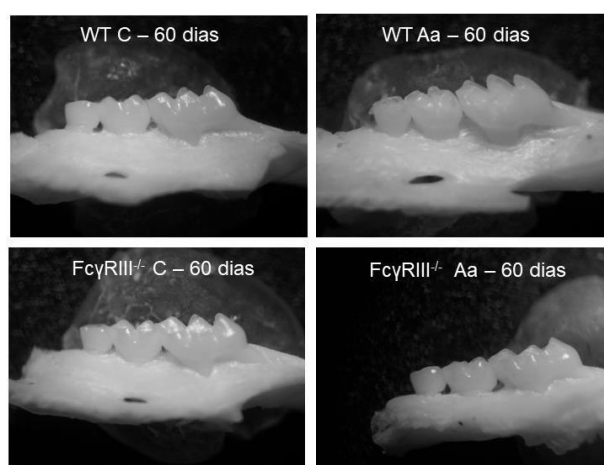
Após a extração, as maxilas foram tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 por 24 horas e, em seguida, foram coradas com azul de metileno 0,3%. Para obtenção das imagens, as maxilas foram fixadas e a câmera (Kodak EasyShare C743, Manaus, Brasil) foi ajustada sob a objetiva do microscópio estereoscópico binocular 200 M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Q724S-1, Diadema, Brasil). A perda óssea alveolar foi avaliada pela medida da área entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte, no primeiro molar superior dos animais, utilizando o programa Image J.

## 2.4 ELISA

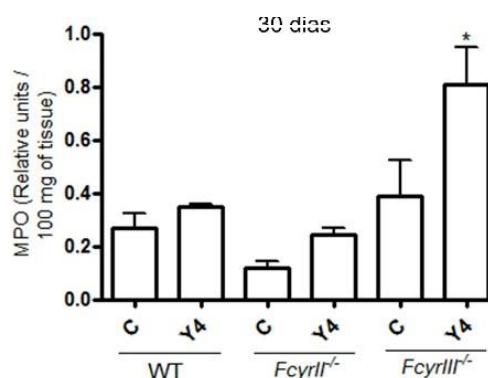
As amostras de sangue foram centrifugadas para coleta do sobrenadante. O IgG total presente no soro foi quantificado utilizando-se um *kit* de ELISA (R&D), seguindo as recomendações do fabricante.

## 3. Resultados e Discussão

A análise da perda óssea nos mostrou um aumento da reabsorção do osso alveolar, induzido pela *Aa*. Contudo, nos animais que não expressavam os receptores FcγRIIb ou FcγRIII, essa perda óssea não foi significativa, tanto no experimento de 30 dias quanto no experimento de 60 dias. Indicando a importância destes receptores para o metabolismo ósseo.



**Figura 1:** *Aa* induziu perda óssea alveolar em camundongos WT 60 dias pi e esta perda não foi significativa nos animais FcγRIIb<sup>-/-</sup> e FcγRIII<sup>-/-</sup>.



**Figura 2:** MPO em tecidos periodontais 30 dias pi. Houve um aumento na atividade de MPO em animais FcγRIII<sup>-/-</sup>.

Houve um aumento na atividade de MPO em animais FcγRIII<sup>-/-</sup> 30 dias pi. Entretanto, não houve alteração de MPO 60 dias pi. De forma geral, não houve correlação entre o infiltrado de neutrófilos e a perda óssea alveolar, como era esperado, uma vez que, na maioria dos casos, o aumento da reabsorção óssea alveolar está associada a um aumento no infiltrado neutrofílico (Hegde et al, 2019). Logo, são necessários novos experimentos para esclarecer o papel de neutrófilos na perda óssea alveolar na ausência do receptor FcγRIII.

Por fim, a quantificação de IgG total no soro não mostrou alteração nos níveis do anticorpo. Ainda é necessário fazer uma quantificação de IgG anti-*Aa* em experimentos posteriores.

#### 4. Conclusões

Os receptores FcγRIIb ou FcγRIII desempenham um papel importante na manutenção do metabolismo ósseo, influenciando fatores como a perda óssea e o número de neutrófilos. Contudo, são necessários novos experimentos para esclarecer a função destes receptores na doença periodontal induzida por *Aa*.

#### 5. Referências

GHOLIZADEHA, P.; PORMOHAMMADC, A.; ESLAMID, H.; SHOKOUHIE, B.; FAKHRZADEHD, V.; KAFIL, H. S.; Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p.303-311, 2017.

GREVERS, L. C.; VRIES, T. J.; EVERTS, V.; VERBEEK, J. S.; BERG, W. B. V. D.; VAN LENT, P. L. M.; Immune complex-induced inhibition of osteoclastogenesis is mediated via activating but not inhibitory Fcγ receptors on myeloid precursor cells. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 278-285, 2012.

SARAIVA, L.; REBEIS, E. S.; MARTINS, E. S.; SEKIGUCHI, R. T.; SUGUIMOTO, E. S. A.; MAFRA, C. E. S.; HOLZHAUSEN, M.; ROMITO, G. A.; MAYER, M. P. A.; IgG sera levels against a subset of periodontopathogens and severity of disease in aggressive periodontitis patients: a cross-sectional study of selected pocket sites. **Journal Of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 10, p.943-951, 2014.

HEGDE, R.; AWAN, K. H.; Effects of periodontal disease on systemic health. **Disease-A-Month**, v. 65, n. 6, p. 185-192, 2019.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus* E *Enterococcus* DE ORIGEM HOSPITALAR

Silva, C. P.<sup>1</sup>; Ferreira, J. F. G.<sup>1</sup>; Silva, C. L.<sup>1</sup>; Leite, A. C. A. D.<sup>1</sup>; Lima, M. E.<sup>2</sup>; Farias, L. M.<sup>1</sup>; Magalhães, P. P.<sup>1</sup>; Santos, V. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

<sup>2</sup> Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

E-mail: [cpeconick@gmail.com](mailto:cpeconick@gmail.com)

**Resumo:** O uso indiscriminado de antimicrobianos, por todo o mundo, aumenta a pressão de seleção sobre os microrganismos, favorecendo a disseminação da resistência bacteriana. Dentre os microrganismos de relevância clínica atual, bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* estão presentes em alta frequência nos ambientes hospitalares como importantes patógenos nosocomiais resistentes a fármacos antimicrobianos. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida, resultado de características estruturais, funcionais e metabólicas. Devido a alta disseminação de resistência no âmbito hospitalar o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de marcadores genéticos associados à resistência bacteriana (GRAs) a fármacos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. isoladas de pacientes hospitalizados. As amostras foram submetidas a extração de DNA por lise térmica e PCR pra detectar a presença de GRAS. Dentre as 38 amostras de *Enterococcus* sp. analisadas, 50,0%, 18,4%, 23,7%, 28,9%, 10,52% e 2,6% apresentaram resultados positivos para *tet(M)*, *vanA*, *tet(L)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *ant(4')IA*. Os genes *tet(O)* e *erm(A)* não foram detectados nas amostras. Entre os representantes do gênero *Staphylococcus* sp. (n=202), 72 amostras foram analisadas para *mec(A)* e *van(A)*, 202 para *erm(A)* e 130 para *erm(B)*. O percentual de amostras positivas para o marcador *mec(A)* foi de 34,7% (n=72), para *erm(A)* 4,1 % (n= 202), e *van(A)* = 1,4% (n=72). Não foi detectado o marcador genético *erm(B)*, em nenhuma das 130 amostras analisadas. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *erm(B)*, dentro do gênero *Staphylococcus*. Os dados gerados pelo presente estudo poderão contribuir para o melhor

conhecimento sobre a temática da resistência antimicrobiana em ambientes hospitalares impactados zpor esses fármacos, contribuindo para um melhor entendimento epidemiológico das doenças vinculadas a estes microrganismos.

**Palavras-chave** resistência aos antimicrobianos; genes de resistência; *Staphylococcus*; *Enterococcus*.

### 1. Introdução

O uso excessivo de antimicrobianos para controle e tratamento de infecções bacterianas gera problemas graves à saúde pública em todo o globo. Em um mundo altamente interligado, este problema estende-se muito além do ambiente hospitalar (CHAGAS *et al.*, 2015). A universalização da assistência médica e o influxo de pessoas por todo o mundo contribuem para a disseminação via efluentes de microrganismos patogênicos e ou com potencial patogênico e/ou portadores de genes de resistência a antimicrobianos encontrados na microbiota humana (RADJENOVIC *et al.*, 2009). Em um relatório recente da OMS, as taxas de consumo entre os países estão variando de aproximadamente quatro doses diárias definidas (DDD) por cada mil habitantes para mais de 64 doses diárias a cada mil habitantes. (OMS, 2018).

A resistência a antimicrobianos é um problema mundial emergente, de grandes proporções, observado em diversos grupos bacterianos, inclusive os gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus*, focos do presente estudo. Substâncias com características antimicrobianas já são conhecidas há muitos anos, incluindo os antibióticos naturais já existentes há bilhões de anos



(HAL; BARLOW, 2004; WRIGHT; POINAR, 2012), que proporcionaram uma vantagem para as linhagens produtoras por permitirem a inibição, ou eliminação de bactérias competidoras por recursos nutricionais e espaço físico (MARTINEZ, 2009; AMINOV, 2009).

Vários GRAs foram identificados em amostras de solo permafrost datado de 30 mil anos, incluindo genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, vancomicina e tetraciclina (D’COSTA *et al.*, 2011; PERRON *et al.*, 2015) e microbiomas isolados de cavernas (BHULLAR *et al.*, 2012). Assim, acredita-se que o resistoma, conjunto de genes envolvidos na resistência bacteriana, seja tão antigo quanto os genes relacionados ao metabolismo bacteriano (GAZE *et al.*, 2013) e que muitos componentes do resistoma evoluíram antes mesmo do uso de antibióticos no ambiente clínico (D’COSTA *et al.*, 2011; PERRON *et al.*, 2015).

Uma das maiores implicações encontradas da resistência de microrganismos aos fármacos antimicrobianos, provocando efeitos mais graves e imediatos, é sua interferência na clínica médica e, em destaque, nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (TINDALL *et al.*, 2017). As taxas elevadas de resistência antimicrobiana entre patógenos nosocomiais têm sobrecarregado os sistemas de saúde, em decorrência de sua associação com taxas elevadas de morbidade e mortalidade, aumento dos custos de tratamento e limitação das opções terapêuticas, principalmente quando relacionado ao grupo ESKAPE que refere a importantes patógenos com crescente resistência a múltiplas drogas. São eles, em ordem: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (ARROZ, 2008; TINDALL *et al.*, 2017; MULANI, 2019). Os patógenos do grupo ESKAPE são responsáveis pela maioria das IRAS e são extensivamente resistentes a agentes antimicrobianos (RICE, 2008; NAVIDINIA, 2016).

Os *Enterococcus* apresentam importância exponencial como causadores de infecção hospitalar, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento de diversas infecções. As espécies mais comumente isoladas do gênero em amostras clínicas humanas são: *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, que apresentam grande capacidade de colonização de pacientes, superfícies

abióticas diversas, incluindo as superfícies de equipamentos utilizados em hospitais (MADSEN, 2017). A emergência desse patógeno nas últimas duas décadas, entre muitos fatores, se deve em parte à sua resistência intrínseca aos antimicrobianos comumente utilizados na clínica como: aminoglicosídeos, aztreonam, cefalosporinas, clindamicina, oxacilina.

O gênero *Staphylococcus* abrange as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Estas podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, sendo resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal. No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, estes microrganismos continuam sendo uns dos mais importantes patógenos para o homem (SCHLEIFER *et al.*, 2015; HADADI, 2018).

Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *S. aureus* parcialmente resistentes aos antibióticos mais potentes como a vancomicina, e relatos da capacidade que os *Staphylococcus* coagulase negativa têm de desenvolver resistência. Assim há necessidade de uma identificação rápida e eficiente de todos os casos em que estes microrganismos se apresentam (SCHLEIFER *et al.*, 2015; HADADI, 2018)

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a presença de marcadores genéticos associados à resistência bacteriana a antimicrobianos em amostras de *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* isoladas de hemocultura, urocultura e secreções de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte no período de novembro a dezembro de 2019.

## 2. Metodologia

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (3.219.929) e da Universidade Federal de Minas Gerais (3.586.852).

### 2.1 Coleta das amostras clínicas

No estudo foram utilizadas 202 amostras de *Staphylococcus spp.* e 39 de *Enterococcus spp.* isoladas de hemocultura, urocultura e secreções de pacientes internados em um hospital público de

Belo Horizonte com diferentes quadros clínicos no período de novembro a dezembro de 2019.

## 2.2 Extração de DNA das amostras

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada usando método de fervura descrito por OLSVIK e STROCKBINE (1993), com modificações. As bactérias foram cultivadas em meio TSA a 37°C por 24h, e em seguida, biomassa obtida foi transferida com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril para microtubos contendo 400 µL de água Milli-q estéril. Após fervura durante 12 min, as suspensões celulares foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas por 12 min a 20215 x g a 4°C. O sobrenadante obtido foi avaliado quanto a concentração de DNA em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000; Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), empregando-se comprimento de onda de 260 nm e, para cálculo da relação DNA/proteína, a leitura foi realizada a 280 nm também. As amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q® estéril até concentração de 20 ng/mL e o material foi armazenado em freezer a -20 °C, até o momento de sua utilização.

## 2.3 Pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos

A pesquisa de genes que codificam resistência a fármacos antimicrobianos foi realizada por Reação da polimerase em cadeia (PCR). Em *Enterococcus*, foram investigados os marcadores de resistência: *tet(O)*, *tet(M)* e *tet(L)* para tetraciclina; *erm(A)*, *erm(B)* e *mefA/E* para macrolídeos; *van(A)* para glicopeptídeos; *ant(4')IA* para aminoglicosídeos, empregando-se *primers* e protocolos específicos descritos em Dutka-Malen *et al.* 1995, MalhotraKumar *et al.*, 2005 e Fluit *et al.*, 2003.

Já nas amostras do gênero *Staphylococcus*, foram pesquisados os marcadores para macrolídeos *mec(A)*, *erm(A)*, *erm(B)* e glicopeptídeos *van(A)* e o β-lactâmico meticilina *mec(A)*. Das 202 amostras, 72 foram testadas para o gene *mec(A)* e *van(A)*, 202 testadas para *erm(A)*, 130 para *erm(B)*, empregando-se *primers* e protocolos específicos descritos em Dutka-Malen *et al.* 1995, MalhotraKuma *et al.*, 2005 e Fluit *et al.*, 2003. Em todos os lotes de reação, foram empregues controles positivo e negativo (água Milli-Q®). O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como padrão de massa

molecular um marcador de 100 pb (Ludwig Biotecnologia, Bela Vista, RS, Brasil). Após a corrida, os géis foram corados com GelRed (Thermo Scientific, Massachussets, EUA), examinados no Gel Doc Ez System (Bio Rad, Santo Amaro, SP, Brasil) e fotodocumentados.

## 3. Resultados e Discussão

Para o gênero *Staphylococcus*, o percentual de amostras positivas para o marcador *mec(A)* foi de 34,7% (n=72), para *erm(A)* 4,1 % (n= 202), e *van(A)* = 1,4% (n=72). Não foi detectado o marcador genético *erm(B)*, em nenhuma das 130 amostras analisadas.

Já para o gênero *Enterococcus* (Figura 2), foram encontrados resultados positivos de 50,0%, 18,4%, 23,7%, 28,9%, 10,52% e 2,6% para *tet(M)*, *van(A)*, *tet(L)*, *mef(A/E)*, *erm(B)* e *ant(4')IA*, respectivamente. Os genes *tet(O)* e *erm(A)* não foram encontrados nas amostras testadas.

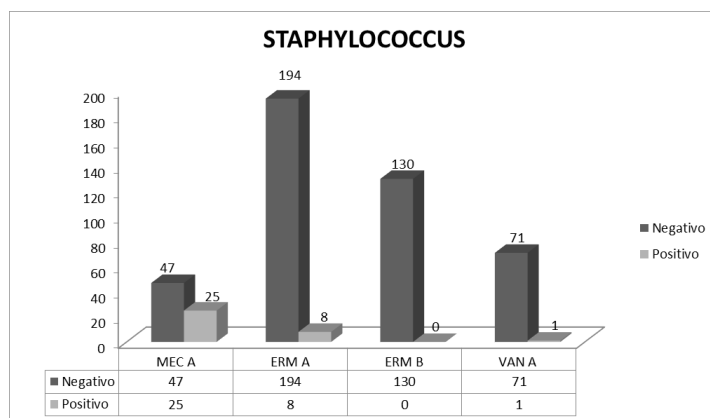


Figura 1: Perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus*

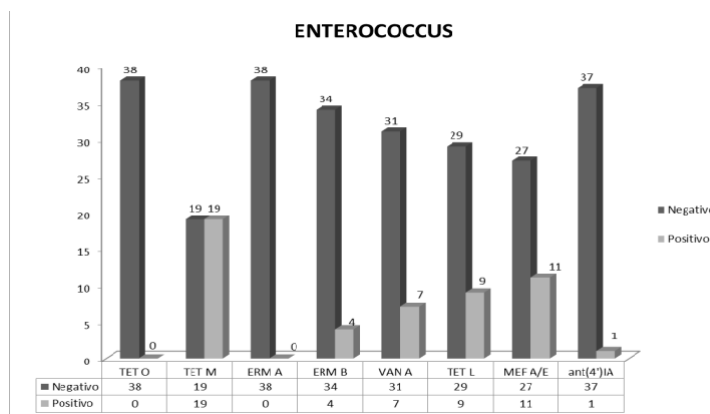


Figura 2: Perfil de resistência das amostras de *Enterococcus*



Embora os macrolídeos não constituam uma opção terapêutica regular para as infecções enterocócicas devido à grande frequência de resistência descrita e à disseminação do gene *erm(B)* entre os microrganismos do gênero, a pesquisa desses determinantes genéticos é de grande relevância quando se considera o elevado potencial de transmissão horizontal desses marcadores para microrganismos de outros gêneros. O gene *erm(B)* confere resistência aos macrolídeos, lincosamídeos e estreptogramina B, sendo esta resistência múltipla e de importantíssima investigação. No presente estudo, foi verificada a frequência de 28,9% do gene *erm(B)* e *erm(A)* entre as amostras de *Enterococcus*, se aproxima do encontrado em SANTOS *et al.* (2017). A frequência do gene *erm(A)* em amostras de *Enterococcus* spp. é geralmente descrita como baixa, chegando a níveis máximos de 6% (SCHMITZ *et al.*, 2000; EMANEINI *et al.*, 2008). Por outro lado, a presença de *erm(B)* em amostras de enterococos é relatada com frequência na literatura (De Leener *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2014; Reyes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2017). O gene *mef(A/E)* codifica uma proteína de efluxo que expulsa os macrolídeos da célula e sua frequência foi de 28,9%, ao contrário ao encontrado em SANTOS *et al.* (2017), com amostras do mesmo gênero.

As tetraciclina possuem amplo emprego em IRAS e o mecanismo de resistência é resultante de três estratégias empregadas pelas bactérias: limitação do acesso ao antimicrobiano ao seu alvo pelo efluxo deste através da membrana celular, alteração ribossomal que dificulta uma ligação efetiva do antimicrobiano ao seu respectivo alvo e produção de enzimas que inativam as tetraciclina. As frequências encontradas dos genes *tet(M)* 50,0%, *tet(L)* 23,7% e *tet(O)* 0,0% se aproximam do encontrado em De Leener *et al.* (2004), também com amostras do gênero *Enterococcus*.

O gene *ant(4')IA*, presente no grupo dos aminoglicosídeos, codifica uma nucleotidotransferase que confere resistência a tobramicina, amicacina, canamicina e dibecacina e menos de 10% de isolados clínicos segundo o Gama *et al.* (2008) possuem este gene, o que reverbera ao encontrado no presente estudo (2,6%).

O gene *van(A)*, representando os glicopeptídeos, abrange um fenótipo de resistência adquirido que codifica resistência a teicoplanina e vancomicina, normalmente adquirido através de transposons. A

frequência encontrada de 18,4% é alarmante, tendo em vista que estes antimicrobianos são de escolha para o tratamento de graves infecções causadas por este gênero em humanos (WILLEMS *et al.*, 2012). Espécies do gênero são capazes de adquirir facilmente genes que codificam elevado nível de resistência aos glicopeptídeos, por isso o número é tão preocupante (KACMAZ; AKSOY, 2005; SCHWARZ *et al.*, 2001; MORRISON *et al.*, 1997).

Já no gênero *Staphylococcus*, a frequência do gene *mec(A)* foi de 34,7% (n=72), frequência próxima ao observado nos estudos de de Faria *et al.* (2009) (42,9%) (n= 49). Esse gene é parte integrante de um elemento genômico denominado "cassete cromossômico estafilocócico *mec*" (SCC*mec*) (GELATTI *et al.* 2009). Já com os genes *erm(A)* e *erm(B)*, até o momento a frequência de amostras positivas foi similar a demais estudos dentro do gênero, onde a taxa do gene *erm(A)* é, na maioria das vezes superior a do gene *erm(B)*, mais dificilmente encontrado (TALEBI *et al.* 2019). Por fim, o gene *van(A)*, foi detectado até agora em 1,4% das amostras do presente estudo, se aproximando dos baixos níveis em estudos similares (LEITE *et al.* 2007).

Esses resultados, no geral, são alarmantes, visto que o ambiente hospitalar é um potencial *HOTSPOT* de disseminação e avanço da resistência a antimicrobianos, impactando na saúde pública e dificuldades de tratamentos dos pacientes e que importantes genes de disseminação de resistência foram computados entre classes alarmantes de antimicrobianos.

#### 4. Conclusões

Os dados gerados pelo presente estudo poderão contribuir para o melhor conhecimento sobre a temática da resistência antimicrobiana em ambientes hospitalares impactados por esses fármacos, contribuindo para um melhor entendimento epidemiológico das doenças vinculadas a estes microrganismos. Além disso, o conhecimento acerca da resistência no ambiente hospitalar proporciona que novos mecanismos de controle da disseminação sejam implementados. O próximo passo é seguir a análise de demais genes e classes de antimicrobianos e buscar padrões de multirresistência entre as amostras e traçar o perfil de resistência entre as espécies dentro dos gêneros estudados.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq, CAPES, FAPEMIG, PRPq/ UFMG.

## 6. Referências Bibliográficas

- AMINOV, R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 12, p. 2970-2988, 2009.
- ARROZ, L.B.; Financiamento Federal para o Estudo da Resistência Antimicrobiana em Patógenos Nosocomiais: ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, v.197, n.8, p.1079-1081, 2008.
- BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E.D.; JOHNSTON, M.D.; *et al.* Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, e34953; 2012.
- CHAGAS, T. P.G.; SILVEIRA, M. C.; ALBANO, R. M.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.110(5): 691-692, 2015.
- COELHO, S. M. O.; *et al.* Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 195-200, Feb. 2007.
- D' COSTA, V.M.; KING, C.E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W.W.; SCHWARZ, C.; *et al.*; Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461; 2011.
- DE LEENER, E. *et al.* Distribution of the *erm* (B) Gene, tet racycline Resistance Genes, and Tn 1545-like Transposons in Macrolide-and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans. *Microbial Drug Resistance*, v. 10, n. 4, p. 341-345, 2004.
- DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.. Distribution of the *erm* (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microbial Drug Resistance*, 10:341-345; 2004.
- DUTKA-MALEN, S., EVERS, S., & COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33(1), 24-27;1995.
- EMANEINI, M.; ALIGHOLI, Z.; AMINSHAHI, M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*, 57: 173–178; 2008.
- FLUIT, A.C., FLORIJN, A., VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* blood culture isolates from 23 European university hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21, 357– 359; 2003.
- GAZE, W.H; *et al.* Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging infectious diseases*, v. 19, n. 7, 2013.
- GELATTI, L. C., BONAMIGO, R. R., BECKER, A. P., & D AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84(5), 501-506; 2009.
- HADADI, M., HEIDARI, H., EBRAHIM-SARAIE, H.S., MOTAMEDIFAR, M. Molecular characterization of vancomycin, mupirocin and antiseptic resistant *staphylococcus aureus* strains; *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* v. 10, n. 1, 2018
- HALL, B. G.; BARLOW, M.. Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Resistance Updates*, v. 7, n. 2, p. 111-123, 2004.
- JIA, W.; LI, G.; WANG, W. . Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11: 3424–3442; 2014.

- KACMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 535-538, 2005.
- KOBAYASHI, N.; ALAM, M.; NISHIMOTO, Y.; URASAWA, Z.; UEHARA, N.; WATANABE, N. . Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiology and Infection*, 126:197- 204;2001.
- MADSEN, K. T. *et al.* Virulence Factors Associated with *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Open Microbiology J.*, v. 11, p. 1, 2017.
- MALHOTRA-KUMAR, S., LAMMENS, C., PIESSENS, J., & GOOSSENS, H. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4798-4800, 2005.
- MARTINEZ, J.L.; Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157:2893–2902, 2009
- MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, v. 83, p. 89-99, 1997.
- MULANI, M. S; *et al.* Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in microbiology*, v. 10, 2019.
- NAVIDINIA, M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciece*. 7, 2008–4978. 10.22037/jps.v7i3.1258; 2016.
- OLSVIK, O.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. *Diagnostic Molecular Microbiology*. Washington: ASM, p. 271-276, 1993.
- PERRON, G. G.; INGLIS, R. F.; PENNING, P. S.; COBEY, S. Fighting microbial drug resistance: a primer on the role of evolutionary biology in public health. *Evolutionary applications*, 8(3), 211-222; 2015.
- RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*; 43:831-841; 2009
- RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*; 43:831-841; 2009.
- REYES, J.; HIDALGO, M.; DÍAZ, L.; RINCÓN, S.; MORENO, J.; VANEGAS, N.; CASTAÑEDA, E.; ARIAS, C.A. Characterization of macrolide resistance in gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases*, 11: 329–336;2007.
- RICE L. B.; Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*; 197, 1079–1081. 10.1086/533452; 2008.
- SANTOS, B.A.; OLIVEIRA, J.S.; CARDOSO, N.T.; BARBOSA, A.V.; SUPERTI, S.V.; TEIXEIRA, L.M.; NEVES, F.P.G.; Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 55:56-62.; 2017
- SCHLEIFER, K.-H., BELL, J. A. *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–43, 2015.
- SCHMITZ, F.J.; SADURSKI, R.; KRAY, A.; BOOS, M.; GEISEL, R.; KÖHRER, K.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C.; Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 2000.
- SCHWARZ, F. V.; PERRETEN, V.; TEUBER, M. Sequence of the 5 kb conjugative multiresistance

plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid Journal*, v. 46, p. 170- 187, 2001.

TALEBI, G.; *et al.*, of *ermA*, *ermB*, *ermC* and *mecA* genes among *Staphylococcus aureus* isolates isolated from patients admitted to hospitals in Tehran, Iran by PCR and Sequencing. *Biomedical Research* Volume 30, Issue 2019.

TINDALL, B. J.; SUTTON, G.; GARRITY, G. M.; *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.*, 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.*, 1971 (Approved Lists 1980). *International. Journal System Evolution Microbiology*. V.67, n. 2, p. 502- 504, 2017.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

WHO - *World Health Organization* – Antimicrobial Resistance, 2018.

WILLIAMS, K. *et al.* Sterilizing activities of novel combinations lacking first-and second-line drugs in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3114-3120, 2012.

WRIGHT, G. D.; POINAR, H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends in microbiology*, 20(4), 157-159; 2012.

---

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

Silva<sup>1</sup>, C. L.; Ferreira<sup>1</sup>, J. F. G.; Silva<sup>1</sup>, C. P.; Leite<sup>1</sup>, A. C. A. D.; Lima<sup>2</sup>, M. E.; Magalhães<sup>1</sup>, P. P.; Santos<sup>1</sup>, V. L.; Farias<sup>1</sup>, L. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia.

<sup>2</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

E-mail: [cassialopes77@hotmail.com](mailto:cassialopes77@hotmail.com)

**Resumo:** A introdução dos antimicrobianos na prática clínica, na década de 1930, revolucionou a medicina e promoveu avanços na terapêutica das doenças infecciosas. Contudo, logo se percebeu que o emprego desses fármacos promovia um efeito indesejado, qual seja, a seleção de amostras resistentes aos mesmos, problemática cada vez mais preocupante, em especial, em hospitais e demais ambientes nos quais o uso de antimicrobianos é rotineira. O estudo dos genes e dos mecanismos relacionados à resistência a antimicrobianos é uma ferramenta que contribui para o controle da disseminação da propriedade, minimizando suas consequências. Dentre os microrganismos de relevância clínica, destacam-se, na atualidade, os bastonetes Gram negativos não fermentadores, entre eles, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar, por PCR, a presença de marcadores genéticos associados à resistência a fármacos β-lactâmicos e colistina em amostras de *A. baumannii* (n = 54) e *P. aeruginosa* (n = 50) isoladas de pacientes hospitalizados. Foram observados *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> em 4,0%, 16,0%, 6,0% e 6,0% das amostras de *P. aeruginosa*, respectivamente. Em *A. baumannii*, apenas *bla*<sub>KPC</sub> foi detectado (14,8%). Observou-se resistência a mais de uma classe de antimicrobianos na mesma amostra. Nenhuma bactéria albergava os marcadores *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *mcr-1*. Os resultados são preocupantes, considerando os grupos bacterianos estudados e a enorme relevância dos fármacos β-lactâmicos na rotina clínica. Os dados gerados pelo presente estudo contribuem para o conhecimento do perfil de suscetibilidade a antimicrobiana local, subsidiando

o estabelecimento de antibioticoterapia empírica, quando necessária.

**Palavras-chave** resistência a antimicrobianos; fármacos β-lactâmicos; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1. Introdução

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos antibacterianos foram, inquestionavelmente, uma história de sucesso do século XX, observando-se a introdução de uma sucessão de novos produtos na prática médica, permitindo que inúmeras vidas fossem salvas (DAVIES e DAVIES, 2010). Entretanto, a resistência a antimicrobianos, propriedade cada vez mais disseminada, é, hoje, reconhecida como uma ameaça à efetividade da antibioticoterapia (MATHUR e SINGH, 2005). Bactérias com elevado potencial de virulência e resistentes a fármacos antimicrobianos representam um desafio para a área de saúde no nível mundial.

A exposição ao fármaco antimicrobiano favorece, de forma inevitável, o aumento do percentual de amostras resistentes, como explicado pelo processo de seleção descrito por Darwin. Entretanto, a automedicação, a prescrição incorreta, a não adesão ao esquema terapêutico proposto e o mau uso na pecuária, entre outros, são fatores responsáveis por acelerar o processo de seleção e, consequentemente, de disseminação de amostras bacterianas resistentes (KHAN *et al.*, 2017). Assim, o “surgimento” de microrganismos resistentes a antimicrobianos e sua distribuição em comunidades microbianas por toda biosfera é baseado, principalmente, em dois fatores, a presença de genes



que codificam resistência e a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (DAVIES e DAVIES, 2010, MATHUR e SINGH, 2005).

O número crescente de patógenos resistentes a fármacos antimicrobianos associados às infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) sobrecarrega o sistema de saúde, acarretando altas taxas de morbidade e mortalidade, atraso no diagnóstico, falhas na antibioticoterapia, aumento dos custos do tratamento e perda de produtividade. Em especial, merece destaque o grupo de patógenos incluídos no acrônimo ESKAPE, que compreende as bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (TINDALL *et al.*, 2017). Neste estudo, abordamos dois deles, os bastonetes Gram-negativos não fermentadores *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

*A. baumannii* é um cocobacilo agente, em especial, de pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção do trato urinário e bacteremia (JUTTUKONDA *et al.*, 2019). Destaca-se por sua capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos e pela habilidade de sobreviver longos períodos sob uma ampla gama de condições ambientais, fatos que potencializam a sua disseminação em ambiente hospitalar (ELIOPOULOS *et al.*, 2008). Exibe diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, quais sejam, alteração da permeabilidade da membrana externa, modificação do alvo de ação do antimicrobiano, alteração de afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), síntese de enzimas que inativam antimicrobianos e expressão de bombas de efluxo (NOWAK *et al.*, 2012).

*P. aeruginosa*, à semelhança de *A. baumannii*, é um agente frequentemente associado a IRAS, capaz de sobreviver em condições ambientais diversas, como no solo, pântanos, *habitats* marinhos costeiros, tecidos vegetais e animais, além de exibir exigências nutricionais mínimas (ARTINI *et al.*, 2018). Uma característica bastante relevante, que contribui para a importância clínica de *P. aeruginosa*, é sua capacidade de formar biofilme, especialmente em superfícies úmidas, em ambiente hospitalar (TSENG *et al.*, 2018). A espécie é conhecida por sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos de linha de frente, devido, principalmente, à baixa permeabilidade de sua membrana externa, superexpressão de bombas de efluxo e inativação enzimática de

antimicrobianos, por exemplo, pela produção de  $\beta$ -lactamases. Além disso, *P. aeruginosa* secreta vários fatores de patogenicidade, incluindo toxinas, lipases e proteases (KHOSRAVI *et al.*, 2017).

Considerando os aspectos discutidos, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a presença de marcadores genéticos associados à resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos em amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte.

## 2. Metodologia

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (3.219.929) e da Universidade Federal de Minas Gerais (3.586.852).

### 2.1 Amostras bacterianas

Foram incluídas no estudo 54 amostras de *A. baumannii* e 50 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemocultura, urocultura e secreções de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte, com diferentes quadros clínicos, nos meses de novembro e dezembro de 2019. As amostras foram isoladas durante procedimento diagnóstico.

### 2.2 Extração de DNA para avaliação genotípica

Após cultivo em *Tryptic Soy Agar* (TSA), por 24 h, a 37 °C, a massa celular foi transferida, com o auxílio de alça bacteriológica estéril, para um microtubo contendo 400  $\mu$ L de água Milli-Q®. Para extração de DNA, o material foi submetido à fervura por 12 min e, após o resfriamento, centrifugado a 21.913 g por 12 min, a 4 °C. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro, empregando-se comprimento de onda de 260 nm e, para cálculo da relação DNA/proteína, a leitura foi realizada também a 280 nm. Então, as amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q® estéril até a concentração de 20 ng/mL e o material foi armazenado em freezer a -20 °C, até o momento de sua utilização.

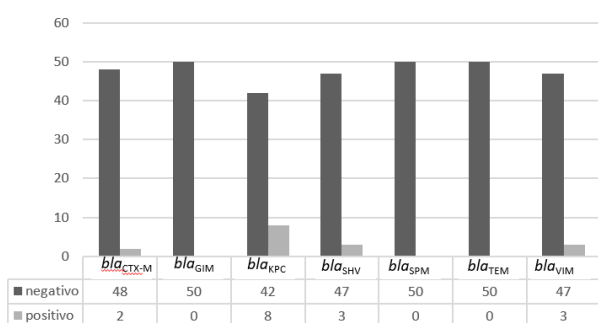
### 2.3 Pesquisa de marcadores de resistência a fármacos antimicrobianos

A pesquisa de genes que codificam resistência a fármacos antimicrobianos foi realizada por reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram investigados marcadores de resistência a carbapenemases ( $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{SPM}$ ,  $bla_{GIM}$ ,  $bla_{IMP}$ ), ESBLs ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ) e colistina ( $mcr-1$ ), empregando-se *primers* e protocolos previamente descritos (BARBIERI *et al.*, 2017; ELLINGTON *et al.*, 2007; GRÖBNER *et al.*, 2009).

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Em todos os lotes de reação, foram empregues controles positivo e negativo (água Milli-Q®). Como padrão de massa molecular, foi empregue marcador de 100 pb. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com GelRed®, examinados e o resultado foi fotodocumentado.

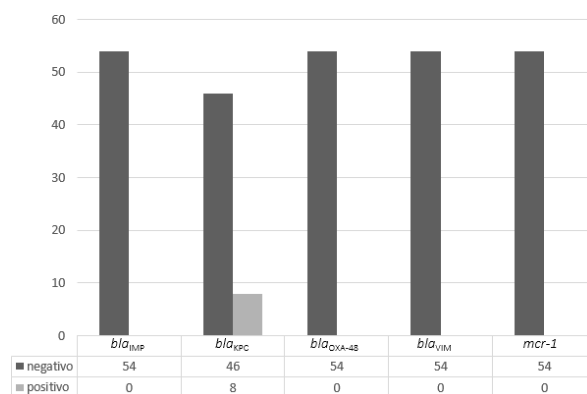
### 3. Resultados e Discussão

Entre as amostras de *P. aeruginosa*, foram detectados  $bla_{CTX-M} = 4,0\%$ ,  $bla_{KPC} = 16,0\%$ ,  $bla_{SHV} = 6,0\%$  e  $bla_{VIM} = 6,0\%$ . Os marcadores  $bla_{GIM}$ ,  $bla_{SPM}$  e  $bla_{TEM}$  não foram observados na espécie (Figura 1).



**Figura 1:** Marcadores de resistência a antimicrobianos nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

No que se refere a *A. baumannii*, apenas  $bla_{KPC}$  foi observado (14,8%). Os demais genes pesquisados para o grupo,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{VIM}$  e  $mcr-1$ , não foram observados (Figura 2).



**Figura 2:** Marcadores de resistência a antimicrobianos nas amostras de *Acinetobacter baumannii*.

Os resultados do estudo demonstram a circulação de amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a fármacos  $\beta$ -lactâmicos frequentemente empregados na rotina clínica. Em especial, foram observadas amostras de *P. aeruginosa* que albergavam genes associados à síntese de carbapenemases ( $bla_{KPC}$  e  $bla_{VIM}$ ) e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido ( $bla_{CTX-M}$  e  $bla_{SHV}$ ). A detecção de amostras capazes de expressar duas carbapenemases é incomum. Na literatura disponível, há poucos relatos referentes a esse fenômeno no Brasil (KARAMPATAKIS *et al.*, 2019). No presente estudo, dentre as amostras de *P. aeruginosa*, foram observadas duas amostras que albergavam dois genes de resistência e uma amostra que exibia três genes associados à resistência a duas classes diferentes de antimicrobianos.

Referente a *A. baumannii*, diversos estudos recentes realizados no Brasil e em outros países demonstraram que é rara a ocorrência de  $bla_{KPC}$  (ABOUELFETOUH *et al.*, 2019; AZEVEDO *et al.*, 2019; LAI *et al.*, 2019; ROMANIN *et al.*, 2019). Entretanto, na presente investigação, a frequência de detecção do gene foi de cerca de 15%.

Assim, embora os percentuais de amostras que albergam os genes pesquisados sejam, à primeira vista, baixos, os resultados gerados por este estudo são, sem dúvida, preocupantes. Os dados alertam para a necessidade premente de monitoramento da disseminação da resistência a fármacos  $\beta$ -lactâmicos entre amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, bastonetes Gram-negativos não fermentadores incluídos entre as bactérias de maior relevância clínica, membros do grupo ESKAPE, paradigmas de patogênese, transmissão e resistência antimicrobiana. É fundamental que se controle a evolução da resistência antimicrobiana, sob penade



enfrentarmos, em um futuro próximo, situações de limitação terapêutica grave, que podem comprometer o prognóstico do paciente.

#### 4. Conclusões

Os dados gerados pelo presente trabalho são relevantes, visto que revelam o perfil genético de microrganismos importantes, em especial, no âmbito hospitalar, e demonstram capacidade de resistência a fármacos antimicrobianos frequentemente prescritos, em alguns casos, raramente reportada. Estudos com esta abordagem são ferramentas essenciais para o controle da evolução das taxas de resistência a antimicrobianos e suas consequências.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq, CAPES e PRPq/ UFMG.

#### 6. Referências

- ABOUELFETOUH, A.; *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem- resistance *Acinetobacter baumannii* isolates from Egypt. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 185, 2019.
- ARTINI, M.; *et al.* Antimicrobial and Antibiofilm Activity and Machine Learning Classification Analysis of Essential Oils from Different Mediterranean Plants against *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 482- 495, 2018.
- AZEVEDO, F. K. S. F.; *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 31- 40, 2019.
- BARBIERI, N. L. *et al.* *mcr-1* identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **PLOS One**, v. 12, n. 3, p. 1-13, 2017.
- DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **American Society for Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 417- 433, 2010.
- ELIOPOULOS, G. M.; *et al.* *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46. n. 8, p. 1254-1263, 2008.
- GRÖBNER, S. *et al.* Emergence of carbapenem- non-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 912- 922, 2009.
- JUTTUKONDA, L. J.; *et al.* *Acinetobacter baumannii* OxyR Regulates the Transcriptional Response to Hydrogen Peroxide. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 1, p. 1- 21, 2019.
- KARAMPATAKIS, T. *et al.* Molecular Epidemiology of Endemic Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in an Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, 2019.
- KHAN, H. A.; *et al.* Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017.
- KHOSRAVI, A. D.; *et al.* The frequency of class1 and 2 integrons in *P. aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. **Plos One**, v. 12, n. 8, 2017.
- LAI, C. C.; *et al.* In vitro activity of cefoperazone and cefoperazone-sulbactam against carbapenem- resistant *A.baumannii* and *P.aeruginosa*. **Infect Drug Resistance**, v. 12, p. 25-29, 2019.
- MATHUR S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p.281- 295, 2005.
- ROMANIN, P.; *et al.* Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Hospital from Brazil: The Importance of Carbapenemase Encoding Genes and Epidemic Clonal Complexes in a 10-Year Study. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 9, 2019.
- TINDALL; *et al.* Enterobacter aerogenes Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). **International Journal System Evolution Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 502- 504, 2017.
- TSENG, B. S.; *et al.* A Biofilm Matrix-Associated Protease Inhibitor Protects *P. aeruginosa* from Proteolytic Attack. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 2, 2018.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O uso de softwares na caracterização de profagos em bactérias da espécie *Helicobacter pylori*

Sousa<sup>1</sup>, S.L.; Silva<sup>1</sup>, H.V.; Crispim<sup>1</sup>, J.S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais - Setor de biologia Coltec.

E-mail:sandraleticiabio@gmail.com

**Resumo:** Este trabalho foi desenvolvido durante a graduação do curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais e teve como objetivo promover a caracterização inicial de profagos presentes na espécie : *Helicobacter pylori*, uma bactéria patogênica e de grande interesse médico devido a algumas características como: sua capacidade cosmópole, difícil erradicação devido a altas taxas de resistência a antibióticos convencionais e impressionante adaptação e sucesso reprodutivo em um ambiente extremamente inóspito. Para a caracterização de profagos foi utilizada como metodologia apenas softwares de bioinformática.

**Palavras-chave:** Profagos, Bioinformática, *Helicobacter pylori*, Bacteriófagos, Microbiologia.

### 1. Introdução

Bactérias com múltiplos mecanismos de resistência a antibióticos estão se tornando cada vez mais expressivas e são um problema para a saúde pública (Medina-Morales et al., 2015). Bactérias da espécie *Helicobacter pylori* são um exemplo de adaptação com múltiplos processos de resistência a antimicrobianos. Importante ressaltar que o mau uso desses medicamentos acelerou esse processo (Sousa et al., 2017). A *H. pylori* está intimamente relacionada a úlceras e gastrites crônicas, além de câncer na mucosa gástrica de seres humanos (Uemura et al., 2001). Além disso, essa espécie é cosmopolita e está extremamente adaptada ao ambiente ácido do estômago humano, sendo descrito como um dos patógenos mais bem sucedidos (Kusters et al., 2006).

Uma forma de combate que vem sendo pensada contra bactérias patogênicas e multirresistentes aos fármacos é a fagoterapia. Esta é uma alternativa que diminui a chance de infecções oportunistas e o insucesso de antibióticos convencionais (Cordeiro et al., 2016). A fagoterapia é realizada por meio de profagos, vírus que infectam exclusivamente bactérias e estão realizando o ciclo lisogênico, ou seja, são uma sequência viral integrada ao DNA da célula bacteriana. Esses bacteriófagos podem eventualmente, em uma situação de estresse, realizar o ciclo lítico e promover a lise da célula bacteriana a procura de outras células hospedeiras (Fortier & Sekulovic, 2013).

Os bacteriófagos estão intimamente relacionados ao *fitness* bacteriano e ao seu potencial patogênico (UCHIYAMA et al, 2013), sendo também responsáveis pela variabilidade presente no genoma bacteriano. Portanto, entender a evolução desses organismos pode auxiliar na compreensão da evolução de seus hospedeiros (Casjens, 2003). Uma forma de investigar a relação entre profagos e bactérias é através da bioinformática, um campo interdisciplinar que permite a análise e interpretação de vários dados biológicos com uma velocidade superior as análises práticas convencionais, pois análises de metagenômica geram um conjunto de dados em volume muito superior a análises tradicionais (Almeida & De Martinis, 2019). Portanto, este trabalho teve como objetivo fazer uma análise detalhada e comparativa de todos os genomas fechados de *H. pylori*, depositados no banco de dados do centro nacional de informação tecnológica NCBI, através de softwares de bioinformática e promover uma caracterização de profagos relacionados a essa espécie.

## 2. Metodologias

### 2.1 Aquisição e comparação dos genomas bacterianos

Para promover a caracterização genômica de profagos nessa espécie, inicialmente, foi feito o *download* de 171 genomas fechados de bactérias da espécie *H. pylori* disponíveis no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esses genomas foram separados em regiões geográficas de forma manual para facilitar o processo de caracterização. Para realizar um alinhamento simples e comparar genomas pequenos identificando sequências homólogas, foi utilizado o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) – Uma ferramenta também disponível no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 2.2 Caracterização dos profagos

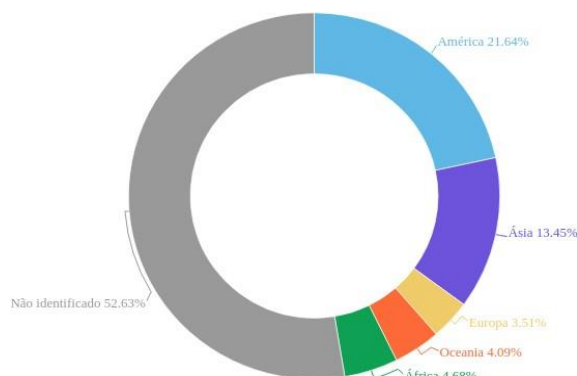
O programa PHASTER (*Phage Search Tool Enhanced Release*) (<https://phaster.ca>) foi utilizado para analisar os genomas bacterianos, adquiridos no NCBI e identificar prováveis regiões de profagos, seu tamanho, sua posição no genoma e seu conteúdo guanina-citosina (GC).

As regiões profago-*like* identificadas pelo PHASTER foram encaminhadas ao VirFam (<http://biodev.cea.fr/virfam/>), um programa que compara a sequência fornecida com um banco de dados e reconhece proteínas virais, como as com função estrutural (cabeça, pescoço e cauda) e recombinases. A partir desse reconhecimento, este programa classifica o genoma viral dentre as famílias da ordem *Caudovirales* (LOPES et al, 2014).

## 3. Resultados e discussão

*H. pylori* é uma bactéria extremamente adaptada ao ambiente ácido do estômago humano (Suerbaum e Michetti, P 2002) e pode provocar inúmeras alterações patogênicas no organismo. Para promover a caracterização de profagos nessa espécie foram catalogados a origem dos 171 genomas fechados de *H. pylori*, Figura 1. Dentre eles, 37 genomas (21,63%)

pertenciam ao continente americano, 6 (3,5%) ao Europeu - 23 (13,4%) ao Asiático, 8 (4,67%) ao Africano e 7 (4%) a Oceania. Além disso, 90 genomas (52,6%) não tinham informações sobre sua origem.



**Fig 1: Distribuição geográfica dos genomas fechados de *Helicobacter pylori* disponíveis no NCBI**

### Identificação profagos

Os profagos pertencem à ordem *Caudovirales* (Ackermann, 2003). Constituída por vírus de DNA fita dupla, não envelopados e compostos por duas partes distintas: cabeça e cauda. Atualmente, são relatadas nove famílias com quase 2.000 espécies. (ICTV-2020). Podem atuar no processo evolutivo das bactérias a medida em que realizam o processo de transdução entre seus hospedeiros. A transdução é a transferência de genes entre bactérias mediada por profagos. Conforme dito anteriormente, bactérias da espécie *H. pylori* possuem altas taxas de resistência a antimicrobianos. O processo de transdução pode ser uma hipótese para explicar a aquisição de genes de resistência apresentados por essa bactéria (DAVIS; WHITE, 2002). Já foi relatado a transferência de genes de resistência a antimicrobianos por bacteriófagos inclusive entre espécies diferentes (MAZAHARI NEZHAD FARD et al, 2011; WATANABE e FUKASAWA, [1961.]). A transdução também pode ser uma hipótese para elucidar a impressionante adaptação apresentada pela *H. pylori* a um ambiente extremamente inóspito em que ela vive. Para comprovar essas hipóteses é necessário o desenvolvimento contínuo da pesquisa. Dos 171 genomas analisados, 54 genomas (31,5%) foram classificados como portadores de regiões profago-*like*, sendo 18 genomas (33%) da América,

13 (24%) Asiáticos, 21 (38,8%) Europeus e 2 (3,7%) da Oceania. Desses genomas, as linhagens 29 Cap (américa), B38 (Europa) e 476AEK5 (Europa) apresentam 2 regiões profago- *like* distintas e os outros 51 genomas apresentam 1 região profago- *like*. As linhagens Lithuania 75, HPB14, V225D, Puno 120, Gambia 94/24, Else 37 e HP42K – apresentavam plasmídeos que também foram analisadas quanto a presença de profagos. Foi encontrada 1 região profago- *like* no plasmídeo da HP42K.

Outra aplicação da caracterização de profagos é a tentativa de indução ao ciclo lítico, promovendo a lise celular dos hospedeiros e um tratamento alternativo aos antibióticos convencionais, processo já relatado em bacteriófagos de várias espécies. A indução de profagos a um ambiente estressante pode ocorrer com a utilização de luzes UV ou antibióticos, como a Mitomicina-C, que estresse a bactéria hospedeira (Crispim et al 2019, Probióticos, 2016).

Neste trabalho a bioinformática obteve resultados consistentes e semelhantes aos presentes na literatura. Ela foi usada, pois permite a otimização de análises biológicas, mesmo que ainda seja uma disciplina pouco difundida na área de graduação (Difusão & Biotecnologia, 2008). A metodologia foi escolhida antes do momento histórico da Pandemia mundial do Novo Coronavírus, ocorrido em 2020, que impôs que as atividades não essenciais fossem paralisadas presencialmente. Contudo, essa paralisação não impediu que a pesquisa continuasse, pois, as ferramentas escolhidas puderam ser usadas sem a necessidade do deslocamento ao laboratório. Demonstrando mais uma das vantagens da utilização da bioinformática em análises microbiológicas.

#### 4. Conclusões

A bioinformática como ferramenta na caracterização de profagos, demonstrou eficiência em análises microbiológicas e foi uma vantagem utilizada na pesquisa durante o enfrentamento do novo coronavírus. A caracterização inicial de profagos de *H. pylori* levantou hipóteses interessantes instigando a necessidade de continuação da pesquisa.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq.

#### 6. Agradecimentos

Gostaria de agradecer especialmente ao Patrick Leandro por ter me ajudado, mesmo que a distância, a resolver problemas no meu desktop, garantindo minha continuação no trabalho, além de ser o melhor ouvinte com o qual pude compartilhar minhas ideias e frustrações relacionadas à pesquisa. Gostaria de agradecer também a Nina que foi minha única companhia presencial durante o isolamento social imposto pela quarentena, ambos me instigam constantemente a perseguir meus objetivos.

#### 7. Referências

- Ackermann, H.-W. (n.d.). *bacteriophage observation and evolution.pdf*.
- Almeida, O. G. G., & De Martinis, E. C. P. (2019). Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 69–82. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9464-9>
- Cordeiro, M., Uber, A., De Souza, L., & Helbel, C. (2016). Fagoterapia: Uma alternativa simples e barata para o tratamento de infecções bacterianas resistentes à antibioticoterapia. *Revista UNINGÁ Review*, 26(2), 31–34.
- Crispim, J. S., Dias, R. S., Laguardia, C. N., Araújo, L. C., da Silva, J. D., Vidigal, P. M. P., de Sousa, M. P., da Silva, C. C., Santana, M. F., & de Paula, S. O. (2019). Desulfobrio alaskensis prophages and their possible involvement in the horizontal transfer of genes by outer membrane vesicles. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.016>
- Difusão, D. E. D. E., & Biotecnologia, D. A. (2008). a Bioinformática Como Instrumento De Inserção Digital E De Difusão Da Biotecnologia. *Revista Eletrônica Extensão Cidadã*, 5(1).
- Fortier, L. C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>

Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>

Medina-Morales, D. A., Machado-Duque, M. E., & Machado-Alba, J. (2015). Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Revista Médica de Risaralda*, *21*(1), 74–74.

Probióticos, L. (2016). *DISEÑO DE UN ENSAYO POR PCR PARA LA DETECCIÓN DE PROFAGOS EN LACTOBACILOS PROBIÓTICOS* Delfina Zaburlin.

Sousa, T. C. de, Almeida, U. T. de F. H., & Bastos, D. A. de O. (2017). H. Pylori Implicações atuais e a resistência à terapia antimicrobiana revisão de literatura. *Pará Research Medical Journal*, *1*(3), 1–7. <https://doi.org/10.4322/prmj.2017.028>

Uemura, N., Examinación, H., & Uemura, N. (2001). HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND THE DEVELOPMENT OF GASTRIC CANCER. *The New England Journal of Medicine*, *345*(October), 784–789. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa001999>

---



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DE *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-835 EM MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL

Souza, R. O.<sup>1</sup>; Miranda, V. C.<sup>1</sup>; Quintanilha, M. F.<sup>1</sup>; Gallotti, B.<sup>1</sup>; De Jesus, L. C. L.<sup>2</sup>; Azevedo, V. A. C.<sup>2</sup> e Martins, F. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Genética

E-mail: ramonsouza8@hotmail.com

**Resumo:** O 5-Fluouracil (5-FU) é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, sua administração está associada à elevada incidência de mucosite intestinal (MI) em pacientes oncológicos. Esta condição é caracterizada pela inflamação e ulceração da mucosa intestinal devido à inespecificidade do quimioterápico sobre as células cancerígenas. Atualmente, não existe tratamento curativo para a MI; portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* BAA-835 em modelo murino de MI induzida por 5-FU. Camundongos Balb/c foram divididos em grupos controle (CTL) e Mucosite (MUC), que receberam 0,1 mL de salina por via intragástrica, e grupos Controle Probiótico (AKK) e tratamento com mucosite induzida (AKK+MUC), que receberam 0,1 mL do probiótico na dose de 10<sup>9</sup> UFC, pela mesma via. Para a indução da mucosite, os animais pertencentes aos grupos MUC e AKK+MUC receberam, por via intraperitoneal, 300 mg/Kg de 5-FU. Ao 3º dia após a indução da mucosite os animais foram sacrificados. A partir do dia da indução da doença, a avaliação clínica dos animais foi mensurada pelo índice de atividade da doença (DAI), que apresentou redução estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos AKK+MUC e MUC. Já os parâmetros imunológicos avaliados por meio das enzimas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), e citocina TNF, apresentaram redução significativa, enquanto a sIgA e citocina anti-inflamatória IL10 apresentaram aumento significativo após a administração probiótica. Portanto, o uso de *A. muciniphila* foi capaz de atenuar os danos causados pela mucosite induzida por 5-FU.

**Palavras-chave:** probiótico; *Akkermansia muciniphila*; mucosite intestinal; câncer

### 1. Introdução

O 5-FU é um dos quimioterápicos mais frequentemente prescritos contra uma variedade de tumores, principalmente os que acometem o cólon e reto (Muresan-Pop et al., 2020; Wang, Han e Zhang, 2019). Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere no metabolismo dos nucleosídeos, podendo ser incorporado ao RNA e DNA, levando à citotoxicidade e morte celular (Longley, Harkin e Johnston, 2003). Por não fazer distinção entre as células sadias e neoplásicas, o 5-FU resulta em efeitos colaterais graves, como por exemplo, náusea, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, diarreia, mielossupressão e mucosite (Sara et al., 2018; Song et al., 2016; Thomas et al., 2016; Wang, Han e Zhang, 2019).

A mucosite é caracterizada pela inflamação e ulceração da mucosa intestinal (Beutheu et al., 2014). Essa doença é considerada um fator limitante no tratamento contra o câncer, justificando interrupções ou redução no tratamento, com consequente aumento da morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a esta terapia (Atiq et al., 2019)

O uso de probióticos tem sido considerado uma importante estratégia terapêutica para o tratamento das doenças gastrointestinais, como a mucosite, graças às suas possíveis propriedades anti-inflamatórias (TANG et al., 2017). Atualmente, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar novas linhagens probióticas que apresentam diferentes efeitos protetores devido à modulação da microbiota intestinal (Bautista-Gallego et al., 2019),

e alguns autores já demonstraram que os probióticos melhoram o quadro de doenças gastrointestinais, como é o caso da mucosite intestinal (De Jesus et al. 2019).

Sendo assim, é crescente a busca por novos microrganismos que possuam efeitos probióticos capazes de estabelecer tais benefícios ao hospedeiro, como é o caso da *Akkermansia muciniphila*.

Dentre seus possíveis mecanismos de ação, já foi demonstrado que *A. muciniphila* estimula a taxa de renovação de muco a partir da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGGC), sendo estes a principal fonte de energia para o epitélio do hospedeiro sintetizar e secretar mucina (Zhou, 2017). Também já foi observado que a administração de *A. muciniphila* aumentou o número de células caliciformes em camundongos (Shin et al., 2014), e está fortemente associada ao espessamento da camada de muco e à integridade da barreira intestinal em humanos e animais (Everard et al., 2013). Tal microrganismo é capaz, ainda, de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL10), promover o aumento de células T<sub>reg</sub>, estimular a produção de peptídeos antimicrobianos e regular a integridade da barreira intestinal (Derrien, Belzer e de Vos, 2017; Naito, Uchiyama e Takagi, 2018).

Assim, uma vez que tal bactéria possa apresentar impacto positivo para o tratamento da mucosite intestinal, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial probiótico de *A. muciniphila* BAA-835 em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

## 2. Metodologias

### 2.1 Microrganismo

*Akkermansia muciniphila* BAA-835 foi obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC). A bactéria foi cultivada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, MD, USA) e preservado em glicerol 20% à - 80 °C. Sua reativação foi procedida em caldo BHI suplementado com hemina (0,1%), menadiona (0,1%), extrato de levedura (5 g/L), L-cisteína (0,5 g/L) e mucina (0,1%) e incubado a 37°C por 48 horas, em jarra anaeróbica, utilizando o kit comercial ANAEROBAC® como sistema de geração de atmosfera anaeróbica. A cultura foi concentrada à 10<sup>10</sup> UFC/mL.

### 2.2 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas foram utilizados. Os animais receberam ração sólida esterilizada por calor úmido e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como, aeração, umidade (60-80%) e temperatura (22 ± 1°C) também foram controladas. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina) (Wirtz et al., 2007). Para o desenvolvimento experimental foram utilizados 7 animais por grupo. Todos os experimentos propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG, protocolo 186/2012).

### 2.3 Indução mucosite

Para indução da mucosite, foi utilizado o quimioterápico 5-FU (Fauldfluour®, Libbs, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam dose única de 300 mg/kg, no dia dez (desafio), por via intraperitoneal, e sacrificados no terceiro dia após a administração do quimioterápico, conforme descrito por MAIOLI e colaboradores (2014). Como controle, foi utilizada solução salina 0,85% estéril, pela mesma via.

### 2.4 Delimitação Experimental

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, sendo eles: I– CTL (controle negativo), II – AKK (tratado com *A. muciniphila* (10<sup>9</sup> UFC), sem indução de mucosite), III– MUC (indução de mucosite com 5-FU, mas sem tratamento probiótico e IV– AKK+MUC (tratado com *A. muciniphila* (10<sup>9</sup> UFC), e mucosite induzida com 5-FU). O tratamento probiótico foi administrado por via intragástrica durante todo o protocolo experimental (14 dias), e salina foi administrada pela mesma via aos animais pertencentes aos grupos CTL e MUC.

### 2.5 Parâmetros clínicos

A avaliação clínica dos animais foi baseada em um escore acumulativo (0 – 10) pela análise de três parâmetros diferentes: (1) consistência das fezes (0 = normal, 1= mole porém ainda formada, 2= muito mole, 3= líquida); (2) presença de sangue nas fezes por meio do Kit Feca-Cult (0= negativo para presença de sangue oculto, 1= positivo para presença de sangue oculto, 2= sangue visível nas



fezes, 3= sangramento retal) e (3) perda de peso dos animais (0 = menos de 1% de perda de peso; 1 = 1 a 5% de perda de peso; 2 = 5 a 10% de perda de peso; 3= 10 a 20% de perda de peso; 4 = mais de 20% de perda de peso). A construção e interpretação do índice de atividade da doença (DAI), foi adaptado de Albert et al. (2010).

## 2.6 Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase

A presença de eosinófilos e neutrófilos no íleo foi medida determinando a atividade das enzimas EPO e MPO. Para isso foram utilizados 100 mg de tecido para cada enzima. A determinação da atividade da EPO e MPO foi realizada de acordo com o descrito por Miranda e colaboradores (2020). Os resultados foram expressos por densidade óptica a 492 nm e 450 nm, respectivamente.

## 2.7. Dosagem de sIgA

A determinação do nível de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA. Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado e processado de acordo com o protocolo descrito por Pedroso e colaboradores (2015). Após o ensaio, as leituras foram realizadas a 492 nm.

## 2.8. Dosagem de Citocinas por q-PCR

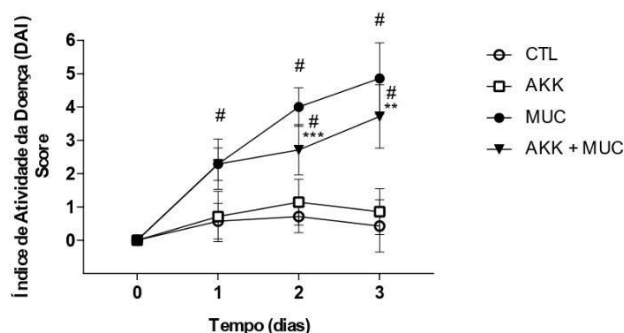
O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Este foi analisado qualitativamente e quantitativamente por eletroforese em gel de agarose 1,5% e espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (ThermoFisher). Em seguida, as amostras foram purificadas com DNase I (Invitrogen, ThermoFisher) para remoção de DNA genômico, e o cDNA sintetizado utilizando Kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante. A partir do cDNA, foi realizada a PCR quantitativa (qPCR) no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System utilizando PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A expressão de genes alvo foi analisada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando a  $\beta$ -actina como referência endógena.

## 2.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os testes foram realizados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, sendo considerados significativos os valores com  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

A avaliação clínica dos animais demonstrou de forma concisa que a administração do antineoplásico em animais pertencentes ao grupo MUC resultou em um DAI significativamente maior em relação ao controle nos dias 1, 2 e 3, alcançando níveis próximos a 5. Por sua vez, o tratamento probiótico preventivo apresentou redução significativa do DAI nos dois últimos dias, quando comparado ao grupo doente, sugerindo uma redução da gravidade dos sintomas clínicos causados por 5-FU (Figura 1).



**Figura 1** - Índice da atividade da doença após indução da mucosite. Símbolos indicam diferença estatística significativa, sendo # diferença entre os grupos CTL/MUC e MUC + AKK/CTL, e \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , entre os grupos MUC e AKK + MUC determinado por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Considerando os parâmetros clínicos utilizados para construção do DAI, a perda de peso é o mais comumente observado na mucosite, sendo justificado pela redução da absorção dos nutrientes devido à diminuição do comprimento das vilosidades intestinais e intensa perda de água e eletrólitos ocasionada pela diarreia (De Jesus et al., 2019).

Por sua vez, a consistência das fezes pode ser afetada por alterações no controle osmótico, na motilidade intestinal ou mudanças no perfil microbiano. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a migração de neutrófilos para o epitélio promova aumento na permeabilidade intestinal, favorecendo a ocorrência de diarreia, podendo ser acompanhada por sangue (Stringer, 2008).

Além disso o desenvolvimento da mucosite intestinal induzido por quimioterápicos é um dos principais estímulos para o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para a mucosa intestinal (SONIS, 2004). Nossos resultados demonstraram que a administração do quimioterápico resultou em um intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e eosinófilos no íleo, sendo que o tratamento probiótico foi capaz de atenuar a inflamação local (Figura 2A e 2B).

Em relação à produção de sIgA no fluido intestinal, foi observada redução estatisticamente significativa nos animais pertencentes ao grupo doente (MUC), quando comparado ao controle, contudo, o tratamento com probiótico foi capaz de reverter o quadro, elevando os níveis de sIgA (Figura 2C).

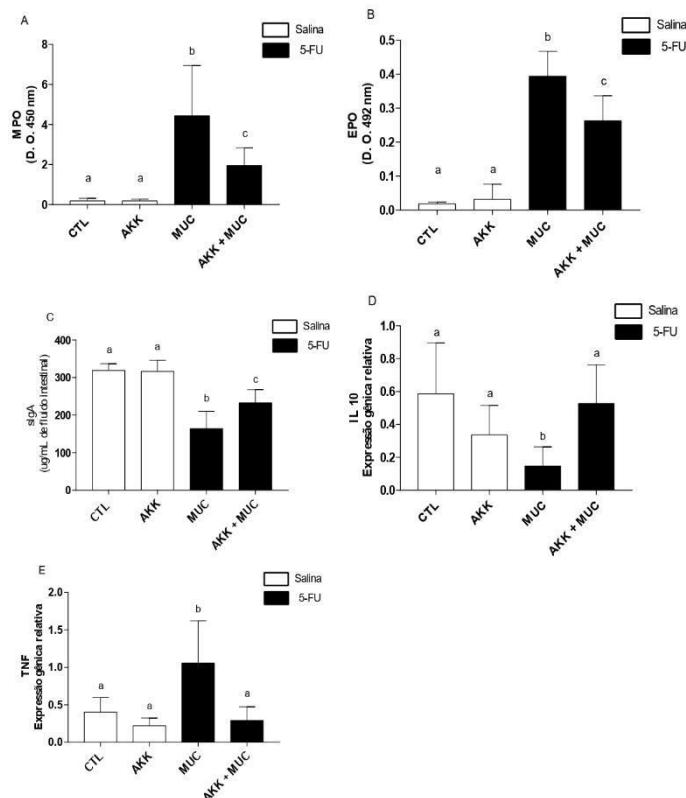
É reportado na literatura que o uso de quimioterápicos afeta a morfologia da mucosa intestinal, e que o uso de 5-FU promove uma diminuição do número de células presentes no tecido linfoide associado ao intestino, com consequente redução na produção de sIgA (Nagayoshi et al., 2005). No entanto, o efeito da administração de *A. muciniphila* no aumento da produção de sIgA em animais com mucosite, pode estar relacionado à preservação no número de linfócitos presentes no GALT (Barros, de et al., 2018).

Com relação a citocina IL10 (Figura 2D), nota-se uma redução significativa no grupo mucosite não tratado em relação ao grupo controle. Contudo, a administração do probiótico foi capaz de reverter este efeito, promovendo um aumento estatisticamente significativo na expressão desta citocina, sugerindo um efeito benéfico exercido pelo probiótico.

Em contraste, os níveis de TNF no grupo mucosite apresentaram-se elevados em relação ao controle, e significativamente reduzidos no grupo tratado quando comparado ao grupo doente (Figura 2E).

É reportado na literatura que a bactéria *A. muciniphila* está envolvida na modulação da

resposta imune, especificamente na estimulação da produção de IL10 (Naito, Uchiyama e Takagi, 2018). Devido ao seu caráter anti-inflamatório, o acúmulo de IL10 pode ter contribuído para supressão da síntese da citocina pró-inflamatórias analisada (TNF).



**Figura 2** – Avaliação dos níveis de (A) MPO, (B) EPO, (C) sIgA, (D) IL 10 e (E) TNF, em amostras de íleo de camundongos. Barras brancas representam animais sem indução de mucosite e barras pretas representam animais com mucosite induzida por 5-FU. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa entre grupos ( $p < 0,05$ ), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.

#### 4. Conclusão

Os resultados apresentados sugerem que *A. muciniphila* apresenta efeito imunomodulador capaz de melhorar os sinais clínicos e imunológicos de animais com mucosite induzida por 5-FU.

#### 5. Apoio Financeiro PRONEM/FAPEMIG, UFMG, Capes

## 6. Referências

- ALBERT, E.; WALKER, J.; THIESEN, A.; CHURCHILL, T.; MADSEN, K. cis-Urocanic Acid Attenuates Acute Dextran Sodium Sulphate-Induced Intestinal Inflammation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13676, 27 out. 2010.
- ATIQ, A.; SHAL, B.; NAVEED, M.; KHAN, A.; ALI, J.; ZEESHAN, S.; AL-SHARARI, S. D.; KIM, Y. S.; KHAN, S. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. **European Journal of Pharmacology**, v. 843, n. November 2018, p. 292–306, jan. 2019.
- BARROS, P. A. V.; ANDRADE, M. E. R.; GENEROSO, S. V.; MIRANDA, S. E. M Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n. January, p.1567–1576, jul. 2018.
- BAUTISTA-GALLEGO, J.; FERROCINO, I.; BOTTA, C.; ERCOLINI, D.; COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. Probiotic potential of a *Lactobacillus rhamnosus* cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. **Food Research International**, v.119, n. January, p. 305–314, maio 2019.
- BEUTHEU, S.; OUELAA, W.; GUÉRIN, C.; BELMONTE, L.; AZIZ, M.; TENNOUNE, N.; BÔLE-FEYSOT, C.; GALAS, L.; DÉCHELOTTE, P.; COËFFIER, M. Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 694–701, ago. 2014.
- DE JESUS, L. C. L.; DRUMOND, M. M.; CARVALHO, A.; SANTOS, S. S.; Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Lactis CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. **Journal of Functional Foods**, v. 53, n. October 2018, p. 197–207, fev. 2019.
- DERRIEN, M.; VAUGHAN, E. E.; PLUGGE, C. M.; VOS, W. M. DE. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1469–1476, 1 set.2004.
- EVERARD, A. et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 28 maio 2013.
- FAO/WHO, F. AND A. O. OF THE U. N. W. H. O. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, 2002.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003.
- MAIOLI, T. U.; MELO SILVA, B. DE; DIAS, M. N.; PAIVA, N. C.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O.; Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 6, 11 dez. 2014.
- MIRANDA, V. C.; SANTOS, S. S.; ASSIS, H. C.; FARIA, A. M. C.; QUINTANILHA, M. F.; MORÃO, R. P.; NICOLI, J. R.; CARA, D. C.; MARTINS, F. S. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A- 905 in a murine model of food allergy. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 3, p. 255–268, 11 maio 2020.
- MURESAN-POP, M.; CHERECHES, G.; BORODI, G.; FISCHER-FODOR, E.; SIMON, S. Structural characterization of 5-fluorouracil& piperazine new solid forms and evaluation of their antitumor activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1207, p. 127842, maio 2020.
- NAGAYOSHI, H.; FUKATSU, K.; UENO, C.; HARA, E.; MAESHIMA, Y.; OMATA, J.; HIRAIDE, H.; MOCHIZUKI, H. 5- Fluorouracil Infusion Reduces Gut-Associated Lymphoid Tissue Cell Number and Mucosal Immunoglobulin A Levels. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 395–400, 5 nov. 2005.
- NAITO, Y.; UCHIYAMA, K.; TAKAGI, T. A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila*. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 33–35, maio 2018.
- PEDROSO, S. H. S. P. et al. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 1950–1960, 1 out. 2015.
- SARA, J. D.; KAUR, J.; KHODADADI, R.; REHMAN, M.; LOBO, R.; CHAKRABARTI, S.; HERRMANN, J.; LERMAN, A.; GROTHEY, A. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, n. 6, p. 18, 18 jan. 2018.
- SHIN, N. R.; LEE, J. C.; LEE, H. Y.; KIM, M. S.; WHON, T. W.; LEE, M. S.; BAE, J. W. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Gut**, v. 63,

n. 5, p. 727–735, 2014.

SONG, M.; BAIK, H. W.; HONG, S.-G.; SUNG, M.-K. Wheat bran arabinoxylan supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 312–320, mar. 2016.

SONIS, S. T. Pathobiology of mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 20, n. 1, p. 11–15, fev. 2004.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.

YEOH, A. S. J. Faecal microflora and  $\beta$ -glucuronidase expression are altered in an irinotecan-induced diarrhea model in rats. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1919–1925, 28 dez. 2008.

TANG, Y.; WU, Y.; HUANG, Z.; DONG, W.; DENG, Y.; WANG, F.; LI, M.; YUAN, J. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, v. 33, p. 96–104, jan. 2017.

THOMAS, S.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 1783–1812, 15 abr. 2017.

WANG, Y.; HAN, Q.; ZHANG, H. Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracil on three digestive enzymes from the view of side effects. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 220, p. 117105, set. 2019.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 541–546, 15 mar. 2007.

WONG, D. V. T.; LIMA-JÚNIOR, R.; CARVALHO, C. B. M. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139985, 6 out. 2015.

ZHOU, K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotic in the gut, evidence from dietary intervention studies. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 194–201, jun. 2017.

---

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## PREDIÇÃO DE VACINA MULTI-EPÍTOPO CONTRA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* APLICANDO ABORDAGENS DE IMUNOINFORMÁTICA

Vilela Rodrigues<sup>1</sup>, T. C.; Azevedo<sup>1</sup>, V. A. C.; Sales-Campos<sup>2</sup>, H.; Jaiswal<sup>1</sup>, A. K.; Kato<sup>1</sup>, R. B.; Tosta<sup>1</sup>, S. F. O.; Giovanetti<sup>3</sup>, M.; Soares<sup>4</sup>, S. C.; Tiwari<sup>1</sup>, S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Laboratório de Genética Celular e Molecular.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Departamento de Biociências e Tecnologia, Laboratório de Imunologia de Mucosas.

<sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Flavivírus

<sup>4</sup> Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Bioinformática

E-mail: thaiscristinavr@gmail.com

**Resumo:** A pneumonia é uma enfermidade que causa de morte de cerca de três milhões de pessoas anualmente. O *Mycoplasma pneumoniae* é um dos principais patógenos associados à doença, com aumento significativo nos últimos anos. As vacinas são fundamentais na prevenção de infecções, além de evitarem consideravelmente a necessidade de serviços hospitalares e recursos financeiros. Dessa forma, a proposta deste estudo é determinar a partir de ferramentas de imunoinformática, uma vacina multi-epítipo contra o *M. pneumoniae*. Para isso, epítipos capazes de induzir tanto respostas celulares quanto humorais foram filtradas quanto à imunogenicidade, cobertura populacional, entre outros. Predições estruturais e análises quanto as propriedades físicas foram realizadas e a vacina construída foi considerada imunogênica, não tóxica, não alérgica e estável. Ferramentas *in silico* para clonagem e simulação imune foram utilizadas para investigar a expressão da vacina em um vetor apropriado e o potencial imunogênico, respectivamente. Para verificar a afinidade entre a vacina com o receptor Toll Like 2, o *docking* molecular está sendo realizado, além da simulação da dinâmica molecular para avaliar a estabilidade do complexo. Nesta prospecção, construímos um potencial candidato vacinal para pneumonia causada por *M. pneumoniae*. Além de contribuir para o entendimento da interação e mecanismos imunes decorrentes deste tipo de infecção, após validação experimental este trabalho poderá auxiliar na prevenção da pneumonia grande escala.

**Palavras-chave** *Mycoplasma pneumoniae*; imunoinformática; vacina multi-epítipo; vacina; simulação dinâmica; simulação imune.

### 1. Introdução

A pneumonia é uma das principais causas de mortalidade sendo responsável por cerca de 3 milhões de mortes anualmente em todo mundo (NAGHAVI et al., 2017; OTTOSEN; EVANS, 2014). Grande parte dos pacientes requer cuidados hospitalares de custo elevado e embora a pneumonia não seja uma doença restrita à países menos desenvolvidos, tem sua mortalidade intensificada em regiões com problemas econômicos, demonstrando a expressiva importância das ações políticas e socioeconômicas para tratamento e prevenção da doença (SULTANA et al., 2019). Dentre os microorganismos causadores da pneumonia, um dos mais importantes é o *M. pneumoniae* que apresenta incidência variando entre 10-40% (BAJANTRI; VENKATRAM; DIAZ-FUENTES, 2018; ONOZUKA; HASHIZUME; HAGIHARA, 2009).

Mycoplasmas são os menores seres, em relação ao tamanho genômico e celular, com capacidade de autorreplicação. Suas particularidades morfofisiológicas conferem uma capacidade biosintética reduzida, de forma que eles não conseguem produzir os componentes de uma parede celular. Esses aspectos dificultam o diagnóstico causando subnotificação, além de gerar uma resistência natural à lactâmicos. Ademais, já existem muitas linhagens de *M. pneumoniae* resistente aos macrolídeos, restringindo as opções terapêuticas (KASHYAP; SARKAR, 2010; NAGHAVI et al., 2017). Dessa maneira, visto a diversidade das linhagens de *M. pneumoniae*, as dificuldades no diagnóstico e tratamento das infecções, o desenvolvimento de uma vacina multi-



epítipo se mostra uma opção de extrema importância e caracteriza a relevância do presente estudo.

Métodos de vacinologia reversa e imunoinformática têm demonstrado serem eficientes estratégias para minimizar tempo e recursos no desenvolvimento de vacinas. Assim, vacinas multi-epítipo são constituídas por epítipos selecionados criteriosamente, que conseguem induzir tanto respostas celulares quanto humorais. Dentre os benefícios de buscar essas novas vacinas estão a possibilidade de direcionar a resposta imune à regiões conservadas do patógeno de interesse, respostas de alta capacidade imunológica e com menor chance de induzir reações adversas em relação às vacinas atenuadas ou inativadas (CHAUHAN et al., 2019; SIX et al., 2012).

Um dos maiores desafios no âmbito de desenvolvimento de vacinas se dá na capacidade imunogênica, destas formas adjuvantes são necessários para potencializar o efeito das vacinas (KARCH; BURKHARD, 2016). Além disso, a capacidade de ativar diversas vertentes do sistema imune para gerar memória imunológica também é uma das dificuldades dos métodos atuais para predição de vacinas, mas que serão abordados neste trabalho através de ferramentas de bioinformática.

## 2. Metodologia

### 2.1 Seleção dos dados

Foram obtidas do banco de dado NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) as sequências em formato FASTA de 8 proteínas selecionadas previamente por vacinologia reversa (VILELA RODRIGUES et al., 2019), pertencentes ao core genoma de 88 linhagens de *M. pneumoniae*, além de duas proteínas adesinas, P1 e P30, consideradas altamente imunogênicas por estudos *in vivo/in vitro* (BASEMAN et al., 1982).

### 2.2 Predição de epítipos

Para selecionar os epítipos de maior confiança, duas plataformas diferentes foram utilizadas para realizar as predições de epítipos de MHC de classe I que interagem com linfócitos T citotóxicos e MHC II que ativam linfócitos T auxiliares. Para isso as plataformas do IEDB (Immune Epitope Database and Analyses Resource), NETCTL e NETMHCII 2.3 server foram utilizadas com buscas baseadas nos

alelos mais frequentes na população e alteração dos parâmetros de acordo com a classe de MHC. Os epítipos lineares de células B foram selecionados através da Ferramenta ABCpred.

### 2.3 Sobreposição de epítipos e filtragens

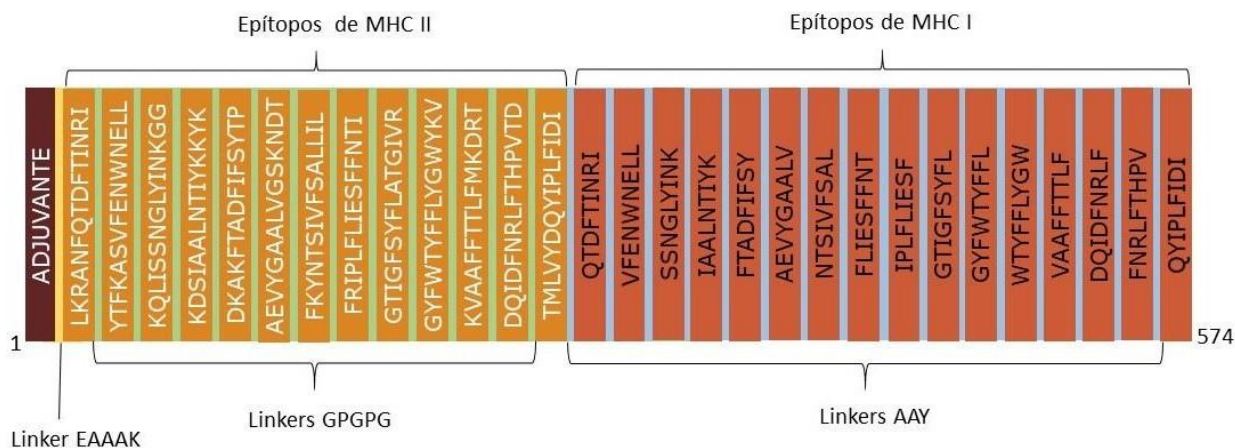
A fim de selecionar os epítipos de MHC I ou MHC II de alta confiança e buscar sobreposições entre cada uma dessas classes de epítipos com epítipos de células B, um script *in house* desenvolvido na linguagem python foi utilizado. Somente esses epítipos de alta confiança e capazes de induzir respostas humorais e celulares foram mantidos. Os outros critérios aplicados para filtrar os epítipos foram: apresentar pontuação > 0.1 para os epítipos de MHC I de acordo com os resultados da ferramenta *Immunogenicity* do IEDB; e os epítipos de MHC II, foram filtrados de acordo com o IC50, nos quais mantivemos aqueles com índices abaixo de 50nM. Por fim, buscamos sobreposições entre epítipos de MHC de classe I e II e mantivemos somente esses epítipo. Todas as buscas por sobreposição e filtragens foram feitas para cada proteína separadamente.

### 2.4 Construção da vacina multi-epítipo

Os epítipos que se adequaram à todos critérios descritos foram unidos por peptídeos *linkers*. O *linker* AAY foi utilizado para unir epítipos CTL e para os epítipos HTL utilizamos o GPGPG. Selecionamos como adjuvante a sequência da cadeia  $\beta$  do precursor da enterotoxina da *Escherichia coli* a fim de potencializar a capacidade imune, seguida do *linker* EAAAK. A sequência formada foi submetida às ferramentas Allertop, ToxinPred, VaxiJen, IFNepitope para avaliar a propensão alergênica, tóxica, a antigenicidade e capacidade de indução de IFN- $\gamma$  pela vacina predita respectivamente. Além disso a sequência foi submetida ao BLASTp contra o proteoma humano para verificar o grau de similaridade e ao ProtParam para avaliar as características físico-químicas.

### 2.5 Predições estruturais

A estrutura secundária da proteína quimérica formada foi predita através do PSIPRED e a estrutura terciária através do Phyre2, método intensivo. A ferramenta Galaxy refiner foi utilizada para aprimorar a estrutura modelada. A estrutura de



**Figura 1:** Representação esquemática da vacina multi-epítipo contra *Mycoplasma pneumoniae* construída.

A vacina é composta pela sequência do adjuvante na região N-terminal seguido do linker EAAAK (amarelo). Epítomos de MHC II (laranja) estão unidos por linkers GPGPG (verde) e epítomos de MHC I estão em vermelho unidos por linkers AAY (azul).

melhor qualidade foi submetida à ferramenta Ellipro para predição de epítomos lineares e conformacionais de células B.

## 2.6 Docking e simulação da dinâmica molecular

O Receptor Toll like 2 foi determinado um dos mais importantes no reconhecimento e indução de respostas imunes contra o *M. pneumoniae*, dessa forma, recuperamos 2 estruturas referentes à esse receptor do Protein Data Bank (ID:2z7x e 6nig) como receptores e utilizamos a plataforma SwarmDock server para realizar o docking molecular com a vacina construída como ligante. Posteriormente, a conformação de menor energia será submetida à simulação da dinâmica molecular para entender as propriedades estruturais microscópicas desse complexo. Para isso o programa Gromacs v5.0 será utilizado.

## 2.7 Clonagem in silico e simulação imune in silico

Para verificar a capacidade de clonagem e expressão da vacina multi-epítomos, a ferramenta Jcat foi utilizada para tradução reversa e otimização de códon para linhagem K12 de *E. coli*. Depois, a visualização do inserto inserido no plasmídeo pET-28a(+) foi realizada através da ferramenta SnapGene. A ferramenta C-ImmSim foi utilizada para simulação da resposta imune. Três injeções contendo 1000 unidades da vacina foram determinadas com intervalo de 4 semanas entre cada injeção. O total de etapas foi alterado para 1050 e os outros parâmetros foram mantidos. Para checar a

efetividade dos epítomos selecionados, refizemos a análise, entretanto submetemos apenas a sequência do adjuvante para compararmos com a simulação resultante da vacina.

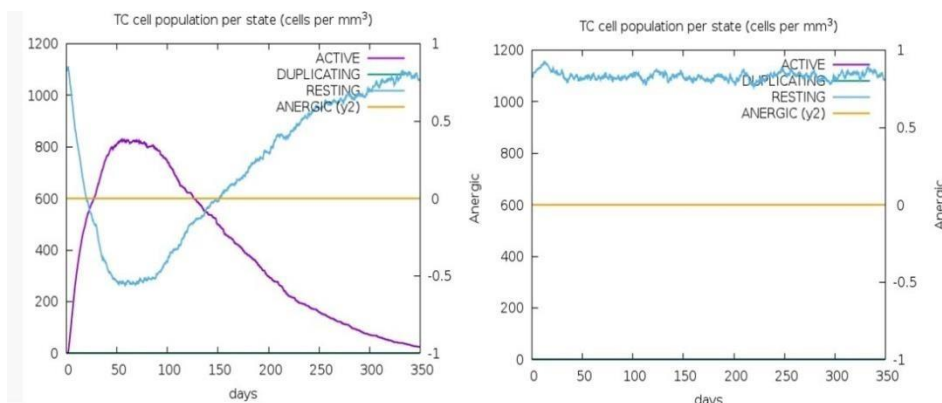
## 3. Resultados e Discussão

Para os ligantes de MHC I, foram preditos mais de 3 mil epítomos pelas duas ferramentas utilizadas e o mesmo foi encontrado para epítomos de MHC II, considerando as 11 proteínas. Foram preditos 718 epítomos de células B. Após as buscas por sobreposição e filtrações, chegamos ao total de 182 epítomos de MHC de classe I e 61 de MHC II. Esses epítomos pertencem à 8 proteínas pois durante as filtrações, algumas não apresentaram epítomos que se enquadraram nos critérios. Posteriormente, buscando sobreposição entre epítomos de MHC I e II, chegamos ao total de 16 epítomos de de MHC I e 13 de MHC II pertencentes à 5 proteínas diferentes. Esses epítomos com as melhores características foram unidos com os peptídeos *linkers* e o adjuvante de forma que a proteína quimérica formada contém 574 aminoácidos (Figura 1).

A vacina foi considerada não alergênica e não tóxica. Com pontuação de 0.64 pelo VaxiJen, demonstrou boa propensão antigênica e 57 epítomos capazes de induzir a produção de IFN- $\gamma$  foram preditos. Além disso, não houve similaridade com o proteoma humano. Esses resultados sugerem potencial imunogênico e segurança da vacina.

De acordo com os resultados do ProtParam, o peso molecular da proteína é 62.91 kD. O ponto isoeletrico é de 8.78 indicando que a vacina é





**Figura 2:** Ativação de linfócitos T citotóxicos pela vacina multi-epítopo construída.

Vacina completa (esquerda) e estímulo somente com o adjuvante (direita) em relação a população de linfócitos T citotóxicos por estado. A linha azul representa populações de linfócitos em repouso e a roxa os linfócitos ativos.

mais estável em meios básicos e apresenta um caráter hidrofóbico de acordo com o GRAVY score (0.202). Além disso, o índice de instabilidade mensurado foi de 12.76 e o índice alifático é 82.60, ambos sugerindo boa estabilidade. A meia vida estimada foi de  $>30$  horas em mamíferos,  $> 20$  em leveduras e  $> 10$  em *E. coli*.

Para avaliar a modelagem da estrutura terciária da proteína, utilizamos o gráfico Ramachandram. A porcentagem de resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis foi de 74.8% na estrutura predita pelo Phyre2. Após o refinamento, esse percentual foi de 87.3%. Através da ferramenta Ellipro foram encontrados 3 epítomos lineares e 4 conformacionais com pontuação superior a 0.7.

A expressão da nossa vacina na linhagem K12 de *E. coli* foi realizada de forma satisfatória. Através da adaptação de códon, obtivemos CAI index de 1.0 e conteúdo GC de 51.21%, valores que se enquadram nos parâmetros esperados e o clone completo foi finalizado com 6978 pares de bases. A respeito da simulação da resposta imune, foi observado um significativo aumento na população de células B de memória ao longo das injeções bem como forte produção de IgM+IgG e IgG1+IgG2 que são importantes para fixação do complemento, indução de respostas inatas e ativação de células Th1. Houve um aumento de células T helper com grande diferenciação em linfócitos Th1 que induzem produção de IFN- $\gamma$  e são células extremamente importantes para combater microrganismos intracelulares como o *M. pneumoniae*. Em comparação com os resultados da simulação realizada apenas com o adjuvante, pode-se observar uma proliferação menos intensa das populações de linfócitos B em relação a simulação da vacina. Entretanto, esse padrão não foi mantido entre as

imunoglobulinas, sugerindo que a produção de anticorpos estaria mais relacionada com o adjuvante e do que com os epítomos selecionados. Adicionalmente, a vacina induziu células T citotóxicas de forma proeminente, o que não foi observado na simulação com o adjuvante. É importante ressaltar que esse tipo de linfócito é essencial na resposta imune contra microrganismos intracelulares como o *M. pneumoniae*. Nossa vacina demonstrou bom potencial para induzir respostas imunes de diferentes vertentes, contudo, testes experimentais são necessários para validar esses achados (Figura 2).

#### 4. Conclusões

Através de abordagens de imunoinformática, foram criteriosamente selecionados epítomos de *M. pneumoniae* altamente imunogênicos e com boa cobertura populacional. Além disso, construímos uma proteína quimérica *in silico* segura e estável. Para melhor avaliar a qualidade da vacina construída, testes estruturais ainda estão sendo realizados. Apesar dos resultados promissores, a vacina também precisará passar por testes de validação, principalmente em modelos biológicos, para que sua eficácia seja ratificada.

#### 5. Apoio Financeiro

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6. Referências

- BAJANTRI, B.; VENKATRAM, S.; DIAZ-FUENTES, G. Mycoplasma pneumoniae: A Potentially Severe Infection. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 10, n. 7, p. 535, jul. 2018.
- BASEMAN, J. B. et al. Molecular basis for cytoadsorption of Mycoplasma pneumoniae. **Journal of Bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1514, set. 1982.
- CHAUHAN, V. et al. Designing a multi-epitope based vaccine to combat Kaposi Sarcoma utilizing immunoinformatics approach. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2019.
- KARCH C. P.; BURKHARD, P. **Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157411/>>. Acesso em: 14 out. 2020.
- KASHYAP, S.; SARKAR, M. Mycoplasma pneumoniae: Clinical features and management. **Lung India : Official Organ of Indian Chest Society**, v. 27, n. 2, p. 75, jun. 2010.
- NAGHAVI, M. et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1151–1210, 16 set. 2017.
- ONOZUKA, D.; HASHIZUME, M.; HAGIHARA, A. Impact of weather factors on Mycoplasma pneumoniae pneumonia. **Thorax**, v. 64, n. 6, p. 507–511, jun. 2009.
- OTTOSEN, J.; EVANS, H. Pneumonia: Challenges in the Definition, Diagnosis, and Management of Disease. **Surgical Clinics of North America**, Surgical Infections. v. 94, n. 6, p. 1305–1317, 1 dez. 2014.
- SIX, A. et al. Systems biology in vaccine design. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 295–304, mar. 2012.
- SULTANA, M. et al. Economic evaluation of community acquired pneumonia management strategies: A systematic review of literature. **PLOS ONE**, v. 14, n. 10, p. e0224170, 24 out. 2019.
- VILELA RODRIGUES, T. C. et al. Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against Mycoplasma pneumoniae: a causative agent of pneumonia. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 7, p. 190907, 2019.
-

## RESUMOS MICOLOGIA

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

### DIVERSIDADE E PERFIL XEROFÍLICO E HALOFÍLICO DE FUNGOS PRESENTES EM ROCHAS DO DESERTO POLAR DA ANTÁRTICA CONTINENTAL

Alves<sup>1</sup>, S. E. O.; Menezes<sup>1</sup>, G. C. A.; Souza<sup>4</sup>, C. D.; Oliveira<sup>3</sup>, F. S.; Schaefer<sup>2</sup>, C. E. G. R.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Geografia.

<sup>4</sup> Instituto Federal de Minas Gerais, Coordenadoria de Geografia.

E-mail: stephanie.evelin@gmail.com

**Resumo:** Dentre os microrganismos extremófilos, há aqueles que habitam a superfície e o interior de rochas, que têm sido o foco de pesquisas com diversos tipos de enfoque por serem capazes de sobreviver em ambientes tão extremos. As superfícies rochosas são consideradas um ambiente inóspito, devido às condições extremas de temperatura, contato direto com o ar, mudanças rápidas na atividade da água e alta radiação ultravioleta (UV) da Antártica. Entretanto, os fungos que colonizam as superfícies rochosas e minerais desempenham um importante papel como agentes geotivos nestes ecossistemas. Os fungos encontrados nesses ambientes são considerados extremófilos e possuem adaptações morfofisiológicas e acredita-se que haja uma relação direta entre resistência à seca, à alta salinidade e ao frio. Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar os fungos do deserto polar Antártico. Até o presente momento, os resultados mostram um número restrito de espécies cultiváveis, encontradas predominantemente na crosta salina das rochas. Dentre os táxons encontrados e identificados, o gênero *Penicillium* se destaca em relação à alta resistência em baixa atividade de água e todos os táxons isolados em meio seletivo confirmaram-se halófilos. Esses resultados demonstram que a comunidade fúngica cultivável presente em rochas de Heritage Range, parte sul das montanhas Ellsworth é composta por fungos adaptados a condições extremas de estresse salino e resistência a baixa atividade de água.

**Palavras-chave:** fungos; extremófilos; halofilia; xerofilia; Antártica.

### 1. Introdução

O complexo de montanhas Heritage Range forma a metade sul das Montanhas Ellsworth na Antártica e é composto principalmente de conglomerados de mármore e calcário da formação Glaciar Union, que são recobertos por grauvaques e conglomerados, xistos e argilitos das formações Hyde Glacier e Drake Icefall (Fogwill et al. 2012). Heritage Range possui clima típico de baixo planalto da Antártica continental, pouca precipitação e fortes ventos catabáticos, consistindo uma região com picos dispersos de altura moderada, nunataques e colinas (Gonçalves et al. 2017).

Apesar das condições adversas do Continente Antártico serem fatores limitantes a vida, as rochas mostram-se como micro-habitats favoráveis para a colonização de microrganismos específicos (Gorbushina 2007). Nestes ecossistemas, a comunidade fúngica pode contribuir para o bio-intemperismo das rochas, desempenhando, assim, um importante papel na formação do solo e abastecimento de nutrientes disponíveis à comunidade microbiana presente neste substrato (Gonçalves et al. 2017).

Devido às adaptações observadas em microrganismos extremófilos, acredita-se que haja uma relação direta entre resistência à seca, à alta salinidade e ao frio em fungos (Gunde-Cimerman et al., 2003). Com isso, este estudo teve como objetivo isolar, identificar e avaliar o perfil fisiológico de halotolerância e xerotolerância de fungos cultiváveis presentes em rochas de Heritage Range, Antártica Continental.

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleta

As rochas foram coletadas durante a Operação Antártica do verão austral de 2013 nas áreas livres de degelo da região do Glaciar Union que forma a parte sul do sistema das montanhas Ellsworth, na Antártica continental e alocadas em sacos plásticos estéreis Whril-Pak (Nasco, Ft. Atkinson, WI, USA). Posteriormente, o material foi transportado para o Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidas a temperatura de -20 °C até o processamento das amostras.

Ao todo, 7 rochas foram coletadas nos pontos de coleta: Edson Hills, Conglomerate Ridge, Charles Peak, Rossman Cove e Mount Dolence, listados abaixo conforme a numeração da rocha coletada em cada coordenada:

R1 - Conglomerate Ridge: 79°43'45.70"S / 83°56'2.35"W;

R2 - Charles Peak: 79°44'2.00"S / 83°10'13.38"W;

R3 - Conglomerate Ridge: 79°43'59.5"S / 83°55'58.3"W;

R4 - Edson Hills: 79°49'13.3"S / 83°38'53.1"W;

R5 - Rossman Cove: 79°48'02.4"S / 82°55'50.1"W;

R6 - Rossman Cove: 79°47'43.8"S / 82°56'36.3"W;

R7 - Mount Dolence: 79°49'18.5"S / 83°11'49.7"W.

### 2.2 Análise das rochas

Para a identificação dos tipos de rochas e crostas de sal, estas foram analisadas de acordo com observações macromorfológicas feitas nas amostras, nas quais as cores, constituintes minerais, texturas e estruturas foram descritas. As crostas de sal foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (SEM, QUANTA FEI 3D).

### 2.3 Isolamento e Processamento

Fragmentos de cada rocha foram pulverizados usando a mini máquina de perfuração STORM 0001 e 1 g de cada amostra foi adicionada à 9 mL da solução salina NaCl 0,85% e 100 µL de uma diluição de 10<sup>-1</sup> foi inoculada nos meios MEA (Extrato de Malte 20g/L, Peptona 1g/L, Glicose 20g/L, Ágar 20g/L), MEA + NaCl 17% (Extrato de Malte 20g/L, Peptona 1g/L, Glicose 20g/L, Ágar 20g/L, NaCl 17 g/L), um meio restritivo devido à hipersalinidade, DG18, um meio restritivo devido à

baixa atividade de água, e DRBC, com adição de Cloranfenicol (Sigma, EUA) e incubados a 10 °C por 60 dias.

### 2.4 Purificação e Preservação

Todos os fungos obtidos foram repicados em novas placas de Petri contendo o meio MEA para a purificação das culturas e armazenamento. Todos os isolados fúngicos obtidos foram preservados em água destilada esterilizada a temperatura ambiente (Castellani 1967) e em criotubos com glicerol 15%, para filamentosos e 20% para leveduras, estocados a -80 °C e depositados, em duplicatas, na Coleção de Células e Microrganismos da UFMG.

### 2.5 Identificação

Os isolados foram agrupados de acordo com a macromorfologia da colônia (cor, aspecto, textura, etc), seguido da extração do DNA (por método CTAB), através da metodologia descrita por Rosa et al. (2009) com modificações, e reagrupamento por meio dos padrões de bandas semelhantes formados no gel de eletroforese pela técnica de PCR microssatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético GTG<sub>5</sub>. Os fungos que apresentaram padrões de bandas similares foram considerados do mesmo grupo e um representante de cada grupo molecular foi selecionado para a amplificação e sequenciamento da região transcrita interna ITS1-5.8S do RNA ribossomal, quando necessário para alguns grupos o gene da  $\beta$ -tubulina em fungos filamentosos e, no para as leveduras os domínios D1/D2 do rDNA.

As sequências obtidas foram analisadas por comparação com outras espécies tipo depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – versão Magic-BLAST (1.5.0) - disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology.

### 2.6 Ensaios

Para o ensaio de xerofilia foi avaliado o crescimento dos fungos em diferentes concentrações de glicerol (18, 36, 54 e 72%) no meio de cultura DG18. Para o ensaio de halofilia, o crescimento dos fungos foi verificado nas concentrações de 3M, 4M e 5M de NaCl no meio de cultura MEA. Os experimentos foram realizados em triplicata a 10 °C e o diâmetro das colônias foram mensurados de 7 a 21 dias, utilizando o paquímetro digital Mitutoyo. Após as médias foram calculadas

com desvio padrão, para cada isolado e todos ensaios foram realizados em triplicata.

A classificação de microrganismos halófilos é baseada na concentração ideal de sal para crescimento em: i) halófilos leves (crescem entre 0,3–0,8 M); ii) halófilos moderados (crescem entre 0,8–3,4 M); iii) halófilos extremos (requerem uma concentração de sal de 3,4–5,1 M). Essa classificação é baseada na concentração ideal de sal para crescimento (De La Haba et al. 2011; Das Sarma e Das Sarma 2012). Os microrganismos xerófilos são classificados em: i) xerófilos moderados em atividade de água a partir de 0,96 (Gunde-Cimerman et al., 2000) e ii) fortemente xerófilos, por crescerem em atividade de água  $\leq$  0,85 (Pettersson & Leong, 2001).

### 3. Resultados e Discussão

A análise das rochas mostrou a presença principalmente de quartzitos verdes e cinzentos, além de amostras de folhelhos, conglomerados e rochas metavulcânicas. As crostas salinas foram divididas de acordo com seus aspectos macromorfológicos em duas categorias: crosta salina tipo 1, que possuem crosta pulverulenta impregnante de CaSO<sub>4</sub> e crosta salina tipo 2, que apresenta crosta de verniz impregnante de CaSO<sub>4</sub>. A principal diferença entre os dois tipos é o grau de desenvolvimento, pois o tipo 2 representa uma crosta mais desenvolvida e mais antiga que o tipo 1.

Ao final do processo de isolamento foram obtidos 34 isolados, 12 foram obtidos do interior das rochas e 22 da superfície, em que 22 isolados derivam de rochas de crosta salina tipo 1, 11 isolados de rochas com crosta salina tipo 2 e 1 de veia carbonática. Os maior número de isolados encontrados no presente estudo foram obtidos das rocha com crosta salina tipo 1 e tipo 2, respectivamente, e isso pode estar associado as crostas de sal. Segundo Campbell e Claridge (1987), a origem dos sais na Antártica ocorre devido a diversos fatores, como precipitação atmosférica, intemperismo de rochas e origem marinha (spray salino). Em cada fase, um biofilme é formado e contribui para a precipitação dos sais e quanto mais fases, mais desenvolvida a crosta e maior a colonização biológica.

Dos 26 isolados identificados até o momento, estes pertencem a 9 gêneros: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Pseudopithomyces*, *Naganishia*, *Filobasidium*, *Montagnula*, *Phomatospora*, *Periconia* e *Septoriella*, distribuídos em 17 espécies (Tabela 1).

**Tabela 1-** Fungos obtidos de rochas antárticas continentais e identificados por comparação de sequência com o BLASTn match com o banco de dados NCBI GenBank.

	Density (CFU g <sup>-1</sup> )	UFMGCB <sup>a</sup>	Top BLAST search results (GenBank accession number)	Query cover (%)	Identity (%)	Nº of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank acc. n.º) <sup>b</sup>	
Rocks salt crust type 1 (inside)	1	15000	<i>Penicillium tarachomyces</i> (MH965983)	100	99.61	511	<i>Penicillium</i> sp. 1	
	1	15001	<i>Penicillium kongii</i> (NR118336)	100	99.80	538	<i>Penicillium</i> sp. 2	
			<i>Penicillium breviconspatum</i> (KF499573)	95	98.84	362		
	4	14033-14031-14032-14038-14037	<i>Naganishia diffusus</i> (MH794402)	100	100	550	<i>Naganishia diffusus</i>	
	2	14034	<i>Filobasidium magnum</i> (NF499573)	100	100	581	<i>Filobasidium magnum</i>	
	2	14651	<i>Cladosporium rugulovarians</i> (KT600459)	100	99.59	483	<i>Cladosporium</i> sp. 1	
Rocks salt crust type 1	2.6	14844-14677-	<i>Penicillium kongii</i> (NR118336)	100	99.80	505	<i>Penicillium</i> sp. 3	
	1	14996	<i>Penicillium rubens</i> (NR111815)	99	99.61	508	<i>Penicillium</i> sp. 4	
			<i>Penicillium chrysogenum</i> (AT495981)	100	97.73	353		
	2	15002-14650	<i>Pseudopithomyces kano</i> (NR154291)	100	96.13	563	<i>Pseudopithomyces</i> sp. 1	
	1	14652	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (MH864840)	100	97.97	493	<i>Cladosporium</i> sp. 2	
	1	14998	<i>Montagnula chiangraensis</i> (NR168864)	99	95.94	495	<i>Diagnosis periconiae</i> sp.	
	1	14662	<i>Cladosporium magnoligena</i> (NR138336)	100	100	378	<i>Cladosporium</i> sp. 3	
	1	14221	<i>Phomatospora biserialis</i> (NR154640)	97	93.08	508	<i>Phomatospora</i> sp.	
	Rocks salt crust type 2	1	14675	<i>Penicillium rubens</i> (MT55823)	100	99.61	512	<i>Penicillium</i> sp. 3
		2	14995-14993	<i>Penicillium kongii</i> (NR118336)	94	99.79	499	<i>Penicillium</i> sp. 5
<i>Penicillium breviconspatum</i> (KF499573)				96	99.44	368		
10		14691	<i>Penicillium rubens</i> (NR111815)	99	98.39	430	<i>Penicillium</i> sp. 6	
1		14997	<i>Periconia homothallica</i> (NR153446)	36	98	519	<i>Periconia</i> sp.	
2		14999	<i>Septoriella oudemansii</i> (KF632350)	100	100	449	<i>Septoriella</i> sp.	
Rock carbonate vein	1	14220	<i>Pseudopithomyces angolensis</i> (NR161121)	99	99.28	527	<i>Pseudopithomyces</i> sp. 2	

<sup>a</sup>: UFMGCB= código da Coleção de Células e Microrganismos da Universidade Federal de Minas Gerais. <sup>b</sup>: Análise BLAST com base no ITS. <sup>c</sup>: Análise BLAST com base na  $\beta$ -tubulina.

Gonçalves et al. (2017), utilizando as mesmas técnicas de cultivo tradicionais aplicadas neste trabalho, também com rochas de Heritage Range, recuperaram 70 isolados fúngicos identificados em apenas nove espécies dos gêneros *Acremonium*, *Byssochlamys*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Penicillium* e *Rhodotorula*. Apesar de ter sido encontrada uma maior diversidade no atual estudo, mais pesquisas são necessárias para caracterizar a comunidade fúngica ativa associada aos vários habitats de rochas dos desertos polares da Antártica continental.

No ensaio de xerofilia como pode-se verificar na Tabela 2, nenhum fungo cresceu no meio DG72. Entretanto, o isolado UFMGCB 14650 foi considerado xerófilo moderado (Gunde-Cimerman et al., 2000) e os isolados UFMGCB 14652, 14669, 15000 e 15001 fortemente xerófilos, por crescerem em atividade de água  $\leq$  0,85 (Pettersson & Leong, 2001).

**Tabela 2** - Crescimento micelial de fungos obtidos das rochas antárticas em diferentes valores de atividades de água e concentração de sal após 28 dias a 10 ° C.

Fungo	Crescimento micelial em mm				
	UFMGCB	DG18 ( $a_w = 0.95$ )	DG36 ( $a_w = 0.90$ )	DG54 ( $a_w = 0.81$ )	DG72 ( $a_w = 0.66$ )
<i>Pseudophthomyces</i> sp. 1	14650	14 ± 1.1	7.7 ± 0.6	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. 2	14652	21.6 ± 0.5	7.6 ± 0.45	4.9 ± 0.3	-
<i>Penicillium</i> sp. 3	14669	19.1 ± 1.1	15.5 ± 2.2	10.6 ± 0.3	-
<i>Penicillium</i> sp. 1	15000	25.8 ± 0.5	14 ± 0.2	6.7 ± 0.5	-
<i>Penicillium</i> sp. 2	15001	19 ± 0.7	22.1 ± 3	12.6 ± 2.1	-

$a_w$  = valor da atividade de água. DG18 = meio de diclorano com 18% de glicerol, DG36 = meio de diclorano com 36% de glicerol, DG54 = meio de diclorano com 54% de glicerol e DG72 = meio de diclorano com 72% de glicerol.

No ensaio de halofilia, nenhum isolado apresentou crescimento em concentrações de NaCl superiores a 3M, porém todos os isolados são considerados halófilos (Gunde-Cimerman et al., 2005). Em nosso estudo, encontramos isolados do gênero *Filobasidium* na crosta salina tipo 1 das rochas, sendo este gênero comumente relatado como adaptado ao frio e a espécie *Filobasidium magnum* é considerado psicrofílo (Buzzini et al. 2018), ou seja, possui adaptações para sobreviver a temperaturas muito baixas.

*Penicillium* é um gênero de ampla distribuição mundial que detém o maior número de substâncias e espécies conhecidas e estudadas (LIN et al., 2014; ZHOU et al., 2018). O gênero possui muitas adaptações fisiológicas, além tolerar diferentes temperaturas e ser considerado halófilo (CANTRELL et al., 2006), dados que vem de encontro com nossos resultados.

O isolado *Cladosporium* sp. 2 (UFMGC 14652) isolado da crosta salina tipo 1, mostrou-se fortemente xerofílico. O gênero *Cladosporium* já foi encontrado em substratos rochosos na Antártica (Coleine et al., 2018), em ambientes hipersalinos (Zalar et al., 2007) e considerado xerófilo (Segers et al., 2015).

#### 4. Conclusões

Os resultados mostram uma comunidade fúngica capaz de colonizar a crosta salina e as veias carbonáticas das rochas do deserto polar Antártico, com indivíduos que desempenham importantes papéis ecológicos como fungos xerofílicos e halofílicos, oportunistas humanos e de animais, sapróbios, psicotolerantes e cosmopolitas.

Dentre os táxons encontrados, o gênero *Penicillium* se destaca em relação à resistência em baixa atividade de água. Todos os táxons isolados em meio seletivo confirmaram-se halófilos. Esses

resultados demonstram que a comunidade fúngica presente em rochas das Montanhas Ellsworth é composta por fungos adaptados a condições extremas de estresse salino e resistência a baixa atividade de água, adaptações estas que os permitem sobreviver na superfície das rochas continentais da Antártica, principalmente devido ao microhabitat da litosfera estar sob o efeito de diferentes condições extremas.

#### 5. Apoio Financeiro

CAPES, CNPq, FAPEMIG, FNDTC, INCT da Criosfera, MYCOANTAR, PROANTAR.

#### 6. Referências

- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B; YURKOV, A. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? **Yeast**, v. 35, e. 8, p. 487-497, 2018.
- CAMPBELL, I.B.; CLARIDGE, G.G.C. Antarctica: soils, weathering processes and environment. **Elsevier**, v. 16, 1987.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled 35 water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 181-184, 1967.
- COLEINE, C.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S.; POMBUBPA, N.; STAJICH, J. E.; SELBMANN, L. Sun Exposure Shapes Functional Grouping of Fungi in Cryptoendolithic Antarctic Communities. **Life**, v. 8, e. 2, 2018.
- DASSARMA, S.; DASSARMA, P. Halophiles, 2012.
- DE LA HABA, R.; SANCHEZ-PORRO, C.; MARQUEZ, M. C. Taxonomy of halophiles. In: HORIKOSHI, K. **Extremophiles handbook**. Springer, Berlin/Heidelberg, p. 344–361, 2011.
- FOGWILL, C. J.; HEIN, A. S.; BENTLEY, M. J.; SUGDEN, D. E. Do blue-ice moraines in the Heritage Range show the West Antarctic ice sheet survived the last interglacial? **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 335-336, p. 61-70, 2012.
- GONÇALVES, V. N.; OLIVEIRA, F. S.; CARVALHO, C. R.; SCHAEFER, C. E. G. R.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antarctic rocks from



- continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. **Extremophiles**, p. 1-12, 2017.
- GORBUSHINA, A.A. Life on the rocks. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1613-1631, 2007.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; DE HOOG, G. S.; PLEMENITAŠ, A. Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 32, e.3, p. 235-240, 2000.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J. C.; DIDERICHSEN, B. PLEMENITAŠ, A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 28, e. 28-32, p. 1273–1278, 2003.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; FRISVAD, J.C.; ZALAR, P.; PLEMENITAŠ, A. Halotolerant and halophilic fungi. In: DESHMUKH, S. K.; RAI, M. K. **Biodiversity of Fungi – Their Role in Human Life**, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., p. 69–128, 2005.
- LIN, A.; WU, G.; GU, Q. CHU, T. LI, D. New eremophilane-type sesquiterpenes from an Antarctic deep-sea derived fungus, *Penicillium* sp. PR19 N-1. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 7, p. 839–844, 2014.
- PETTERSSON, O. V., LEONG, S. L. Fungal Xerophiles (Osmophiles), 2011.
- SEGERS, F. J. J.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; WÖSTEN, H. A. B.; DIJKSTERHUIS, J. Xerotolerant *Cladosporium sphaerospermum* Are Predominant on Indoor Surfaces Compared to ther *Cladosporium* Species. **PLOS ONE**, v. 10, e. 12, 2015.
- ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, v. 32, n. 2, p. 161–167, 2009.
- ZALAR, P.; DE HOOG, G. S.; SCHROERS, H. J.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; GUNDE-CIMERMAN, N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 157–183, 2007.
- ZHOU, Y.; LI, Y. H.; YU, H. B.; LIU, X. Y.; LU, X. L.; JIAO, B. H. Furanone derivative and sesquiterpene from Antarctic marine-derived fungus *Penicillium* sp. S-1-18. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 12, p. 1108–1115, 2018.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AO ITRACONAZOL CAUSA RESISTÊNCIA CRUZADA ENTRE ANTIFÚNGICOS E ALTERA A INTERAÇÃO DE *Trichophyton interdigitale* COM MACRÓFAGOS

Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Oliveira<sup>1</sup>, J. C. M. D.; Alves<sup>1</sup>, B. M.; Almeida<sup>1</sup>, B. C. T.; Gouveia-Eufrasio<sup>1</sup>, L.; Peres<sup>1</sup>, N. T. A. e Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia

E-mail: paulofonsecca@gmail.com

**Resumo:** A emergência da resistência aos antifúngicos é uma problemática na prática clínica. A resistência *in vitro* pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca determina a tolerância a um antifúngico específico; enquanto a resistência adquirida representa eventos de surgimento de uma linhagem resistente de uma população que, anteriormente, era sensível ao antifúngico. O fungo pode exibir ainda resistência cruzada, que ocorre quando um mecanismo de resistência referente a uma droga também propicia resistência a outras moléculas. Para dermatófitos, mecanismos de resistência adquirida e resistência cruzada ainda não são totalmente elucidados. No intuito de avaliar a influência da resistência adquirida ao itraconazol e resistência cruzada em agentes causadores de dermatofitose *in vitro* e *in vivo*, três linhagens *Trichophyton interdigitale* (II, 865 e 917) passaram por um processo de adaptação a este antifúngico, originando linhagens adaptadas (AI) que, posteriormente, foram subcultivadas em meio na ausência deste antifúngico (10pI). As linhagens AI adquiriram resistência e exibiram resistência cruzada para cetoconazol, ciclopirox e terbinafina. As linhagens 10pI mantiveram o perfil de resistência adquirida, mas não houve resistência cruzada. A resistência acarretou alterações no crescimento e na germinação de conídios. As linhagens foram menos fagocitadas por macrófagos e tiveram reduzida capacidade de proliferação em modelo murino. Deste modo, itraconazol induz resistência, que pode ser cruzada com outros antifúngicos de diferentes classes químicas.

**Palavras-chave:** resistência cruzada; dermatófito; antifúngico; itraconazol; resistência adquirida.

### 1. Introdução

A dermatofitose é uma doença fúngica cutânea causada por um grupo de fungos patogênicos denominados dermatófitos (CAFARCHIA et al., 2006). Estima-se que ocorram 1,500,000,000 casos de dermatofitose anualmente em todo o mundo e que esta infecção afete aproximadamente 40% da população mundial, índice que representa cerca de 30% de todas as infecções micóticas (FUNGAL RESEARCH TRUST, 2011).

O tratamento da dermatofitose ocorre por meio do uso de antifúngicos como o itraconazol (ANSARI et al., 2016). Entretanto, a crescente emergência da resistência dos dermatófitos ao itraconazol e a falha terapêutica advinda desse processo traz consigo uma problemática em termos de saúde pública (SHAPIRO et al., 2011).

A resistência *in vitro* pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca determina a tolerância a um antifúngico específico; enquanto a resistência adquirida representa eventos de surgimento de uma linhagem resistente de uma população que, anteriormente, era sensível ao antifúngico (FERREIRA; SANTOS, 2017). Além disso, o fungo pode exibir ainda resistência cruzada. A resistência cruzada ocorre quando um mecanismo de resistência referente a uma droga também propicia resistência a outras moléculas de diferentes grupos químicos (FARIA-RAMOS et al., 2014).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da resistência adquirida ao itraconazol e resistência cruzada em agentes causadores de dermatofitose *in vitro* e *in vivo*.

## 2. Metodologias

### 2.1 Seleção das linhagens adaptadas e após 10 passagens na ausência de itraconazol

As linhagens de *Trichophyton interdigitale* II, 865 e 917 selvagens (NA) foram cultivadas em meio ágar batata dextrose (ABD) suplementado com concentrações crescentes do antifúngico itraconazol (ITZ) até que o crescimento fosse cessado. As linhagens capazes de crescer na concentração máxima após exposição sucessiva ao itraconazol foram denominadas AI. Em seguida, as linhagens AI foram subcultivadas por 100 dias, com repique a cada 10 dias, na ausência do itraconazol. As linhagens resultantes após 10 passagens foram denominadas 10pI (BASTOS *et al.*, 2017).

Para avaliar a resistência adquirida e a resistência cruzada frente a amorolfina (AMR), cetoconazol (CTZ), ciclopirox (CPX) e terbinafina (TRB) foi utilizado o ensaio de microdiluição em caldo segundo o documento M38-A2 proposto pelo CLSI para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

### 2.2 Crescimento

O crescimento radial foi mensurado em placas de Petri 90 × 15 mm na ausência (ABD) e na presença de itraconazol (ABD + ITZ) em concentrações subinibitórias (½ CIM). Um inóculo de 10<sup>3</sup> conídios (SANTOS; HAMDAN, 2005) foi colocado no centro das placas, seguido de incubação por 7 dias a 28 °C. Após este período, o diâmetro da colônia foi mensurado (ACHTERMAN *et al.*, 2011).

### 2.3 Germinação

A germinação foi determinada após crescimento fúngico em caldo batata dextrose a 28 °C por 24 horas na ausência (ABD) e na presença do itraconazol (ABD + ITZ). Após este período, alíquotas foram tomadas e o número de conídios germinados e não germinados foi determinado utilizando um hemocítômetro (LIU *et al.*, 2007).

### 2.4 Conteúdo de ergosterol

O conteúdo de ergosterol foi determinado a partir da extração do esterol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 282 nm junto a uma curva padrão de ergosterol. A absorbância foi convertida em conteúdo de ergosterol com base na curva padrão (ARTHINGTON-SKAGGS *et al.*, 2000).

## 2.5 Interação com macrófagos

Células foram obtidas a partir de camundongos BALB/C fêmeas (CEUA/UFMG 228/2019) e diferenciadas em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) (WEISCHENFELDT; PORSE, 2008).

BMDM foram desafiados com conídios das diferentes linhagens (2 x 10<sup>5</sup> células/mL - proporção 5:1 de conídios para BMDM) e leituras foram realizadas 2 e 6 horas pós-desafio para determinação do número de conídios internalizados a cada 100 macrófagos contabilizados (conídios/100Φ). Além disso, determinou-se a taxa de proliferação intracelular (IPR) nas mesmas condições. A IPR é a razão do número de fungos recuperados do interior do macrófago no tempo de 6 horas sob o tempo de 2 horas (RIBEIRO *et al.*, 2017).

### 2.6 Modelo murino de dermatofitose

Camundongos BALB/C fêmeas foram infectados com as diferentes linhagens (10<sup>6</sup> células/animal). Sete dias pós-infecção, a pele dos animais foi coletada para determinação da carga fúngica (UFC/g) (CARMO *et al.*, 2020).

### 2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do Software Prism 6 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey e, para as curvas de crescimento, foi determinada a área sob a curva. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. Resultados e Discussão

As linhagens II AI e II 10pI apresentaram aumento da CIM para ITZ, caracterizando um evento de resistência adquirida. A linhagem 865 AI apresentou aumento da CIM para ITZ e CTZ, demonstrando a ocorrência de resistência adquirida e resistência cruzada. Entretanto, a linhagem 865 10pI exibiu aumento da CIM apenas para ITZ. Já a linhagem 917 AI exibiu aumento da CIM para ITZ, CTZ, CPX e TRB, indicando resistência adquirida e resistência cruzada. Por outro lado, a linhagem 917 10pI exibiu aumento da CIM apenas para ITZ. Após o subcultivo na ausência do antifúngico, todas as linhagens mantiveram o perfil de resistência adquirida. Em contrapartida, nenhum evento de

resistência cruzada foi verificado nas linhagens 10pI.

A resistência a ITZ é um fenômeno descrito para o gênero *Trichophyton*. Além de exibirem resistência adquirida a ITZ, algumas linhagens de *T. rubrum* exibiram resistência cruzada a outros antifúngicos como AMR e TRB (GHELARDI et al., 2014). Este evento também foi descrito para *T. interdigitale* (YAMADA et al., 2017).

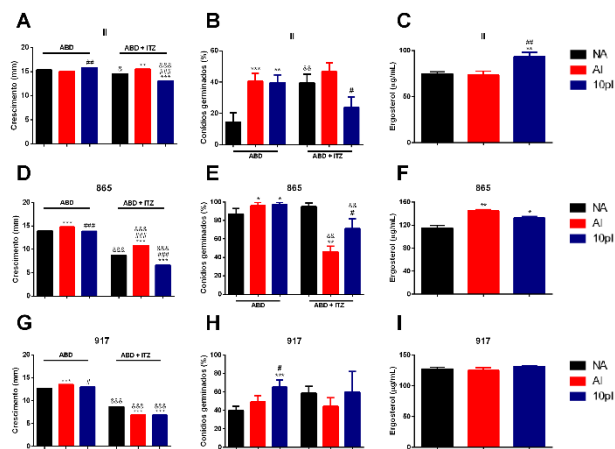
Por outro lado, Ghelardi et al. (2014) demonstraram que na ausência da pressão exercida pelo antifúngico, as linhagens reestabeleciam ao perfil de susceptibilidade da linhagem selvagem. No presente estudo, as linhagens exibiram resistência adquirida mesmo após o subcultivo na ausência do antifúngico.

Na presença de ITZ, a linhagem II AI apresentou maior crescimento ( $p < 0,01$ ) e a II 10pI exibiu menor crescimento ( $p < 0,001$ ) (Fig. 1.A). Os conídios de II AI ( $p < 0,001$ ) e II 10pI ( $p < 0,01$ ) apresentaram maior germinação na ausência de ITZ (Fig. 1.B). O conteúdo de ergosterol foi maior na linhagem II 10pI ( $p < 0,01$ ) (Fig. 1.C).

A linhagem 865 AI apresentou maior crescimento ( $p < 0,001$ ) na ausência e presença de ITZ. Já a linhagem 865 10pI exibiu menor ( $p < 0,001$ ) crescimento na presença do antifúngico (Fig. 1.D). A germinação foi maior na ausência de ITZ para 865 AI e 865 10pI ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, na presença do antifúngico, a germinação de 865 AI foi reduzida ( $p < 0,01$ ) (Fig. 1.E). As linhagens 865 AI ( $p < 0,01$ ) e 865 10pI ( $p < 0,05$ ) apresentam maior conteúdo de ergosterol (Fig. 1.F).

Na ausência de ITZ, 917 AI exibiu maior crescimento ( $p < 0,01$ ). Na presença do antifúngico, 917 AI e 917 10pI também exibiram menor crescimento ( $p < 0,001$ ) (Fig. 1.G). A germinação foi elevada em 917 10pI na ausência de ITZ ( $p < 0,001$ ) (Fig. 1.H).

**Figura 1:** Efeito da resistência ao itraconazol no crescimento, na germinação e no conteúdo de ergosterol dos fungos.



\* Diferença significativa em relação as linhagens II, 865 ou 917 no mesmo meio de cultura.

# Diferença significativa em relação as linhagens II AI, 865 AI ou 917 AI no mesmo meio de cultura.

& Diferença significativa em relação ao mesmo grupo no meio de cultura sem itraconazol (ABD).

De modo similar ao observado, Yamada et al. (2017) demonstraram que alterações genéticas que culminam em resistência a antifúngicos podem ocasionar em alterações no crescimento de dermatófitos.

Além disso, a conidiogênese dos fungos foi influenciada pela resistência. Enquanto as linhagens II AI, II 10pI, 865 AI, 865 10pI e 917 10pI exibiram maior germinação de conídios na ausência de ITZ, houve uma redução na conidiogênese na presença de ITZ para a linhagem 865 AI. Em contrapartida, a maior parcela das linhagens não teve sua conidiogênese diminuída na presença de ITZ. A conidiogênese é uma etapa importante para a invasibilidade do dermatófito no tecido no hospedeiro (VERMOUT et al., 2008) e, por isso, muitos antifúngicos inibem a germinação fúngica.

O contato com o antifúngico aumentou o conteúdo de ergosterol das linhagens II 10pI, 865 AI e 865 10pI. O aumento do conteúdo de ergosterol é um mecanismo de resistência observado em dermatófitos em resposta ao uso de drogas que atuam na biossíntese deste esteroide (ZAVREL; WHITE, 2015).

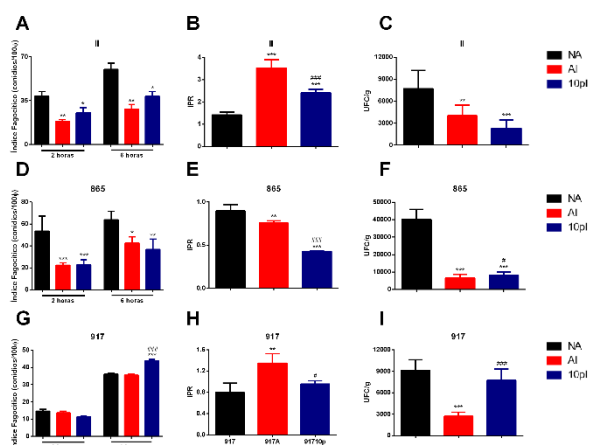
Ao avaliar a interação das diferentes linhagens com BMDM e em modelo murino, foi observada uma diminuição do índice fagocítico no desafio com II AI e II 10pI nos tempos de 2 e 6 horas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Fig. 2.A). Em contrapartida, a IPR foi elevada para II AI e II 10pI ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2.B).

Em modelo murino, II AI ( $p < 0,01$ ) e II 10pI ( $p < 0,001$ ) foram menos recuperadas (Fig. 2.C).

As linhagens 865 AI e 865 10pI também exibiram menor índice fagocítico nos tempos de 2 e 6 horas ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 2.D). A IPR também foi diminuída para 865 AI ( $p < 0,01$ ) e 865 10pI ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2.E). As linhagens 865 AI e 865 10pI ( $p < 0,001$ ) foram menos recuperadas em modelo murino (Fig. 2.F).

O índice fagocítico foi maior para no desafio com a linhagem 917 10pI no tempo de 6 horas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2.G). A IPR foi aumentada para 917 AI ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2.H). Já 917AI foi menos recuperada em modelo murino ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2.I).

**Figura 2:** Efeito da resistência ao itraconazol na interação com macrófagos e em modelo murino de dermatofitose.



\* Diferença significativa em relação as linhagens II, 865 ou 917 no mesmo meio de cultura.

# Diferença significativa em relação as linhagens II AI, 865 AI ou 917 AI no mesmo meio de cultura.

& Diferença significativa em relação ao mesmo grupo no meio de cultura sem itraconazol (ABD).

A resistência ao itraconazol resultou em menor internalização dos conídios das linhagens II AI, II 10pI, 865 AI e 865 10pI por BMDM. Entretanto, em modelo murino, ambas as linhagens foram menos recuperadas, demonstrando maior resolução da infecção. Em contrapartida, a linhagem 917 10pI foi mais internalizada por BMDM, mas exibiu perfil similar a linhagem selvagem na infecção em modelo murino.

#### 4. Conclusões

O contato prévio com antifúngicos induz alterações fisiológicas no fungo, o que resulta em

uma modificação no seu perfil de susceptibilidade, em uma interação diferenciada com fagócitos murinos e em modelo murino de dermatofitose.

#### 5. Apoio Financeiro

CNPq, Capes, FAPEMIG.

#### 6. Referências

ACHTERMAN, R. R.; SMITH, A. R.; OLIVER, B. G., et al. Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. **Fungal Genetics Biology**, v. 48, n. 3: p. 335–341, 2011.

ANSARI, S.; HEDAYATI, M. T.; ZOMORODIAN, K., et al. Molecular characterization and *in vitro* antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1, pp 89-95, 2016.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2081-2085, 2000.

BASTOS, R. W.; CARNEIRO, H. C. S.; OLIVEIRA, L. V.; et al. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 17, 2017.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; et al. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **Veterinary Dermatology**, v.17, n. 5, p.327-331, 2006.

CARMO, P. H. F.; COSTA, M. C.; FRANCO, P. H. C., et al. Essential oils of *Taxandria fragrans* and *Melaleuca alternifolia* have effective antidermatophytic activities *in vitro* and *in vivo* that are antagonised by ketoconazole and

potentiated in gold nanospheres. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2020.

FARIA-RAMOS, I.; FARINHA, S.; NEVES-MAIA, J., et al. Development of crossresistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. **BMC Microbiology**, n. 14, p. 155, 2014.

FERREIRA, G.F., SANTOS, D. A. Heteroresistance and fungi. **Mycoses**, p. 1–7, 2017.

FUNGAL RESEARCH TRUST. **How Common are Fungal Diseases?** 2011. Disponível em: <<https://www.fungalinfectiontrust.org/How%20Common%20are%20Fungal%20Diseases5.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2020

LIU, T.; ZHANG, Q.; WANG, L.; et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. **BMC Genomics**, 8:100, 2007.

RIBEIRO, N. Q., COSTA, M. C., MAGALHÃES, T. F. F., et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 695–702, 2017.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2: p. 213, 2011.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. **Bone marrow-derived macrophages (BMM):** isolation and applications. CSH Protoc, 2008.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ALTERAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DE *Cryptococcus neoformans* EXPOSTO A AGROQUÍMICOS E APÓS INTERAÇÃO COM *Nicotiana benthamiana*

Dornelas<sup>1</sup>, J. C. M.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Paixão<sup>1</sup>, V. M.; Resende-Stoianoff<sup>1</sup>, M. A. e Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

E-mail: joaocmdo@yahoo.com.br

**Resumo:** Com o objetivo de verificar a influência da resistência à agroquímicos na interação Cn-planta, linhagens de H99 não adaptadas (NA), adaptadas (A) e subcultivadas em meio na ausência dos agroquímicos (10p) piraclostrobina (PCT) e tebuconazol (TBZ) foram avaliadas quanto a contagem de UFC, morfologia, susceptibilidade a fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) e TBZ e PCT, taxa de crescimento e atividade enzimática para fosfolipase, proteinase e urease antes e após a passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). O pico de recuperação fúngica para as linhagens de Cn H99 ocorreu ao sétimo dia após a inoculação em Nb. As linhagens obtidas de Nb apresentaram significativas alterações morfológicas em relação à linhagem não adaptada aos agroquímicos. É possível observar que as linhagens H99 A TBZ e H99 10p TBZ recuperadas de Nb mostram aumento de 4x para AMB e FCZ, respectivamente. A curva de crescimento da linhagem adaptada a TBZ e PCT recuperado após 7 dias de inoculação em Nb é menor que do fungo não recuperado da planta quando comparado o tempo de 48 horas. A produção das enzimas urease e proteinase permaneceram inalteradas para as linhagens de Cn H99. A atividade de fosfolipase reduziu qualitativamente para as linhagens H99 NA, H99 A TBZ e H99 10p TBZ e aumentou para as linhagens H99 A PCT e H99 10p PCT após passagem na planta. Conclui-se que o contato prévio com antifúngicos e a passagem em Nb induz alterações morfo-fisiológicas no fungo promovendo uma modificação no seu perfil de susceptibilidade a antifúngicos clínicos.

**Palavras-chave** *Cryptococcus*; modelo vegetal; tebuconazol; piraclostrobina.

### 1. Introdução

A criptococose é uma micose sistêmica resultante da inalação de células fúngicas de *C. neoformans* (Cn) e *C. gattii* (Cg), a partir de fontes ambientais (COLOM VALIENTE et al., 1997; SEVERO et al., 2009; FRANCO-PAREDES et al., 2014). Dados epidemiológicos indicam que, anualmente, cerca um  $1 \times 10^6$  pessoas infectadas pelo HIV apresentam quadros de criptococose e que destes, aproximadamente  $6 \times 10^5$  vão à óbito (PARK et al., 2009; BUTTS et al., 2013; COGLIATI, 2013; PRATES et al., 2013).

A associação do *Cryptococcus* com espécies vegetais tem sido bastante estudada no intuito de compreender o papel dessa relação na ocorrência de surtos de criptococose. Sabe-se que as plantas têm um papel fundamental na plasticidade fenotípica de *Cryptococcus* (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010).

Neste contexto, Bastos et al. (2018) e Carneiro et al. (2019) demonstraram que o uso de agroquímicos pode influenciar na fisiologia, virulência e no perfil de resistência de *Cryptococcus* frente a antifúngicos clínicos, indicando que a utilização extensiva desses compostos pode influenciar as características de fungos ambientais.

Levando em consideração o contexto mundial, mas principalmente no Brasil, onde o consumo dessas substâncias aumentou em 190% nos últimos anos, compreender essa interação se faz ainda mais relevante e necessária do ponto de vista ecológico e clínico (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014). Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo verificar a influência de resistência a agroquímicos na interação Cn-planta.

## 2. Metodologias

### 2.1 Seleção das linhagens

As linhagens de Cn H99 não adaptadas (NA), adaptadas (A) e subcultivadas aos agroquímicos (10p) piraclostrobina (PCT) e tebuconazol (TBZ) foram cultivadas em meio ágar sabouraud dextrose (ASD) e, posteriormente, incubadas por 48h à 30°C (BASTOS et al., 2018).

### 2.2 Inoculação em *Nicotiana benthamiana* (Nb) e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Utilizando-se o método de escarificação (MICHEREFF, 2001) foram inoculadas  $10^5$  células/mL de Cn na folha de Nb. A recuperação de células fúngicas de Nb ocorreu nos períodos de 24h, 7, 14, 21 e 30 dias após a inoculação. Inicialmente, as plantas foram ou não desinfestadas e, posteriormente, fragmentadas com uso de tesoura e pinça cirúrgica estéril em caule, folha inoculada e folha não inoculada, sendo os fragmentos de cada planta pesados e, em seguida, macerados em placa de 24 poços com ponteiros estéreis de 1000  $\mu$ L em 100  $\mu$ L de PBS 1X e diluídos até 1:100 para quantificação de UFC. Após trituradas e diluídas, 50  $\mu$ L de cada amostra foram plaqueadas em ASD suplementado com cloranfenicol 0,001% e cicloheximida 0,001% e, incubadas à 37°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e, em seguida, estabelecida a quantidade de UFC/g de fragmento de cada planta.

### 2.3 Análise morfológica

Para a análise morfológica de Cn, células foram previamente cultivadas em ASD (controle), foram inoculadas em Nb e recuperadas após 7 dias de inoculação. Uma alíquota de 10  $\mu$ L da suspensão obtida diretamente do triturado da planta contendo as células fúngicas, foi adicionada em uma lâmina com tinta nanquim, para posterior visualização em microscópio óptico e captura da imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de pelo menos 50 espécimes de cada amostra foram mensurados com o auxílio do programa Image J (ARAÚJO et al., 2012). Posteriormente, a razão superfície/volume foi determinada usando a fórmula  $3/r$  em que  $r$  = raio e a razão espessura capsular/raio do corpo celular foi dada pela fórmula  $EC/r$ , em que  $EC$  = espessura capsular e  $r$  = raio do corpo celular (FERREIRA et al., 2015; BASTOS et al., 2018).

### 2.4 Avaliação da concentração inibitória mínima - CIM

Para avaliar a susceptibilidade das linhagens de Cn aos antifúngicos fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) e agroquímicos tebuconazol (TBZ) e piraclostrobina (PCT) antes e após a passagem em Nb foi utilizado o ensaio de microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 proposto pelo CLSI para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos avaliados (CLSI, 2017).

### 2.5 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento foi determinada para as linhagens de Cn cultivadas em meio ASD incubadas à 30°C por 48 horas e linhagens obtidas de Nb após 7 dias de inoculação na no modelo vegetal. Um inóculo de  $10^3$  células/mL foram cultivados em 300  $\mu$ L de caldo sabouraud a 30°C sob rotação de 100 rpm. Durante 48 h de cultivo, nos *timepoints* indicados: 0, 2, 6, 24 e 48h, alíquotas das culturas foram diluídas a  $10^3$  e plaqueadas em ASD para a determinação da UFC/mL e viabilidade celular. Cada condição de cultivo foi plaqueada em triplicata.

### 2.6 Avaliação da atividade enzimática de Cn

#### Fosfolipase e proteinase

Amostras de Cg e Cn foram cultivada em meio ASD e incubadas a por 48h a 35°C. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 3 mL de solução salina 0,85% estéril. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de  $10^6$  células/mL. Em seguida, 10  $\mu$ l da suspensão fúngica de cada amostra foi dispensada em placas com meio ágar fosfolipase e meio indutor de proteinase. A presença das enzimas fosfolipase e proteinase foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia da levedura e a PZ foi calculada dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro do halo de degradação, sendo utilizada uma régua para auxiliar nessa medida. Quando o PZ foi 1, a atividade enzimática foi zero, PZ entre 0,64 e 0,99, sua atividade foi considerada média e para  $PZ \leq 0,63$ , atividade elevada (PRICE et al., 1982).

#### Urease

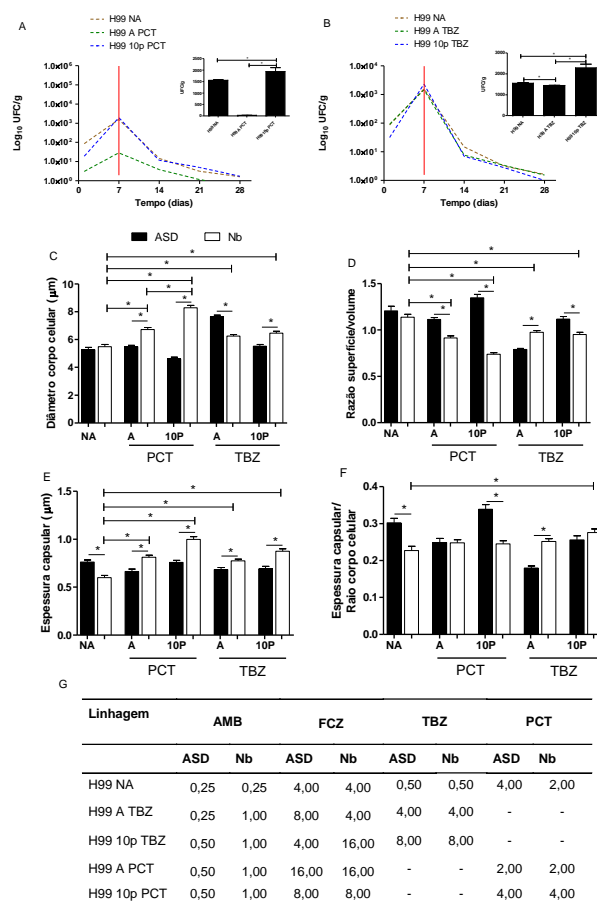
O inóculo fúngico, previamente cultivado em meio YEPG (*Yeast Extract-Glucose-Peptone agar*), foi suspenso em 2 mL de água destilada estéril e mensurado em espectrofotômetro a 600 nm, obtendo uma absorbância entre 0,8 a 1,0, que equivale a  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  células/mL. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em vórtex e, posteriormente, 1 mL dessa suspensão foi adicionada a 1 mL de caldo RUH (*Rapid Urea Broth*). Após a combinação da suspensão fúngica com o caldo RUH, a mistura foi incubada à 37°C sob rotação de 40 rpm. Após 4 horas de incubação, a solução foi centrifugada a 1.500 g por 10 min e o sobrenadante removido para posterior leitura em espectrofotômetro com absorbância a 560 nm. Utilizou-se como controle negativo uma suspensão contendo caldo RUH (1 mL de 1x RUH caldo misturado com 1 mL de água destilada) (ROBERTS et al., 1978).

### 2.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio do software Prism 5 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados de cada ensaio foram analisados individualmente e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

### 3. Resultados e Discussão

A linhagem de Cn H99 apresenta pico de recuperação fúngica aos 7 dias após a inoculação em Nb. Quando previamente adaptada (H99 A PCT) ou passada 10 vezes (H99 10p PCT) por meio ASD contendo o agroquímico PCT (256  $\mu\text{g/mL}$ ) o pico de recuperação também se dá ao sétimo dia, porém a carga fúngica recuperada é significativamente diferente da linhagem não adaptada (H99 NA) ( $p < 0,05$ , FIGURA 1A); de modo que Nb infectada com H99 10p PTC apresenta maior carga fúngica em relação a NA e A. O mesmo fenômeno foi observado quando a mesma linhagem foi adaptada ou passada no agroquímico TBZ (2  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0,05$ , FIGURA 1B).



**Figura 1:** (A e B) Cinética de eliminação de Cn H99 adaptados e não adaptados a agroquímicos em folha infectada com  $10^5$  células pelo método de escarificação para a espécie Nb, após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (C, D, F, G) Morfometria do diâmetro celular, espessura capsular, razão superfície/volume e razão EC/RC para a linhagem de Cn H99 e para as células obtidas de Nb após 7 dias de inoculação de  $10^5$  células de Cn pelo método de escarificação. As colunas correspondem à média de cinquenta repetições  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ). (G) Valores de concentração inibitória mínima (CIM -  $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos (AMB, FCZ, TBZ e PCT).

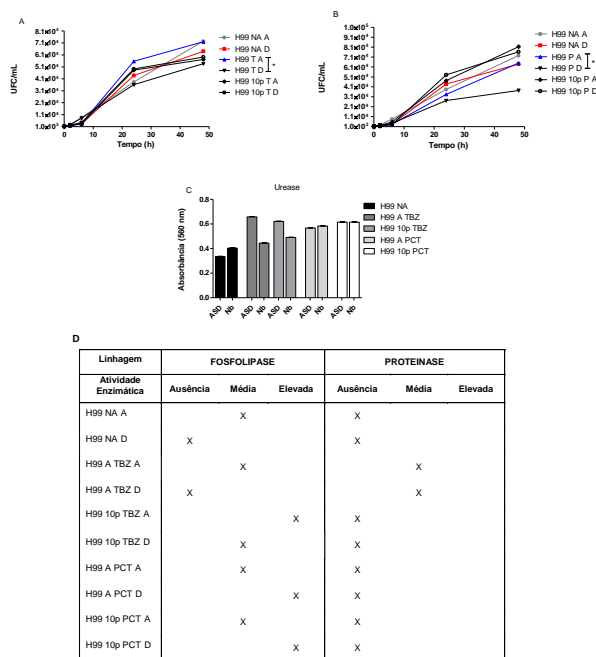
Na planta, estas linhagens apresentaram também significativas alterações morfológicas. As linhagens H99 A PCT, H99 10p PCT e H99 10p TBZ apresentam diâmetro celular maior enquanto que a linhagem H99 A TBZ apresenta redução para este parâmetro quando recuperada de Nb ( $p < 0,05$ , Figura 1C). Observa-se que as linhagens adaptadas a PTC e TBZ apresentam maior conteúdo capsular quando no modelo vegetal Nb e quando também comparadas à linhagem não adaptada aos agroquímicos ( $p < 0,05$ , Figura 1E). Quando analisado como o agroquímico age nessa alteração de interação com a planta, observa-se que a

linhagem 10p PCT apresenta, no modelo vegetal, além de maior recuperação de carga fúngica, redução significativa na razão superfície/volume em relação a linhagem NA ( $p < 0,05$ , FIGURA 1D). Com relação ao parâmetro cápsula/corpo celular observa-se que a linhagem 10p TBZ aumenta quando comparada com a linhagem NA ( $p < 0,05$ , Figura 1F).

Sobre o perfil de sensibilidade de linhagens obtidas de planta, a linhagem H99 A TBZ apresenta um aumento do valor de CIM de 4x para AMB (FIGURA 1G). Ainda, durante a análise das alterações do valor de CIM, nós vimos que a linhagem H99 10p TBZ recuperada de Nb mostra aumento de 4x para FCZ (FIGURA 1G). Além disso, é possível observar que as demais linhagens adaptadas ou passadas previamente em TBZ ou PCT cultivadas em meio ASD e obtidas de Nb se mantém constante ou aumentado e reduzido em 2x em relação as linhagens não obtidas de Nb o que não indica alteração no perfil de sensibilidade das linhagens aos antifúngicos e agroquímicos empregados neste ensaio.

As linhagens H99 A TBZ e H99 A PCT apresentam pico de recuperação fúngica aos 7 dias após a inoculação em Nb (figura 1A e 1B). A curva de crescimento da linhagem adaptada a TBZ recuperado neste pico é menor que a do fungo não recuperado da planta quando comparado os tempos de 24 e 48 horas ( $p < 0,05$ , Figura 2A). Para as linhagens H99 NA e 10p TBZ a passagem pela planta não influenciou na curva de crescimento do fungo (Figura 2A). A curva de crescimento da linhagem H99 A PCT recuperado neste pico também é menor que a do fungo não recuperado da planta quando comparado no tempo de 48 horas ( $p < 0,05$ , Figura 2A).

A produção das enzimas urease e proteinase permaneceram inalteradas (Figura 2B e 2C) para as linhagens H99 NA, A e 10p. A atividade de fosfolipase reduziu qualitativamente para as linhagens H99 NA, H99 A TBZ e H99 10p TBZ e aumentou para as linhagens H99 A PCT e H99 10p PCT após passagem na planta (Figura 2C).



**Figura 2:** (A e B) Taxa de crescimento e (C e D) avaliação da atividade enzimática das enzimas urease, fosfolipase e proteinase de Cn H99 e Cn obtido de uma passagem em Nb. O Cn H99 foi cultivado em meio ASD a 37°C por 48 horas e para as células obtidas de Nb, foi realizada a recuperação após 7 dias de inoculação de  $10^5$  células de Cn H99 pelo método de escarificação. As letras A e D após a nomenclatura de cada linhagem representa a passagem (D) ou não passagem (A) por Nb. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Conclusões

O contato prévio com antifúngicos e a passagem por *N. benthamiana* induz alterações morfo-fisiológicas no fungo, o que resulta em uma modificação no seu perfil de susceptibilidade a antifúngicos clínicos.

#### 5. Apoio Financeiro

UFMG, Capes, CNPq, Fapemig.

#### 6. Referências

ARAUJO, G. R. S., FONSECA, F. L., PONTES, B., TORRES, A., CORDERO, R. J. B., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, p.1–11, 2012

- BASTOS, R. W., CARNEIRO, H. C. S., OLIVEIRA, L. V. N., ROCHA, K. M., FREITAS, G. J. C., COSTA, M. C. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimic Agents and Chemot**, v. 62, 1, 2018.
- BUTTS, A., DIDONE, L., KOSELYN, K., B. A., BAXTER, B. K., CHABRIER-ROSELLO, Y., WELLINGTON, M. et al. Treatment of Cryptococcosis Pharmacological Properties Relevant to the Structural Chemotype, and Cryptococcal Activity, a Common Off-Patent Drugs with Fungicidal A Repurposing Approach Identifies. **Eukaryotic Cell**. v. 12, n. 2, p. 278, 2013.
- CARNEIRO, H. C. S. **Influência do agroquímico benomil na morfo-fisiologia, virulência e susceptibilidade de *Cryptococcus gattii* aos antifúngicos clínicos *in vitro* e em modelo murinho**. Tese (Doutora em Microbiologia: Ênfase em Micologia). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**. 2013.
- COLOM VALIENTE, M. F., ALBERDI, M., MESEGUER, I., TORRES RODRIGUEZ, J. M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples in Alicante. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 63-64, 1997.
- FRANCO-PAREDES, C., WORMACK, T., BOHLMAYER, B. S., SELLERS, B., HAYS, A., PATEL, K. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infect Dis**, v. 15, p. 348-355, 2014.
- MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife: UFRPE, 2001.
- PARK, B. J., WANNEMUEHLER, K. A., MARSTON, B. J., GOVENDER, N., PAPPAS, P. G., CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.
- PRATES, A. R., FUCHS, B. B., MIZUNO, K., NAVQI, Q., KATO, I. T., RIBEIRO, M. S., et al. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **Plos One**, v. 8. 2013.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.
- RIGOTTO, R. M., VASCONCELOS, D. P., ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cad Saude Publica**. v. 30, p. 1360-1362, 2014.
- ROBERTS, G.; HORSTMEIER, C. D.; LAND, G. A.; FOXWORTH. J. H. Rapid urea broth test for yeast. **J. Clin. Microbiol**. v. 7: p. 584-588, 1978.
- SEVERO, C.B.; XAVIER, M. O.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p. 166-171, 2009.
- SPRINGER, D.J., CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p.14-20, 2010.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DE EXOENZIMAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO

**Fontenelle<sup>1</sup>, P. H. C.; Macedo<sup>1</sup>, A. T.; Furtado<sup>1</sup>, H. L. A.; Silva<sup>1</sup>, T. O.; Silva<sup>1</sup>, S. L.; Costa<sup>1</sup>, E.V.S; Santos<sup>1</sup>, J. R. A.**

<sup>1</sup> Universidade Ceuma, Laboratório de Microbiologia Ambiental

E-mail: pedrohfontenelle@hotmail.com

**Resumo:** As micoses são doenças negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública, apresentando uma alta morbimortalidade, principalmente em áreas endêmicas, embora não sejam de notificação compulsória no Brasil. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho o perfil fosfolipídico de isolados clínicos de pacientes com infecções fúngicas invasivas em hospital de referência no estado do Maranhão. O estudo foi realizado com amostras biológicas de pacientes internados em uma Unidade Hospitalar (São Luís-MA), no período de Setembro de 2018 a Outubro de 2019. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pelo MALDI-TOF. Em seguida, foi realizado o teste de fosfolipase para a verificação da presença da zona de precipitação (Pz) e o teste de catalase para verificação da conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A avaliação da atividade da enzima fosfolipase mostrou que 69,4% dos isolados apresentaram atividade moderada a muito forte. Além disso, todas as amostras foram positivas para a presença da catalase. Desta forma, a presença de tais enzimas em isolados clínicos mostra o potencial de virulência do microrganismo no hospedeiro, o que contribui para a invaginação de tecidos mais profundos. Portanto, espera-se contribuir com o conhecimento da presença de tais exoenzima em infecções fúngicas invasivas em um hospital de referência para doenças infecto-contagiosas no Estado, no intuito de contribuir com a terapia correta de pacientes com tais patologias.

**Palavras-chave** Micoses; Fosfolipase; Fungos; Infecções.

### 1. Introdução

Os fungos têm sido foco de estudos por cientistas e pesquisadores devido ao seu potencial perigo à saúde humana e animal. Desta forma, através de tais pesquisas, foi possível avaliar e estudar a diversidade e complexidade de múltiplas espécies de fungos buscando avaliar a patogenicidade desses microrganismos. A maioria dos fungos é cosmopolita e podem ser encontrados no solo, em seres humanos, vegetais, materiais em decomposição e em animais domésticos (FAVALESSA et al., 2009).

Atualmente, muitas internações são recorrentes em hospitais, devido à elevada incidência de casos de micoses sistêmicas e oportunistas no Brasil (PEREIRA, 2015).

A criptococose (DARZÉ et al., 2000) tem como principal causador o fungo *Cryptococcus neoformans*, que também é cosmopolita, com altas taxas de mortalidade, com incidências em homem, animais selvagens, como tatus, e domésticos, em especial o cachorro e o gato (QUEIROZ et al., 2008). Vale ressaltar que outra espécie conhecida como *C. gattii* é encontrada com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, em alguns países da América Latina (ABEGG et al., 2006). Além disso, esse fungo pode espalhar-se sistemicamente por via hematológica ou linfática, causando meningite e meningoencefalite. (HONSHO et al., 2003; LARSSON et al., 2003; TABORDA, 2004).

Outras infecções fúngicas invasivas podem agredir a homeostasia de muitos indivíduos, conhecidos por serem fungos oportunistas. Um exemplo disso é a candidíase, que se caracteriza por possuir como agente etiológico o fungo *Candida* spp., ao qual a principal espécie que causa



patologias no homem e mais comumente encontrada é a *C. albicans*. Os fungos do gênero *Candida* estão presentes na microbiota gastrointestinal do ser humano. Tornam-se patógenos quando existem condições que possibilitam seu desenvolvimento, quando, por exemplo, a imunidade do indivíduo está comprometida, pelo uso de doses elevadas de corticóides, ou até mesmo as infecções por HIV. (MANGUEIRA et al., 2011).

A avaliação da produção de exoenzimas como a fosfolipase e catalase para isolados fúngicos é relevante para a verificação do potencial de virulência dos fungos, tendo em vista que conferem ao microrganismo mecanismos que facilitam sua penetração em tecidos mais profundos podendo levar o paciente a formas mais abrasivas da doença e levar o indivíduo a óbito (JUNIOR et al, 2012).

## 2. Metodologias

### 2.1 Coleta das amostras biológicas

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução 466/12 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma, sob parecer número 2.927.864

As amostras biológicas (soro, escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, sangue total, soro, urina, líquido e biópsia) foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório CEDRO (São Luís-MA) para identificação da espécie fúngica.

Os fungos foram identificados por meio da técnica automatizada Maldi-Tof e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade CEUMA, mantidos em meio Agar Sabouraud e incubados a 28 e a 37°C. Em seguida, foram mantidos na Coleção de culturas do Laboratório, sob congelamento em -20°C e sob refrigeração para subseqüentes testes de virulência.

### 2.2 Avaliação do perfil fosfolipídico

Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi preparado um meio de cultura que consiste em 180 mL de ágar Sabouraud dextrose acrescido de 11,40g de cloreto de sódio; 0,11g de cloreto de cálcio; 4 % de glicose e 20 mL de gema de ovo. O meio foi inoculado com 3 µL de inóculo fúngico preparado em salina 0,85%, comparado com a escala de McFarland 0.5 (1 a 5 x 10<sup>6</sup> células/mL).

As placas de Petri foram incubadas a 37°C e o diâmetro das colônias e da área de precipitação mais a colônia foram medidos 96 horas após a inoculação. Os experimentos foram feitos em duplicata. As medidas e cálculos da zona de precipitação (Pz) da fosfolipase foram feitos de acordo com o descrito por Price et al. (1982), a partir da média dos valores obtidos na duplicata, os coeficientes encontrados foram classificados em 5 grupos: Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; PZ<0.70, muito forte (PRICE ET al., 1982).

### 2.3 Avaliação da presença de catalase

A atividade da catalase foi constatada em meio Sabouraud com adição de solução de peróxido de hidrogênio a 3% sobre a cultura fúngica para a observação da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo metodologia modificada de Shin & Kim (1998).

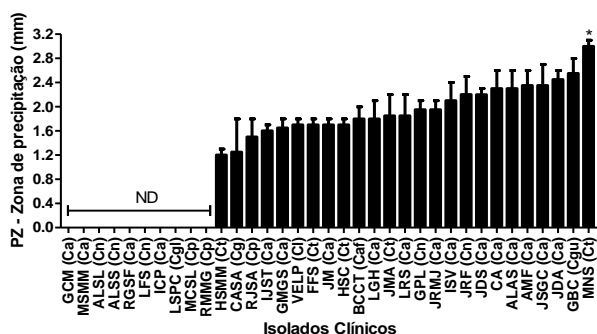
### 2.4 Análise estatística

As variáveis numéricas foram analisadas pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA e o teste t de student independente. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, ou seja, será considerado como estatisticamente significativo, um valor de  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

O resultado positivo para o teste de fosfolipase é confirmado através da formação de um halo opaco ao redor da colônia. Dos isolados testados, 69,4% apresentaram formação do halo, indicando uma maior produção significativa ( $p < 0,05$ ) da enzima. Em contrapartida, 30,6% dos mesmos foram não detectados.

Isolados como MNS,GBC e JDA foram as cepas que apresentaram maior halo(PZ) e isso explana um potencial significativo para o fungo, pois a presença da fosfolipase funciona como um mecanismo auxiliador na colonização e infecção de tecidos mais profundos. Porém, em contrapartida, houveram isolados que a presença da enzima foi tida como não detectado como nas amostras GCM e MSMM e outros apresentaram a exoenzima, porém com PZ inferiores, como nos isolados HSMM e IJST.

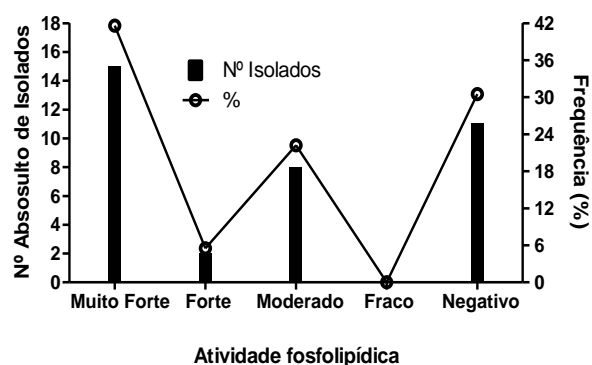


Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Caf: *Candida africana*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cgu: *Candida guilliermondii*; Cg: *Cryptococcus gattii*; Cl: *Cryptococcus laurentii*; C.gl: *Candida glabrata*. ND: Não detectado; \* P < 0,05

**Figura 1:** Produção de fosfolipase dos isolados fúngicos

Segundo Junior (2012), as atividades de fosfolipase são consideradas como um papel importante na patogênese de fungos oportunistas. A presença de fosfolipase em amostras de *C. albicans* e outras espécies de fungos invasivos estão relacionados à virulência das espécies.

De acordo com o trabalho de Campos e Baroni (2010) a maioria das cepas apresentaram atividade muito forte para produção de fosfolipase, (75%). No estudo de Costa et al. (2010), a maioria dos isolados apresentaram atividade enzimática para produção de fosfolipase, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo. Da mesma forma, no estudo de Hartmann et al (2012), através da determinação da atividade fosfolipídica dos 24 isolados fúngicos foi possível observar que 37,5% das cepas dispunham de atividade positiva para exoenzimas.



Negativo: Pz = 1; Fraco: Pz entre 0.9 e 0.99; Moderado: Pz entre 0.80 e 0.89; Forte: Pz entre 0.70 e 0.79; Muito forte: Pz < 0.70.

**Figura 2:** Intensidade da Produção de fosfolipase (Pz) dos isolados fúngicos.

A atividade enzimática dos isolados fúngicos possibilita confirmar o aumento da patogenidade dos microrganismos, pois a presença de tais fatores de virulência auxilia os mesmos na penetração e colonização de tecidos mais profundos causando quadros mais abrasivos para o hospedeiro, tendo em vista, que as micoses invasivas são negligenciadas e acabam levando o indivíduo portador a óbito. Logo, um maior potencial de virulência manifestado associado, por exemplo, a possíveis quadros de imunossupressão, eleva o número de quadros da doença (ANDREOLA et al 2016).

A avaliação da produção de catalase pelos microrganismos foi confirmada pela conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por todos os isolados, favorecendo o potencial de virulência dos mesmos e auxiliando na penetração de tecidos mais profundos.

Isolados de *C. neoformans* e de *Candida* spp. possuem vários constituintes imunes inatos, incluindo a fosfolipase e catalase com o papel de a colonização de tecidos como o cérebro e pulmões (YANG et al, 2017).

Conforme Kantarcioglu & Yucel (2002), a maioria das cepas positivas para produção de fosfolipase foi de amostras provenientes de secreção urinária e traqueal, apesar de não ser notada proporcionalidade no arranjo distribucional das espécies de *Candida* entre os materiais clínicos, visto que a maior atividade da fosfolipase foi definida nos isolados do trato respiratório.

De acordo com Rodrigues et al (2008), a presença de catalase positiva permite com que o microrganismo invada tecidos mais profundos. Além disso, a catalase é uma metaloenzima antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, tal exoenzima auxilia o fungo na driblagem imunológica contra o estresse oxidativo imposto pelo sistema imune do hospedeiro.

#### 4. Conclusões

Desta forma, tendo em vista que as infecções fúngicas são consideradas um problema de saúde pública e que tais patologias são negligenciadas, faz-se necessário mais estudos acerca dos fatores de virulência das leveduras nas micoses invasivas, pois como mostrado, isolados clínicos como os da presente pesquisa mostraram-se eficazes na produção de exoenzimas capazes de adentrar profundamente nos tecidos mais profundos.

## 5. Apoio Financeiro

. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e pela Universidade CEUMA.

## 6. Agradecimentos

Ao Laboratório CEDRO pelo fornecimento das amostras fúngicas, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e em especial a Universidade CEUMA.

## 7. Referências

- ABEGG MA, CELLAFL, FAGANELLO J, VALENTE P, SCHRANK A, VAINSTEINMH. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathol** 2006; 161(2):83- 91
- ANDREOLA, PATRÍCIA et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero Candida isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- CAMPOS, FELIPE LOPES; BARONI, FRANCISCO DE ASSIS. Isolados de Cryptococcus neoformans, C. gattii e C. laurentii produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 83-90, 2010.
- COSTA, C. R.; PASSOS, X. S; SOUZA, L. K. H; LUCENA, P. A.; FERNANDES, O. F. L; SILVA, M. R. R. Differences in exoenzyme production and adherence ability of Candida spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo , v. 52, n. 3, p. 139-143, June 2010 .
- DARZÉ, C., LUCENA, R., GOMES, I. MELO, A. 2000. Características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningite criptocócica. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. 33:21-26.
- FAVALESSA, OLIVIA COMETTI et al. First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of Cryptococcus spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, 2009.
- HARTMANN, ANDREIA et al. Incidência de Candida spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125-130, 2016.
- HONSHO, C. S.; MINE, S. Y.; ORIÁ, A.P.; BENATO, N.; CAMACHO, A. A.; ALESSI, A.C.; LAUS, J.L. Generalizedsystemiccryptococcosis in a dogafterimmunossuppressivecoricotherapy., 2003.
- JUNIOR, AUREAN DECA; DE ANDRADE MONTEIRO, CRISTINA CRISTINA. Atividade diferencial in vitro de fosfolipases e proteinases ácidas de isolados clínicos de Candida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, 2012.
- KANTARCIOGLU AS, YUCEL A. Atividades de fosfolipase e protease em isolados clínicos de Candida com referência às fontes de cepas. **Mycoses** 2002; 45: 160-165
- MANGUEIRA, DAYANE FRANCO; MANGUEIRA, LIANE FRANCO BARROS; DINIZ, MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO. Candidose oral. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 69-72, 2011.
- PEREIRA, TATIANA CAROLINE DIAS; BARROS, ROSÂNGELA ABREU MONTEIRO DE. Cryptococcus neoformans E Cryptococcus gattii: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **facider-Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2015.
- QUEIROZ, et al., 2008. Criptococose- UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Acta Veterinária Brasília**, v2, n2, p32-38.
- RODRIGUES, MARCIO L. et al. Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

SHIN K-SOO, KIM C-JIN (1998) Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters** 20:569-572.

YANG, CHENG LIANG; WANG, JUN; ZOU, LI LI. Innate immune evasion strategies against Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans*. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 6, p. 5243-5250, 2017.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE *Strongyloides venezuelensis* NA PROGRESSÃO DA CRIPTOCOCOSE MURINA EXPERIMENTAL

Gouveia-Eufrazio, L.<sup>1</sup>; Costa, M.C.<sup>1</sup>; Peres-Emídio, E.C.<sup>1</sup>; Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Carmo, P.H.F.<sup>1</sup>; Rezende, M.C.<sup>2</sup>; Rodrigues, V.F.<sup>2</sup>; Rodrigues, J.G.M.<sup>2</sup>; Negrão-Corrêa, D.A.<sup>2</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: milagouveia@yahoo.com.br

**Resumo:** *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica que afeta os pulmões, podendo acometer o sistema nervoso central. A estrogiloidíase é uma doença intestinal causada por parasitas do gênero *Strongyloides*. Um fator comum entre essas doenças é que *Strongyloides* passa pelos pulmões do hospedeiro, o que poderia contribuir para a ocorrência de coinfeções com esses organismos. Desse modo, este trabalho tem o objetivo de avaliar a influência de *S. venezuelensis* (Sv) na progressão da criptococose murina causada por *C. gattii* (Cg). Inicialmente, foi avaliada a fagocitose de *C. gattii* por macrófagos estimulados com antígeno de larva infectante (L3) de Sv. Posteriormente, camundongos foram infectados com Sv antes ou depois de Cg, para determinação do tempo de coinfeção. Após a essa etapa, animais foram infectados com Sv 2 dias antes de Cg e eutanasiados 10 dias após a infecção fúngica, para determinação de carga fúngica no cérebro, pulmão e lavado broncoalveolar. O estímulo de macrófagos com o L3 3 horas antes da infecção com Cg resultou em uma maior proliferação intracelular fúngica. Em relação à morbimortalidade dos animais, houve redução da sobrevida em todos os grupos infectados com Sv depois do fungo, quando comparados ao grupo Cg. Em relação à recuperação de carga fúngica, observou-se um aumento da carga fúngica no lavado broncoalveolar do grupo coinfectado, em comparação ao grupo Cg, com redução do recrutamento de leucócitos, sugerindo que a redução na sobrevida dos animais pode estar associada a uma alteração na resposta inflamatória ou dano tecidual.

**Palavras-chave** coinfeção; criptococose; *Cryptococcus gattii*; *Strongyloides venezuelensis*.

### 1. Introdução

A criptococose é uma micose sistêmica que acomete os pulmões, com tendência à migração para o Sistema Nervoso Central (SNC), por isso as manifestações clínicas mais comuns são a pneumonia e a meningoencefalite (MAY *et al.*, 2016). Essa doença é causada por fungos do gênero *Cryptococcus* spp., sendo *C. gattii* e *C. neoformans* as principais espécies responsáveis por essa micose (FANG *et al.*, 2014). *C. gattii* e *C. neoformans* podem ser encontrados como sapróbios no ambiente e, quando acometem o homem, (LIN e HEITMAN, 2006) a infecção se dá pela inalação de propágulos fúngicos presentes em fontes ambientais, causando o quadro de infecção criptocócica. Esses propágulos podem ser a levedura dessecada ou esporos, apesar de não haver relatos da identificação de esporos no ambiente (BOTTS e HULL, 2010).

A estrogiloidíase é uma doença que consiste na infecção crônica no trato gastrointestinal de vertebrados terrestres, sendo causada por parasitas do gênero *Strongyloides* (MENDES *et al.*, 2017; VINEY e KIKUCHI, 2017; VINEY, 2017). A infecção se dá pela penetração ativa de larvas infectantes (L3) na pele dos indivíduos que entram em contato direto com solo contaminado. Após penetrarem no hospedeiro, as larvas L3 migram para os pulmões pela corrente sanguínea, podendo induzir respostas inflamatórias, além de causar pneumonite e hemorragia pulmonar (CDC, 2018;

VARATHARAJALU e RAO, 2016). Em seguida, as larvas migram para o intestino do hospedeiro, onde ocorre a maturação e produção de ovos, que eclodem no lumen intestinal, eliminando as larvas nas fezes (WHO, 2018).

A estrogiloidíase é uma doença que está associada à falta de saneamento básico, uma vez que a infecção ocorre em decorrência da eliminação de fezes em locais abertos (SCHÄR et al., 2013). O parasita é endêmico em algumas regiões do Brasil, sendo considerado um problema de saúde pública. A criptococose, assim como a estrogiloidíase, apresenta maior prevalência na África e em países de clima tropical, como o Brasil, fator que poderia propiciar a ocorrência de coinfeções na população dessas regiões, uma vez que os patógenos são capazes de colonizar os pulmões dos indivíduos. Entretanto, não há estudos acerca da interação entre *Cryptococcus* spp. e *Strongyloides* spp. Dessa forma, estudos sobre possíveis interações entre o fungo e o nematoda se fazem necessários. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é o de avaliar, em modelo murino, a influência de *S. venezuelensis* na progressão da criptococose experimental causada por *C. gattii*.

## 2. Metodologias

### 2.1 Ensaio de fagocitose

Para avaliar o papel de *S. venezuelensis* na fagocitose de *C. gattii* por macrófagos, células precursoras foram obtidas da medula óssea de camundongos balb/C fêmeas. Essas células foram diferenciadas por meio de cultivo em uma meio suplementado com sobrenadante de cultura de células L-929, que contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos.

Os macrófagos foram estimulados com antígeno de larva L3 de *Strongyloides* e infectados pelo fungo, sendo utilizadas duas estratégias de infecção: 1<sup>a</sup>) antígeno adicionado 3 horas antes de *C. gattii*; 2<sup>a</sup>) antígeno adicionado 24 horas antes de *C. gattii*. Foram feitos três controles: um apenas com a suspensão de macrófagos, ou macrófagos infectados apenas com a suspensão de *C. gattii* ou apenas com o antígeno L3, na concentração de 10 µg/ml. Para cada tipo de infecção o experimento foi realizado em sextuplicada. Após a incubação por 3 e 24 horas, foram avaliados a capacidade fagocítica dos macrófagos, a taxa de proliferação intracelular do fungo e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN).

### 2.2 Curva de sobrevivida

Inicialmente, foi realizado um experimento de curva de sobrevivida (n=7) para investigar a influência da infecção parasitária na infecção fúngica. Para a coinfeção com *S. venezuelensis*, animais foram infectados com 700 larvas L3 antes ou após infecção com 10<sup>4</sup> leveduras viáveis da linhagem L27/01 de *C. gattii*, seguindo os regimes de infecção a seguir descritos, e foram acompanhados diariamente quanto à mortalidade.

Grupo 1: Controle – PBS – não infectado

Grupo 2: infecção com *C. gattii* L27/01

Grupo 3: infecção com *S. venezuelensis*

***C. gattii* X *S. venezuelensis***

Grupo 4: infecção com *S. venezuelensis* 7 antes da infecção com *C. gattii* L27/01

Grupo 5: infecção com *S. venezuelensis* 2 antes da infecção com *C. gattii* L27/01

Grupo 6: infecção com *S. venezuelensis* 2 dias após a infecção com *C. gattii* L27/01

Grupo 7: infecção com *S. venezuelensis* 7 dias após a infecção com *C. gattii* L27/01

### 2.3 Quantificação de carga fúngica em órgãos alvo

Novos grupos de animais (n=7/grupo) foram infectados e eutanasiados para determinação de carga fúngica e observação do perfil de recrutamento celular no lavado broncoalveolar. Foram coletados cérebro, pulmões e lavado broncoalveolar para quantificação de leveduras viáveis. O lavado broncoalveolar foi obtido com o auxílio de um tubo traqueal, por meio de injeção de 3 mL de PBS gelado nas vias aéreas dos camundongos. Os órgãos foram removidos cirurgicamente, pesados e triturados em 1 mL de PBS. O volume de 50µL de cada homogenato dos órgãos e do lavado broncoalveolar foram plaqueados, em duplicata, em Ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO) para quantificação das leveduras viáveis. Os dados foram expressos em quantidade de UFC/g de pulmão e cérebro e UFC/mL de lavado. Para a contagem total e contagem diferencial de leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares, o LBA restante foi centrifugado a 1200 rpm, 4°C, por 5 minutos, e o *pellet* celular resultante foi suspenso em 100µL de BSA 3% (Sigma). Para contagem diferencial entre neutrófilos e leucócitos mononucleares, foi feita



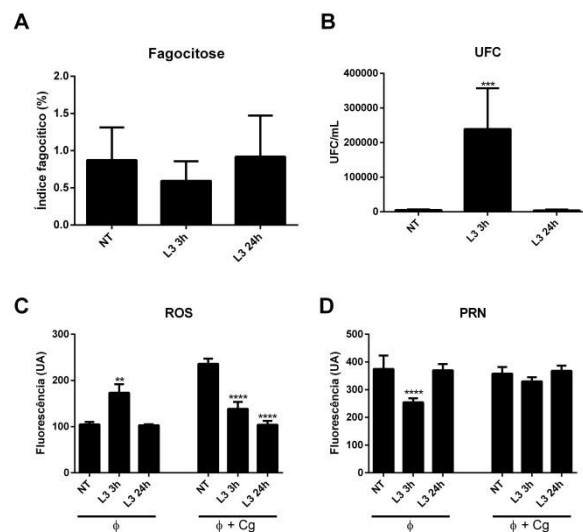
confeção de esfregaços em Cytospin (Thermo), a 450 rpm, por 5 minutos, que foram em seguida corados com Panótico Rápido (LABORCLIN), conforme protocolo de coloração sugerido pelo fabricante. Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG), com número de protocolo 369/2018.

### 2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se testes estatísticos para comparar as diferenças significativas entre os grupos estudados, com o apoio instrumental do software PRISMA 6.0 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). O nível de 95% de significância foi considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados e Discussão

A exposição de macrófagos ao antígeno L3 não resultou em uma alteração no índice fagocítico 3 horas após a infecção (Figura 1A). Em relação à proliferação intracelular nos tempos de 3 e 24 horas após a infecção com Cg, houve maior proliferação fúngica no interior de macrófagos estimulados com L3 por 3 horas antes da infecção com o fungo (Figura B). Em relação à produção de ROS, em ambos os tempos de 3 e 24 horas após a infecção com o fungo, houve uma menor produção dessas espécies para os dois tempos de estímulo com o antígeno (Figura 1C). Ao avaliar a produção de PRN por macrófagos infectados com o fungo, não foi observada diferença entre os grupos avaliados em ambos os tempos (Figura 1D). Esses resultados sugerem que uma infecção prévia com o parasita pode promover uma maior proliferação fúngica, o que poderia culminar num agravamento do quadro clínico.



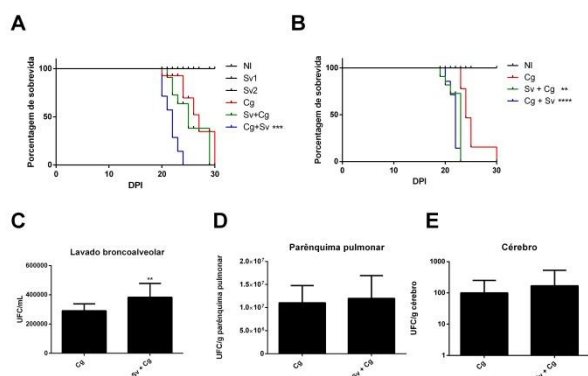
**Figura 1.** A) Índice fagocítico de macrófagos derivados de medula após 3 horas de infecção com *C. gattii*. B) Número de colônias recuperadas dos macrófagos após 3 horas de infecção com *C. gattii*. C) Produção de espécies reativas de Oxigênio (ROS) 3 horas após a infecção. D) Produção de peroxinitrito (PRN) 3 horas após a infecção. NT: macrófagos não estimulados; L3 3h: macrófagos estimulados com o antígeno L3 3 horas antes da infecção com *C. gattii*; L3 24h: macrófagos estimulados com o antígeno L3 24 horas antes da infecção com *C. gattii*;  $\Phi$ : macrófagos cultivados na ausência do fungo;  $\Phi + Cg$ : macrófagos cultivados na presença do fungo.

Para selecionar o melhor tempo para a coinfeção de *S. venezuelensis* e *C. gattii*, foi realizada uma infecção de animais com inóculos previamente padronizados. Inicialmente os animais foram infectados com o parasita 7 dias antes e 7 dias depois da infecção fúngica, sendo observado que apenas os animais infectados com o parasita após o fungo (Cg + Sv) apresentaram uma sobrevida reduzida em comparação aos animais infectados somente com Cg (Figura 2A). Com base nos resultados obtidos e levando-se em consideração que após dois dias de infecção as larvas de *S. venezuelensis* passam pelos pulmões, uma nova análise de sobrevida foi realizada. Além disso, foi avaliado se a coinfeção com o parasita em um tempo menor do que sete dias também resultaria em uma menor sobrevida dos animais. Para isso, os animais foram coinfectados 2 dias antes e 2 dias após a infecção por Cg (Figura 2B). Em ambas as coinfeções, houve redução na sobrevida dos animais.

Os ensaios de sobrevida da coinfeção entre *C. gattii* e *S. strongyloides* demonstraram que a coinfeção do parasita antes ou depois da infecção

fúngica são capazes de aumentar a morbimortalidade dos animais. Entretanto, para a coinfeção com o parasita antes (Sv + Cg), esse aumento de morbimortalidade é dependente do tempo de contato do hospedeiro com o parasita antes da infecção fúngica.

A partir dos resultados obtidos, o tempo de infecção com Sv 2 dias antes de Cg foi escolhido para a quantificação de carga fúngica nos órgãos alvo. Após 10 dias de infecção com o fungo os animais foram eutanasiados, sendo observado um aumento da carga fúngica no lavado broncoalveolar dos animais coinfectados (Sv + Cg) (Figura 2C). Entretanto, não houve diferença de carga fúngica no cérebro e parênquima pulmonar entre os grupos Cg e Sv + Cg (Figuras 2D e 2E). Em relação ao perfil de recrutamento celular no lavado broncoalveolar, o grupo Sv + Cg apresentou um menor recrutamento de células, quando comparado ao grupo Cg. Também foi observado um menor recrutamento de células polimorfonucleadas.



**Figura 2.** A) Curva de sobrevivência de animais coinfectados com Sv 7 dias antes ou 7 dias depois da infecção com *C. gattii*. B) Curva de sobrevivência de animais coinfectados com Sv 2 dias antes ou 2 dias depois da infecção com *C. gattii*. NI: não infectado; Sv1: grupo infectado com *S. venezuelensis*; Sv2: grupo infectado com *S. venezuelensis*; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sv + Cg: grupo infectado com Sv 2 ou 7 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg + Sv: grupo infectado com Sv 2 ou 7 dias após a infecção com *C. gattii*. Carga fúngica de animais infectados com *S. venezuelensis* 2 dias antes da infecção com Cg, sendo eutanasiados 10 dias após a infecção com o fungo. C) UFC/g de parênquima pulmonar D) UFC/mL de lavado broncoalveolar. E) UFC/g de cérebro. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sv + Cg: grupo infectado com Sv 2 dias antes da infecção com *C. gattii*;

#### 4. Conclusões

A coinfeção dos grupos com *S. venezuelensis* após *C. gattii*, resultou em maior morbidade e mortalidade dos animais, independente do tempo de inoculação do parasita. Já o aumento da morbimortalidade dos grupos coinfectados com o parasita antes do fungo foi dependente do tempo de inoculação de *S. venezuelensis* nos animais. Essa maior morbimortalidade pode estar associada a uma alteração na resposta imune do hospedeiro ou de um dano tecidual causado pela coinfeção.

#### 5. Apoio Financeiro

Capes, CNPq e Fapemig.

#### 6. Referências

BOTTS, M. R. & HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. **Current Opinion in Microbiology** 13, 437–442 (2010).

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Strongyloides*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>. Acesso em: 18/10/2018.

FANG, W.; FA, Z. & LIAO, W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. **Fungal Genetics and Biology** 78, 7–15 (2015).

LIN, X. & HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology** 60, 69–105 (2006).

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T. & NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology** 14, 106–117 (2016).

MENDES T.; MINORI, K.; UETA, M.; MIGUEL D.C.; ALLEGRETTI, S.M. Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug Research. **Journal of Parasitology Research**. 2017.

SCHÄR, F.; Trostorf, U.; Giardina, F.; Khieu, V.; Muth, S.; Marti, H.; Vounatsou, P.; Odermatt, P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and

Risk Factors. **PLoS Negl Trop Dis** 7(7): e2288.  
doi:10.1371/journal.pntd.0002288

Varatharajalu, R. & Rao, K. *Strongyloides stercoralis*: current perspectives. **Reports in Parasitology**. 2016;5:23-33

VINEY M. *Strongyloides*. **Parasitology** [Internet]. 2017 Mar [cited 2018 Oct 19];144(3):259–62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5364833/>

VINEY, M. & KIKUCHI, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. *Parasitology*. 2016 Mar; 144(3):285–94.

**WHO. World Health Organization.**

Strongyloidiasis. Disponível em: [http://www.who.int/intestinal\\_worms/epidemiology/strongyloidiasis/en/](http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/strongyloidiasis/en/). Acesso em: 18/10/2018.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## DA MICOLOGIA CLÁSSICA À NANOTECNOLOGIA: AUMENTO DA EFICIÊNCIA PARA DETECÇÃO DE MICOSES SISTÊMICAS E APLICAÇÃO DE UM NOVO TESTE RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO PARA DIAGNÓSTICO DE CRIPTOCOCOSE

Junqueira<sup>1</sup>, C. M.; Siman<sup>2</sup>, L. G.; Corrêa<sup>3</sup>, A. J.; Santos<sup>3</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física/Laboratório de Física de Sistemas Biológicos

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

E-mail: caroline.junqueria@ctnano.org

### Resumo

A criptococose é uma doença causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. É a infecção fúngica que mais acomete o SNC. Quanto ao diagnóstico, métodos imunológicos, são bastante laboriosos, exigindo fino treinamento de pessoal e disponibilidade de equipamentos onerosos para a obtenção de resultados. Testes imunocromatográficos são de rápida e simples execução, porém podem gerar resultados falso-positivos devido à ocorrência de reação cruzada com outros microrganismos. Considerando as lacunas importantes no diagnóstico da criptococose causadas pelas falhas inerentes a cada método, é de grande importância o desenvolvimento e aplicação de testes rápidos, sensíveis, específicos, de fácil manuseio e acessíveis em ambientes distantes de grandes centros. Esse trabalho visa a combinação de fotônica e nanotecnologia para um novo método de diagnóstico através da geração de nanosensores capazes de se ligar a antígenos criptocócicos e de medidas óticas que possibilitem a detecção e caracterização dessas ligações. Assim, nanobastões de ouro foram sintetizados e funcionalizados com anticorpos monoclonais 18B7, que são capazes de reconhecer fragmentos de GXM. Os nanosensores foram testados utilizando soros de camundongos infectados e sadios através de medidas realizadas por um espectrômetro portátil de espalhamento de luz que utiliza medidas de espalhamento dinâmico de luz sendo capaz de detectar, em minutos, a presença de fragmentos da cápsula criptocócica, além de estimar a massa molecular dos mesmos e medir a constante de afinidade química com os anticorpos. Portanto, nesse trabalho demonstra-se a prova de conceito de uma tecnologia do tipo *point*

*of care* de alta acurácia para o diagnóstico de criptococose.

**Palavras-chave** *Cryptococcus*; Diagnóstico de criptococose; Nanotecnologia; Fotônica.

### 1. Introdução

A criptococose é uma doença causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*. Caracterizada como uma micose oportunista, é uma das principais doenças invasivas em humanos. Apresenta-se na forma de infecção pulmonar, sendo essa a mais frequente e, na forma de meningoencefalite criptocócica, correspondendo à forma mais letal da doença (Oliveira e Malhem, 2014). A contaminação ocorre através da inalação de células fúngicas, conhecida como basidiósporos. (Kronstand *et al.*, 2011). *C. neoformans* é encontrado em excrementos de pombos, ou em solos contaminados. Por outro lado, a espécie *gattii* pode ser encontrada em associação com ocos de árvores ou em madeiras em decomposição (Esher *et al.*, 2018).

Essas leveduras possuem diversos fatores de virulência que facilitam sua sobrevivência e multiplicação no organismo hospedeiro (Li e Mody, 2010; Chen *et al.*, 2014). Dentre eles, a cápsula polissacarídica é responsável, principalmente, pela inibição da fagocitose mediada por macrófagos (Chow e Casadevall, 2011). Estruturalmente é composta por polissacarídeos sintetizados na própria célula fúngica, como glicoronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MPs). A GXM compõe cerca de 90% da massa

capsular com peso molecular entre 1700 a 7000 KDa (O'Meara e Alspaugh; 2012).

Do ponto de vista social, é de extrema relevância mencionar que as micoses sistêmicas acometem, em sua grande proporção, indivíduos em situação de maior vulnerabilidade social. Considerando que o Brasil é marcado por discrepâncias em termos de distribuição de renda, o diagnóstico e tratamento dessas doenças não são de fácil acesso a todos, pois equipamentos de média e grande complexidade estão concentrados nos grandes centros, regiões metropolitanas e alguns polos regionais, o que resulta em grande variação de fluxo de pacientes para ter acesso aos serviços (Costa *et al.*, 2019).

Para isso, nanotecnologia possui grande aplicação no diagnóstico clínico, na detecção e tratamento de doenças uma vez que corresponde a um campo interdisciplinar que abrange áreas da física, biologia e química (Toma, 2016).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) tem sido extensamente utilizadas em pesquisas devido às suas propriedades únicas facilitando a ligação de biomoléculas à sua superfície; alguns formatos podem absorver luz na região infravermelha, sendo importante para fins biológicos; e por apresentarem testes negativos para toxicidade, e portanto, serem biocompatíveis (Pissuwan *et al.*, 2008).

Os nanobastões (NBs) são os mais estudados em razão de possuir maior aplicabilidade biológica e crescimento altamente controlado (Xu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zijlstra *et al.*, 2006). Os NBs de ouro são partículas anisotrópicas, de forma que a oscilação dos elétrons no material pode ocorrer em dois sentidos principais: ao longo do eixo curto, referido como eixo transversal, e ao longo do eixo longo, referido como eixo longitudinal (Wang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2011). Devido à alta razão entre a área de superfície e volume que os NBs de ouro apresentam, observa-se uma alta sensibilidade dos mesmos à natureza dielétrica do ambiente circundante (Stone *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de biosensores a partir de nanopartículas se baseia em princípios de transdução ótica, especialmente em técnicas de fluorescência, ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e quimiluminescência. Os nanobiosensores são amplamente utilizados em diversos setores científicos incluindo diagnóstico clínico; desenvolvimento de medicamentos; detecção de drogas ilícitas; qualidade e segurança alimentícia e monitoramento ambiental (Cao *et al.*, 2014).

Nesse trabalho utilizou-se nanobiosensores e a técnica de espalhamento dinâmico de luz para propor um novo método de diagnóstico para *Cryptococcus*, por uma Plataforma Portátil de Biodiagnóstico. Para isso os nanobastões foram funcionalizados com anticorpo monoclonal 18B7 e o diagnóstico ocorre pela alteração de tamanho dos nanosensores quando estes se ligam a moléculas específicas. As medidas óticas foram realizadas por um equipamento portátil, que utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica para amplificar o espalhamento de luz pelos nanosensores em solução. A metodologia utilizada indica se houve ligação aos nanosensores e fornece informação sobre a massa molecular do ligante e da afinidade química entre os ligantes, em poucos minutos. Sendo assim, o diagnóstico do tipo *point of care* é de alta acurácia.

## 2. Metodologias

### 2.1 Obtenção de amostras clínicas

Para esse procedimento foram utilizadas culturas de leveduras fornecidas pelo Laboratório de Micologia da UFMG, utilizou-se as linhagens H99 de *C. neoformans*. Essas leveduras foram repicadas em Agar Sabouraud Dextrose-ASD, através do método de espalhamento por estrias e incubadas à 37 °C por 48 horas.

Para a execução dos experimentos *in vivo*, utilizou-se camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Para *C. neoformans* utilizou-se o inóculo e o modelo de infecção intratraqueal desenvolvido no Laboratório de Micologia – UFMG. Após 18 dias de infecção dos camundongos, iniciou-se o processo de obtenção de soros. Protocolo CEUA 235/2017.

### 2.2 Síntese e funcionalização dos nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro foram sintetizados através do método sem semente utilizando resveratrol como redutor fraco. Os NBs produzidos possuem a lateral passivada por CTAB e as extremidades livres de moléculas para que ocorra a ligação do anticorpo monoclonal 18B7.

Para que facilitar a ligação entre NBs e anticorpo adicionou-se um *linker* denominado MUA (ácido - 11- mercaptoundecanóico). Esse *linker* possui duas extremidades: uma possibilita a

ligação com moléculas contendo grupos amina, via um grupamento carboxila (-COOH); e outra que possibilita ligação ao nanobastão de ouro, por um grupamento tiol (-SH) (Bolat *et al.*, 2013).

### 2.3 Medidas óticas

Em decorrência das propriedades óticas dos nanobastões de ouro, a interação de moléculas em sua superfície é refletida em alterações da ressonância plasmônica, observada através de deslocamentos do pico de ressonância longitudinal, sendo medidos por meio de medidas de espectroscopia ótica UV-Visível na faixa de radiação entre 400 a 900 nm.

O dispositivo Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL), patente número BR 10 2016 009765 7, se baseia na correlação de fótons para medir e caracterizar o espalhamento dinâmico de luz a partir de soluções coloidais, e determinar o tamanho das partículas em suspensão. Uma das aplicações do EPEL é em biodiagnóstico, através da análise do tamanho de nanosensores em solução.

## 3. Resultados e Discussão

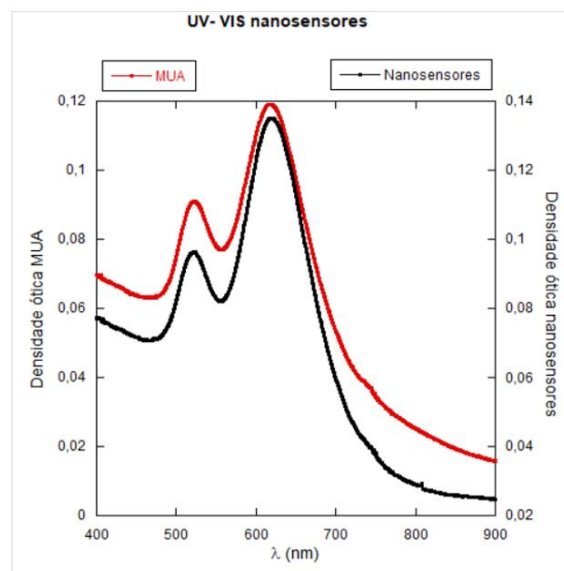
### 3.1 Caracterização dos nanobastões de ouro

Os dados gerados a partir da análise por UV-VIS das sínteses produzidas foram visualizados pelo programa KaleidaGraph. Observa-se um pico na extinção relativo à LSPR longitudinal em 619 nm e outro pico em 524 nm relativo à LSPR transversal e uma eficiência de 1,4. A partir da leitura ótica pelo dispositivo EPEL, obtém-se que o tau médio ( $\tau$ ) = 11  $\mu$ s, o que retorna um tamanho de  $L= 44$  nm para os NBs e, portanto, um diâmetro  $d= 22$  nm. A partir de uma análise da amplitude das funções de autorrelação temporal de intensidades para diferentes concentrações das soluções dos NBs, define-se a concentração ótima que retorna o máximo espalhamento de luz em 150 pM.

### 3.2 Caracterização dos nanobastões de ouro funcionalizados

Os dados gerados a partir da análise por UV - VIS dos nanosensores funcionalizados com o anticorpo monoclonal 18B7 foram visualizados pelo programa KaleidaGraph e os resultados estão representados na figura 1. Observa-se o pico

relativo à LSPR longitudinal em 620,5 nm. A partir da leitura pelo dispositivo EPEL, obtém-se que o tau médio ( $\tau$ ) dos NBs de 20,0  $\mu$ s, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 7 nm para cada lado do nanobastão de ouro, coincidindo com o tamanho de um IgG completo.



**Figura 1:** Análise por UV-VIS dos nanosensores. Os nanosensores (preto) apresentam um pico máximo de absorvância em 620.5 nm com  $\Delta\lambda$  de -3nm e concentração aproximada de 848 pM.

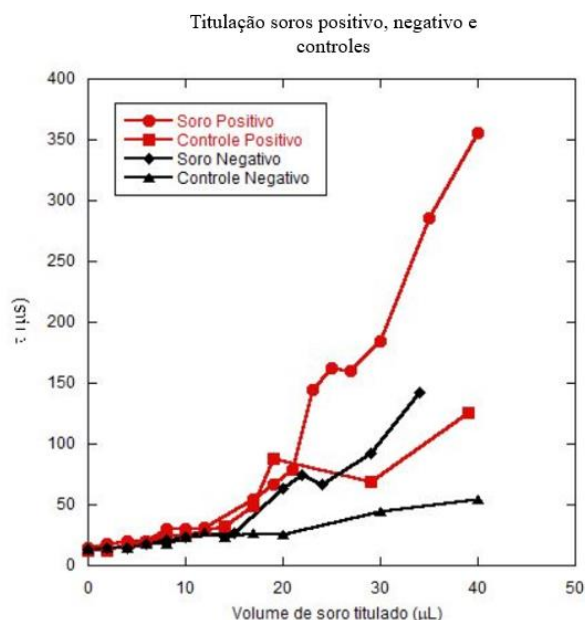
### 3.3 Titulação dos soros positivo e negativo aos nanosensores

Os soros positivo e negativo e os controles foram titulados com adição do blocker (BSA) ao nanosensor, os resultados obtidos estão representados na figura 2. Para a titulação do soro negativo nota-se o tau inicial de 20  $\mu$ s e o tau final de aproximadamente 150  $\mu$ s, com 35  $\mu$ L de soro titulado. Por outro lado, o controle titulado com o soro negativo, apresentou tau inicial de 20  $\mu$ s e o tau final de aproximadamente 50  $\mu$ s, com 40  $\mu$ L de soro titulado. Assim, observa-se que a presença do anticorpo favorece a ligação de proteínas (antígenos específicos ou inespecíficos).

Para a titulação do soro positivo nota-se o tau inicial de 20  $\mu$ s e o tau final de aproximadamente 360  $\mu$ s, com cerca de 40  $\mu$ L de soro titulado. Esse aumento no tempo de decaimento corresponde a um aumento de aproximadamente 50 nm para cada lado dos nanosensores. Esse valor é compatível com o tamanho dos fragmentos da cápsula polissacarídea criptocócica, especificamente fragmentos de glucoroxilomanana (GXM) que



possui peso molecular entre 1700 a 7000 KDa (O'Meara e Alspaugh; 2012). Para o controle titulado com o soro positivo, o tau inicial foi de 20  $\mu$ s e o final de 150  $\mu$ s. Novamente os dados indicam que a presença do anticorpo favorece a ligação de proteínas.



**Figura 2:** Titulação dos soros positivo e negativo e controles. Soros diluídos 1000 vezes.

### 3.4 Avaliação da especificidade dos nanosensores

Para comprovar a especificidade dos nanosensores, o soro positivo foi submetido ao aquecimento em banho térmico a 95 °C durante 5 minutos. Nota-se um valor de 350  $\mu$ s para o soro positivo e de aproximadamente 50  $\mu$ s para o soro positivo aquecido. Esse resultado demonstra que o aquecimento promoveu a desnaturação de proteínas, inclusive de antígenos, impedindo o evento de bioreconhecimento do nanosensor sintetizado.

## 4. Conclusões

A partir dos experimentos realizados, concluiu-se que a síntese baseada no componente natural resveratrol forneceu nanobastões com características físico-químicas adequadas para a fabricação de nanosensores para uso na plataforma. Além disso, com a realização dos processos de funcionalização chegou-se a uma concentração ótima de anticorpos a ser utilizada para a fabricação dos nanosensores.

A sensibilidade e especificidade dos nanosensores sintetizados foram avaliadas com a

titulação de soros positivos e negativos para criptococose, demonstrando a acurácia do diagnóstico. Sendo assim, esse trabalho demonstrou a prova de conceito do uso de uma plataforma portátil de biodiagnóstico para a detecção de criptococose em soro de animais infectados.

O próximo passo nesse desenvolvimento é a validação da metodologia, o que inclui as atividades: novos testes com um banco de soros e a comparação das respostas com a técnica padrão de diagnóstico, estudo da estabilidade dos nanosensores (em solução ou liofilizados) para armazenamento dos mesmos e uso da plataforma em campo.

## 5. Apoio Financeiro

Fapemig.

## 6. Referências

- CAI, W. et al. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology, science and applications**, v. 2008, n. 1, p. 10.2147/NSA.S3788, ISSN 1177-8903. 2008.
- CAO, J.; SUN, T.; GRATTAN, K. T. V. Gold nanorod- based localized surface Plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 195, p. 332 – 351. 2014.
- CHEN, H. et al. Gold nanorods and their plasmonic properties. **Chemical Society Reviews**.v.42, p. 2679 – 2724, 2013.ISSN 0306-0012.
- CHEN, S; MEYER, W; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 27, n.4, p. 980 – 1024. Oct. 2014.
- CHOW, S. K; CASADEVALL, A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. **Vaccine**. v. 29, n. 10. Fev. 2011.



COSTA M. C et al. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**. v. 29, 2019.

ESHER, S. K. et al. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.113, n. 7. 2018.

KRONSTAND, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews**. v. 5, p. 193-203. Mar. 2011.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Health Research Innovation Centre**, Calgary, v. 7, p. 186 – 196, Oct. 2010.

OLIVEIRA, L.; MALHEM, M., S., C. *Cryptococcus neoformans*: importância do diagnóstico clínico das formas polimórficas. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**. v. 24, n. 1, p. 49-50. 2014.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 3, p. 387 –408. Jun. 2012.

PISSUWAN, D.; VENEZUELA, S. M.; CORTIE, M. B. Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. v. 25, n. 1, p. 93 – 112. 2008.

STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. **Jonh Wiley e Sons, Inc**. v. 3, p. 100 – 108. Jan –Fev. 2011.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia Molecular-Materiais e Dispositivos**. v. 6, São Paulo: Blucher, 2016. Cap. 10, p. 279 – 304.

XU, X. et al. Seedless Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods with High Yield. **Journal of Materials Chemistry A**. 2013.

WANG, W. et al. Seedless synthesis of gold nanorods using resveratrol as a reductant. **Nanotechnology**. v. 27, Mar. 2016.

ZIJLSTRA, P. et al. High-temperature Seedless Synthesis of Gold Nanorods. **J. Phys. Chem**. v. 110, n.39, p. 19315 – 19318. Aug. 2006.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## A IMPORTÂNCIA DE UM SERVIÇO QUALIFICADO EM MICOLOGIA EM UM HOSPITAL REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS.

Magalhães<sup>1,2</sup>, V.C.R.; Moura<sup>2</sup>, A. C. L.; Costa<sup>1</sup> M. C. e Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

<sup>2</sup> Hospital Eduardo de Menezes/Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais -FHEMIG

E-mail: dasufmg@gmail.com

**Resumo:** O Hospital Eduardo de Menezes (HEM) é um hospital público, localizado na cidade de Belo Horizonte, considerado referência em doenças infectocontagiosas e dermatologia sanitária no estado de Minas Gerais. O objetivo deste trabalho foi reestruturar o laboratório de micologia da instituição no intuito de se obter um serviço de diagnóstico qualificado e capaz de atender a demanda exigida pelo HEM. Para isso, utilizou-se uma detalhada análise situacional para identificar possíveis problemas que poderiam estar comprometendo o desempenho dos exames micológicos. As notificações da Vigilância Sanitária (VISA) foram atualizadas e listadas. A partir das inconsistências obtidas com a análise situacional e com as notificações da VISA, definiu-se ações como: organização física, elaboração e atualização de processos, capacitações, alinhamento com a equipe multidisciplinar de saúde e utilização de técnicas micológicas fundamentadas em evidências científicas para solucionar os problemas identificados. Implementou-as e verificou se as modificações contribuíram para o objetivo proposto. Além disso, foi feito um levantamento dos laudos micológicos, do período de 2014 a 2019, para se obter o perfil epidemiológico das micoses sistêmicas e subcutâneas do HEM. Assim, evidenciou-se que a organização estrutural, processual e de recursos humanos, juntamente com programas de capacitação e uso de metodologias baseadas em evidências científicas, impactam positivamente e de forma relevante no desempenho final do serviço prestado. Este estudo também possibilitou verificar que as técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico micológico possuem limitações inerentes a cada metodologia, e que o ideal é o uso associado destas.

**Palavras-chave** hospital referência em doenças infectocontagiosas; micoses sistêmicas e subcutâneas; diagnóstico micológico; gestão laboratorial; sistema de qualidade.

### 1. Introdução

O laboratório clínico é uma instituição que presta serviço destinado a análise de amostras biológicas para diagnóstico e monitoramento de doenças humanas, prevenção, estratificação de risco, prognóstico e monitoramento terapêutico. A medicina laboratorial é inquestionável e desempenha um papel dominante na tomada de decisões clínicas (Plebani; Lippi, 2016) uma vez que os resultados das análises laboratoriais são responsáveis por, aproximadamente, 70% das informações pertinentes à decisão médica (Hallworth, 2011). Assim, exige-se do laboratório a necessidade de incorporar os conceitos da qualidade, particularmente na melhoria do processo de diagnóstico e na redução de erros de diagnóstico (de Souza et al., 2016; Plebani, 2010).

Por outro lado, a crescente ocorrência de doenças infecciosas fúngicas representa um grande desafio para a saúde humana em todo o mundo. Estima-se que o número total de espécies de fungos exceda 1,5 milhão (Hawksworth, 2001), e entre essas espécies, mais de 600 são relatados como capazes de infectar humanos e animais, causando infecções simples a fatais (Brown et al., 2012). Além disso, o *Global Action Fund for Fungal Infections* (GAFFI) estima que cerca de 1,5–2,0 milhões de pessoas morrem de uma infecção fúngica a cada ano, superando as mortes por malária ou tuberculose (Denning e Bromley, 2015).

Considerando que o correto diagnóstico e tratamento dos pacientes, em tempo hábil,

contribuem para um bom prognóstico das comorbidades fúngicas, a necessidade de reestruturação do Serviço de Diagnósticos de Análises Clínicas do HEM, com enfoque nas micoses, torna-se iminente.

## 2. Metodologias

### 2.1 Gestão da qualidade laboratorial

Realizou-se uma análise situacional do laboratório de micologia por meio do Diagrama de causa e efeito (Rodrigues, 2011). Em seguida, elaborou-se o “Plano de ação de Reestruturação da Micologia HEM”, pelo método 5h2W (Rodrigues, 2011), no qual listamos as inconsistências resultantes da análise situacional estratificadas em quatro grupos: estrutural, organizacional, metodológico e recursos humanos, juntamente com as variáveis: N° do item, inconformidade, ação corretiva e *status* após intervenção, para o acompanhamento efetivo das ações.

As notificações da Vigilância Sanitária (VISA), referentes ao setor estudado, foram levantadas e listadas. Com os dados obtidos foi elaborada uma “Planilha de Notificações da VISA – Laboratório Micologia HEM, 2013 a 2015”. Posteriormente, as inconsistências foram analisadas pelo programa Epi Info 3.5.3 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Estados Unidos) para se obter a distribuição de frequência para as variáveis: N° do item, grupo, legislação, responsável e *status*, antes e após as ações de reestruturação do laboratório.

Mediante as informações obtidas da análise situacional e do levantamento das notificações da VISA, definiu-se ações e tomou-se decisões a fim de solucionar os diferentes problemas identificados.

### 2.2 Estudo Epidemiológico

Os dados brutos laboratoriais dos exames micológicos, do período de 2014 a 2019, foram coletados em uma tabela padronizada. As informações coletadas foram: ano; prontuário; iniciais do paciente; sexo; data do exame; tipo de amostra clínica e resultados dos exames micológicos. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Epi Info 3.5.3 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Estados Unidos) para se obter a distribuição de frequência para as informações obtidas.

## 3. Resultados e Discussão

A análise situacional do setor em estudo possibilitou detectar a relação entre o efeito e as causas que estavam contribuindo para a ocorrência de falhas no processamento dos exames laboratoriais micológicos. Como resultados, detectou-se: exames não realizados de amostras recebidas, ausência de responsável técnico, quantitativo insuficiente de funcionários, setor desorganizado e desalinhado ao laboratório de análises clínicas, fluxos de trabalho não estabelecidos, Procedimentos Operacional Padrão (POP's) desatualizados/ausentes, desconhecimento das fases externas ao laboratório relacionadas a obtenção, armazenamento e encaminhamento de amostras clínicas, ausência de treinamentos e capacitações dos funcionários do setor, controle de qualidade de apenas alguns exames, falta de monitoramento dos processos e estrutura física em desacordo com a RDC nº50, a qual dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (Anvisa, 2002).

Dentre os problemas detectados, verificou-se que os que estavam diretamente relacionados à desassistência do paciente, por exames micológicos não realizados, pertenciam à fase pré-analítica do processo, fase onde ocorrem 70% dos erros laboratoriais que interferem nos processos analítico e pós-analítico (Plebani, 2012). Além disso, trata-se de problemas de processos que podem ser evitados (Carraro; Plebani, 2007).

Os itens notificados pela VISA e que encontravam-se pendentes, total de 38 itens, foram separados por grupos: infraestrutura, acomodações, estrutura e condições ambientais 10/38 (26,32%); garantia da qualidade 8/38 (21,05%); biossegurança 7/38 (18,42%); equipamentos/instrumentos 5/38 (13,16%); processos 3/38 (7,89%); recursos humanos 3/38 (7,89%) e recepção, coleta e transporte 2/38 (5,26%). E, posteriormente, por suas respectivas governabilidades: bioquímico 20/38 (52,63%), diretoria, 17/38 (44,74%) e diretoria assistencial de serviços em saúde (DIRASS) 1 (2,63%), conforme Tabela 01.

Os dados demonstram que em aproximadamente 53% das inconsistências notificadas pela VISA a responsabilidade de solução é do responsável técnico pelo setor. Além disso, as notificações de resolubilidade do bioquímico abrangem todos os grupos, mas se evidenciam no grupo de garantia da qualidade 7/20 (87,50%). Enquanto os itens pertencentes à diretoria se concentram no grupo infraestrutura, acomodações, estrutura e condições ambientais 6/16 (60,00%), biossegurança 5/16 (71,43%) e equipamentos 4/16 (80,00%).

Tabela 1- Grupo de inconsistências notificadas por governabilidades antes da reestruturação e itens sanados e pendentes após a reestruturação do setor de Micologia (HEM).

Grupo de inconsistências	Antes da reestruturação			Após a reestruturação	
	Bioquímico	Diretoria	DIRAAS	Itens sanados	Itens pendentes
Infraestrutura, acomodações, estrutura e condições ambientais ( <i>n</i> =10)	4 (40,00 %)	6 (60,00 %)	0 (00,00%)	4 (40,00 %)	6 (60,00 %)
Garantia da qualidade ( <i>n</i> =8)	7 (87,50%)	0 (00,00%)	1 (12,50%)	7 (87,50 %)	1 (12,50 %)
Biossegurança ( <i>n</i> =7)	2 (28,57%)	5 (71,43%)	0 (00,00%)	2 (28,57 %)	5 (71,43 %)
Equipamentos/instrumentos ( <i>n</i> =5)	1 (20,00%)	4 (80,00%)	0 (00,00%)	1 (20,00 %)	4 (80,00 %)
Processos ( <i>n</i> =3)	2 (66,67%)	1 (33,33%)	0 (00,00%)	2 (66,67 %)	1 (33,33 %)
Recepção, coleta e transporte ( <i>n</i> =2)	2 (100,00%)	0 (00,00%)	0 (00,00%)	2 (100,00 %)	0 (0,00 %)
Recursos humanos ( <i>n</i> =3)	2 (66,67%)	1 (33,33%)	0(00,00%)	2 (66,67 %)	1 (33,33%)

DIRAAS = diretoria assistencial de serviços em saúde.

De acordo com a RDC N°302, cabe a direção e o responsável técnico do laboratório clínico a responsabilidade de planejar, implementar e garantir a qualidade dos processos. Além disso, estabelecer uma estrutura organizacional documentada com instruções escritas e atualizadas das rotinas técnicas implantadas, garantir a rastreabilidade de todos os processos e assegurar a confiabilidade dos serviços laboratoriais prestados (Anvisa, 2005). Neste sentido, após a análise situacional e o levantamento das notificações da VISA, ações foram delineadas a fim de solucionar os problemas identificados cuja responsabilidade de resolução coubesse a atual bioquímica do setor de micologia.

A etapa inicial foi a execução do programa 5s (Ribeiro, 1994) baseado nos sentidos de utilização, de ordenação, de limpeza, de saúde e de autodisciplina, aplicado ao setor de micologia que se encontrava bastante desorganizado. Objetos em desuso ou estragados e documentos arquivados por período superior a cinco anos foram descartados. Móveis estragados e enferrujados foram substituídos por móveis novos. As caixas de papelão, utilizadas para o armazenamento, foram substituídas por caixas rígidas de plástico identificadas. Os armários, caixas, pastas, arquivos e lixeiras foram organizados e identificados corretamente com nomes e símbolos, quando necessário. Os papéis afixados nas paredes foram retirados e um quadro de aviso foi instalado.

Os fluxos de trabalho foram estabelecidos de modo a integrar o setor de micologia ao laboratório de análises clínicas, em especial ao setor de microbiologia, constituindo uma extensão deste. Definiu-se tanto a centralização do recebimento das amostras biológicas direcionadas à micologia, pelo setor de distribuição, quanto a centralização dos plantios micológicos pela microbiologia. O fluxo estabelecido contribuiu para aplicar o processo de recebimento, armazenamento e encaminhamento de

amostras biológicas, possibilitando a conferência adequada destas. Ademais, possibilitou o plantio imediato das amostras o que favoreceu para o aumento da capacidade de recuperação do agente etiológico micológico além de assegurar o processamento das amostras evitando sua perda.

Foram atualizados 6 POP's e outros 6 foram instituídos. Os técnicos do laboratório e a equipe multidisciplinar do hospital foram capacitados quanto aos processos de trabalho estabelecidos. Implementou-se o controle de qualidade interno de todos os exames realizados no setor. Além disso, planilhas de rastreabilidade dos corantes e meios de culturas; de controle da temperatura de incubação das culturas fúngicas e de manutenções corretivas e preventivas dos equipamentos foram introduzidas na rotina.

Por fim, padronizou-se os métodos: exame micológico a fresco com hidróxido de potássio (KOH) a 30%, as colorações pelo Panótico, Ziehl Neelsen e Gram e o método Tinta da china, quando solicitado ou necessário, para o exame "Pesquisa de fungos". Novos meios de culturas foram introduzidos para aumentar a sensibilidade das técnicas micológicas clássicas e ainda aumentar a capacidade de identificação presuntiva dos agentes fúngicos. Dentre estes podemos citar: o ágar Sabouraud com cloranfenicol, o ágar Batata Dextrose, o ágar Níger e o CHROMagar® (Ribeiro et al, 2009).

Assim, as atuações de gestão laboratorial exercidas pela bioquímica e autora deste trabalho possibilitaram melhorias no serviço de micologia, sobretudo nos itens de sua responsabilidade, especificados na Tabela 01. Os itens resolvidos, em ordem decrescente de resolutividade foram: Recepção, coleta e transporte 2/2 (100%); Garantia de qualidade 7/8 (87,50%); Processos e Recursos humanos 2/3 (66,67 %); Infraestrutura, acomodações, estrutura e condições ambientais 4/10 (40,00%); Biossegurança 2/7 (28,57%) e

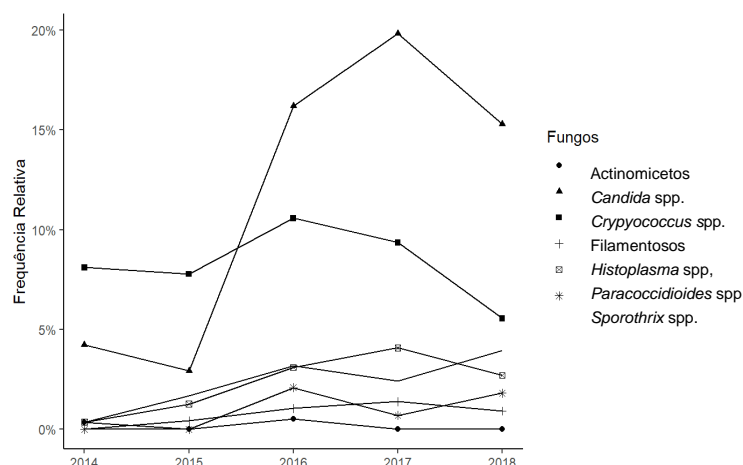
Equipamentos/instrumentos 1/5 (20,00%). Visto isso, pode-se concluir que as questões relacionadas à Infraestrutura, acomodações, estrutura e condições ambientais; Biossegurança e Equipamentos/instrumentos permaneceram com grande parte de itens a resolver. E que 18/20 (90%) dos itens em desacordo com a VISA foram resolvidos pela bioquímica enquanto as intervenções corretivas da diretoria ficaram restritas a 2/17 (11,76 %) dos itens.

Por outro lado, a frequência das variáveis categóricas, obtidas dos dados brutos laboratoriais, permitiu esboçar o panorama dos exames micológicos na instituição e ainda identificar os aspectos de interesse do presente estudo.

Foram considerados um total de 6327 resultados de exames de culturas micológicas, realizados no período de 2014 a 2019. A partir do Gráfico 01, verificou-se que durante todos os anos os fungos mais frequentes são: *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., sendo que no período entre 2014 a 2015 o *Cryptococcus* spp. foi o mais frequente, no entanto a partir de 2016, predominou-se *Candida* spp.. Em seguida, foram *Histoplasma* spp. e *Sporothrix* spp., que tiveram um aumento a partir de 2015, porém o número de *Histoplasma* spp. reduziu após 2017 e o de *Sporothrix* spp. continuou aumentando. O fungo *Paracoccidioides* spp. praticamente não apareceu em 2014 e 2015, mas a partir de 2016 há um pequeno deste. As bactérias actinomicetos foram isoladas em pequeno número. É relevante mencionar que após o ano 2015, com a introdução do meio de cultura diferencial para leveduras, o CHROMagar®, iniciou-se a identificação presuntiva das leveduras de todas as amostras

clínicas o que ocasionou o aumento expressivo deste fungo a partir deste período.

Gráfico 1- Frequência relativa dos fungos isolados no laboratório de micologia do HEM, 2014 a 2019.



#### 4. Conclusões

O presente estudo evidenciou que a organização estrutural, processual e de recursos humanos, juntamente com programas de capacitação e o uso de metodologias baseadas em evidências científicas impactam positivamente e de forma relevante no desempenho final do serviço prestado. Além disso, o estudo dos dados laboratoriais relativos aos exames micológicos do HEM, no período de 2014 a 2019, possibilitou traçar um panorama da evolução do serviço micológico da instituição e ainda evidenciou a importância do Hospital Eduardo de Menezes à sociedade frente às micoses sistêmicas, fornecendo respostas rápidas e eficazes para a promoção da saúde no Estado de Minas Gerais.

#### 5. Apoio Financeiro

UFMG, CNPq e FAPEMIG.

#### 6. Agradecimentos

À Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais-FHEMIG.

## 7. Referências

ANVISA, A. N. DE V. SANITÁRIA. RDC no 302, de 13 de outubro de 2005. v. 2005, p. 1–9, 2005.

BROWN, G. D. et al. Tackling human fungal infections. **Science** 336, 647. 2012.

CARRARO, P.; PLEBANI, M. Errors in a stat laboratory: Types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1338–1342, 2007.

DE SOUZA, M. C. et al. Normas para a gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas. **Espacios**, v. 37, n. 6, p. 363–368, 2016.

DENNING, D. W. et al. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. **Science** 347, 1414–1416, 2015.

HALLWORTH, M. J. The “70% claim”: What is the evidence base? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 487–488, 2011.

HAWKSWORTH, D. L.. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.** 105, 1422–1432., 2001.

LEGISLAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - Rdc No. 50, De 21 De Fevereiro De 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, n. I, p. 1–125, 2002.

PLEBANI, M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 101–110, 2010.

PLEBANI, M. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 33, n. 3, p. 85–88, 2012.

PLEBANI, M.; LIPPI, G. Improving diagnosis and reducing diagnostic errors: The next frontier of laboratory medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 54, n. 7, p. 1117–1118, 2016.

RIBEIRO, Haroldo. 5S: Um roteiro para uma implantação bem sucedida. Salvador, BA: **Casa da qualidade**, 1994. 99 p.

RIBEIRO, P.M., et al. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. **Braz Dent Sci** 2009

out./dez.; 12 (4): 40–45 Disponível em: <http://www.plastlabor.com.br/blog/isolamento-candida/>. Acesso em: 26/09/2020.

RODRIGUES MV, CARÂP LJ, EI-WARRAK LO, Rezende TB. Qualidade e acreditação em saúde. 1ed. Rio de Janeiro: Editora FGV, v.4, p.152, 2011.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 DURANTE INFECÇÃO POR *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Malacco<sup>1</sup>, N.L.S.O.; Souza<sup>1</sup>, J. A. M.; Moura<sup>1</sup>, T.R.; Souza<sup>2</sup>, D.G.; Teixeira<sup>1</sup>, M.M.; Russo<sup>3</sup>, R.C.; Soriani<sup>1</sup>, F.M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Fisiologia Pulmonar.

E-mail: nathalialuisa2@gmail.com

**Resumo:** *Aspergillus fumigatus* é um fungo ubíquo que tem relevância ambiental e clínica. A infecção se dá após inalação de conídios e indução desencadeamento de uma resposta inflamatória robusta, incluindo uma grande produção de quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos. Dentre os receptores de quimiocinas, há o receptor ACKR2, que é responsável por regular negativamente quimiocinas inflamatórias do tipo CC. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do receptor ACKR2 na aspergilose pulmonar. Para isso, foram utilizados camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> e WT de 10 a 12 semanas infectados com *A. fumigatus*. Os resultados mostraram que os camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> são susceptíveis a infecção por *A. fumigatus*. Esses animais também apresentaram maior carga fúngica em comparação aos animais WT. A análise de células no sítio infeccioso mostrou que animais ACKR2<sup>-/-</sup> tiveram aumento significativo nos leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos após a infecção. Em relação à liberação de quimiocinas, foi observado que há um aumento significativo nos níveis de CCL2, CCL3 e CCL5 nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> em comparação aos animais WT após infecção. Além disso, o antagonismo farmacológico do receptor CCR5 por met-RANTES em camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> foi capaz de reduzir a inflamação no foco infeccioso após a infecção por *A. fumigatus*. Como conclusão, os resultados demonstram que o receptor ACKR2 tem um papel protetor na aspergilose pulmonar, sendo

responsável por limitar a resposta antifúngica, a inflamação e o recrutamento de leucócitos.

**Palavras-chave** *Aspergillus*; aspergilose; ACKR2; quimiocinas; receptor atípico de quimiocinas.

### 1. Introdução

*Aspergillus fumigatus* é um fungo ubíquo e saprofítico que desempenha um papel importante na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio. É também o agente etiológico de cerca de 90% das aspergiloses diagnosticadas (LATGÉ, 1999). A aspergilose pulmonar é uma infecção que ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos e é dispersa em todas as regiões geográficas. As taxas de mortalidade variam de 50% a 95% e são dependentes de fatores como o estado imunológico do hospedeiro, o local da infecção, e o regime de tratamento aplicado (MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

A infecção por *A. fumigatus* se inicia após a inalação de conídios presentes no ar, seguida pela deposição nos bronquíolos ou nos alvéolos pulmonares. Após, os conídios tornam-se metabolicamente ativos, dando início a uma resposta pró-inflamatória. O desencadeamento da resposta imune está relacionado com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do fungo, por intermédio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes nos macrófagos alveolares e células epiteliais do hospedeiro (DAGENAIS; KELLER, 2009; ERWIG; GOW, 2016).

Os conídios e as hifas são capazes de ativar macrófagos pelos receptores do tipo Toll 2 (TLR2) e 4 (TLR4), enquanto dectina-1 é específica para



os carboidratos fúngicos  $\beta(1,3)$ -glucana, que estão normalmente mascarados na parede celular dos conídios de *A. fumigatus*. Os sinais de dectina-1 ativam a via do fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) e induzem a expressão de citocinas e quimiocinas, que são importantes para a defesa do hospedeiro contra este patógeno e também para o recrutamento de outros leucócitos (MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

Para que o recrutamento de leucócitos seja coordenado, é essencial a expressão de quimiocinas inflamatórias e seus respectivos receptores nas células-alvos. Dentro do sistema de quimiocina há um grupo de receptores atípicos de quimiocinas (ACKR), que se assemelham estruturalmente com os receptores convencionais, mas que não iniciam a sinalização clássica de ativação celular. Estes receptores atípicos se ligam e sequestram seus ligantes específicos, degradando e depletando progressivamente as quimiocinas do meio extracelular, realizando, assim, uma regulação negativa sobre as quimiocinas inflamatórias (BACHELERIE *et al.*, 2014; BORDON *et al.*, 2009; NIBBS; GRAHAM, 2013).

O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é capaz de se ligar a um amplo painel de quimiocinas inflamatórias da família CC reconhecidas pelos receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4 e CCR5, internalizando seus ligantes e regulando os níveis de quimiocinas do meio extracelular. Ele é expresso principalmente nas células endoteliais dos vasos linfáticos da pele, intestino e pulmão; e alguns leucócitos como macrófagos alveolares e células B inatas (NIBBS; GRAHAM, 2013).

O aumento da incidência de doenças fúngicas nas últimas décadas tem reforçado o interesse em compreender os mecanismos pelos quais a doença pode ser modulada para proteger indivíduos susceptíveis. Dessa forma, se fazem necessários estudos buscando entender o papel de moléculas importantes na inflamação. Além disso, o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na aspergilose pulmonar ainda não foi elucidado. Desta forma, o objetivo desse estudo é avaliar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 durante a aspergilose pulmonar.

## 2. Metodologias

### 2.1 Animais experimentais e infecção

Foram utilizados neste estudo camundongos WT (C57BL/6J) e ACKR2<sup>-/-</sup> com 10 a 12 semanas de idade. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número

62/2011. Os animais foram infectados via intranasal com  $1 \times 10^8$  conídios de *Aspergillus fumigatus* da linhagem A1163 (MALACCO *et al.*, 2020). Após a infecção, os animais foram monitorados a cada 24 h durante 7 dias consecutivos, para avaliar a susceptibilidade dos animais à infecção.

### 2.2 Lavado broncoalveolar e coleta de pulmões

Após 24 e 48 h de infecção foram coletados o lavado broncoalveolar (BAL) e pulmões. A partir de amostras do BAL foi feita a contagem total e diferencial de células. Já os pulmões foram utilizados para avaliação da carga fúngica pulmonar, pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e também para análise do infiltrado inflamatório pela medida da atividade de mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) e pela análise histopatológica dos tecidos.

### 2.3 Ensaio de ELISA

A dosagem das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL22 e das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  foi realizada no BAL após 1 e 2 dias de infecção, pelo método imunoenzimático de ELISA (R&D Systems), de acordo as instruções do fabricante.

### 2.4 Inibição da sinalização de CCR5 com o antagonista met-RANTES

Camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> foram tratados com 4 e 8  $\mu g/kg$ /animal com o antagonista do ligante de CCR5 (met-RANTES) em 1 e 24 horas de infecção, via intraperitoneal. Após 48 h de infecção, o BAL foi coletado e o infiltrado celular foi avaliado.

### 2.5 Análises estatísticas

Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 6.0. A curva de letalidade foi analisada pelo método de Log-Rank. Comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste t-Student. Já as análises entre mais de dois grupos foram feitas por One Way-ANOVA, seguida pelo método pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes se  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

Para se investigar o papel do receptor atípico de quimiocinas (ACKR2) na aspergilose pulmonar, camundongos WT e deficientes para esse receptor (ACKR2<sup>-/-</sup>) foram infectados via intranasal com *A. fumigatus*. Na análise de susceptibilidade a infecção por *Aspergillus fumigatus*, foi observado que os camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> apresentaram letalidade de 100% em comparação com os animais WT, que tiveram letalidade em torno de 25%, demonstrando o papel protetor desse receptor. Essa maior susceptibilidade a infecção foi correlacionada com uma maior carga fúngica pulmonar após 24h de infecção, já que os camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> apresentaram aproximadamente 2,5x10<sup>6</sup> UFC em comparação aos camundongos WT, que mostraram cerca de 1,2x10<sup>6</sup> UFC por pulmão.

Esses resultados vão de acordo com a literatura em modelos de sepse, em que camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> submetidos à sepse severa apresentam também letalidade de 100% e associado a isso há uma maior carga bacteriana no peritônio e no sangue (E SILVA CASTANHEIRA *et al.*, 2018).

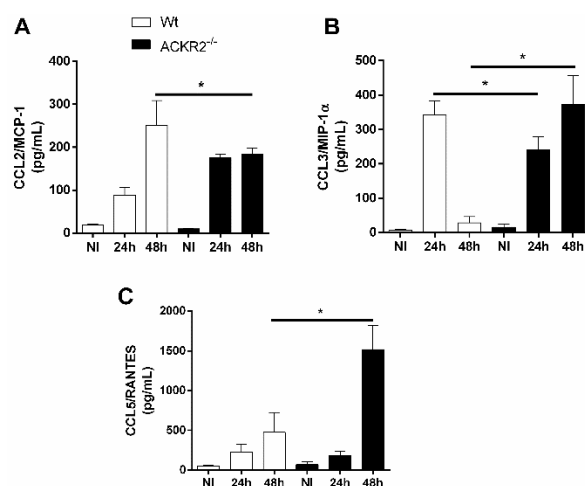
Já em relação ao recrutamento de células para o sítio da infecção, foi observado que, após 24 h de infecção, os animais ACKR2<sup>-/-</sup> apresentaram aumento significativo nos leucócitos totais (4,7 x 10<sup>6</sup> nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 1,9 x 10<sup>6</sup> nos animais WT), neutrófilos (4,1 x 10<sup>6</sup> nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 1,7 x 10<sup>6</sup> nos animais WT) e macrófagos (6,2 x 10<sup>5</sup> nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 4 x 10<sup>5</sup> nos animais WT). Também foi avaliado o extravasamento de proteínas plasmáticas, que mostrou ser maior nos camundongos deficientes em ACKR2 (23,9 mg/mL nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 12,79 mg/mL nos animais WT) também após 24 h de infecção.

No modelo experimental de sepse, também há o aumento significativo da presença de neutrófilos nos pulmões, rins e no coração em camundongos deficientes para o receptor ACKR2, mostrando a importância desse receptor em controlar a chegada excessiva de leucócitos inflamatórios nos tecidos (E SILVA CASTANHEIRA *et al.*, 2018).

Em relação a liberação de citocinas inflamatórias, foi observado que os níveis de TNF- $\alpha$  são similares nos camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> e WT. Já para IFN- $\gamma$ , foi observado níveis semelhantes após 24 h de infecção e diminuição significativa após 48 h de infecção por *A. fumigatus* (1395,6 pg/mL nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 2080,5 pg/mL nos animais WT).

Na avaliação do perfil de liberação de quimiocinas CC inflamatórias, três quimiocinas se

destacaram, são elas, a CCL2, CCL3 e CCL5. Foi observado que há um aumento significativo nos níveis de CCL2 nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> em comparação aos animais WT após 24h de infecção (175,29 pg/mL nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 88,61 pg/mL nos animais WT), enquanto CCL3 e CCL5 tiveram aumento significativo após 48 h de infecção por *A. fumigatus* nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> em comparação aos animais WT após infecção (para CCL3: 372,55 pg/mL nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 28,27 pg/mL nos animais WT e para CCL5: 1517,8 pg/mL nos animais ACKR2<sup>-/-</sup> contra de 475,43 pg/mL nos animais WT) (Figura 1)



**Figura 1:** A presença do receptor ACKR2 regula os níveis das quimiocinas (A) CCL2, (B) CCL3 e (C) CCL5 após infecção por *A. fumigatus*.

Já os níveis das quimiocinas CCL4, CCL11, e CCL17 são similares nos camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> e WT tanto em 24 h e 48 h de infecção.

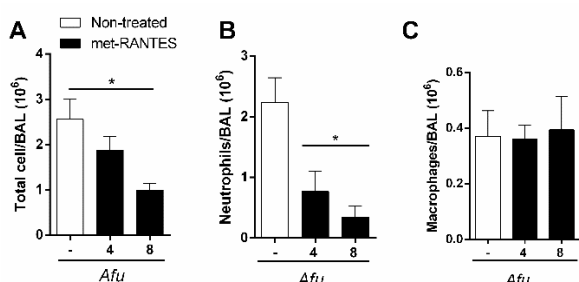
Um estudo com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos com deficiência em ACKR2 mostrou a importância desse receptor para manter a regulação e balanço da resposta inflamatória, controle da carga bacteriana e sobrevivência dos animais. O mecanismo apontado pelos autores é que ACKR2 controla os níveis de expressão de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, que, por sua vez, têm a capacidade de controlar o influxo de macrófagos e linfócitos para os pulmões (DI LIBERTO *et al.*, 2008).

Como foi demonstrado, ACKR2 é um receptor que tem seu papel no controle principalmente de CCL2, CCL3 e CCL5 durante a infecção por *Aspergillus fumigatus*, sendo que para a

quimiocina CCL5 os níveis são mais de três vezes maiores nos animais ACKR2<sup>-/-</sup>.

Dessa forma, a fim de avaliar a importância do controle da sinalização pela via CCL5-CCR5, foi utilizado um antagonista para o receptor CCR5, o met-RANTES. Os animais ACKR2<sup>-/-</sup> foram infectados com *A. fumigatus* e, tratados com duas doses de 4 ou 8 µg de met-RANTES no tempo de 1 h e 24 h após infecção. A eutanásia aconteceu após 48 h de infecção e houve então a análise de infiltrado celular no sítio de infecção.

A inibição farmacológica da via do receptor CCR5 pelo antagonista met-RANTES em camundongos ACKR2<sup>-/-</sup> foi capaz de reduzir em grande quantidade o infiltrado de células e neutrófilos nos alvéolos (para células totais: 2,56 x 10<sup>6</sup> nos animais não tratados; 1,84 x 10<sup>6</sup> com 4 µg de met-RANTES e 0,99 x 10<sup>6</sup> com 8 µg de met-RANTES; para neutrófilos: 2,24 x 10<sup>6</sup> nos animais não tratados; 0,77 x 10<sup>6</sup> com 4 µg de met-RANTES e 0,33 x 10<sup>6</sup> com 8 µg de met-RANTES). No entanto, não foram observadas diferenças significativas em relação aos macrófagos (Figura 2).



**Figura 2:** A inibição da via de CCR5 reduziu o infiltrado de leucócitos após infecção por *A. fumigatus*.

Em um modelo murino de dor neuropática, a administração de met-RANTES nos camundongos também levou a diminuição da infiltração de macrófagos, bem como a diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL6. Mais ainda, a inibição dessa via diminuiu também a nocicepção nos animais. Dessa forma, os resultados sugerem que controle e a regulação da via CCL5 tem um papel essencial no controle da inflamação (LIYOU *et al.*, 2013).

#### 4. Conclusões

O papel do receptor ACKR2 é protetor na aspergilose pulmonar. A presença do receptor ACKR2 é responsável por limitar a resposta antifúngica, a inflamação, por limitar diversas vias de sinalização de quimiocinas CC após infecção e o recrutamento de leucócitos, tornando os camundongos mais resistentes a infecção por *Aspergillus fumigatus*.

#### 5. Apoio Financeiro

UFMG, Capes, CNPq, Fapemig e INCT em dengue e interações microrganismo hospedeiro.

#### 6. Referências

BACHELERIE, Françoise *et al.* International union of pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 66, n. 1, p. 1–79, 2014.

BORDON, Yvonne *et al.* The Atypical Chemokine Receptor D6 Contributes to the Development of Experimental Colitis. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 8, p. 5032–5040, 2009.

DAGENAIS, Taylor R T; KELLER, Nancy P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 3, p. 447–465, 2009.

DI LIBERTO, Diana *et al.* Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 9, p. 2075–2084, 2008.

E SILVA CASTANHEIRA, Fernanda V. *et al.* The Atypical Chemokine Receptor ACKR2 is Protective Against Sepsis. *Shock*, v. 49, n. 6, p. 682–689, 2018.

ERWIG, Lars P.; GOW, Neil A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro.2015.21>>.

LATGÉ, Jean-paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.

12, n. 2, p. 310–350, 1999.

LIU, Jiin Tarng *et al.* Peritoneal Administration of Met-RANTES Attenuates Inflammatory and Nociceptive Responses in a Murine Neuropathic Pain Model. *Journal of Pain*, v. 14, n. 1, p. 24–35, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2012.09.015>>.

MALACCO, Nathalia Luisa Sousa Oliveira *et al.* Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiology*, v. 14, n. 17, p. 1511–1525, 2020.

MARGALIT, Anatte; KAVANAGH, Kevin. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 39, n. 5, p. 670–687, 2015.

NIBBS, Robert J.B.; GRAHAM, Gerard J. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 11, p. 815–829, 2013.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O CONSUMO CRÔNICO DO ÁLCOOL PELOS DOADORES DE MEDULA ÓSSEA AFETA A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS RECEPTORES NA INFECÇÃO CONTRA *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

**Martins, F.R.B.<sup>1</sup>; Malacco, N.L.S.O.<sup>1</sup>; Rezende, B. M.<sup>2</sup>; Pinho, V.<sup>3</sup>; Teixeira, M.M.<sup>4</sup> e Soriani, F.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução.

<sup>2</sup> UFMG, Escola de Enfermagem, Departamento de Enfermagem Básica.

<sup>3</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia.

<sup>4</sup> UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica Imunologia Imunologia.

Email: flaviarayssa133@gmail.com

**Resumo:** O consumo do álcool é considerado um fator de risco para pneumonias, principalmente, por diminuir a função e migração de neutrófilos nos pulmões. O objetivo deste trabalho foi avaliar quais dessas alterações causadas pelo consumo do álcool seriam mantidas após transplante de medula óssea para camundongos não expostos ao álcool. Para isso, os camundongos doadores foram tratados por 12 semanas com etanol e sua medula óssea foi transplantada para animais receptores. Após recuperação, os camundongos receptores foram infectados com conídios de *Aspergillus fumigatus*. Os resultados demonstraram que os animais receptores de medula óssea de doadores tratados apresentaram menor quantidade de células totais no lavado broncoalveolar e uma menor quantidade de neutrófilos nos alvéolos e no parênquima pulmonar após dois dias de infecção. Os neutrófilos de animais receptores de medula óssea de doadores tratados com álcool também apresentaram menor capacidade fagocítica e, conseqüentemente, um aumento de carga fúngica no pulmão. Além disso, o consumo do álcool diminuiu a quantidade de plaquetas no sangue e essa alteração se manteve nos animais que receberam a medula óssea dos animais tratados. As plaquetas são essenciais para a migração, fagocitose e contenção do crescimento de conídios no pulmão, e sua diminuição observada nos animais receptores pode contribuir para o fenótipo de susceptibilidade encontrado nos animais consumistas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, álcool, neutrófilo, migração, inflamação e susceptibilidade.

As desordens causadas pelo consumo do álcool vêm sendo associadas a uma susceptibilidade a pneumonias, tanto porque o consumo crônico do álcool causa uma disfunção no aparelho mucociliar quanto porque diminui a resposta imunológica nas vias aéreas inferiores (Raasch et al., 2010). Os consumistas apresentam sintomas mais intensos e um aumento da morbidade e mortalidade frente infecções, portanto, o consumo crônico do etanol é considerado um fator de risco para pneumonias bacterianas e fúngicas (Happel et al., 2005).

*Aspergillus fumigatus* é o patógeno mais comum em casos de aspergilose pulmonar, estando presente em 90% dos casos humanos diagnosticados, é um fungo filamentoso, ubíquo e saprofítico que desempenha uma função importante na decomposição de carbono e nitrogênio no solo (Latzé, 1999). Seus conídios são facilmente aerotransportados pelas vias aéreas do hospedeiro, onde entram em contato com o epitélio das vias aéreas e com a superfície alveolar, desencadeando uma série de respostas inflamatórias que levarão ao recrutamento de leucócitos e subsequente depuração fúngica em organismos imunocompetentes. Porém, na ausência de uma resposta imunológica adequada, esses conídios germinam e causam a aspergilose pulmonar invasiva em seus hospedeiros (Margalit et al., 2015).

Um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o consumo crônico de álcool prejudica a resposta imunológica do hospedeiro contra *Aspergillus fumigatus*. Foi observada uma diminuição de macrófagos e neutrófilos no sítio da infecção e no parênquima pulmonar, havendo também uma diminuição da expressão de CXCR2

### 1. Introdução

nos neutrófilos. Além disso, as células presentes no sítio da infecção apresentavam menor capacidade fagocítica e menor produção de ROS, levando a um aumento da carga fúngica pulmonar e uma maior letalidade (Malacco et al., 2020).

A hipótese deste trabalho é que o efeito observado de diminuição da resposta neutrofílica gerada pelo consumo crônico de etanol se mantém nas células hematopoiéticas. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar se o transplante de medula óssea de animais tratados com etanol para indivíduos hígidos é capaz de manter a susceptibilidade dos receptores à aspergilose pulmonar. Além disto, avaliar também se este efeito está relacionado a um prejuízo na resposta neutrofílica.

## 2. Metodologias

### 2.1 Tratamento com etanol

Camundongos doadores de medula óssea da linhagem C57BL/6 com 5-6 semanas de idade foram tratados com etanol (EtOH) durante 12 semanas, seguindo protocolo estabelecido por Yeligar et al. em 2012. Protocolo CEUA 271/2019.

### 2.2 Transplante de medula óssea

Camundongos receptores de medula óssea (MO) da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de idade foram irradiados no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG, com 8 Grays. A medula óssea dos camundongos doadores foi transplantada para os animais receptores e o acompanhamento da quimerização seguiu os protocolos estabelecidos por Rezende et al. em 2017.

### 2.3 Infecção por *Aspergillus fumigatus*

Após 30 dias da recuperação do transplante os animais foram infectados com  $1 \times 10^8$  conídios de *A. fumigatus* via intranasal (Malacco et al., 2020).

### 2.4 Contagem total e diferencial das células

Após dois dias de infecção, os animais foram eutanasiados e foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL). As células foram usadas para contagem direta e o sobrenadante para dosagem de mediadores inflamatórios e proteínas totais. Os pulmões também foram usados para determinação indireta do infiltrado celular através de N-acetilglicosaminidase (NAG) relativa a macrófagos,

Mieloperoxidase (MPO) relativa a neutrófilos e peroxidase eosinofílica (EPO) relativa a eosinófilos. Sangue total foi utilizado para realização do hemograma por esfregaço hematológico.

### 2.5 Determinação do UFC

Dois dias pós infecção, o pulmão direito foi macerado, diluído e inoculado em meio completo YAG. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram mensuradas.

### 2.6 ELISA

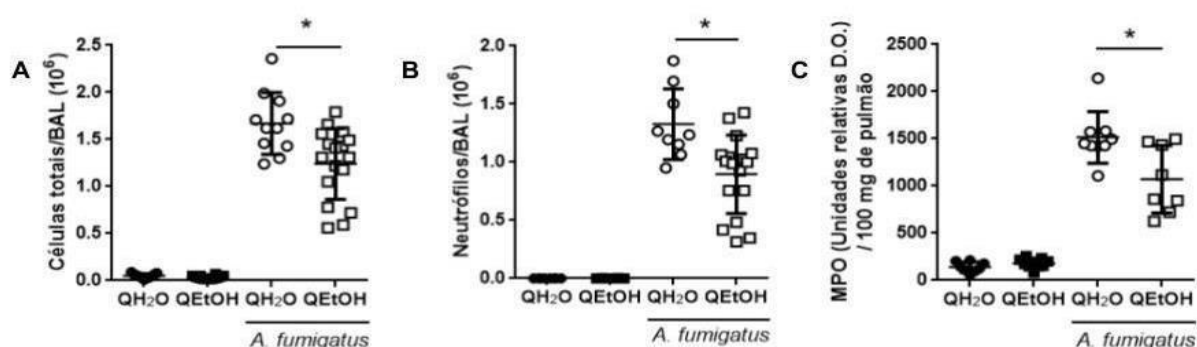
A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizada no BALF dois dias após a infecção, pelo método imunoenzimático de ELISA (R&D Systems) para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, CXCL1 e CXCL2.

### 2.7 Análises estatísticas

A construção de gráficos e análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 7.0. As análises entre as diferenças de mais de dois grupos foram determinadas pela Análise de variância de uma via (One Way – ANOVA), seguida pelo método pós- teste de Holm-Sidak's. Para comparações entre dois grupos foi usado teste t *Student*. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes se  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

A inflamação pulmonar gerada por *A. fumigatus* é caracterizada por um influxo massivo de neutrófilos, nas 6 horas iniciais da infecção, que é essencial para a correta eliminação do patógeno e maior sobrevivência do hospedeiro (Mircescu et al., 2009 e Margalit et al., 2015). Diversos trabalhos relatam a modulação do sistema imune após o consumo, agudo ou crônico, de etanol, prejudicando a resposta do hospedeiro contra os patógenos (Samuelson et al., 2017 e Yeligar et al., 2012). Nossos resultados demonstram que os animais receptores da MO de animais tratados com etanol (Q-EtOH) apresentam menos células no BALF dois dias após a infecção em comparação aos animais receptores de MO de animais não tratados (Q-H<sub>2</sub>O) (Figura 1-A). Após contagem diferencial destas células não foi observada diferença na quantidade de macrófagos, linfócitos ou eosinófilos no



**Figura 1.** A- Contagem das células totais do BALF, B- Contagem diferencial de neutrófilos no BALF e C- Quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar mensurada por atividade de MPO. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

BALF (dados não mostrados) entre os grupos infectados, porém, os animais receptores de MO de camundongos tratados apresentaram um menor influxo neutrofílico para o pulmão em comparação como o grupo receptor de MO não tratada (Figura 1-B).

Os resultados de influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar corroboram o que foi observado nas vias aéreas (Figura 1-C). A diminuição da migração de neutrófilos para os alvéolos e tecido pulmonar após estímulo foi observada em alguns estudos de exposição, tanto crônica quanto aguda, ao álcool (Raasch et al., 2010 e Malacco et al., 2020). Este dado sugere que as alterações causadas pela exposição crônica ao álcool foram fixadas nas células hematopoiéticas dos consumistas, de tal forma a afetar a função dos neutrófilos dos animais quimerizados.

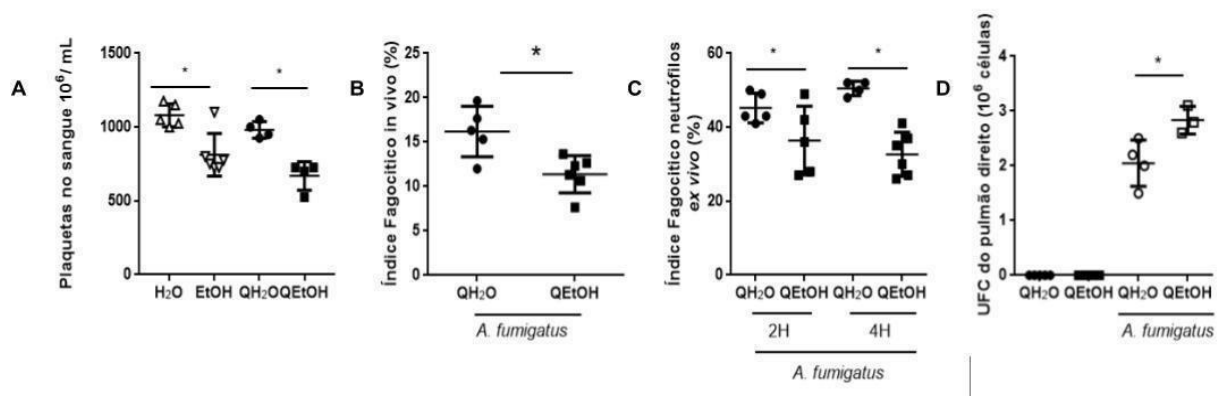
Os níveis de células polimorfonucleares no sangue periférico não diferiram entre os animais Q- EtOH e Q-H<sub>2</sub>O (dados não mostrados). Esses dados sugerem que o dano causado pelo consumo crônico do etanol pelos doadores está afetando a migração neutrofílica nos animais receptores e não a produção destas células pela MO.

O hemograma também revelou uma diminuição da contagem de plaquetas nos animais doadores consumistas (EtOH), que se mantém nos animais receptores de MO de animais doadores tratados com álcool (Q-EtOH) (Figura 2-A). Isso sugere que a diminuição de plaquetas no sangue causada pelo consumo crônico do álcool é mantida na MO desses animais. Korneup e colaboradores demonstraram, em 2010, que a depleção de plaquetas diminuiu

drasticamente a migração e ativação de neutrófilos para o pulmão em resposta ao estímulo com Zymosan.

A fagocitose seguida da depuração dos conídios é essencial para a contenção do crescimento fúngico de *A. fumigatus* no pulmão (Mircescu et al., 2009). Estudos têm demonstrado que o consumo do álcool diminui a capacidade fagocítica e a eliminação de bactérias (Jareo et al., 1996 e Khocht et al., 2013). Nossos resultados demonstram que o etanol consumido pelos doadores diminui a capacidade fagocítica de neutrófilos *ex vivo* e de leucócitos recrutados para o sítio da infecção, sugerindo que o consumo crônico do álcool mantém o perfil fagocítico alterado nas células imunes dos animais quimera EtOH, mesmo após o transplante (Figura 2- B e C). Os resultados não demonstram diferenças na quantidade de macrófagos nos pulmões de ambos os grupos infectados e nem na produção de mediadores inflamatórios como CXCL1, TNF- $\alpha$ , CXCL2 e IL- 10 sugerindo que o consumo crônico do álcool pelos animais doadores não afetou as funções dessas células (dados não mostrados). Porém, foi observado um aumento da produção de IL-6 nos animais Q-EtOH. Kendrick e colaboradores demonstraram que o consumo do álcool aumentava o padrão de acetilação no promotor do gene de IL-6 nas células de *Kupffer*, macrófagos residentes do fígado, o que leva a um aumento de sua expressão neste órgão (Kendrick et al., 2010). Além disso, em 2019, Johnstone e colaboradores comprovaram que esse aumento na produção de IL-6 era mantido também na micróglia, macrófagos residentes cerebrais, após 21 dias de interrupção da exposição crônica ao etanol. Esses dados sugerem que o consumo do etanol altera a regulação da expressão desta importante citocina





**Figura 2-** A- Contagem de plaquetas no sangue, B- índice de fagocitose dos leucócitos do BALF após infecção, C- Índice fagocítico de neutrófilos derivados da medula óssea incubados com conídios e D- Unidades formadoras de colônia no pulmão após a infecção. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

inflamatória, mecanismo este que pode ser através de modificações nos padrões epigenéticos.

Como os neutrófilos são as principais células de ação direta na eliminação fúngica no sítio infeccioso, e esse perfil celular estava diminuído nos animais quimera EtOH, foi analisada a capacidade do controle da carga fúngica no pulmão dos animais.

Os resultados demonstraram um aumento do número de unidades formadoras de colônias fúngicas viáveis nos animais quimera EtOH em relação aos animais quimera H<sub>2</sub>O (Figura 2-D). Estes resultados mostram que as alterações causadas pelo consumo crônico de álcool pelos animais doadores afetaram a migração e a fagocitose do patógeno pelos neutrófilos nos animais Q-EtOH, além de diminuir a capacidade de eliminação do fungo no pulmão destes animais, acarretando uma maior carga fúngica.

#### 4. Conclusões

Até o presente momento, podemos concluir que o consumo crônico de etanol gera alterações no tecido hematopoiético que, após transplante em animais hípidos, se manifestam especificamente na migração e fagocitose de neutrófilos durante infecção pulmonar aguda por *A. fumigatus* e na diminuição da produção plaquetária, mantendo o fenótipo de sensibilidade à infecção e aumento da carga fúngica observado em animais tratados com álcool.

#### 5. Apoio Financeiro

Capes, CNPq, Fapemig e INCT dengue.

#### 6. Referências

- HAPPEL, L. I.; NELSON, S. Alcohol immunosuppression, and the lung. **Proceedings of the American Thoracic Society**, 2005.
- JAREO P.W.; PREHEIM L.C.; GENTRY M.J.; Ethanol ingestion impairs neutrophil bactericidal mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. **Alcoholism Clinical Experimental Research**. 1996.
- KENDRICK, S.F.W; O'BOYLE, G; AMM, J; ZEYBEL, M; PALMER, D.E.J.J; DAY, C. P; Acetate, the Key Modulator of Inflammatory Responses in Acute Alcoholic Hepatitis. **Hepatology**, 2010
- KHOCHT, A.; SCHLEIFER, S.J.; JANAL, M.N; KELLER, S. Neutrophil function and periodontitis in alcohol-dependent males without medical disorders. **Journal of Substance Abuse Treatment**, 2013.
- KORNERUP, K. N., SALMON, G. P., PITCHFORD, S. C., LIU, W. L., & PAGE, C. P. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. **Journal of Applied Physiology**, 2010.

LATGÉ, JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999.

MALACCO, N.L.S.O.; SOUZA, J.A.M.; MARTINS, F.R.B.; RACHID, M.A.; SIMPLICIO, J.A.; TIRAPELLI, C.R.; SABINO, A.P.; QUEIROZ, C.M.; GOES, G.R.; VIEIRA, L.Q.; SOUZA, D.G.; PINHO, V; TEIXIERA, M.M.; SORIANI, F.M. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. **Elife**, 2020.

MARGALIT, A.; KAVANAGH, K. The immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. **FEMS microbiology Reviews**, 2015

MIRCESCU, M. M., LIPUMA, L., VAN ROOIJEN, N., PAMER, E. G., & HOHL, T. M. Essential Role for Neutrophils but not Alveolar Macrophages at Early Time Points following *Aspergillus fumigatus* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 2009.

RAASCH, C.E.; ZHANG, P.; SIGGINS, R.W.; LAMOTTE, L.R.; NELSON, S.; BAGBY, G. J. Acute Alcohol Intoxication Impairs the Hematopoietic Precursor Cell Response to Pneumococcal Pneumonia. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 2010.

REZENDE, B.M.; ATHAYDE, R.M.; GONÇALVES, W.A.; RESENDE, C.B.; BERNARDES, P.T.T.; PEREZ, D.A.; ESPER, L.; REIS, A.C.; RACHID, M.A.; CASTOR, M.G.M.; CUNHA, M.C.; MACHADO, F.S.; TEIXEIRA, M.M.; PINHO, V. Inhibition of 5-lipoxygenase alleviates graft-versus-host disease. **Journal of experimental Medicine**, 2017.

SAMUELSON, D.R.; SHELLITO, J.E.; MAFFEI, V.J.; TAGUE, E.D.; CAMPAGNA, S.R.; BLANCHARD, E.E.; LUO, M.; TAYLOR, C.M.; RONIS, M.J.J., MOLINA, P.E.; WELSH, D.A. Alcohol-associated intestinal dysbiosis impairs pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **PLOS Pathogens**, 2017.

YELIGAR, S. M; HARRIS, F. L.; HART, C. M.; BROWN, L. A. S. Etanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. **Journal of immunology**, 2012.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## A INFECCÃO POR *Cryptococcus gattii* AGRAVA A DOENÇA CAUSADA POR *Streptococcus pneumoniae* EM MODELO MURINO

**Miranda<sup>1</sup>, B. A.; Emídio<sup>1</sup>, E. C. P.; Ribeiro<sup>1</sup>, N.Q.; Costa<sup>1</sup>, M. C.; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Paixão<sup>1</sup>, V.M.; Freitas<sup>1</sup>, G. J. C.; Hubner<sup>2</sup>, J.; Fagundes<sup>3</sup>, C. T.; Santos<sup>1</sup>, D. A.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Imunofarmacologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia Laboratório de Interação Micro-organismo-Hospedeiro.

E-mail: barbara.miranda@yahoo.com.br

**Resumo:** *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) são microrganismos que podem causar pneumonia, alcançar diversos órgãos e chegar ao Sistema Nervoso Central (SNC) e causar meningite, podendo levar o indivíduo à morte. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a coinfeção de *S. pneumoniae* e *Cryptococcus gattii* em modelo murino. Nossos resultados demonstraram que, em um processo de coinfeção com *C. gattii*, a infecção secundária causada por *S. pneumoniae* piora significativamente o estado neuropsiquiátrico, o comportamento motor e a função autônoma dos animais, levando à morte precoce. Esses resultados foram associados ao aumento da translocação bacteriana do pulmão para outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central. A quantidade de leucócitos no lavado broncoalveolar aumentou, sendo as células mononucleadas o tipo celular predominante. No momento, estudos de elucidação da resposta inflamatória estão em andamento para propiciar melhor entendimento sobre os mecanismos que levam à maior translocação bacteriana na presença de *C. gattii*.

**Palavras-chave:** coinfeção; *Cryptococcus gattii*; *Streptococcus pneumoniae*.

### 1. Introdução

Doenças polimicrobianas, ou coinfeções são causadas por dois ou mais microrganismos, se

apresentam de forma sinérgica/concomitante ou sequencial, e ainda podem causar infecções agudas ou crônicas. Essa interação pode ocorrer entre microrganismos de diferentes reinos, gêneros, espécies ou até mesmo entre variantes fenotípicas dentro da mesma própria espécie (PAPPAS, 2013). Ainda pouco elucidados os mecanismos de coinfeção, acredita-se que em uma infecção secundária, considerando um organismo já debilitado e com o sistema imune já ativado, poderia favorecer a expressão de genes de resistência de um segundo patógeno. Esse ambiente torna-se competitivo entre os microrganismos, sendo assim, é provável que em estado de coinfeção tenha-se um agravamento da doença e danos maiores ao paciente (PASMANN, 2012; STEENBERGEN, *et.al.*, 2001).

Oliveira e colaboradores demonstraram que a interação entre a levedura *Cryptococcus gattii* e Influenza A vírus (IAV) pode acarretar sérios danos ao hospedeiro. Como resultado dessa interação, em modelos murinos, observam-se lesões pulmonares causadas pelo subtipo viral H1N1 favorecendo o desenvolvimento e disseminação de *C. gattii* em sua forma mais severa (OLIVEIRA *et. al.*, 2017).

*Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) é uma levedura encapsulada, ambiental, cosmopolita que pode causar desde pneumonia até meningite. A criptococose, doença essa causada por fungos do gênero *Cryptococcus* spp. se dá por inalação de leveduras ressecadas ou esporos encontrados na natureza que chegam aos pulmões, causando pneumonia ou ainda podem alcançar outros órgãos por meio da corrente sanguínea e chegar ao Sistema Nervoso Central (SNC) causando

meningoencefalite no hospedeiro. *C. gattii* possui diversos fatores de virulência que proporcionam ao patógeno o sucesso na progressão da doença (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Compartilhando o mesmo local de infecção, *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa que pode se apresentar aos pares como diplococos ou como lancetas. Normalmente, são encontradas como comensais no trato respiratório superior de indivíduos saudáveis (AUSTRIAN, 1986). Porém, pode se tornar um microrganismo patogênico sendo uma das principais causas de infecções bacterianas como otite média, pneumonia adquirida na comunidade, sepse e meningite (HENRIQUES-NORMARK e TUOMANEN, 2013). A transmissão se dá de pessoa para pessoa por meio de aerossóis. A bactéria alcança a cavidade nasal, se liga às células epiteliais nasofaríngeas permanecendo como colonizadora ou então pode alcançar outros órgãos, como ouvidos e pulmões, a corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica causando meningite (WEISER *et al.*, 2018).

Desde a década de 1990, relatos de casos deixam claro que a interação entre microrganismos desses dois gêneros *Cryptococcus spp.* e *Streptococcus sp.* podem acarretar sérios danos ao hospedeiro levando à morte (JOHN *et al.*, 1998; BOGAERT *et al.*, 2004; NADAUD *et al.*, 2007; SALEEM *et al.*, 2015; TROEGER *et al.*, 2017). Por isso, o objetivo desse trabalho é investigar a influência de *S. pneumoniae* na progressão da criptococose experimental, em modelo murino, causada por *C. gattii*.

## 2. Metodologias

### 2.1 Microrganismos

Para todas as análises, *Cryptococcus gattii* (linhagem L27) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Micologia - ICB - UFMG), foi cultivado em meio Ágar Sabouraud Dextrose - ASD (Difco) a 37°C durante 48 horas. *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), foi cultivado em meio Todd-Hewitt suplementado com sangue de carneiro desfibrinado por 12 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esse período a bactéria foi cultivada em caldo Todd-Hewitti com uma absorbância inicial de 0,1 (densidade óptica (DO) a 600 nm = 0,1). A bactéria foi cultivada até a fase exponencial (DO de 0,4 a 600 nm) para preparo dos inóculos.

### 2.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57/BL6, macho de 5-6 semanas. Foram fornecidos água e ração *ad libitum* e ciclos de claro/escuro foram mantidos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG) sob autorização protocolo 313/2016. A inoculação fúngica foi realizada via intratraqueal e a bacteriana via intranasal, ambas após anestesia via intraperitoneal (SANTOS *et al.*; 2014; TAVARES *et al.*; 2016).

### 2.3 Padronização do inóculo para coinfeção

Os animais foram infectados com  $1 \times 10^5$  leveduras viáveis de *Cryptococcus gattii* (L27) por via intratraqueal e com diferentes inóculos de *Streptococcus pneumoniae* com o objetivo de padronizar um inóculo bacteriano não letal que permitisse avaliar como a infecção bacteriana interferisse na criptococose causada por *C. gattii*.

### 2.4 Curva de sobrevivência e análise comportamental SHIRPA

Com o inóculo da coinfeção padronizado, novos grupos de animais foram infectados com  $1 \times 10^5$  leveduras viáveis de *C. gattii* e com inóculo de  $1 \times 10^3$  células viáveis de *S. pneumoniae*, obedecendo à seguinte ordem: animais infectados com *C. gattii* no tempo 0 e com *S. pneumoniae* 3 e 4 dias antes e depois da infecção fúngica. E animais infectados com *S. pneumoniae* no tempo 0 e *C. gattii* 3 e 4 dias antes e depois da infecção com *S. pneumoniae*. Os animais foram acompanhados diariamente para obtenção da curva de sobrevivência e, simultaneamente, a foi avaliado o perfil de morbidade utilizando o protocolo SHIRPA (SmithKline / Harwell/ Imperial College/Royal Hospital / PhenotypeAssessment – SHIRPA) para avaliação comportamental. Com este ensaio, foi possível mimetizar as manifestações gerais, neurológicas e psiquiátricas que ocorrem nos seres humanos (LACKNER *et al.*; 2006). Após essa análise, foi escolhido o grupo que apresentou o perfil de coinfeção mais significativo com progressão da doença mais expressiva.

### 2.5 Quantificação das cargas fúngica e bacteriana em órgãos alvo e contagem total e diferencial de células do lavado broncoalveolar (LBA)

Determinado o grupo que apresentou um perfil característico de agravamento por infecção

subsequente, novos grupos de animais foram infectados com inóculo de  $1 \times 10^4$  leveduras viáveis de *C. gattii* e três dias depois da infecção fúngica, os animais foram infectados com  $1 \times 10^3$  células viáveis de *S. pneumoniae* e no terceiro dia após a coinfeção, os animais passaram por eutanásia. Os experimentos contaram com grupos monoinfectados com *C. gattii* e *S. pneumoniae* e grupo controle Ni, não infectado. Os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos e fluidos foram coletados: lavado broncoalveolar (LBA), pulmões, sangue, fígado, baço e cérebro. Os órgãos e o sangue foram macerados e plaqueados para a quantificação da carga microbiana (OLIVEIRA et al., 2017). O LBA foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos para avaliação da resposta inflamatória (MAXEINER et al., 2007).

### 2.6 Quantificação de MPO e NAG

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. Para a determinação de MPO os pulmões foram processados – conforme protocolo (CROSS et al., 2003) - e o ensaio foi conduzido adicionando-se 25  $\mu$ l da amostra em duplicata em placa de 96 poços. A reação se iniciou pela adição de 25  $\mu$ l de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich) dissolvidos em DMSO com concentração final de 1,6 mM às amostras e incubação a 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa adicionou-se 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) para término da reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (450nm). Para quantificação de NAG, o acúmulo de macrófagos no tecido foi avaliado pelo ensaio de atividade enzimática da N-acetilglicosaminidase (NAG). Os níveis de NAG foram determinados pela alteração na densidade ótica (D.O.) durante leitura em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 405 nm utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidina (SIGMA) e tampão glicina 0,2M (pH 10,6) leitura das placas foi feita no leitor de ELISA.

### 2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do Software Prism 6 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). O teste empregado foi análise de variância (ANOVA), pós teste de Tukey para múltiplas comparações, onde valores de  $p < 0,05$ , foram considerados estatisticamente significativos.

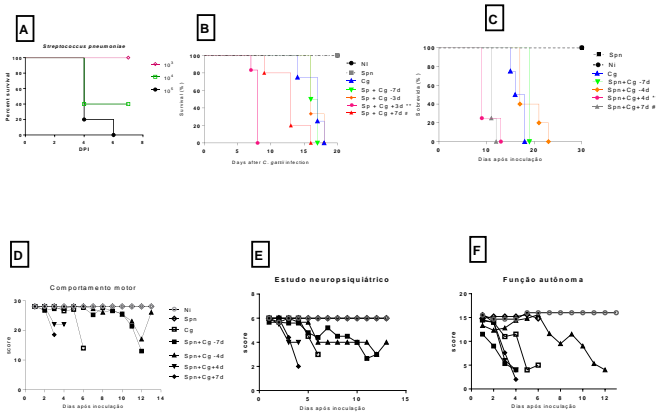
## 3. Resultados e Discussão

O inóculo de *S. pneumoniae* escolhido para avaliar a coinfeção foi o de  $1 \times 10^3$  pois 100% dos animais permaneceram vivos (Fig. 1A). Animais infectados três ou quatro dias antes sobreviveram na mesma média de vida do grupo infectado apenas com *C. gattii* (Fig. 1B e 1C). Os animais infectados com *S. pneumoniae* quatro dias depois da infecção fúngica apresentaram alteração tanto no protocolo comportamental/neuropsiquiátrico quanto na curva de sobrevivência, com quadro clínico mais expressivo (Fig. 1C, 1D, 1E e 1F); sendo esse grupo selecionado como modelo para as demais análises.

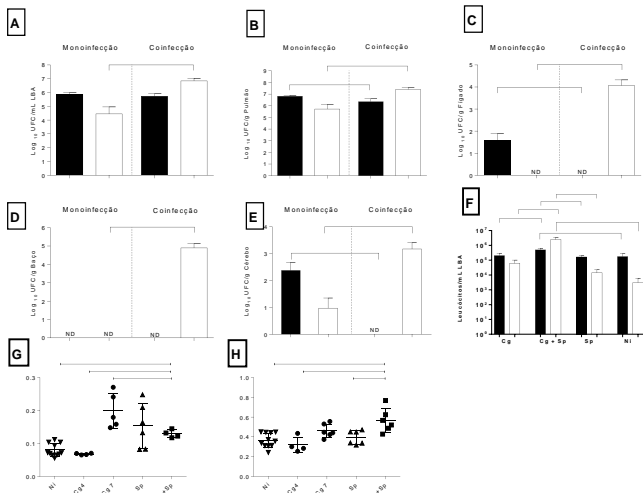
A quantificação da carga microbiana demonstrou que a carga bacteriana aumenta no grupo coinfectado em relação a carga fúngica, que diminui significativamente nos órgãos como fígado, baço e cérebro (Fig. 2A, 2B, 2C, 2D e 2E). Para tentar entender como a bactéria interfere na carga fúngica no SNC, será avaliada a expressão do gene PARF (Receptor de fator de ativação de plaquetas), por PCR em tempo real, tanto em modelo murino quanto em modelo de barreira hematoencefálica humana *in vitro* (IOVINO et al., 2016).

A infecção fúngica permaneceu limitada em órgãos como o pulmão e no LBA (Fig 2A e 2B). Este resultado pode ser justificado pela possibilidade de redução de carga fúngica feita pela atuação direta da bactéria sobre o fungo; ou ainda, pela intensificação de uma resposta celular induzida pela bactéria que direciona maior eliminação de *C. gattii*.

No lavado broncoalveolar, o grupo coinfectado apresentou maior quantidade de células polimorfonucleadas quando comparado aos grupos monoinfectados e o grupo não infectado (Fig. 2F). Demonstrando que a presença do fungo estimula o recrutamento de células polimorfonucleadas, o que não é observado no grupo monoinfectado com *S. pneumoniae*. Entretanto, a quantificação de MPO e NAG, demonstrou que no grupo coinfectado é mais marcante a atividade de macrófagos do que neutrófilos (Fig. 2G e 2H). Dentro dessa perspectiva, ensaio de citometria para identificação das populações celulares, no tecido pulmonar e LBA, estão em andamento.



**Figura 1.** [A] Padronização do inóculo para infecção de *S. pneumoniae*, foram testados inóculos  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ . [B] e [C] curva de sobrevivência, testando infecção de *S. pneumoniae* três e quatro dias antes e depois da infecção de *C. gattii*. [D], [E] e [F] protocolo Shirpa; Comportamento motor, Estudo neuropsiquiátrico e função autônoma, respectivamente.



**Figura 2.** Quantificação da carga microbiana dos grupos coinfetados e monoinfetados. Nos gráficos A, B, C, D e E a barra preta representa a carga fúngica e a barra branca representa a carga bacteriana. Em [A] tem-se a contagem de leveduras e bactérias viáveis no LBA. Em [B] o órgão representado é o pulmão; [C] o fígado; [D] o baço e em [E] cérebro. Já em [F] tem-se a citologia do LBA. Representado pela barra preta está a quantificação de células polimorfonucleares e pela barra branca a quantificação de células mononucleadas. Em [G] tem-se a quantificação de MPO e em [H] quantificação NAG.

**4. Conclusão**

Nosso trabalho sugere que o modelo ideal para trabalhar coinfeção *C. gattii* e *S. pneumoniae* é

infecção fúngica primária e infecção bacteriana secundária, após quatro dias. Neste modelo houve alterações significativas na morbimortalidade dos animais e isso pode estar associado a alteração no curso da resposta imunológica causada por *C. gattii* seguida da infecção bacteriana.

**5. Apoio Financeiro**

UFMG, Capes, CNPq.

**6. Referências**

AUSTRIAN, ROBERT. Some aspects of the pneumococcal carrier state. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 18, n. Supplement A, p. 35-45, 1986.

BOGAERT, DEBBY; DE GROOT, RONALD; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 144-154, 2004.

CROSS, A. S. et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 4112-4120, 2003.

HENRIQUES-NORMARK, BIRGITTA; TUOMANEN, ELAINE I. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 7, p. a010215, 2013.

IOVINO, FEDERICO et al. How does *Streptococcus pneumoniae* invade the brain? **Trends in microbiology**, v. 24, n. 4, p. 307-315, 2016.

JOHN, M.-A.; COOVADIA, Y. Meningitis due to a combined infection with *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* in an AIDS patient. **Journal of Infection**, v. 36, n. 2, p. 231-232, 1998.

KWON-CHUNG, KYUNG J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LACKNER, P. *et al.* Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 32, n. 2, p. 177–188, 2006.

MAXEINER, J. H. *et al.* A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nature protocols*, v. 2, n. 1, p. 105–112, 2007.

NADAUD, J. *et al.* Méningite bactérienne chez le patient VIH positif: pensez aux coinfections! In: *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. Elsevier Masson*, 2007. p. 85-87.

OLIVEIRA, Lorena VN *et al.* Influenza A virus as a predisposing factor for cryptococcosis. ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology***, v. 7, p. 419, 2017.

PAPPAS, PETER G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. ***Transactions of the American Clinical and Climatological Association***, v. 124, p. 61, 2013.

PASMAN, LESLEY. The complication of coinfection. ***The Yale journal of biology and medicine***, v. 85, n. 1, p. 127, 2012.

SANTOS, JULLIANA RIBEIRO ALVES *et al.* Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. ***PLoS One***, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014.

SALEEM, Faryal; FASIH, Naima; ZAFAR, Afia. *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* co-infection in post-traumatic meningitis in a patient with unknown HIV status. ***Journal of Pakistan Medical Association***, v. 65, n. 10, p. 1122, 2015.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

TAVARES, L. P. *et al.* Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung

Injury in Mice. ***American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***, p. 1–11, 2016.

TROEGER, CHRISTOPHER *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. ***The Lancet Infectious Diseases***, v. 17, n. 11, p. 1133-1161, 2017.

WEISER, JEFFREY N.; FERREIRA, DANIELA M.; PATON, JAMES C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. ***Nature Reviews Microbiology***, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018.



Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## COMORBIDADES MICROBIANAS EM PACIENTES COM COVID-19 EM BELO HORIZONTE

Miranda, C.M.<sup>1</sup>; Silva, D.L.<sup>2</sup>; Magalhães<sup>1</sup>, V.C.R.<sup>2</sup>; Baltazar, L.M.<sup>2</sup>; Johann, S.<sup>1</sup>; Peres, N.T.A.<sup>2</sup>; Caligorne, R.B.<sup>3</sup>; Martins, J.C.<sup>4</sup>; Rabelo, L.F.<sup>4</sup> e Santos, D.A.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

<sup>3</sup>Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, MG.

<sup>4</sup>Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, MG.

Email: carolinemiranda.bio@gmail.com

### Resumo:

A infecção ocasionada pelo novo coronavírus (COVID-19) está relacionada à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), que pode predispor às coinfeções bacterianas e fúngicas, porém pouco ainda se sabe sobre a epidemiologia e consequências desses processos. No presente estudo foi realizada uma análise descritiva dos pacientes que internados com COVID-19 de Maio à Setembro de 2020, no Hospital Eduardo de Menezes. Foram incluídos 158 pacientes com diagnóstico confirmado por RT-PCR. A taxa de mortalidade total foi de 17,08%. A distribuição dos pacientes com COVID-19 por sexo foi 53,16% masculino 46,83% feminino. A taxa de coinfeções dentro do grupo analisado foi de 22,15%, contudo, a taxa de mortalidade nesse grupo foi maior (48,57%) do que no grupo dos sem coinfeção (8,13%). Do total de indivíduos coinfectados, observou-se que 45,71% apresentaram infecção mista, isto é, em mais de um sítio. E na maioria (51,42%) dos casos a coinfeção envolvia mais de um agente. *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. e *Candida* sp. foram os agentes mais isolados. Apesar de ter sido uma análise inicial, os dados revelam a importância do estudo de coinfeções, principalmente, para o direcionamento do tratamento desses pacientes.

**Palavras-chave:** coinfeção; bacteriana; levedurese; COVID-19.

As infecções respiratórias são mundialmente reconhecidas como uma das principais causas de mortalidade (World Health Organization, 2020). A infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2 pode acometer múltiplos sítios, principalmente o trato respiratório dando origem à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (Chen et al, 2020).

A taxa de mortalidade ocasionada pelo COVID-19 é variável entre os países, sendo que até o início de Outubro o Brasil já havia contabilizado 149.692 mortes (World Health Organization, 2020).

As coinfeções fúngicas, bacterianas e virais têm sido associadas ao agravamento do quadro clínico dos pacientes internados (Lansbury et al, 2020). Em Wuhan, foram relatadas infecções bacterianas em 15% dos pacientes internados com COVID-19 (Ruan et al, 2020). Hughes et al. (2020) também mostraram ser comum o isolamento de leveduras no trato respiratório (21,4%). Poucos estudos identificaram microorganismos atípicos (Yu et al, 2020).

Estudos clínicos relataram o uso empírico de antimicrobianos em muitos pacientes internados com COVID-19 (Wang et al, 2020; Langford et al, 2020). Além disso, os pacientes coinfectados podem estar sofrendo outras infecções não ligadas ao trato respiratório, como infecção urinária ou na corrente sanguínea (Rawson et al, 2020). Neste contexto, o diagnóstico precoce desses agentes é essencial para o direcionamento do tratamento (Khoeler et al, 2020).

### 1. Introdução

## 2. Metodologias

### 2.1 Aspectos éticos e critérios de inclusão

O presente projeto envolve o armazenamento temporário e uso de material biológico isolado de amostras clínicas humanas, além da análise de prontuários médicos. Foram incluídos neste estudo, pacientes internados no Hospital Eduardo de Menezes de Maio à Setembro de 2020 que receberam o diagnóstico positivo para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR e que aceitaram participar do estudo (ou tiveram a participação aceita pelo responsável) após concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi autorizado pela CONEP (CAAE: 30627320.6.0000.0008).

### 2.2 Análise dos dados

Os dados coletados nos prontuários dos pacientes com diagnóstico confirmado para COVID-19 foram: sexo, presença ou ausência de coinfeção, tipo de coinfeção (mista ou única), quantidade de agentes envolvidos na coinfeção e a identificação do gênero desses microorganismos nos pacientes coinfectados.

## 3. Resultados e Discussão

No total foram incluídos 158 pacientes internados. Para análise, foram considerados dois grupos: não óbito que inclui os pacientes que tiveram alta e os que continuam internados e o grupo dos pacientes que foram à óbito durante o período do estudo. As coinfeções foram mais frequentes (62,96%) no grupo de pacientes que foi a óbito (Tabela 1). No grupo que não foi a óbito, o percentual foi de 13,74%. Alguns autores encontraram que o percentual de coinfeções fúngicas e bacterianas em pacientes com COVID-19 foi de de 8% (Arentz et al, 2020; Yu et al, 2020; Rawson et al, 2020).

A taxa de coinfeções simples, isto é, em um único sítio foi predominante (58,82%) no grupo que foi a óbito. No grupo que não foi a óbito não houve diferença no percentual de isolamento em coinfeções simples e mistas. Além disso, no grupo que não foi a óbito, houve maior número de coinfeções por mais de 2 agentes, ao contrário do grupo que foi a óbito, em que houve maior número de coinfeções por um único agente. Alguns estudos apontam que a taxa de mortalidade entre indivíduos coinfectados é amplamente variável (Rawson et al, 2020).

Tabela 1- Características dos pacientes internados

Características	Não óbito %	Óbito %
Gênero		
Masculino	52,67	55,56
Feminino	47,33	44,44
Coinfeção	13,74(18)	62,96(17)
Simples	50,00	58,82
Mista	50,00	41,18
Único agente	38,89	58,82
Mais de 2 agentes	61,11	41,18
<b>Total</b>	131	27

Foram considerados 35 pacientes para a análise dos microorganismos associados às coinfeções. Desse total, foram analisadas 86 amostras provenientes de aspirado traqueal (42), urina (11), ponta de catéter (17), refluído (1), escarro (3) e hemocultura (12). Sendo assim, foi admitido mais de um tipo de amostra por paciente, incluindo assim os pacientes com coinfeções mistas.

Para a análise, foi realizado um agrupamento em amostras respiratórias, urinárias e sanguíneas (Figura 1). Nas amostras respiratórias os agentes mais frequentemente isolados foram *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus* sp. e *Candida* sp. Além disso, houve maior diversidade de bactérias gram negativas (*Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Proteus* sp.), seguido do isolamento fúngico (*Candida* sp. e *Aspergillus* sp.). Hughes et al (2020) encontraram o predomínio de *Staphylococcus aureus*, seguido do isolamento de *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. em pacientes internados com SARS-CoV-2 no Reino Unido. Em nosso estudo, o isolamento de *Staphylococcus* sp. estava diretamente relacionada às amostras provenientes de ponta de cateter. Em relação ao isolamento de *Candida* sp., este agente não é considerado patológico quando é identificado em cultura de escarro, sendo muita das vezes associado à candidíase orofaríngea ou da microbiota normal (Hughes et al, 2020; Rawson et al, 2020). Estudos anteriores também relataram o isolamento de *Aspergillus* sp. em amostras respiratórias de pacientes com COVID-19 (Khoeler et al, 2020).

Nas amostras sanguíneas houve maior (54,54%) isolamento de bactérias gram positivas

(*Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp.). Outros agentes encontrados em menor percentual foram *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp. e *Candida* sp. Neste contexto, é importante destacar a importância de gerenciar adequadamente pacientes com SARS-CoV-2 a fim de se evitar infecções nosocomiais. Alguns estudos relatam que o isolamento de cocos gram-positivos em resultados de hemocultura podem se relacionar às altas taxas de contaminação e ao uso de antimicrobianos de forma empírica (Hughes et al, 2020). Acrescenta-se ainda, o fato de que coinfeções bacterianas parecem estar relacionadas aos cuidados de saúde, incluindo bacteremia associadas ao cateter central e pneumonia associada ao ventilador (Lansbury et al, 2020; Rawson et al, 2020).

No trato urinário, foi predominante (77,78%) o isolamento da levedura *Candida* sp., seguido do isolamento de *Enterococcus* sp. Estudos utilizando a identificação de antígenos urinários encontraram *Streptococcus* sp. e *Legionella* sp. sendo os agentes mais frequentes (Hughes et al, 2020).

É interessante ressaltar que entre os estudos relatando coinfeções fúngicas/ bacterianas em pacientes com COVID-19, poucos relataram organismos atípicos como *Legionella pneumophila* encontrada em uma paciente com COVID-19 na China (Rawson et al, 2020). No estudo realizado por Langford et al. (2020), as bactérias relatadas com maior frequência foram *Mycoplasma* sp., *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em comparação, nosso estudo revelou maior percentual de isolamento de *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., e *Acinetobacter* sp. em relação a todos os sítios.

Destaca-se que para infecções mistas graves, além da virulência dos patógenos envolvidos nas coinfeções, o estado imunológico do hospedeiro é um fator importante para se determinar o desfecho clínico (Chen et al, 2020). Neste estudo inicial não foram avaliadas outras condições relacionadas aos pacientes como idade, comorbidades e uso de medicamentos imunossupressores. No entanto, nossos permitem uma avaliação precoce acerca dos principais agentes de coinfeções em pacientes com SARS-CoV-2.

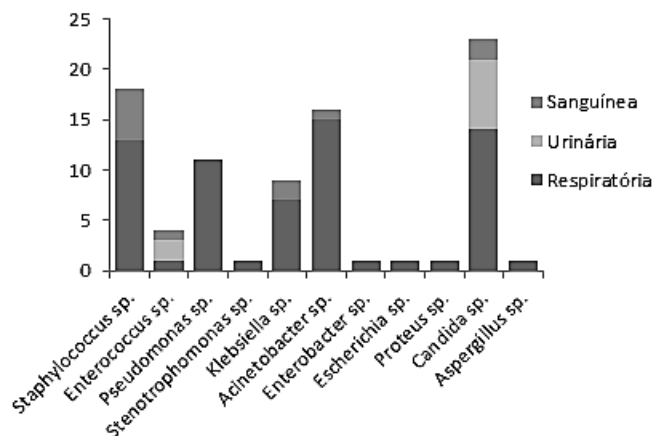


Figura 1. Identificação de bactérias e leveduras por sítio de isolamento.

#### 4. Conclusões

No presente estudo foi feita uma análise descritiva correlacionando os dados de 158 pacientes, tendo sido observado maior taxa de indivíduos coinfectados no grupo que foi a óbito. Além disso, encontramos maior variedade de microorganismos nos isolados de amostras respiratórias. Os dados encontrados ainda são iniciais e ainda estão sob análise para a verificação de correlações e associações estatísticas.

#### 5. Apoio Financeiro

Este projeto está sendo financiado pela Fapemig.

#### 6. Agradecimentos

Nosso agradecimento aos colaboradores do Hospital Eduardo de Menezes e aos pacientes e responsáveis que autorizaram a participação neste estudo.

#### 7. Referências

ARENTZ, M., et al. Characteristics and outcomes of 21 critically ill patients with COVID-19 in Washington State. **J Emerg Med.**, v. 58, n. 4, p. 710, 2020.

CHEN, N., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet.**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.

HUGHES, S., et al. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. **Clin Microbiol Infect.**, v. 26, n. 10, p. 1395-1399, 2020.

KHOELER, P., et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses.** v. 63, n. 6, p. 528-534, 2020.

LANGFORD, B. J., et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect.** v. 22, n. 20, p. 30423-7, 2020.

LANSBURY, L., et. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **J Infect.** v. 81, n. 2, p. 266-275, 2020.

RAWSON, T.M., et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. **Clin Infect Dis.** v. 2, p. 530, 2020.

RUAN, Q., et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Med.** v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

WANG, Y., et al. Clinical Outcomes in 55 Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Who Were Asymptomatic at Hospital Admission in Shenzhen, China. **J Infect Dis.** v. 221, n. 11, p. 1770-1774, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Site: [www.who.int](http://www.who.int). Acesso em: 10 de outubro de 2020.

YU, N. et al. Clinical features and obstetric and neonatal outcomes of pregnant patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective, single-centre, descriptive study. **Lancet Infect Dis.** v.20, n. 5, p. 559-564, 2020.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## OS IMPACTOS DA ADIÇÃO DE *Lactobacillus casei* NO METABOLISMO DO BIOFILME DE *Candida albicans*.

Paschoaleto<sup>1</sup>, P.M.; Dias<sup>1</sup>, A.M.; Silva<sup>1</sup>, C.L.; Silva<sup>1</sup>, N.C.; Dias<sup>1</sup>, A.L.T.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Microbiologia e Imunologia.

E-mail: pietropaschoaleto@gmail.com

**Resumo:** Candidíases compreendem uma extensa diversidade de síndromes clínicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, que apresentam cerca de 200 espécies descritas, dentre elas, *Candida albicans*. Em condições normais, *Candida* spp. atua como organismo comensal, porém, na presença de fatores favoráveis podem causar a infecção fúngica. Fatores associados à virulência, como a capacidade de formação de biofilmes, dificultam o tratamento das infecções, agravando ainda mais o quadro clínico do paciente. *Lactobacillus* spp. são bactérias lácticas predominantes na microbiota vaginal e intestinal saudável. Esse estudo teve como objetivo avaliar os impactos da presença de *Lactobacillus casei* na formação de biofilme por *Candida albicans*. A obtenção do biofilme de *C. albicans* ocorreu em placas de microtitulação de 96 poços, por inoculação na ordem de  $1 \times 10^7$  células/mL, seguido de incubação anaeróbica a 37°C e 75 rpm por 24 horas. Determinou-se atividade metabólica do biofilme através da análise da redução da solução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilina (XTT)/Menadiona. Foi possível observar diminuição de aproximadamente 45% na atividade metabólica do biofilme multiespécie em relação ao biofilme formado apenas por *C. albicans*. A observação do biofilme associado, em microscópio invertido, evidenciou, ainda, alterações morfológicas em *C. albicans*, especialmente no que tange à filamentação, visivelmente reduzida quando comparado ao biofilme não associado. Essa mudança morfológica pode ser significativa, uma vez que a filamentação é importante no processo de formação de um biofilme fúngico íntegro. Assim, esse estudo destaca um alvo terapêutico potencial no combate à candidíase, além de corroborar com o entendimento das interações desses microrganismos no organismo humano.

**Palavras-chave:** Biofilme; *Candida albicans*; *Lactobacillus casei*.

### 1. Introdução

O gênero *Candida* compreende leveduras de grande importância devido à sua prevalência nos seres humanos, seja como colonizadoras ou oportunistas patogênicas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Somente 10% destas leveduras, porém, são reconhecidas como agentes responsáveis por infecções humanas, entre elas, *Candida albicans* é a espécie mais encontrada tanto em pacientes saudáveis como imunossuprimidos (NAVES et al., 2013).

A levedura comensal *C. albicans* é facilmente encontrada em diversas microbiotas humanas, como oral, gastrointestinal e urogenital desde o nascimento. Quando há ruptura do equilíbrio biológico, seja por fatores patológicos, fisiológicos, imunológicos ou mecânicos, há propiciação de sua reprodução e consequente invasão de tecidos por esses microrganismos o que culminará no desenvolvimento de uma infecção denominada candidíase (NAVES et al., 2013). Em casos de indivíduos imunossuprimidos, os oportunistas patogênicos do gênero *Candida* podem levar a quadros de candidemia, infecções sistêmicas causadas por essas leveduras e que, dentre as infecções fúngicas, apresentam mortalidade entre 40% a 60% (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

*Candida albicans*, além de seu alto potencial patogênico, ainda é capaz de formar biofilmes altamente estruturados, que apresentam uma matriz extracelular e se aderem a superfícies, sendo recorrentes em dispositivos médico-hospitalares. Os biofilmes tornam essas infecções ainda mais complicadas, uma vez que muitas vezes se faz necessário a troca desses dispositivos em pacientes já muito debilitados, além dos agentes antifúngicos

administrados serem ineficientes na penetração da matriz extracelular, não conseguindo exercer sua ação e favorecendo a reinfecção do hospedeiro e o desenvolvimentos de cepas resistentes (GULATI; NOBILE, 2016).

*Lactobacillus casei* são bactérias lácticas amplamente empregadas na indústria alimentícia, sendo utilizadas na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação para produção de queijos. Além disso tem ganhado destaque o seu papel promotor de saúde quando administrado como probiótico. *L. casei* também apresenta aptidão para colonizar o corpo humano, principalmente a boca, trato intestinal e vagina (BURITI; SAAD, 2007).

Estudos prévios demonstraram suposta proteção conferida por *L. casei* contra biofilmes de *C. albicans*; os mecanismos envolvidos nessa interação, entretanto, ainda não foram completamente elucidados. As teorias mais aceitas argumentam que essa capacidade inibitória se dá devido à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela bactéria, substância prejudicial para o desenvolvimento da levedura, acredita-se também que a competição por sítios no epitélio do hospedeiro pode ser significativa na interação entre as duas espécies, uma vez que coexistem no microbioma. Além dessas, porém, é sabido que dentre os metabólitos de *Lactobacillus* spp., há produção de lactato e butirato, substâncias capazes de inibir uma família de enzimas conhecidas como histonas deacetilase (HDCA) da levedura que, ao serem inibidas, hiperacetilam as histonas e interferem no estágio inicial do biofilme, a adesão (PAROLIN et al., 2015).

Diante do exposto, buscou-se averiguar os impactos causados pela adição de *L. casei* na formação e desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* em diferentes tempos para melhor elucidar a interação desses microrganismos que coexistem no microbioma humano.

## 2. Metodologias

### 2.1 Estratégia de ação

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas. As culturas de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei* foram mantidas, a -80°C, no Repositório de Microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Básicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). O isolado da levedura empregado no estudo é o

padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) *C. albicans* ATCC 10231, e o do *L. casei* foi adquirido de uma farmácia de manipulação.

### 2.2 Formação do Biofilme

Os biofilmes foram formados de acordo como descrito inicialmente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações. Realizou-se subcultivo da linhagem de *C. albicans* e *L. casei* em caldo TYE e estes foram incubados por 24 horas em estufa de agitação orbital com programação de 75 rpm, a 37°C ± 2,5°C. As células foram colhidas e lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 e ajustadas à densidade óptica de 0,4 a 530nm, equivalente a 1-5x10<sup>7</sup> células/mL em caldo TYE, para utilização logo após o preparo.

Em 77 poços da microplaca foram adicionados 100µL da ressuspensão celular de *C. albicans*, em 22 desses foram adicionados também 100µL da ressuspensão celular de *L. casei*, sendo incubados em jarra de anaerobiose em estufa de agitação orbital, a 75 rpm, por 1,5 hora, a 37°C. Posteriormente, todos os poços que continham a ressuspensão foram lavados com 150µL de PBS, para a remoção de células não aderidas, e tiveram 200µL de caldo TYE adicionados. Os 22 poços referentes a adição de *L. casei* após 1,5 hora do tempo de adesão da levedura, foram lavados novamente com 150µL de PBS antes do acréscimo da ressuspensão da bactéria, e, em seguida, 200µL dessa foram adicionados. O mesmo se deu para os outros 22 poços referentes a adição após 6 horas do tempo de adesão de *C. albicans*. Em 12 poços, ainda, foram adicionados 200µL da ressuspensão celular de *L. casei* após 6 horas do tempo de adesão da levedura, para o controle positivo da bactéria. Para controle do meio, 8 poços foram manuseados de maneira idêntica, exceto pela não adição de suspensão contendo os microrganismos.

### 2.3 Avaliação da atividade metabólica do Biofilme

Após a formação do biofilme foi realizada a avaliação da atividade metabólica seguindo protocolo pré-estabelecido por colaboradores do projeto. A análise baseou-se na redução da solução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilina (XTT) pelos biofilmes presentes na placa. Cada poço foi lavado uma vez com 200µL de PBS e invertidos em papel absorvente estéril para remoção máxima do tampão residual. Em seguida foi preparado a solução do

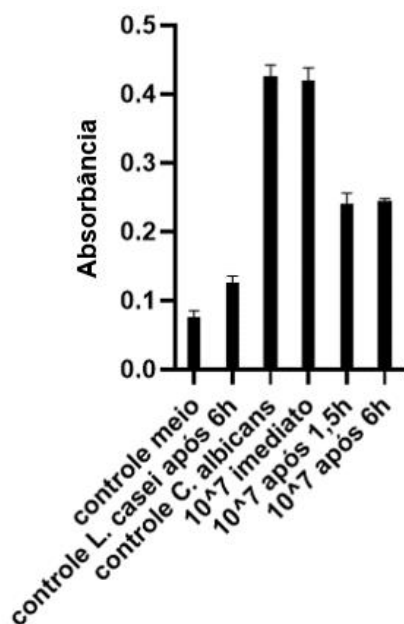
XTT 1 mg/mL em recipiente estéril com adição de menadiona 0,4M. Foram adicionados 200µL da solução em cada poço e a placa incubada em estufa a  $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 1,5 hora, embrulhada em papel alumínio. Por fim, transferiram-se 100µL do poço para uma nova e posterior leitura espectrofotométrica a 490 nm.

### 3 Resultados e Discussão

A formação de biofilmes se deu de acordo como descrito inicialmente por Ramage e colaboradores (2011) para *C. albicans* com modificações envolvendo meios de cultura e tempo de incubação.

Após o estabelecimento das condições ideais para a formação do biofilme, foi avaliada a atividade metabólica através da metabolização da solução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilina (XTT) por enzimas mitocondriais que reduzem o sal de tetrazólio em sal de XTT Formazan, resultando em alteração colorimétrica, que permite a observação da atividade metabólica por leitor espectrofotométrico.

Os diferentes tempos de adição do *L. casei*, imediatamente com a levedura, após 1,5 hora e após 6 horas em relação ao término do tempo de adesão da levedura foram selecionados para que, além de observar o impacto dessa adição, fosse possível entender como a bactéria se relaciona com o metabolismo do biofilme multiespécie.



**Figura 1:** Resultado do teste de redução do sal de tetrazólio pelo biofilme multiespécie de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei*.

Observando os resultados obtidos, foi possível inferir que, a adição de *L. casei* imediatamente com *C. albicans*, não impacta significativamente no metabolismo do biofilme da levedura, isso pode se dar devido à lavagem com PBS feita após o tempo de adesão de *C. albicans*, uma vez que se a bactéria não se adere com o biofilme da levedura, será retirada no momento dessa lavagem, restando apenas células de *C. albicans* e, portanto, culminará na formação de um biofilme monoespécie, apresentando valores de redução do sal de tetrazólio bem próximos ao do controle positivo da levedura.

Outro fato importante observado é que não há relevância significativa do impacto no metabolismo do biofilme quando há adição 1,5h ou 6h após o tempo de adesão de *C. albicans*, porém essa adição impacta, em ambos os casos, negativamente no metabolismo do biofilme da levedura, uma vez que houve uma diminuição de cerca de 45% em relação ao controle positivo do biofilme de *C. albicans*.

Utilizando um microscópio invertido, evidenciou-se, ainda, uma diminuição na filamentação da levedura e, uma vez que se trata de uma etapa importante na formação de biofilmes íntegros, esse pode ser mais um indicador da diminuição da atividade metabólica do mesmo.

### 4 Conclusões

A presença da espécie *L. casei*, adicionada a intervalos específicos sobre o biofilme de *C. albicans*, reduziu a viabilidade metabólica do mesmo. Estudos adicionais procurarão elucidar o mecanismo desta inibição, no entanto, este fato merece avaliações subsequentes como um possível alvo antibiofilme de *C. albicans*.

### 5 Agradecimentos

UNIFAL-MG, Capes, CNPq, Fapemig.

### 6 Referências

- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: Caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373–380, 2007.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira**



de **Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, 2016.

NAVES, P. L. F.; SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013.

PAROLIN, C.; MARANGONI, A.; LAGHI, L.; FOSCHI, C.; PALOMINO, R. A. N.; CALONGHI, N.; CEVENINI, R.; VITALI, B. Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 01–17, 2015.

RAMAGE, G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 4, p. 163-170, 2001.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE TRÊS DIFERENTES REINOS: ENTENDENDO A COMPLEXIDADE DA COINFEÇÃO ENTRE A BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* E O FUNGO *Cryptococcus gattii* EM MODELO MURINO

Peres-Emidio, E. C. P.<sup>1</sup>; Costa, M. C.<sup>1</sup>; Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Brito, C. B.<sup>3</sup>; Arifa, R. D. N.<sup>3</sup>; Carmo, P.H.F.<sup>1</sup>; Gouveia-Eufrasio, L.<sup>1</sup>; Silva, L. M. V.<sup>1</sup>; Santos, A. P. N.<sup>1</sup>; Ribeiro, N. Q.<sup>1</sup>; Oliveira, L. V. N.<sup>1</sup>; Bastos, R. W.<sup>1</sup>; Paixão, T. A.<sup>2</sup>; Fagundes, C. T.<sup>3</sup>; Souza, D. G.<sup>3</sup>; Santos, D. A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia / Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Patologia / Laboratório de Patologia Celular e Molecular.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia / Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro.

E-mail: eluziaperes@yahoo.com.br

**Resumo:** A criptococose, uma micose invasiva causada por *Cryptococcus* spp., acomete pulmões e o sistema nervoso central (SNC) e é considerada mundialmente como a quinta doença infecciosa mais letal. Pode ocorrer concomitantemente com outros patógenos, caracterizando uma coinfeção. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) é um patógeno oportunista, também causador de pneumonias. Neste trabalho foi avaliada a progressão da criptococose murina causada por *C. gattii* (Cg) durante coinfeção com Pa. *In vitro*, Pa reduziu o crescimento de Cg pela secreção de moléculas inibitórias. *In vivo*, a infecção prévia por Pa reduziu a morbidade e atrasou a letalidade da criptococose. O mesmo não ocorreu quando a infecção por Pa ocorreu após a de Cg. Essas alterações podem ser explicadas pela redução da carga fúngica nos pulmões e no cérebro, mostrando um atraso na translocação de Cg para o SNC. Esses achados foram justificados pelo aumento do recrutamento e da atividade fungicida de macrófagos previamente estimulados por Pa. Além disso, a presença prévia de Pa nos pulmões promoveu aumento da produção de mediadores como IL-1 $\beta$ , CXCL-1 e IL-10. Esses dados revelam a alteração do ambiente de instalação inicial de Cg, dificultando a disseminação e transmigração do fungo para o SNC. A inibição da enzima iNOS no processo de coinfeção promoveu a reversão (em 60%) do fenótipo, demonstrando sua importância no processo. Pa é capaz de reduzir a morbidade e letalidade da doença causada por Cg por um mecanismo que envolve recrutamento de

macrófagos e produção de espécies reativas de nitrogênio.

**Palavras-chave:** Criptococose; Coinfeção; *Cryptococcus gattii*; *Pseudomonas aeruginosa*;

### 1. Introdução

A criptococose é uma micose sistêmica e invasiva, que afeta primordialmente os pulmões, podendo também atingir o SNC, provocando meningoencefalite. É causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* spp. que se encontram globalmente distribuídas (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). É classificada como a quinta doença infecciosa mais letal, atrás apenas da AIDS, tuberculose, malária e diarreia (RODRIGUES, 2018).

As coinfeções representam um grande desafio, pois, além de envolverem doenças com maior gravidade, são pouco estudadas e certamente subnotificadas (PASMAN, 2012). Também é importante considerar que os microorganismos existem em comunidades repletas de interações que podem ser antagônicas ou sinérgicas e que influenciam na evolução do patógeno (MAYER; KRONSTAD, 2017).

Dessa forma, *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria, que semelhante a *Cryptococcus* spp., está presente no ambiente e atua como um patógeno oportunista, sendo importante agente causador de pneumonias nosocomiais. É capaz de secretar um enorme arsenal de toxinas importantes na patogenicidade e com grande potencial na inibição

do crescimento de diferentes microrganismos, incluindo bactérias e fungos (RELLA et al., 2012).

O presente trabalho avaliou a influência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na progressão da criptococose causada por *Cryptococcus gattii*, em modelo murino, com perspectivas de ampliar o conhecimento sobre a patogênese da doença, investigar a influência dessas bactérias no mecanismo de disseminação do fungo para o SNC e ampliar a compreensão das possíveis interações entre esses patógenos *in vivo*.

## 2. Metodologias

### 2.1 Ensaios *in vitro*

Inicialmente foram realizados co-cultivos de  $10^5$  UFC de *C. gattii* L27/01 com  $10^5$  UFC de *P. aeruginosa* ATCC27853. Após 4 horas, o crescimento fúngico foi avaliado através da quantificação de UFC do fungo em meio ASD com 0,2 g/L de Cloranfenicol.

Para avaliar a inibição *C. gattii* L27/01 por produtos secretados por *P. aeruginosa*, foi realizado o método de antagonismo de *spot-on-the-lawn*, de acordo com Harris et al., 1989, com algumas modificações (HARRIS et al., 1989).

Atividade fagocítica e fungicida de macrófagos contra *C. gattii*, na presença de *P. aeruginosa*, foi realizada por meio dos ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (PRN), utilizando macrófagos derivados de medula óssea, que foram estimulados com  $10^3$  UFC de Pa 30 minutos antes da inoculação de  $10^5$  UFC de Cg (MOI 1:1), considerando tempos de incubação de 3 e 6 horas.

### 2.2 Ensaios *in vivo*

Para a execução dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG), com número de protocolo 77 / 2018.

Inicialmente, os animais foram coinfetados com  $10^5$  UFC de Pa e  $10^4$  UFC de leveduras viáveis de Cg, formando diferentes grupos, Pa inoculada três dias antes (grupo Pa+Cg) e três dias após (grupo Cg+Pa) a inoculação de Cg. Foram acompanhados diariamente para avaliação da morbidade (protocolo SHIRPA- (ROGERS et al.,

1997)) e construção de uma curva de sobrevivência para avaliar a mortalidade. Em seguida, foram realizadas análise de carga fúngica nos pulmões, cérebros e lavado broncoalveolar (LBA), avaliação da resposta inflamatória no LBA, incluindo análise do perfil de recrutamento celular e quantificação de citocinas por ELISA e análise histológica dos pulmões. Também foi realizada análise da população de macrófagos e neutrófilos por meio da técnica de citometria de fluxo; e nova curva de sobrevivência para avaliar a mortalidade frente ao uso de droga inibidora da enzima NO sintase (iNOS), Cloridrato de Aminoguanidina (Sigma-Aldrich), adicionada na água dos animais na concentração de 1 mg/mL, tratamento contínuo.

### 2.3 Análise Estatística

Os grupos estudados foram analisadas com o apoio do software PRISMA 5.0 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA), considerando nível de 95% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 3 Resultados e Discussão

O co-cultivo de Cg com Pa (ATCC27853), mostrou redução significativa no crescimento de *C. gattii*. De forma semelhante, os produtos secretados a partir do cultivo de Pa apresentaram uma atividade inibitória sobre o crescimento de *C. gattii* (L27/01) mostrando halos de inibição límpidos e bem definidos (figura 1A).

*Cryptococcus* spp. é considerado um patógeno intracelular facultativo e macrófagos alveolares e neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra esse microrganismo. Assim, diante do potencial inibitório de Pa sobre Cg, foi avaliado se o contato prévio de Pa com macrófagos poderia interferir no processo de fagocitose do fungo. Dessa forma, a análise do índice fagocítico mostrou uma fagocitose significativamente menor no grupo Pa+Cg em relação ao grupo Cg, nos tempos analisados. Também mostrou que no tempo de 6 horas houve uma maior eficiência fungicida do macrófago (figura 1B), o que pode ser justificado pela maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (PRN) promovidas pelo estímulo prévio com a bactéria, promovendo a morte do fungo pelos macrófagos (figura 1 C e D).

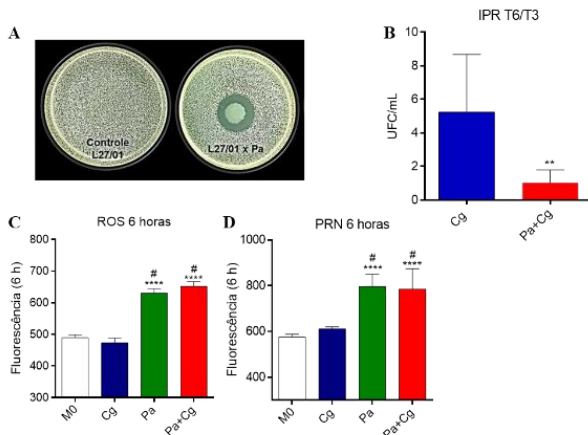


Figura 1: A) Atividade antagonista de metabólitos secretados por *P. aeruginosa* (ATCC27853), inibindo o crescimento de *C. gattii*. B) Índice de proliferação intracelular das leveduras (IPR) recuperadas após serem fagocitadas. C e D) Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (C) e nitrogênio - peroxinitrito - PRN (D) após 6h de infecção por *C. gattii*. \*diferença estatística em relação ao grupo controle NI; #diferença estatística em relação ao grupo Cg.

Os animais infectados somente com a bactéria (Pa) apresentaram uma média de sobrevivência semelhante ao grupo não infectado (NI), apresentando perda de peso após inoculação da bactéria, mas com rápida recuperação, em torno de 3 a 4 dias. Os animais infectados somente com Cg, tiveram uma média de sobrevivência de 26 dias, enquanto o grupo de animais que recebeu a bactéria 3 dias antes (Pa+Cg) apresentou uma média de sobrevivência de 32 dias, sendo 6 dias a mais ( $p < 0,0001$ ) que os grupos (Cg) e (Cg+Pa), com média de 25 dias (figura 2A). O atraso na letalidade observado em Pa+Cg foi acompanhado com uma redução de morbidade, que mostrou melhoras significativas nos parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA, quando comparados com os grupos Cg e Cg+Pa.

A eutanásia dos animais no décimo dia de coinfeção, revelou uma redução significativa na carga fúngica recuperada nos LBA e nos pulmões dos animais pertencentes ao grupo que recebeu a bactéria antes (Pa+Cg), quando comparados com os grupos Cg e Cg+Pa. Com relação à carga fúngica no cérebro, houve recuperação nos grupos Cg e Cg+Pa. No grupo Pa+Cg, além da carga fúngica reduzida nos pulmões e LBA, no cérebro só foi possível recuperação de carga fúngica em apenas 40% dos animais analisados (figura 2B).

A análise do perfil de citocinas no grupo Pa+Cg 1d (eutanásia 24 horas após a inoculação de Cg) mostrou níveis mais elevados de CXCL-1 e IL-1 $\beta$  quando comparados ao grupo Cg 1d (figura 2 C e D). Já no décimo dia após inoculação de Cg, o grupo Pa+Cg mostrou níveis de IL-10 superiores

ao grupo Cg10d (figura 2 E). Na figura 2 F e G pode-se observar contagens de macrófagos e neutrófilos com iNOS mais elevadas no grupo Pa+Cg 1d, comparativamente ao grupo Cg 1d.

Na figura 2H, a análise da curva de sobrevivência dos grupos Cg e Pa+Cg tratados com inibidor de iNOS, comparativamente aos grupos não tratados, mostraram que a inibição de iNOS no grupo Pa+Cg promoveu uma letalidade precoce em mais de 60% dos animais.

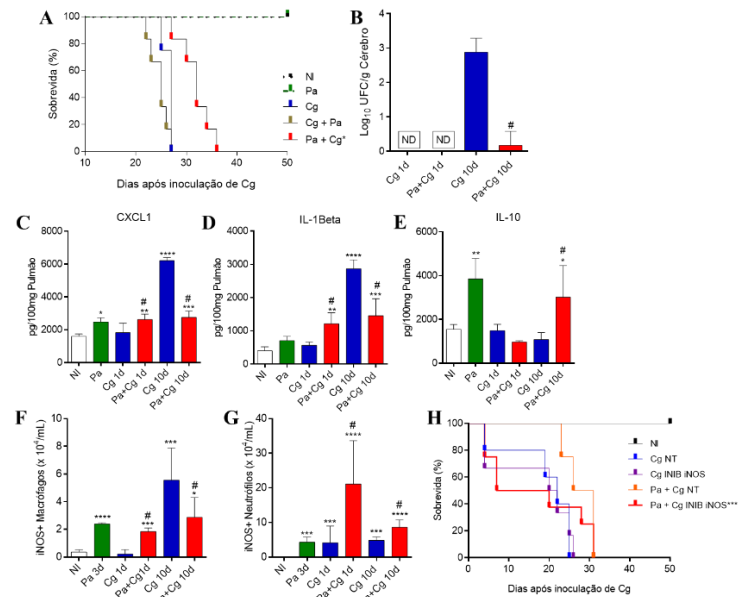


Figura 2: A) Curva de sobrevivência – avaliação da mortalidade dos animais coinfectados. B) Carga fúngica recuperada no cérebro. C, D) e E) Quantificação de CXCL-1, IL-1 $\beta$  e IL-10, respectivamente. F) e G) Perfil de macrófagos e neutrófilos com NO sintase induzida (iNOS+), respectivamente. H) Curva de sobrevivência de animais infectados com Cg e coinfectados (Pa+Cg) submetidos a tratamento com inibidor de iNOS, comparativamente aos grupos não tratados (NT). \*diferença estatística em relação ao grupo controle NI; #diferença estatística em relação ao grupo Cg.

#### 4 Conclusões

A inoculação prévia de Pa nos pulmões promoveu uma modulação protetiva no sistema imune dos animais, atrasando o desenvolvimento da criptococose pelo recrutamento de macrófagos e ativação da enzima iNOS.

#### 5 Apoio Financeiro

Capes, CNPq, Fapemig.

#### 6 Referências

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, C. *Cryptococcus gattii* Infections. v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Mbio.Asm.Org**, v. 8, n. 5, p. e01537-17, 2017.

PASMAN, L. The Complication of Coinfection. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, p. 127–132, 2012.

RELLA, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Cryptococcus* Species. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 451–461, 2012.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 7–8, 2018.

ROGERS, D. C. et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. **Mammalian genome**, v. 8, n. 10, p. 711–713, 1997.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O PAPEL DO EOSINÓFILO NA CANDIDÍASE ORAL INDUZIDA EM ANIMAIS SIBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTINEOPLÁSICO

Santos, B.M.A.<sup>1</sup>, Gaggino, J.C.P.<sup>1</sup>; Brito, C.B.<sup>1</sup>, Queiroz-Junior, C.M.<sup>2</sup>; Baltazar, L.M.<sup>1</sup>; Soriani, F.M.<sup>3</sup>, Santos, P.C.<sup>1</sup>; Souza, D.G.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

E-mail: bmamorims@gmail.com

**Resumo:** A candidíase oral, causada por *Candida albicans*, é a infecção oportunista mais prevalente em pacientes em uso de drogas com atividade imunossupressora. Este uso está associado a um importante quadro de imunossupressão e estudos demonstram que esta infecção é uma das principais causas de abandono do tratamento. Neste contexto, nosso objetivo foi estabelecer um modelo de candidíase oral em camundongos submetidos ao tratamento com o 5-fluoracil (5-FU) e avaliar o efeito do eosinófilo na patogênese da infecção. Camundongos BALB/c selvagens (WT) ou deficientes para eosinófilo ( $\Delta db/Gata1^{-/-}$ ) foram tratados com 3 doses de 5-FU, no 5º dia foram inoculados com o fungo, sublingual e, eutanasiados no 2º dia pós-infecção para análises clínicas e inflamatórias. Nossos resultados mostram que a infecção em animais pré-tratados com o 5-FU associa-se a uma maior recuperação da carga fúngica, aumento da lesão tecidual, do infiltrado inflamatório e perda de peso quando comparada ao grupo infectado e não tratado. Houve um aumento significativo de CXCL-1 e CCL-11 na língua do primeiro grupo e aumento sistêmico de TNF- $\alpha$  e CXCL-1. De maneira interessante, a deficiência em eosinófilos foi associada a melhora dos parâmetros descritos anteriormente e, ela foi acompanhada de alterações histopatológicas mais discretas e menor recuperação da carga fúngica na língua destes quando comparados aos WT. Assim, os resultados sugerem que o pré-tratamento com antineoplásico aumentou a gravidade da infecção por *Candida albicans* quando comparado aos não tratados e, que os eosinófilos apresentam importante papel na patogênese da doença.

**Palavras-chave:** Candidíase oral; *Candida albicans*; antineoplásico; 5-FU; eosinófilo.

### 1. Introdução

O aumento da expectativa de vida, bem como o estilo de vida moderno tem contribuído para um expressivo aumento no número de pessoas com algum comprometimento do sistema imune (Vallabhaneni *et al.*, 2016). À vista disso, o aumento dessa prevalência de doenças neoplásicas resulta em um maior uso de quimioterápicos antineoplásicos e, esse tipo de tratamento está intimamente associado ao comprometimento do sistema imune (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2014) que, muitas vezes pode estar associado à alta incidência de infecções oportunistas, como por exemplo a candidíase oral.

Esta, é uma infecção fúngica oportunista que tem aumentado sua incidência nas últimas décadas e tem como agente etiológico fungos do gênero *Candida* ssp, mas principalmente a espécie *Candida albicans* (Doi *et al.*, 2016).

Em sua forma comensal, *C. albicans* coloniza o trato gastrointestinal, a pele e o trato genitourinário feminino de pelo menos 70 % da população mundial. No entanto, ela pode se tornar patogênica caso os hospedeiros desenvolvam deficiências imunes, danos epiteliais ou disbiose (Noble *et al.* 2016).

O uso de antineoplásicos está associado a um importante quadro de imunossupressão e achados clínicos demonstram que a candidíase oral é uma das principais causas de abandono do tratamento (Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

Dessa forma, é extremamente relevante o desenvolvimento de modelos que permitam avaliar mecanismos fisiopatológicos dessa infecção em quadros de imunossupressão.

Sabe-se que há a associação entre inflamação eosinofílica e sensibilização ou colonização fúngica, no entanto, o papel do eosinófilo na infecção por *C. albicans* ainda não foram elucidados.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo de candidíase oral em camundongos submetidos ao tratamento com o antineoplásico 5-fluoracil (5-FU) e avaliar o efeito do eosinófilo na patogênese da infecção.

## 2. Metodologia

### 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de vida da linhagem BALB/c selvagens (WT) ou deficientes para eosinófilos ( $\Delta db/Gata1^{-/-}$ ) adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do laboratório de Imunofarmacologia, respectivamente, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Aprovado pelo CEUA: 390/2018.

### 2.2 Candida albicans

Neste trabalho foi utilizada uma amostra clínica (L3881) de *C. albicans* (LEMI # L3881, Padovan *et al.*, 2009). Consiste em uma amostra gentilmente cedida pelo Prof. Frederico Marianetti Soriani, do Departamento de Genética, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 2.3 Droga utilizada e indução de imunossupressão

Para a indução de imunossupressão no utilizou-se o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (Fauldfluor), na dose de 75 mg/Kg, sendo administrado uma dose por dia, via i.p, durante os três primeiros dias consecutivos.

### 2.4 Preparo do inóculo

O cultivo de *Candida albicans* foi realizado em meio Mycosel, a 37°C, *overnight*. Os inóculos foram preparados em PBS 1X e ajustados para uma solução com  $6,66 \times 10^8$  UFC/mL de *C. albicans* por contagem em câmara de Neubauer. Dessa solução foram retirados 30 µL por animal para realização da infecção com  $2 \times 10^7$  UFC do fungo.

### 2.5 Indução da candidíase oral

A candidíase oral foi induzida em camundongos tratados com 5-FU sob anestesia com uma solução contendo xilazina (15mg/Kg) e cetamina (100 mg/kg). Como estratégia para facilitar a infecção, foi realizada uma escoriação sublingual nos animais com bisturi para retirar camadas do epitélio de modo que não houvesse lesões profundas na língua. Posteriormente, os animais foram inoculados por meio de uma bola de algodão estéril contendo 30 µL do inóculo estabelecido. Esse algodão foi colocado na região sublingual dos animais anestesiados por 75 minutos.

### 2.6 Avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas e análise histopatológica

Os animais, tanto WT quanto deficiente para eosinófilos ( $\Delta db/Gata1^{-/-}$ ) foram separados em quatro grupos experimentais, sendo eles: grupo controle, grupo infectado com *C. albicans*, grupo tratado com 5-FU e grupo tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans*. No segundo dia após o tratamento com o antineoplásico 5-FU foi realizada a inoculação de *C. albicans* nos animais e, dois dias após esse procedimento eles foram eutanasiados para análises de lesões tecidual, inflamatória e leucograma. Amostras de soro e língua foram utilizadas para dosagem de citocina (TNF) e quimiocinas (CCL-11 e CXCL-1).

Amostras de língua foram coletadas e foram imediatamente fixados em 10% de formalina tamponada durante 24 horas, processadas, incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas, coradas com H&E e PAS.

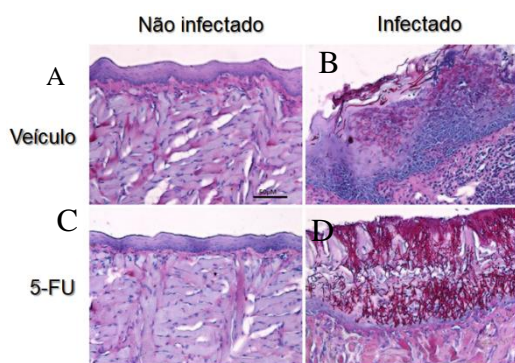
### 2.7 Análises estatísticas

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados serão apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado será de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).



### 3 Resultados e Discussão

Nossos resultados mostram que a infecção em animais pré-tratados com o 5-FU foi associada a uma maior recuperação da carga fúngica, aumento da lesão tecidual, do infiltrado inflamatório e perda de peso quando comparado ao grupo somente infectado. No entanto, ao compararmos a infecção dos animais WT e  $\Delta db/Gata1^{-/-}$  dos grupos pré-tratados com 5-FU não há diferença na carga fúngica, mas há uma perda de peso mais atenuada e alterações histopatológicas mais discretas no grupo deficiente para eosinófilos.



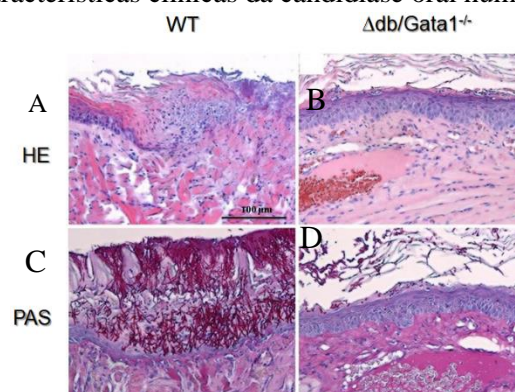
**Figura 1:** Histologia da língua de animais WT tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Ocorreu um aumento significativo de CXCL-1 e de CCL-1 na língua dos animais WT do grupo 5-FU+*C. albicans* em relação aos demais grupos. Além do aumento sistêmico de CXCL-1 juntamente com o de TNF- $\alpha$  nesse mesmo grupo. No entanto, o grupo deficiente para eosinófilo, que foi tratado e infectado, apresentou uma atenuação nos parâmetros inflamatórios, ou seja, os níveis dessas citocinas e quimiocinas não foram elevados comparados ao grupo WT.

Tratando-se das alterações histopatológicas, podemos observar na figura 1A representada a língua de um animal controle caracterizada pela presença de um epitélio íntegro, a 1B corresponde a uma língua infectada por *C. albicans* e tal processo deu origem à hiperplasia do epitélio e à exocitose e, o processo inflamatório foi caracterizado pela presença de um infiltrado celular. A figura 1C consta a língua de um animal controle tratada com o antineoplásico 5-FU, apresentando alterações leves no epitélio, com um infiltrado inflamatório sutil. Por fim, a figura 1D representa a língua do animal que foi infectado após o tratamento com o 5-FU. É possível observar uma grande quantidade de hifas invadindo o tecido epitelial e conjuntivo do tecido lingual.

Já na figura 2, podemos observar o mesmo corte histológico (por motivos de comparação) visto anteriormente na primeira imagem representada por D que está corada em PAS, este procedimento cora especificamente glicogênio, substância que está presente nas células fúngicas, mais especificamente, nas hifas e, nesta histologia estão presentes as alterações que ocorrem em animais que são infectados após serem tratados com o antineoplásico. Na figura 2 B e 2D podemos ver, curiosamente, os animais deficientes para eosinófilos apresentando uma arquitetura lingual menos danificada e com menos infiltrado inflamatório, não apresentando filamentação do fungo em ambos os grupos.

Na língua dos animais estavam presentes tanto leveduras quanto hifas de *C. albicans*, mostrando que este modelo mimetiza as principais características clínicas da candidíase oral humana.



**Figura 2:** Histologia da língua de animais WT e  $\Delta db/Gata1^{-/-}$  infectados com *C. albicans* e tratados com 5-FU coradas com duas formas distintas, H&E e PAS.

É de conhecimento que ainda não existem dados na literatura que associam candidíase à ação dos eosinófilos. Sendo assim, para estudarmos o papel dos eosinófilos nesse contexto utilizamos camundongos  $\Delta db/GATA1^{-/-}$  que não possuem o fator de transcrição para eosinófilos e apresentam a retirada completa na circulação, medula óssea e tecidos. Os eosinófilos desempenham um papel imunorregulador e já foi demonstrado que eles podem secretar moléculas ou desencadear a expressão de fatores com propriedades ativadoras de outras células associadas à defesa imune do hospedeiro. Portanto, isso sugere que os eosinófilos são capazes de alterar o perfil de resposta de outras células. Analisando as histologias pode-se concluir que a lesão tecidual na língua de animais  $\Delta db/GATA1^{-/-}$  são bem mais discretas, assim como

a quantidade de células inflamatórias e fúngicas é menor em relação ao grupo WT.

As menores lesões teciduais e redução nos níveis de recrutamento de células inflamatórias em animais deficientes para eosinófilos pode indicar que na ausência dessas células a resposta de defesa do hospedeiro parece ser mais resolutive e menos lesiva ao organismo.

#### 4. Conclusões

Neste trabalho, foi possível estabelecer um modelo de candidíase oral em camundongos submetidos ao tratamento com antineoplásico. A participação dos eosinófilos ficou clara, visto que em animais  $\Delta db/Gata1^{-/-}$  observamos uma resposta inflamatória mais controlada e efetiva, e isso pôde ser comprovado pela melhora clínica e patológica desses animais. Esses achados permitem ter uma nova visão em termos de estratégias para o tratamento e controle de infecções por *C. albicans*. Nas últimas décadas tem se observado cada vez mais o aparecimento de linhagens resistentes a drogas antifúngicas, o que dificulta o tratamento de indivíduos acometidos pela infecção. Diante disso, estratégias terapêuticas que possam modular a resposta imune do hospedeiro são promissoras como arsenal para o controle dessas doenças. Nesse contexto, a modulação das atividades efetoras dos eosinófilos na infecção por *Candida albicans* pode se mostrar uma ferramenta poderosa para auxiliar o manejo dos pacientes infectados. Todavia, ainda são necessárias muitas pesquisas e melhorias para elucidar diversos mecanismos que estão envolvidos neste processo.

#### 5. Apoio Financeiro

Agradecemos à UFMG, Capes, CNPq, Fapemig pelo apoio e suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

#### 6. Referências

DIASIO RB, HARRIS BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, 1989; 16: 215-37.

DIEHL, R., FERRARA, F., MÜLLER, C., DREYER, A. Y., MCLEOD, D. D., FRICKE, S., & BOLTZE, J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cellular & Molecular Immunology**, 2016. 14(2), 146–179.

DOI AM, PIGNATARI ACC, EDMOND MB, MARRA AR, CAMARGO LFA, *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLOS ONE**, 2016; 11(1): e0146909.

HELLSTEIN, John W.; MAREK, Cindy L.. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head And Neck Pathology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.25-32, 29 jan. 2019.

HOGAN S. P., ROSENBERG H. F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P. S., LACY P., *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, 2008; 38, 709–750.

LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Bdj**, [s.l.], v. 223, n. 9, p.675-681, 10 nov. 2017.

MAVOR AL, THEWES S, HUBE B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr Drug Targets**, 2005.

MENEZES-GARCIA, Z. Papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico fluorouracil. **Tese (Doutorado em microbiologia)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015.

NAGLIK JR, FIDEL PL JR., ODDS FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett**, 2008. 283: 129–139.

NOBLE SM, GIANETTI BA, WITCHLEY JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nat Rev Microbiol**. 2016;15(2):96-108.

PADOVAN A. C., CHAVES G. M., COLOMBO A. L., BRIONES M. R. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Med. Mycol.**, 2009. 47, 824–835.

RAZZAGHI-ABYANEH, M., SADEGHI, G., ZEINALI, E., ALIREZAEI, M., GHAFHAROKHI, M. S., AMANI, A., *et al.* Species distribution and antifungal

susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. **J. Mycol. Med**, 2014.

VALLABHANENI, S., MODY, R. K., WALKER, T., AND CHILLER, T. The global burden of fungal diseases. **Infect. Dis. Clin. North Am**, 2016.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## INTERAÇÃO DA GENTAMICINA COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL CONTRA LINHAGENS DE *CRYPTOCOCCUS*

Silva<sup>1</sup>, L. M. V.; Freitas<sup>1</sup>, G. C.; Carmo<sup>1</sup>, P. H. F.; Santos<sup>1</sup>, D. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais Departamento/Laboratório Micologia

E-mail: lviavitorino@yahoo.com.br

---

**Resumo:** A criptococose é uma micose sistêmica que causa danos aos pulmões e cérebro. Objetivou-se nesse estudo avaliar a atividade do antibacteriano (gentamicina isolada e associada aos antifúngicos clínicos fluconazol e anfotericina B) contra linhagens de *Cryptococcus* spp. Foram realizados ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos isolados, bem como a interação da gentamicina entre os antifúngicos por meio do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF). Ainda realizou-se adaptação de linhagens do fungo ao antibacteriano para avaliar a possibilidade de indução a resistência cruzada com antifúngicos. A CIM para fluconazol testadas nas linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* obtiveram uma variação de 0,5-8µg/mL e 0,25-1µg/mL e para anfotericina B a variação foi de 0,5-8µg/mL e 0,25-0,5µg/mL respectivamente. Para gentamicina a CIM para todas as linhagens de *C. gattii* foi de 512µg/mL e as cepas de *C. neoformans* variou de 128µg/mL a >512µg/mL. Os resultados para ICIF foram observados que a interação da gentamicina entre antifúngicos foram classificados como indiferente para as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*. Durante o processo de adaptação ao antibacteriano, verificou-se que uma linhagem de *C. gattii* foi capaz de crescer cerca de 3 vezes maior que a linhagem não adaptada. No momento estão sendo realizados testes para o entendimento do processo de adaptação e suas consequências para o fungo e para a progressão da criptococose em modelo murino.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana; infecções fúngicas; mecanismos de resistência

### 1. Introdução

A infecção causada por *Cryptococcus* se inicia pela inalação dos propágulos fúngicos disseminados no meio ambiente. A doença atinge primeiramente os pulmões e em casos clínicos mais graves o patógeno é disseminado pela corrente sanguínea atingindo a barreira hematoencefálica, sendo a manifestação comum da criptococose humana, a meningoencefalite (Cao et al, 2018; Lin; Heitman, 2016; Li et al, 2016).

O tratamento da criptococose está diretamente ligado ao mecanismo de infecção, ao estado imunológico do paciente e a disponibilidade de terapia. Usualmente os antifúngicos utilizados são o polieno anfotericina B associado ao azólico fluconazol ou 5-flucitosina (Smith et al, 2015).

Com isso, a terapia combinada é empregada na prática clínica afim de intensificar o tratamento das infecções fúngicas, no entanto, estudos demonstraram que linhagens de *Cryptococcus* adquiriram resistência aos antifúngicos clínicos e menos sensíveis a concentrações elevadas de outros medicamentos, tornando-as mais virulentas (Bastos et al, 2017; Santos et al, 2012; Santos et al, 2014).

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a susceptibilidade das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* submetidas a gentamicina isolada e combinada aos antifúngicos convencionais anfotericina B e fluconazol.

## 2 Metodologias

### 2.1 Diluição dos fármacos para determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

Foram utilizados dois antifúngicos clínicos e um antibacteriano anfotericina B (Sigma-Aldrich), fluconazol (Sigma- Aldrich) e gentamicina (Sigma-Aldrich) respectivamente.

Diluições seriadas foram preparadas em meio sintético RPMI-1640 tamponado (pH7,0) e para cada antimicrobiano foram obtidas dez concentrações finais, sendo para anfotericina B 0,3-16µg/mL, fluconazol 0,12-64µg/mL e gentamicina 1-512µg/mL.

Logo após, alíquotas de 100µL de cada fármaco foram distribuídas em placas de 96 poços, sendo que para cada placa foram definidos dois controles: crescimento e esterilidade (CLSI, 2008).

### 2.2 Preparo do inóculo e leitura dos resultados das concentrações mínimas inibitórias do antibacteriano e dos antifúngicos

O inóculo fúngico foi preparado a partir de linhagens de *C. gatti* e *C. neoformans* em ágar Sabouraud Dextrose incubadas a 37°C durante 48h.

Após o período de incubação uma alçada de cada linhagem foi colocada em tubo de ensaio com 2mL de solução salina esterilizada. As amostras foram homogeneizadas no vortex e lidas no espectrofotômetro a 530nm e ajustadas na transmitância para a obtenção de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Em seguida, as amostras foram diluídas em RPMI-1640 para alcançar uma concentração de  $1 \times 10^3$ .

A leitura dos antimicrobianos foram realizadas após 72h de incubação e visualmente. A CIM foi considerada em 100% de inibição de crescimento fúngico para anfotericina B e gentamicina e 50% de inibição para fluconazol, conforme o (CLSI, 2008).

### 2.3 Avaliação da concentração inibitória fracionária (CIF)

A gentamicina foi avaliada quanto a sua atividade combinada com os antifúngicos. Alíquotas de 50µL de cada fármaco foi distribuído em placas de 96 poços com dez concentrações para anfotericina B (0,3-16µg/mL) fluconazol (0,12-

64µg/mL) nas posições vertical e sete para a gentamicina (8-512µg/mL) na posição horizontal.

Em seguida 100µL do inóculo fúngico foi colocado nas placas e incubadas a 37°C por 72h.

O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) foi calculado pela soma dos CIF's:

$$\text{ICIF: } \text{CIF}_A + \text{CIF}_B = (C_A^{\text{COMB}} / \text{CIM}_A^{\text{INDIVIDUAL}}) + (C_B^{\text{COMB}} / \text{CIM}_B^{\text{INDIVIDUAL}})$$

Dessa forma a interação foi classificada como sinergismo se  $\text{ICF} \leq 0,5$ , antagonismo se  $0,5 < \text{ICF} < 4$  e indiferente se  $\text{ICF} > 4$  (Santos et al, 2012).

### 2.4 Avaliação da concentração inibitória em meio sólido

As colônias de *Cryptococcus* foram cultivadas em meio ASD sem droga durante 48h. Após esse período, as colônias foram suspendidas em salina estéril e o inóculo ajustado em espectrofotômetro, 10 µL do inóculo ajustado foram transferidos para o meio sólido suplementado com o antibacteriano.

As placas foram incubadas a 37°C, por 72 horas. As CIMS para a gentamicina em meio sólido foram determinadas visualmente avaliando 100% de inibição do crescimento (Carneiro, 2019).

### 2.5 Seleção das linhagens menos sensíveis (adaptadas) a gentamicina

Após o teste de susceptibilidade em CIM em meio sólido, as linhagens foram cultivadas em ASD com concentrações crescentes de gentamicina. Depois de quatro dias o inóculo foi preparado em solução salina estéril e a transmitância (530nm) foi ajustada para uma faixa de 75-77% ( $1 \times 10^6$  UFC/mL).

Posteriormente 10µL ( $1 \times 10^3$ UFC/mL) de cada suspensão em meio contendo gentamicina foram cultivadas de forma gradativa, em concentrações crescentes do fármaco até cessar o crescimento fúngico.

As colônias foram submetidas ao antibacteriano foram denominadas linhagens adaptadas (LA) e as cepas originais (sem exposição) de linhagem selvagem (LS) (Bastos et al, 2017).

### 3 Resultados e Discussão

Ao avaliar a CIM da gentamicina nas cepas de *C.gattii* testadas, todas as amostras obtiveram uma CIM de 512µg/mL e para os isolados de *C.neoformans*, apenas a cepa *C.neoformans* 96806 a CIM do antibacteriano foi 128µg/mL, outras duas amostras de *C.neoformans* 28957 e *C.neoformans* H99 foi de 512µg/mL e >512µg/mL, respectivamente.

As linhagens também foram submetidas aos antifúngicos, no qual todos os isolados foram sensíveis ao anfotericina B, com variação da CIM de 0,25-1µg/mL para as amostras de *C.gattii* e 0,25-0,5µg/mL para os isolados de *C.neoformans*. Para o fluconazol a variação da CIM foi de 0,5-8µg/mL em todas as linhagens, conforme a Tabela 1. Os resultados da concentração inibitória fracionária (CIF) para as combinações GENT/ANB e GENT/FLZ estão apresentados na Tabela 1.

A CIF para GENT/ANB para as diferentes concentrações de gentamicina foram classificadas como indiferente para todas as linhagens de *C. gattii* avaliadas, exceto para a cepa *C. gattii* 547 que na concentração de 16µg/mL foi considerado como sinergismo e a CIF para GENT/FLZ a linhagem *C. gattii* 196L apresentaram antagonismo nas concentrações 512, 256 e 128µg de gentamicina.

Para os isolados de *C.neoformans* o antagonismo foi observado na interação GENT/ANB nas concentrações 512, 256 e 128µg/mL do antibacteriano, apenas na cepa *C.neoformans* 96806 e indiferente para GENT/FLZ para todas as linhagens.

A CIF das concentrações de gentamicina associada aos antifúngicos em sua maioria das linhagens de *Cryptococcus* avaliadas, foram classificadas como indiferente, porém, fármacos da mesma classe associados, como o fluconazol também obtiveram a CIF classificada como indiferente (Santos et al, 2012).

Os dados obtidos para a CIM em meio sólido (CIM<sub>s</sub>) e adaptação das linhagens estão descritos na Tabela 2. A CIM<sub>s</sub> da gentamicina para as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* variaram de 256-656µg/mL.

Em relação a seleção das linhagens menos sensíveis (adaptadas) as concentrações crescentes de gentamicina, a linhagem *C. gattii* L27/01 destacou-se quanto a concentração máxima alcançada.

Na linhagem selvagem a concentração máxima alcançada do antibacteriano foi de

192µg/mL enquanto que no processo adaptativo a cepa cresceu em uma concentração 3 vezes maior de gentamicina.

A adaptação de linhagens de *C. gattii* e *C.neoformans* demonstraram a capacidade destes patógenos de produzir mecanismos para sobreviver e infectar os seres humanos tornando a terapia praticamente ineficiente (Bastos et al, 2017; Santos et al, 2014).

### 4 Conclusões

A cepa *C. gattii* L27/01 apresentou resultados iniciais importantes ao ser submetida a diversas concentrações de gentamicina. Portanto outros ensaios serão realizados:

A CIM da linhagem selvagem e da linhagem adaptada com os fármacos isolados e associados. Posteriormente a curva de crescimento de ambas as linhagens e ensaio de fagocitose.

Depois desta etapa serão realizados a ensaios para quantificação do ergosterol, tamanho de cápsula, mecanismo de resistência pela avaliação da bomba de efluxo e expressão gênica. Todos estes processos serão efetuados e dependendo dos resultados serão realizados ensaios em modelo murino

### 5 Apoio Financeiro

UFMG, Capes, CNPq

**Tabela 1:** Valores da concentração inibitória fracionária (CIF) para linhagens de *Cryptococcus* obtidos da interação entre anfotericina B (ANB), fluconazol (FLC) com gentamicina (GENT).

	CIM(mg/L)			CIF para interação ANBGENT para diferentes concentrações de GENT							CIF para interação FLCGENT para diferentes concentrações de GENT								
	Linhagens	FLC	AMB	GENT	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	
<i>Cryptococcus gattii</i>	R265	1	0,5	512	3	1,5	1	0,75	0,62	0,56	1,03	2,03	1,03	1	0,75	1,12	1,06	1,03	
	547	4	0,5	512	3	1,5	1	0,75	0,62	0,5*	1,03	2,03	1,03	1	0,75	1,12	1,06	1,03	
	L27/01	0,5	0,25	512	2	1,5	2,25	1,12	1,06	1,03	1,01	1,24	0,74	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	
	196L	8	1	512	2	1,5	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	10**	6**	4	3	2,5	2,25	2,12	
	29/0893	4	1	512	2	1,5	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	1,03	0,62	0,52	0,62	0,56	0,53	0,51	
	28/0893	4	1	512	2	1,5	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	1,03	0,62	0,52	0,62	0,56	0,53	0,51	
	Variação da CIM	0,5-8	0,25-1	-															
	Média geométrica	3,5	3,4																
<i>Cryptococcus neoformans</i>	28957	0,5	0,25	512	2	1,5	2,25	1,12	1,06	1,03	1,01	1,24	0,74	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	
	96806	16	0,25	128	17**	9**	5**	3	2	1,5	1,25	4,00	2,00	1,00	0,5	1,25	1,12	1,06	
	H99	8	1	>512	1,5	1	1,25	1,12	1,06	1,03	1,01	1,12	0,75	0,75	0,62	0,56	0,53	0,51	
	Variação da CIM	0,5-16	0,25-16	-															
	Média geométrica	8,1	5,75																

<sup>a</sup>CIM (50%) - endpoint considerado 50% de inibição de crescimento

<sup>b</sup>CIM (100%) - endpoint considerado 100% de inibição de crescimento

\*Sinergismo

\*\*Antagonismo

**Tabela 2:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de gentamicina no teste do meio sólido, ( $\text{CMA}_{\text{LS}}$ ) para linhagens selvagens e ( $\text{CMA}_{\text{LA}}$ ) para linhagens adaptadas em cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Linhagens	CIM <sub>s</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{CMA}_{\text{LS}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{CMA}_{\text{LA}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Cryptococcus gattii</i>	R265	512	64; 128; 192; 256; 512
	547	256	64; 128; 192; 256
	L27/01	256	64; 128; 192; 256
	196L	576	64; 128; 192; 256; 512; 576
	29/0893	656	64; 128; 192; 256; 512; 576; 640; 656
	28/0893	640	64; 128; 192; 256; 512; 576; 640
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	96806	512
28957		656	64; 128; 192; 256; 512; 576; 640; 656
H99		576	64; 128; 192; 256; 512; 576

CIM<sub>s</sub>: concentração inibitória mínima em meio sólido

$\text{CMA}_{\text{LS}}$ : concentração máxima alcançada em linhagens selvagens

$\text{CMA}_{\text{LA}}$ : concentração máxima alcançada em linhagens adaptada



## 6.Referências

BASTOS, R. W. et al. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. e01179-17, 2017.

CAO, W. et al. Comparison of clinical features and prognostic factors of cryptococcal meningitis caused by cryptococcus neoformans in patients with and without pulmonary nodules. **Mycopathologia**. v. 184, p. 73-80, 2018.

CARNEIRO, H.C.S, et al. Effect of non-antifungal agrochemicals on the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 58, p.47-53, 2019.

CLSI. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third Edition. CLSI document M27 – A3. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.

LI, J. et al. Cryptococcal meningitis in tally presenting with eye symptoms in an immunocompetent patient: A case report.

**Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 12, n. 2, p. 1119-1124, 2016.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**. v. 60, p. 69-105, 2006.

SANTOS, J.R. et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 12, n. 5, p. 2553-2558, 2012.

SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2014.

SMITH K. D. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59, n. 9, p. 7197-7204, 2015.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## COINFEÇÕES POR LEVEDURAS EM PACIENTES COM COVID-19: IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Silva<sup>1</sup>, D.L.; Lima<sup>1</sup>, C.M.; Magalhães<sup>1,4</sup>; V.C.R.; Baltazar<sup>3</sup>, L.M.; Johann<sup>2</sup>, S.; Peres<sup>1</sup>, N.T.A.; Carvalho<sup>4</sup>, J.; Rabelo<sup>4</sup>, L.F.; Caligorne<sup>5</sup>, R.B.; Santos, D.A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro.

<sup>4</sup> Hospital Eduardo de Menezes. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

<sup>5</sup> Hospital Santa Casa de Belo Horizonte.

E-mail: daninetbh@yahoo.com

### Resumo:

A doença causada por SARS-CoV-2 (COVID-19) se tornou pandemia em 2020. Ainda não há tratamentos eficazes contra COVID-19, e o manejo dos pacientes envolve uso de antibacterianos, antivirais e corticóides, o que favorece o surgimento de coinfeções fúngicas. Neste estudo foram incluídos 20 pacientes com coinfeções por leveduras. A taxa de mortalidade foi de 55%. As leveduras isoladas (n=28) foram identificadas por diferentes métodos e seu perfil de sensibilidade a antifúngicos foi avaliado. *C. albicans* foi a espécie mais frequente, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. O método molecular identificou isolados não identificados pelo fenotípico. Os isolados de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos testados. Já os de *C. tropicalis* apresentaram sensibilidade intermediária ao voriconazol e os de *C. glabrata* apresentaram resistência a esse antifúngico. Monitorar o perfil de sensibilidade é importante na detecção de resistência cruzada e da emergência de linhagens resistentes pelo uso de tratamentos empíricos. Identificar precocemente as coinfeções e monitorar o perfil de sensibilidade dos seus agentes causadores torna possível um tratamento individualizado, o que impacta diretamente na sobrevivência destes pacientes.

**Palavras-chave:** coinfeção; *Candida*; COVID-19; antifungograma; levedurose.

### 1. Introdução

SARS-CoV-2 é um vírus respiratório causador da COVID-19 que, até 10/10/2020, ocasionou mais de um milhão de mortes em todo o mundo, sendo 148.957 delas no Brasil (WHO, 2020).

As infecções respiratórias estão entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsáveis por três milhões de mortes em 2016 (WHO, [s.d.]). Neste cenário as doenças polimicrobianas ou coinfeções merecem destaque, uma vez que estão comumente associadas à maior gravidade dos quadros clínicos (Pasman, 2012). Coinfeções ou doenças polimicrobianas são aquelas que envolvem dois ou mais microrganismos que atuam de forma concomitante/sinérgica ou sequencial, podendo envolver condições agudas ou crônicas. Os organismos envolvidos podem pertencer a diferentes reinos, gêneros e espécies ou variantes fenotípicas de uma única espécie (Bakaletz, 2004).

A coinfeção do SARS-CoV-2 com outros microrganismos pode aumentar as dificuldades de diagnóstico, tratamento, prognóstico da COVID-19 e podem estar associadas à maior gravidade e mortalidade nos pacientes por elas acometidos (Zhu et al. 2020).

Diante do atual cenário de falta de tratamentos eficazes contra COVID-19, antibacterianos, antivirais e corticoides têm sido amplamente utilizados no manejo dos pacientes. O uso destes medicamentos, porém, pode favorecer o surgimento de coinfeções fúngicas, não só no foco pulmonar, mas também em sítios não relacionados à apresentação respiratória, tais como trato urinário e corrente sanguínea (Rawson et al., 2020; Song, Liang, Liu, 2020). Conhecer as coinfeções associadas à COVID-19 e seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos permite a escolha da melhor opção terapêutica, reduzindo as chances de agravamento e mortalidade.

## 2. Metodologias

### 2.1 Aspectos éticos e critérios de inclusão

Esse projeto foi aprovado pela CONEP (CAAE: 30627320.6.0000.0008), e envolve armazenamento temporário e uso de material biológico isolado de amostras clínicas humanas, além de análise de prontuários médicos. Foram incluídos neste estudo pacientes internados no Hospital Eduardo de Menezes que receberam no hospital o diagnóstico positivo para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR e que aceitaram participar do estudo (ou tiveram a participação aceita pelo responsável) após tomarem ciência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os espécimes clínicos analisados no estudo incluíram aqueles de origem respiratória (aspirado traqueal, escarro, minibal), sanguínea (cateter, sangue) e urinária (urina).

### 2.2 Isolamento e identificação presuntiva das leveduras

As amostras provenientes de pacientes foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose com 5% de cloranfenicol (Sigma-USA) e Mycosel (Difco) e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por até 30 dias. Quando houve crescimento fúngico, procedeu-se com seu isolamento e criopreservação.

Cada isolado foi subcultivado em placa de CHROMagar *Candida*® (Difco) e incubado a 35 °C por 48 h. As espécies de *Candida* foram identificadas com base na cor da colônia de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.3 Identificação molecular

Os isolados de fungos filamentosos obtidos foram crescidos em meio Sabouraud a 28°C por sete dias. A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por (Rosa et al., 2009) com modificações. Em relação às leveduras, uma colônia de cada isolado foi cultivada em meio Sabouraud e incubada por 48h a 37°C. A extração do DNA total foi realizada conforme o trabalho descrito por Ferrer e colaboradores (2001). Todos os produtos obtidos na extração foram quantificados em NanoDrop e estocados a -20°C até a sua utilização.

A identificação das leveduras foi realizada por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores espécie específicos para *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. A comparação do padrão de bandas foi realizada sob luz ultravioleta com a coloração GelRed. Quando não foi possível a identificação com os iniciadores específicos, as leveduras foram submetidas ao sequenciamento utilizando-se iniciadores ITS1/ITS4. As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas em parceria com o laboratório da FIOCRUZ/Instituto René Rachou, utilizando o kit Big Dye versão 3.1. As sequências obtidas foram analisadas na plataforma GenBank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### 2.4 Perfil de sensibilidade a antifúngicos

Foi avaliada a sensibilidade das leveduras isoladas ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada conforme o documento M27- 4 ed. do CLSI (2017). Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado para preparar as soluções estoque dos fármacos. Todo o processamento da anfotericina B foi protegido da luz com papel alumínio, tendo em vista a fotossensibilidade da mesma. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 com adição de MOPS 0,165 mol/L. Posteriormente 100 µL de cada diluição foi distribuída em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, EUA). O controle de crescimento do microrganismo foi constituído de 100 µL do inóculo da levedura mais 100 µL de RPMI, e o controle de esterilidade apenas com o meio de cultura. Após a preparação das placas,

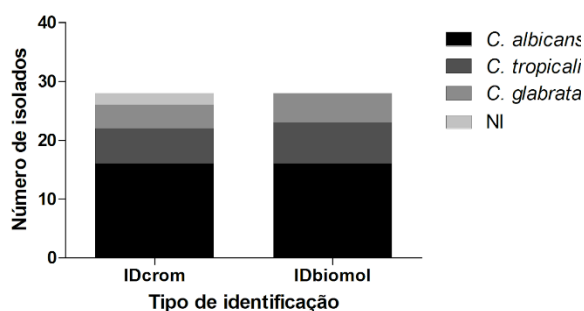
todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL do inóculo fúngico padronizado. Todos os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 e a leitura foi realizada visualmente. Para a anfotericina B a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. Para a leitura dos demais antifúngicos foi considerada a inibição de 50% do crescimento quando comparado ao crescimento do controle (CLSI, 2017).

### 3. Resultados e Discussão

Foram incluídos neste estudo 20 pacientes a partir dos quais houve crescimento de leveduras em amostras clínicas. Deste total, 11 (55%) vieram a óbito. A taxa de mortalidade entre esses pacientes é mais que o dobro daquela registrada na média geral de pacientes internados no Hospital Eduardo de Menezes (17,08%), o que pode indicar uma importância das coinfeções fúngicas no desfecho do quadro clínico. A presença de coinfeções tem sido relacionada a quadros mais graves em pacientes com COVID-19 (Zhu et al., 2020; Al-Hatmi et al., 2020).

No total foram obtidos 28 isolados fúngicos a partir dos espécimes clínicos coletados. Utilizando o meio cromogênico foram identificadas 16 amostras de *C. albicans*, 06 de *C. tropicalis* e 04 de *C. glabrata*. Ainda, não foi possível a identificação de 02 amostras. Já na identificação molecular foram identificadas 16 amostras de *C. albicans*, 07 de *C. tropicalis*, 05 de *C. glabrata*. Por ambas as metodologias a espécie mais frequente foi *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Figura 1).

Leveduras identificadas por diferentes metodologias



**Figura 1:** Identificação de leveduras por diferentes métodos. IDcrom: identificação realizada por cultivo em CHROMagar *Candida*®. IDbiomol: identificação realizada por métodos moleculares.

Houve 100% de similaridade na identificação de *C. albicans* por método fenotípico e molecular. Uma das amostras não identificada por método fenotípico foi identificada como *C. albicans* por método molecular, enquanto outra foi identificada como *C. tropicalis*. Para 01 amostra houve discrepância na identificação por cada método.

Os resultados da avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos estão sumarizados na Tabela 1.

A média geométrica de concentração inibitória mínima para amostras de *C. albicans* foi de 0,19 µg/mL para fluconazol, 0,09 µg/mL para itraconazol, 0,14 para voriconazol e 0,68 µg/mL para anfotericina B.

Dentre os isolados de *C. tropicalis*, a média geométrica foi de 0,37 µg/mL para fluconazol, 0,08 µg/mL para itraconazol, 0,28 µg/mL para voriconazol e 1,22 µg/mL para anfotericina B.

Já para os isolados de *C. glabrata*, a média geométrica foi de 8,0 µg/mL para fluconazol, 0,57 µg/mL para itraconazol, 3,03 µg/mL para voriconazol e 0,87 µg/mL para anfotericina B.

Tabela 1- Perfil de sensibilidade a antifúngicos

		CIM (µg/mL)			
		FLC	ITZ	VOR	AMB
<i>C. albicans</i>	MedGeo	0,19	0,09	0,14	0,68
	CIM 50	0,25	0,06	0,125	0,5
	CIM 90	0,25	0,25	0,25	1,0
<i>C. tropicalis</i>	MedGeo	0,37	0,08	0,28	1,22
	CIM 50	0,5	0,125	0,25	1,0
	CIM 90	0,5	0,25	0,5	2,0
<i>C. glabrata</i>	MedGeo	8,00	0,57	3,03	0,87
	CIM 50	4,0	0,5	1,0	1,0
	CIM 90	64	2,0	32	1,0

CIM: Concentração inibitória mínima. MedGeo: média geométrica. FLC: fluconazol. ITZ: itraconazol. VOR: voriconazol. AMB: anfotericina B.

Todos os isolados de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos testados. Porém, em média, as amostras de *C. tropicalis* apresentaram uma sensibilidade intermediária ao voriconazol, enquanto aquelas de *C. glabrata* se mostraram resistentes a este antifúngico (CLSI, 2020). O

monitoramento do perfil de sensibilidade a antifúngicos se faz importante diante da crescente emergência de fungos resistentes e também da ocorrência de resistência cruzada, o que pode impactar no sucesso do tratamento (Whaley et al., 2016; Beardsley et al., 2018).

#### 4. Conclusões

Neste estudo foi realizada identificação e antifungigrama de fungos isolados em amostras de 20 pacientes com COVID-19 internados no Hospital Eduardo de Menezes. A taxa de mortalidade no grupo (55%) foi superior à global dos internados com a doença (17,08%). Futuros estudos são necessários para avaliar se coinfeções fúngicas são responsáveis por aumentar a taxa de letalidade em pacientes com COVID-19.

As condições a que tais pacientes estão submetidos (comprometimento pulmonar e sistêmico, uso de corticóides e uso empírico de antibacterianos de amplo espectro) fornecem condições propícias para o desenvolvimento de coinfeções fúngicas, que contribuem para aumento na dificuldade no diagnóstico clínico e no tratamento. Portanto, ao testar o SARS-CoV-2, é importante rastrear simultaneamente outros patógenos, de forma a promover um prognóstico mais favorável para estes pacientes.

O monitoramento do perfil de sensibilidade a antifúngicos se faz importante diante da crescente emergência de fungos resistentes, bem como da ocorrência de resistência cruzada, o que pode impactar no sucesso do tratamento.

#### 5. Apoio Financeiro

Este projeto está sendo financiado pela Fapemig.

#### 6. Agradecimentos

Nosso agradecimento à FIOCRUZ/Instituto René Rachou, ao Hospital Eduardo de Menezes e aos pacientes e responsáveis que autorizaram a participação neste estudo.

#### 7. Referências

Al-Hatmi, A.M.S.; Mohsin, J.; Al-Huraizi, A.; Khamis, F. COVID-19 associated invasive candidiasis [published online ahead of print, 2020 Aug 7]. **The Journal of infection**. S0163-4453(20)30539-9. Advance online publication. 2020.

Bakaletz, L.O. Developing Animal Models for Polymicrobial Diseases. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. July, p. 552–568, 2004.

Beardsley, J., Halliday, C. L., Chen, S. C., & Sorrell, T. C. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**. V. 13, n. 10, p. 1175–1191. 2018.

CLSI M 27 4<sup>th</sup> ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI standard M27, 2017 (ISBN 1-56238-826-6 [Print]; ISBN 1-56238-827-4 [Electronic]). 2017.

CLSI M60, 2020. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60 (ISBN 978-1-68440-082-9 [Print]; ISBN 978-1-68440-083-6 [Electronic]). 2020.

Ferrer, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 39, n. 8, p.2873-9. 2001.

Pasman, L. The Complication of Coinfection. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, n. 1, p. 127–132, 2012.

Rawson T.M.; Moore L.S.P; Zhu N.; Ranganathan, N; Skolimowska, K.; Gilchrist, M.; Satta, G.; Cooke, G.; Holmes, A. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. **Clinical Infectious Diseases**. 2020 May 2. Online ahead of print. 2020.

Rosa, L.H.; Almeida Vieira, M.D.L.; Santiago, I.F.; Rosa, C.A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.(Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v.1, p.178-189, 2010.

Song, G.; Liang, G.; Liu, W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from

China. **Mycopathologia**. V. 185, n. 4, p. 599-606, 2020.

Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in microbiology**. V. 7, 2173. 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory (GHO) data [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/) [s.d.]. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <https://covid19.who.int>. Data de acesso: 10/10/2020.

Zhu, X.; Ge, Y.; Wu, T.; Zhao, K.; Chen, Y.; Wu, B.; Zhu, F.; Zhu, B.; Cui, L. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. **Virus Research**. Aug; 285:198005. Epub 2020 May 11. 2020.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE LEVEDURAS PATOGENICAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE E/OU HIV EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO MARANHÃO

Silva<sup>1</sup>, T. O.; Fontenelle<sup>1</sup>, P. H. C.; Macedo<sup>1</sup>, A. T.; Furtado<sup>1</sup>, H. L. A.; Costa<sup>1</sup>, E. V. S.; Silva<sup>1</sup>, S. L.; Santos<sup>1</sup>, J. R. A.

<sup>1</sup> Universidade Ceuma, Laboratório de Microbiologia Ambiental

E-mail: thayomara10oliveira@gmail.com

**Resumo:** O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema de saúde pública recorrente, principalmente em países subdesenvolvidos, como o Brasil. Essa infecção causa um desequilíbrio imunológico, possibilitando infecções oportunistas, como tuberculose (TB), devido a relação direta com a quantidade de células CD4+ e a candidíase, doença fúngica. Tendo como objetivo de estudo, avaliar o perfil de virulência e de susceptibilidade antifúngica de fungos isolados de pacientes com TB e/ou HIV no Estado do Maranhão. As amostras biológicas foram coletadas em uma Unidade Hospitalar em São Luís – MA no período de dezembro de 2018 a agosto de 2020 e realizada a identificação de cada espécie fúngica, por meio da técnica automatizada MALDI-TOF. Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi realizado o teste de fosfolipase com a medição do diâmetro do halo. A avaliação da atividade da enzima fosfolipase mostrou que 77,8 % dos isolados apresentaram atividade moderada a muito forte. A análise de susceptibilidade *in vitro* foi realizada pela técnica de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), frente a antifúngicos, como o fluconazol, anfotericina B, itraconazol e voriconazol. Identificando assim, um perfil de virulência de espécimes fúngicas aparentemente, oportunistas, assim com um perfil de susceptibilidade, que auxilia também na terapêutica antifúngica de cada paciente.

**Palavras-chave:** Infecções oportunistas; resistência fúngica; virulência.

### 1. Introdução

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema de saúde pública recorrente, principalmente em países subdesenvolvidos, como o Brasil. Sendo responsável por 35 milhões de

mortes em todo o mundo e quase 2 milhões de infecções ocorreram em 2016. Essa infecção debilita o sistema imunológico do hospedeiro, tornando-o suscetível a infecções oportunistas, sendo as mais comuns, tuberculose (TB), pneumonia, candidíase e infecção por citomegalovírus (CMV) sendo a principal causa de hospitalização (SAHA et al., 2011).

A infecção pelo HIV é o principal fator de risco conhecido para o desenvolvimento da TB, e atualmente, essa coinfeção carrega dificuldades no diagnóstico e terapia, pois a imunidade celular é essencial para o controle da TB. Teixeira et al., (2018) descreve em seu estudo que o avanço dessa síndrome, aumenta as taxas de mortalidade por outras infecções oportunistas, como por exemplo, infecções fúngicas, que aproveitam da queda de imunidade do indivíduo para lhe causar danos, uma vez que ela está diretamente associada à baixa contagem de células CD4 +.

Alguns fatores de virulência como a fosfolipase, hemolisina e formação de biofilmes, podem contribuir para o agravo da infecção, sendo a *C. albicans* a principal espécie do gênero causadora de tais infecções (SILVA, 2017).

Além da candidíase, a criptococose, infecção causada pelo fungo do gênero *Cryptococcus* spp, tornou-se uma doença oportunista importante, que durante a epidemia da AIDS, foi a principal causa de infecções sistêmicas, destacando-se a espécie *C. neoformans* (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). No ambiente, o fungo é encontrado em excretas de pombos e em ocos de árvores, e a inalação dos propágulos fúngicos pode provocar uma infecção pulmonar, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. De acordo com Soares, et al. (2005) a infecção por HIV já esteve associada a mais de 80% de casos de criptococose em todo o mundo, e no Brasil, a doença ainda é um problema de saúde pública em pacientes com AIDS.



Antes da disponibilidade da terapia antirretroviral, a infecção criptocócica foi a maior infecção oportunistas e a maior causa de morte em pacientes infectados pelo HIV.

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de virulência e de susceptibilidade antifúngica de fungos isolados (*Candida* e *Criptococcus*) de pacientes com TB e/ou HIV em Unidade Hospitalar no Estado do Maranhão.

## 2. Metodologias

### 2.1 Aspectos éticos

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução 466/12 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma, sob parecer número 1.570.408.

### 2.2 Coleta das amostras biológicas

As amostras biológicas (soro, escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, sangue total, soro, urina, líquido e biópsia) foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório CEDRO (São Luís-MA) para identificação da espécie fúngica, por meio da técnica automatizada MALDI-TOF e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade CEUMA no período de dezembro de 2018 a agosto de 2020. As amostras foram mantidas em meio Ágar Sabouraud e incubados a 28 e a 37°C. A coleção de culturas será mantida em meio BHI + glicerol (10%) no Laboratório, sob congelamento em -20°C e sob refrigeração.

### 2.3 Determinação da atividade fosfolipídica

Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi preparado um meio de cultura composto por 180 ml de ágar Sabouraud dextrose acrescido de 11,40g de cloreto de sódio; 0,11g de cloreto de cálcio; 4% de glicose e 20ml de gema de ovo. Foi inoculado ao meio 3µl de inóculo fúngico, preparado em salina 0,85%, seguindo a escala de McFarland 0.5 (1 a  $5 \times 10^6$  células/ml). As placas de Petri foram incubadas a 37°C e o diâmetro e área de precipitação das colônias foram medidos 96 horas após a inoculação. Os experimentos foram feitos em duplicata. As medidas e cálculos da zona de

precipitação (Pz) da fosfolipase serão feitos de acordo com a média dos valores obtidos na duplicata. Os coeficientes encontrados serão classificados em 5 grupos: Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; Pz<0.70, muito forte (PRICE et al., 1982).

### 2.4 Avaliação da susceptibilidade antifúngica pela concentração inibitória mínima

A análise de susceptibilidade *in vitro* foi realizada pela técnica de microdiluição usando o protocolo padronizado pelo CLSI (2008) para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. O fluconazol foi dissolvido em água esterilizada, enquanto, o itraconazol, voriconazol e a anfotericina B foram dissolvidos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguindo o protocolo para 1000 µg/ml. Antes dos testes, os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose, por um período de 48 horas, a 28° e a 37°C. Todos os testes foram realizados em duplicata para cada isolado no meio RPMI-1640, com concentrações de 0,125 a 64µg/ml para o fluconazol (FLU) e de 0,03 a 16µg/ml para a anfotericina B (ANFO B), voriconazol (VORI) e itraconazol (ITRA). Para o teste de microdiluição, 100µL de suspensão de inóculo (Escala de McFarland 0,5) foi transferido para placas de 96 poços contendo 100µL de cada antifúngico ou apenas RPMI-1640 (controle de crescimento). As placas foram incubadas a 28°C ou a 37°C, por 48 horas para determinação da CIM, por meio da leitura visual para inibição do crescimento quando comparado ao controle. Os pontos de corte foram: Fluconazol: CIM ≤ 8 µl/ml (S-Sensível), 16-32 µl/ml (SDD- Sensível Dose-Dependente) e ≥ 64 µl/ml (R-Resistente); Itraconazol: CIM < 0,125 (S), 0,25-0,5 (SDD) e > 1 (R); Voriconazol: CIM < 0,125 (S), 0,25-0,5 (SDD) e > 1 (R); Anfotericina B: CIM <1 (S) e >1 (R) (CLSI, 2008).

### 2.5 Análise estatística

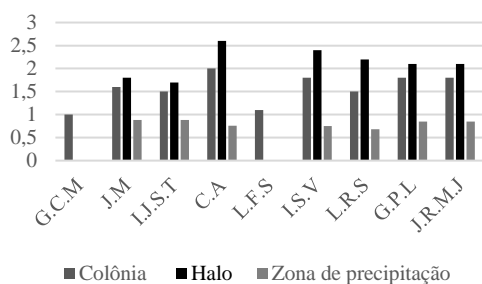
As variáveis numéricas foram analisadas pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA e o teste t de student independente. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, ou seja, será considerado como estatisticamente significativo, um valor de p<0,05.

### 3. Resultados e Discussão

A presença da formação do halo ao redor da colônia demonstra uma positividade na produção da exoenzima. Dos 09 isolados testados, 07 (77,8%) apresentaram formação do halo. Dentre estes, 04 isolados (57,1%) demonstraram produção moderada, 2 (28,5%) apresentaram uma produção forte e apenas 1 (14,2%) teve uma PZ classificada como muito forte. Os outros 2 isolados (22,2%) não foram reconhecidos como produtores de fosfolipase.

O isolado L.R.S (*C. albicans*) foi a cepa que apresentou maior halo, com uma PZ de 0,68, sendo assim, classificado como “muito forte”. Outros como, C.A (*C. albicans*) e I.S.V (*C. albicans*) tiveram uma formação de halo menor, classificados pela PZ apenas como “forte”. J.M (*C. albicans*), I.J.S.T (*C. albicans*), G.P.L (*C. neoformans*) e J.R.M.J (*C. albicans*), foram isolados que apresentaram uma produção moderada de halo. Já nos isolados L.F.S (*C. neoformans*) e G.C.M (*C. albicans*) não foi detectado a formação do halo.

Assim como no presente estudo, Menezes et al (2016) também não observou formação de halo em algumas espécies de *Candida* spp. Ele destaca que, das cepas de *C. albicans*, sete (87,5%) produziram fosfolipase com a atividade entre moderada e forte, com valor de PZ entre 0,63-0,88, semelhante aos resultados apresentados na Figura 1.



GCM (*Candida albicans*); JM (*C. albicans*); IJST (*C. albicans*); CA (*C. albicans*); LFS (*Cryptococcus neoformans*); ISV (*C. albicans*); LRS (*C. albicans*); GPL (*C. neoformans*); JRMJ (*C. albicans*).

**Figura 1:** produção de fosfolipase dos isolados fúngicos.

Fatores de virulência expressados por esses gêneros fúngicos contribuem para uma patogenicidade contra o hospedeiro. Sendo um dos principais fatores de virulência, a expressão de genes de resistência aos antifúngicos, bem como a produção de enzimas extracelulares, tais como fosfolipases, proteinases e hemolisinas. Segundo Marcos-Arias et al. (2011), as fosfolipases são

enzimas capazes de degradar diversos tipos de substratos, como por exemplo, componentes celulares das mucosas. Estas enzimas extracelulares hidrolisam ligações presentes nos fosfolipídios, realizando um papel importante na invasão dos tecidos, caracterizada pela desintegração das membranas epiteliais, o que facilita a ancoragem da hifa para dentro do citoplasma da célula.

O trabalho de Andreola et al. (2016) demonstrou que menos da metade (29%) dos isolados clínicos, que totalizam 35 do gênero *Candida*, apresentaram produção de enzima extracelular. Dentre estes, 09 são de *Candida albicans*, sendo 07 reconhecidos como fortes produtores e apenas 02 como produtores moderados. O único isolado positivo de *C. parapsilosis* foi classificado como um forte produtor e os outros 02 de *C. tropicalis* foram identificados como negativos.

A produção de enzimas extracelulares é considerada como o maior fator de virulência para o desenvolvimento das infecções oportunistas, em especial na candidíase. O *Cryptococcus neoformans* está entre uma das espécies fúngicas oportunistas também considerados como produtoras de enzimas hidrolíticas. No entanto, há poucos estudos que investigam o comportamento da virulência entre estas espécies de leveduras (VIDOTTO V., et al. 1987).

Campos e Baroni (2010) demonstraram em seu estudo que as cepas de *Cryptococcus* analisadas apresentaram produção fosfolipídica, sendo as 02 espécies *C. neoformans* analisadas, classificadas como muito forte através da PZ. No presente estudo, de 02 isolados clínicos, apenas 01 observou-se perfil de produção de fosfolipase, como moderado.

ISOLADOS FLU VORI ITRA ANFO B

ISOLADOS	FLU	VORI	ITRA	ANFO B
G.C.M	0,5	0,12	0,25	0,25
J.M	0,25	0,25	0,25	0,25
I.J.S.T	0,25	0,12	0,12	0,5
C.A	0,5	0,25	0,12	0,12
L.F.S	2	S	0,25	2
I.S.V	2	S	S	2
L.R.S	R	2	2	1
G.P.L	4	1	0,5	0,25
J.R.M.J	R	R	R	S

**Tabela 1:** concentração inibitória mínima (MIC) de cada isolado clínico.

A amostra J.R.M.J (*C. albicans*) apresentou resistência a maioria dos antifúngicos testados contra o fungo, sendo sensível apenas a anfotericina B. Já a amostra L.R.S (*C. albicans*) só apresentou resistência frente ao fluconazol, aos demais

antifúngicos, foi possível identificar uma concentração mínima que inibiu o crescimento fúngico. Ambos os isolados são de mesma espécie, o que corrobora com o estudo de Alangaden (2011), que descreve as infecções fúngicas, principalmente causadas por leveduras do gênero *Candida*, cada vez mais comuns em pacientes imunodeprimidos ou que foram submetidos terapias medicamentosas especiais.

Nenhum dos isolados foram sensíveis a concentração mínima de fluconazol (0,125). Já frente ao fármaco voriconazol, dois isolados apresentaram sensibilidade, L.F.S (*C. neoformans*) e I.S.V (*C. albicans*) e exclusivamente o isolado I.S.V também foi sensível a itraconazol. E como foi descrito, apenas o isolado clínico J.R.M.J foi sensível a anfotericina B.

Observa-se na Tabela 1 que todos os antifúngicos testados apresentaram atividade contra *C. neoformans* (G.P.L e L.F.S). Não foi detectada nenhuma cepa resistente aos antifúngicos testados.

Batista, Birman e Cury (1999), mostram em seu estudo a efetividade do antifúngico anfotericina B contra cepas de *C. albicans*. Todas as cepas foram sensíveis à anfotericina B. O que corrobora com o presente estudo, uma vez que, nenhum isolado apresentou resistência à anfotericina B, com notável efeito fungicida. Apesar de ser um fármaco mais antigo, mesmo assim, ainda é considerado o fármaco referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas.

No presente trabalho, os dois isolados fúngicos de *C. neoformans* não apresentaram resistência aos antifúngicos. Assim como Silva, et al., (2008) demonstram, onde a maioria das amostras também apresentaram susceptibilidade. A maioria dos estudos encontrados na literatura mostra que isolados da espécie apresentam susceptibilidade *in vitro* a diferentes antifúngicos.

#### 4. Conclusões

A avaliação do fator de virulência, dos 09 fungos isolados, possivelmente patogênicos, de *Candida* e *Cryptococcus*, avaliados no presente estudo, confirma um potencial de virulência manifestado nomecanismo utilizados pelo microrganismo, associado a possíveis quadros de imunossupressão, aumenta a possibilidade de penetração e infecção dos diferentes tecidos do hospedeiro.

A avaliação da susceptibilidade mostrou-se eficaz para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profilaxia para melhorar o prognóstico de pacientes imunossuprimidos. Uma vez que, os antifúngicos tenham conseguido inibir a maioria

dos isolados, ainda sim, foi observado resistência de dois isolados, o que demonstra a importância de avaliar diferentes antifúngicos em amostras clínicas de pacientes imunodeprimidos.

#### 5. Apoio Financeiro

. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e pela Universidade CEUMA.

#### 6. Referências

- ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infect Dis Clin N Am**, v. 25, n. 1, p. 201-25, 2011.
- ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B.; ELSEMANN R. B.; GAZZONI, A. F. Estudo comparativo entre a população de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Rev Odontol UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343- 348, 1999.
- CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 2, p. 83-89, 2010.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts -Third Edition. CLSI document M27-A3. **Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. 14, 2008.
- MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; AGUIRRE, J. M.; QUINDÓS, G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. 10-6, 2011.
- NUCCI, M.; TELLES, F. Q.; MATUTE, T. A.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.;

BLANCO, M. G.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; OSORNIO, J. S.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PloS one**, v. 8, n. 3, 2013.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

SAHA, K.; FIRDAUS, R.; SANTRA, P.; PAL, J.; ROY, A.; BHATTACHARYA, M. K.; CHAKRABARTI, S.; SADHUKHAN, P. C. Recent pattern of Co-infection amongst HIV seropositive individuals in tertiary care hospital, Kolkata. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 116, 2011.

SILVA, P. R.; RABELO, R. A. S.; TERRA, A. P. S.; TEIXEIRA, D. N. S. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158-162, 2008.

SILVA, W. P. Efeito da fração acetato de etila do extrato de *Eugenia uniflora* na expressão global de proteínas durante a morfogênese de *Candida albicans*. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2017.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety grubii in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 1, p. 31-36, 2005.

TEIXEIRA, F.; RABONI, S. M.; RIBEIRO, C. E.; FRANÇA, J. C. B.; BROSKA, A. C.; SOUZA, N. L. S. Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis Coinfection in a Tertiary Hospital in Southern Brazil: Clinical Profile and Outcomes. **Microbiology Insights**, v. 11, p. 1178636118813367, 2018.

VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; DI FRAIA, D.; CARDAROPOLI, S.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 136, n. 3, p. 119-23, 1997.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## TAXONOMIA DE FUNGOS ASSOCIADOS À MACROALGAS ANTÁRTICAS

Souto<sup>1</sup>, M. F.; de Paula<sup>2</sup>, M. T. R.; Da Silva<sup>1</sup>, T. H.; Coelho<sup>1</sup>, L. C.; Pellizzari<sup>3</sup>, F. M.; De Carvalho<sup>4</sup>, C. R. E.; Rosa<sup>1</sup>, L. H.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Paraná, Laboratório de Ficologia e Qualidade de Água Marinha

<sup>4</sup> Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz

E-mail: matheus.5011@hotmail.com

**Resumo:** A Antártica é caracterizada por ser uma das regiões mais inóspitas do planeta. Sob a influência da corrente circumpolar antártica (ACC), esse ambiente é marcado por padrões físico-químicos e biológicos únicos. Os diferentes micro-habitats existentes no Oceano Antártico já são conhecidos como potenciais substratos para colonização de micro-organismos. Na Antártica, os fungos podem ser encontrados na forma livre ou associados a diferentes substratos, como madeira, animais invertebrados e macroalgas. O presente estudo objetivou por caracterizar a distribuição e taxonomia de fungos filamentosos associados a três macroalgas antárticas: *Monostroma grevillei*, *Adenocystis utricularis*, e *Prasiola* sp., coletadas nas ilhas Deception, Rei George e Pinguim. Obteve-se um total de 211 fungos filamentosos, dos quais 22 foram identificados até o momento por meio de técnicas morfológicas e moleculares. Entre os táxons obtidos, *Microdochium* sp. é o mais frequente, seguido por *Antarctomyces* sp.. Os resultados obtidos até o momento sugerem que as macroalgas antárticas atuam como um substrato natural para a associação de comunidades de fungos filamentosos, que podem apresentar adaptações ecológicas e evolutivas para a sobrevivência em condições extremas.

**Palavras-chave:** Antártica; Macroalgas; Fungos; Taxonomia; Ambientes extremos.

### 1. Introdução

A Antártica é uma das regiões mais inóspitas do planeta (CONVEY et al., 2014). Seus ecossistemas

são diversos, apresentando desde desertos polares, cobertos de gelo, a lagos de água doce e salgada, entretanto a maior representatividade biótica ocorre na região costeira, principalmente na Península Antártica (CONVEY et al., 2014; CONVEY, 2017).

Além das condições diferenciadas de temperatura, o continente antártico é caracterizado pela baixa disponibilidade de nutrientes, alta radiação ultravioleta, ventos fortes e diferentes níveis de pH (ROSA, 2019).

O Oceano Antártico se distribui ao redor do continente Antártico e sofre a influência da Corrente Circumpolar Antártica (ACC), uma das maiores correntes oceânicas do mundo (MOORE, et al., 2018). Devido as suas particularidades de movimento, tem efeitos significativos nesse ambiente principalmente no que tange a distribuição de espécies, movimentação de correntes oceânicas e manutenção de temperatura (MOORE, et al., 2018).

Os oceanos guardam uma enorme diversidade de micro-organismos (vírus, bactérias, arqueias, microalgas e fungos) os quais estão envolvidos na ciclagem de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo, tornando-os organismos chaves, que atuam como produtores primários e decompositores na cadeia trófica (OGAKI et al., 2019). Apesar dos micro-organismos desempenharem um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas marinhos, eles ainda foram pouco estudados (OGAKI et al., 2019).

Os fungos são micro-organismos versáteis capazes de colonizar diversos substratos oceânicos independentemente do material como madeiras, sedimentos, animais, folhas em decomposição, entre outros. Devido a essa versatilidade, algumas

espécies são capazes de se dispersarem pelo ambiente marinho e se estabelecerem em regiões inóspitas e extremas com diferentes padrões de salinidade e temperatura, como a Antártica (NAMIKOSHI, 2019).

Os diferentes microhabitats existentes no Oceano Antártico já são conhecidos como potenciais substratos para colonização de microorganismos. Por se tratar de um ambiente com padrões físico-químicos hostis, a comunidade microbiana marinha da Antártica apresenta diferentes características fenotípicas, resultado de adaptações fisiológicas e moleculares acumuladas ao longo da evolução (PEARCE, 2017).

Em trabalhos mais recentes, novas espécies foram descritas sendo recuperadas de substratos ainda pouco explorados, com destaque para aquelas endêmicas. Um exemplo é a espécie *Antarctomyces pellizariae* isolado da neve sazonal da Península Antártica (DE MENEZES et al., 2017).

Em decorrência das condições extremas e seletivas da Antártica as comunidades de macroalgas marinhas desse ambiente apresentam um alto grau de endemismo (33%), fato que as torna uma comunidade ímpar quando comparadas com a flora ficológica de regiões tropicais e temperadas (PELLIZZARI et al., 2017).

As macroalgas são a segunda maior fonte de fungos isolados do ambiente marinho, os quais pertencem em sua grande maioria ao filo *Ascomycota* (LOQUE et al., 2010). Em seus componentes estruturais os fungos encontram um abrigo seguro que os protegem de fatores estressantes como o dessecação, radiação UV e baixa disponibilidade de nutrientes (FURBINO, 2012).

O presente estudo objetivou por identificar fungos associados a três macroalgas antárticas: *Monostroma grevillei*, *Adenocystis utricularis*, e *Prasiola* sp., coletadas nas ilhas Deception, Rei George e Pinguim.

## 2. Metodologias

### 2.1 Áreas de Coleta

As amostras de macroalgas provenientes da Antártica foram coletadas durante a Operação Antártica XXXVI do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) no período de novembro a dezembro de 2017. Cinco exemplares foram coletados, sendo eles: *Monostroma grevillei* (Thuret) Wittrock (*Chlorophyta*), *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg (*Phaeophyceae*) e três de *Prasiola* sp. (C.Agardh) Meneghini

(*Chlorophyta*). *Prasiola* sp. foi coletado em três locais distintos: Ilha Deception, Ilha Pinguim e Ilha Rei George. *Monostroma grevillei* foi coletada Ilha Deception e *Adenocystis utricularis* coletada na Ilha Rei George.

### 2.2 Isolamento e preservação dos fungos

Durante o processamento das macroalgas para o isolamento dos fungos os talos foram lavados três vezes com água do mar esterilizada. Após a lavagem, os talos foram fragmentados com auxílio do bisturi, seguido pela inoculação de cinco fragmentos em Ágar Marinho (AM) 2% (p/v) de glicose, para algas aquáticas, e Ágar Batata Dextrose (BDA), para algas terrestres. Todos os meios foram suplementados com 2000 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Sigma, EUA) para a inibição do crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 15 °C por até 60 dias. Após o período de incubação e crescimento dos fungos estes foram purificados em novas placas de Petri contendo AM suplementado, com 2% de glicose e BDA, respeitando o habitat de cada macroalga.

### 2.3 Identificação dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos obtidos, foram caracterizados e agrupados de acordo com suas características macromorfológicas, como: cor da colônia, cor da borda, textura, produção de exsudatos e produção de pigmentos. Após o agrupamento, foi utilizada a técnica de PCR microssatélite (MSP-PCR), fazendo uso do oligonucleotídeo sintético GTG<sub>5</sub> para a análise de perfis moleculares e confirmação do agrupamento macromorfológico. Os fungos que apresentaram padrões de bandas similares foram considerados como pertencentes ao mesmo grupo. Sendo assim, utilizando a Região Transcrita Interna ITS1-5.8S do RNA ribossomal para sequenciamento, um isolado fúngico de cada grupo molecular foi escolhido para ter essa região sequenciada.

### 2.4 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências de espécies tipo ou espécies referência de fungos depositadas no GenBank. Todo esse processo foi realizado fazendo uso do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – versão Magic-BLAST (1.5.0)) - disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),

desenvolvido pelo National Center For Biotechnology.

### 3 Resultados e Discussão

Dos 211 isolados fúngicos obtidos a partir das algas coletadas nas ilhas mencionadas, a Ilha Rei George apresentou a maior quantidade de isolados, 93 (44,07%); seguido da Ilha Pinguim, com 86 (40,75%) e por último a Ilha Deception, com 32 (15,16%). Furbino (2012) ao explorar a diversidade de fungos das macroalgas antárticas *Monostroma hariotti* e *Porphyra endiviifolia*, obteve-se um total de 278 isolados, sendo 149 fungos filamentosos. Os autores obtiveram 147 isolados da ilha Rei George, enquanto um menor número para a ilha Deception, 31.

Os 22 fungos filamentosos identificados até o momento, a partir dos três exemplares de *Prasiola* sp., se distribuem em quatro gêneros (Tabela 1), sendo eles *Antarctomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Microdochium*, pertencentes ao filo *Ascomycota* e *Mortierella*, pertencente ao filo *Zygomycota*.

Endêmico da Antártica, o gênero *Antarctomyces* foi isolado pela primeira vez em 2001, sendo a espécie *Antarctomyces psychrotrophicus*, coletada de amostras de solo (STCHIGEL et al., 2001). Até o momento, somente uma segunda espécie foi descrita para o gênero, coletada de neve na Ilha Robert, sendo denominada *Antarctomyces pellizariae* (de MENEZES et al., 2017). As espécies desse gênero já foram isoladas de diversos outros substratos antárticos, incluindo de macroalgas (LOQUE et al., 2010; FURBINO et al., 2014), solo (GOMES et al., 2018), entre outros.

As espécies desse gênero foram investigadas quanto a capacidades de produzir substâncias de interesse na indústria (ROSA, 2019). Para *A. pellizariae*, seu pigmento azul, característico pela coloração da colônia, pode ser explorado para o uso na indústria de alimentos (de MENEZES et al., 2017).

*Pseudogymnoascus*, por sua vez, ocorre frequentemente no ambiente antártico e apresenta uma ampla distribuição em regiões polares (ROSA, 2019).

Representantes desse gênero já foram descritos em diversos trabalhos, sendo isolados de solo (GOMES et al., 2018), entre outros. Espécies desse gênero utilizam diferentes fontes de carbono, o que pode explicar a sua ampla colonização em diferentes substratos (ARENZ & BLANCHETTE, 2011).

A espécie *Pseudogymnoascus destructans* é patogênica e se distribui em abundância na Antártica (ROSA, 2019). O estudo com a virulência dessa espécie do continente antártico ainda é incipiente (GOMES et al., 2018).

Rosa (2019), destacam o considerável número de estudos que são publicados com a identificação somente a nível de gênero para *Pseudogymnoascus*, que podem apresentar uma considerável fonte para descrição de espécies novas. Mais estudos são necessários a fim de elucidar os papéis ecológicos das espécies de micro-organismos encontrados na Antártica, que além de trazer conhecimento para a taxonomia, gera uma maior caracterização da micologia antártica.

Um estudo realizado por Restrepo e colaboradores (2016), fez uma reclassificação da espécie *Monographella lycopodina* para o gênero *Microdochium*, sendo então conhecida como *Microdochium lycopodinum*.

Na antártica, exemplares de *M. lycopodinum* já foram isolados de neve (SNIDER et al., 2000) e angiospermas (SANTIAGO et al., 2012).

Santiago e colaboradores (2012) demonstraram o potencial citotóxico de *M. phragmitis* contra células cancerígenas humanas do tipo UACC-62. Por fim, destacaram também a possibilidade de outras espécies apresentarem atividades leishmanicidas.

Por fim, o gênero *Mortierella* é frequentemente encontrado na Antártica em diferentes tipos de substratos (ROSA, 2019), sendo isolados de solo (GOMES et al., 2018), macroalgas (FURBINO et al., 2014), entre outros.

Considerada endêmica da Antártica, a espécie *M. antarctica* já foi isolada de amostras do solo (ROSA, 2019). Além disso, essa espécie tem a capacidade de produção de ácidos linoleico e araquidônico, essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento em baixas temperaturas (ROSA, 2019).

Algumas espécies desse gênero apresentam um potencial para a produção de ácidos graxos essenciais, como por exemplo o ômega 3 e 6. Tal potencial pode ser explorado para benefício humano, uma vez que essas substâncias não são sintetizadas pelo corpo humano e são benéficos para a saúde (DYAL & NARINE, 2005).



Tabela 1. Identificação molecular dos fungos isolados a partir de *Prasiola* sp. coletadas em diferentes ilhas Antárticas.

Local de coleta	Código UFMG CB <sup>a</sup>	Sequência tipo de referência do BLAST (Número de acesso GenBank) <sup>b</sup>	Cobertura / Identidade (%)	Espécie ou grupo taxonômico sugerido
Ilha Deception	16383	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR1642921)	100/100	<i>Antarctomyces</i> sp.
	16385	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR1118381)	99/97	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
Ilha Pinguin	14582	<i>Microdochium hycopodium</i> (NR1452231)	100/100	<i>Microdochium</i> sp.
	16401	<i>Mortierella parvispora</i> (NR0771851)	97/100	<i>Mortierella</i> sp.1
	10403	<i>Mortierella gamsii</i> (MH8592221)	99/100	<i>Mortierella</i> sp.2
Ilha Rei George	16478	<i>Microdochium hycopodium</i> (NR1452231)	100/100	<i>Microdochium</i> sp.

UFMGCBa = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade. b Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS5.8S da região do gene do rRNA.

#### 4 Conclusões

Estudos que procuram conhecer a interação de fungos marinhos com macroalgas ainda são incipientes. Nossos resultados preliminares sugerem que macroalgas sub-antárticas podem ser um rico substrato para comunidades fúngicas. Encontramos táxons endêmicos e com distribuição ampla de ambientes frios. A caracterização da micologia desse ambiente extremo baseada na identificação taxonômica desses fungos, torna-se essencial para o conhecimento da diversidade de espécies da região, além do entendimento da associação com macroalgas antárticas.

#### 5 Apoio Financeiro

UFMG, MYCOANTAR, PROANTAR, CAPES, CNPq, FAPEMIG, FNDCT, INCT da Criosfera.

#### 6 Referências

ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 308-315, 2011.

CONVEY, P. Antarctic Ecosystems. In: **Reference Module in Life Sciences**. Elsevier, 2017. p. 179-188.

CONVEY, Peter et al. The spatial structure of Antarctic biodiversity. **Ecological monographs**, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014.

DE MENEZES, Graciéle CA et al. *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles**, v. 21, n. 2, p. 259-269, 2017.

DYAL, Sandra D.; NARINE, Suresh S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, n. 4, p. 445-467, 2005.

FURBINO, Laura E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.

FURBINO, Laura Esteves. Diversidade e bioprospecção de fungos associados às macroalgas antárticas *Monostroma hariotti* Gain e *Porphyra endiviifolia* (A. Gepp & ES Gepp) YM Chamberlain. 2012.

GOMES, Eldon CQ et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 381-393, 2018.

HERNÁNDEZ-RESTREPO, Margarita; GROENEWALD, Johannes Z.; CROUS, Pedro W. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 36, p. 57, 2016.

LOQUE, Carolina P. et al. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641-648, 2010.

MOORE, Jenna M. et al. The Antarctic Circumpolar Current isolates and connects: Structured circumpolarity in the sea star *Glabraster antarctica*. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 21, p. 10621-10633, 2018.

NAMIKOSHI, Michio; XU, Jin-Zhong. Filamentous Fungi in the Marine Environment:

Chemical Ecology. In: **Fungi from Different Environments**. CRC Press, 2019. p. 91-128.

OGAKI, Mayara B. et al. Marine Fungi Associated with Antarctic Macroalgae. In: **The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment**. Springer, Cham, 2019. p. 239-255.

PEARCE, David A. Extremophiles in Antarctica: life at low temperatures. In: **Adaption of microbial life to environmental extremes**. Springer, Cham, 2017. p. 99-131.

PELLIZZARI, F. et al. Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios. **Polar biology**, v. 40, n. 8, p. 1671-1685, 2017.

SANTIAGO, Iara F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, n. 1, p. 95-103, 2012.

SNIDER, Christopher S. et al. Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. **Phytopathology**, v. 90, n. 4, p. 354-361, 2000.

STCHIGEL, Alberto M. et al. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, v. 105, n. 3, p. 377-382, 2001.

ROSA, Luiz Henrique (Ed.). **Fungi of antarctica: Diversity, ecology and biotechnological applications**. Springer, 2019.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO INTESTINO DE BESOUROS EM ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA

Souza<sup>1</sup>, G. F. L.; Barros<sup>1,2</sup>, K. O.; Santos<sup>1</sup>, A. R. O; Fonseca<sup>3</sup>, C. R. V.; Abegg<sup>4</sup>, M. A e Rosa<sup>1</sup>, C. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos.

<sup>2</sup> Laboratory of Genetics, University of Wisconsin-Madison, WI 53706, USA.

<sup>3</sup> Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

<sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

E-mail: giseleflsouza@gmail.com

**Resumo:** Espécies de leveduras têm sido descobertas a partir de amostragens de materiais encontrados em diferentes ecossistemas. O estudo da associação de leveduras com besouros tem revelado a presença de espécies desconhecidas desses microrganismos. Os insetos entram em contato com as leveduras que estão amplamente distribuídas em seu *habitat*. Os besouros vivem e se alimentam de madeira em decomposição, e seus intestinos são ricamente colonizados por leveduras. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras provenientes do intestino de besouros da família Passalidae coletadas a partir da floresta amazônica brasileira no município de Itacoatiara/AM. Para tanto, foram coletados 35 espécimes de besouros pertencentes a família Passalidae em 3 (três) pontos na floresta Amazônica. A partir do conteúdo intestinal destes insetos, foram obtidos 413 isolados sugestivos de leveduras. A identificação molecular de 150 isolados de levedura mostrou a ocorrência 13 espécies. Estas informações mostram a importância de estudar leveduras de fontes das mais diversas, reafirmando que o intestino de besouros são um *hotspot* de novas espécies.

**Palavras-chave:** Besouros; Passalidae; Amazônia Brasileira; Diversidade; Leveduras.

### 1. Introdução

Os besouros estão presente em praticamente todos os ambientes terrestres habitáveis (BIEDERMANN; NUOTCLÀ, 2020). A extensão dos benefícios acumulados pelos microrganismos por meio de associações com insetos ainda é pouco

compreendida pela comunidade científica. Sabe-se que as leveduras desempenham um papel fundamental na vida dos insetos, auxiliando na localização de alimentos, contribuindo para a digestão ou servindo ainda como fonte essencial de nutrientes (STEFANINI, 2018). As leveduras já foram relatadas a partir de uma variedade de insetos, incluindo besouros (SUH et al. 2003).

Besouros das famílias Passalidae, Cerambycidae, Buprestidae e Tenebrionidae (a espécie *Phrenapates bennetti*) são conhecidos por colonizarem o interior de troncos de árvores em decomposição, devido à disponibilidade de nutrientes para seu desenvolvimento (ABREU et al., 2017; BLACKWELL, 2017). Portanto, para as leveduras, pode ser vantajoso utilizar o intestino de insetos como *habitat*, já que isso permite que as espécies sobrevivam e se reproduzam, criando uma associação mais duradoura com o hospedeiro (RAVELLA et al., 2011; STEFANINI, 2018).

Associações entre leveduras e intestino de besouros possuem um campo enorme a ser pesquisado. No contexto amazônico, em áreas de florestas primárias e secundárias, existem muitas oportunidades de conduzir novos estudos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras provenientes do intestino de besouros da família Passalidae coletadas a partir da floresta amazônica brasileira no município de Itacoatiara/AM.

## 2. Metodologias

### 2.1 Áreas de coleta

A coleta dos besouros da família Passalidae foi realizada em três pontos na floresta amazônica: no *Campus II* da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464'), no ramal da comunidade Sol Nascente – Piquiá (S03°01.045' W058°28.830') e nos arredores do aeroporto (S03°07'37.3" W58°28'24.6") no município de Itacoatiara – AM.

### 2.2. Isolamento de leveduras do trato intestinal de besouros

Os besouros foram mantidos em placas de Petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, antes da dissecação. Em seguida, os insetos foram congelados até sua morte e sofreram desinfecção superficial por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária 2,5% (5 min) e água estéril (10 min) antes da remoção do intestino. A água estéril (100 µL) foi semeada em ágar YM acidificado (g/L: peptona 5g, extrato de levedura 3g, extrato de malte 3g, dextrose 10g e ágar 15g, água destilada 1000mL, cloranfenicol 0,1g; pH ajustado a 3,5 com ácido clorídrico), como controle negativo (SUH; BLACKWELL, 2004). O intestino foi removido assepticamente, e cortado em três partes e esmagados, microtubos de 2ml estéreis, contendo 1000 µL de solução salina 0,9% e realizado a diluição de  $10^{-1}$ . Foram semeados 100 µL deste macerado puro e da solução  $10^{-1}$  em ágar YM acidificado e YNB-xilose (D-xilose 1%; yeast nitrogen base 0,67%; cloranfenicol 0,02%, água destilada 1000mL), este procedimento foi realizado em duplicata [modificado a partir de Ravella et al. (2011)]. As culturas foram incubadas a 30°C por 5 dias, e colônias individuais foram purificadas por ao menos 2 repiques sucessivos em ágar YM. As leveduras isoladas durante o estudo foram depositadas na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 2.3 Identificação das leveduras

As leveduras obtidas foram preliminarmente agrupadas de acordo com suas características morfológicas e testes fisiológicos e bioquímicos, segundo procedimento padrão (KURTZMAN et al., 2011). As leveduras com perfis fisiológicos idênticos foram submetidas à análise molecular, por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase),

utilizando-se o iniciador GTG5 para a realização do agrupamento em perfis moleculares distintos. Das leveduras que apresentaram perfis fisiológicos e moleculares distintos, uma amostra foi selecionada para o sequenciamento.

### 2.4 Sequenciamento

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando o Kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. As sequências foram analisadas, utilizando BLASTn (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), sendo comparadas com aquelas depositadas no GenBank.

## 3 Resultados e Discussão

No presente trabalho foram coletados um total de 35 espécimes de besouros nos 3 (três) pontos na floresta Amazônica (Figura 1). Esses espécimes foram identificados no laboratório de Entomologia (INPA) como sendo pertencentes a família Passalidae. A partir do conteúdo intestinal destes insetos, foram obtidos, 207 isolados em meio YNB-xilose e 206 em YM-acidificado, totalizando 413 isolados sugestivos de leveduras.

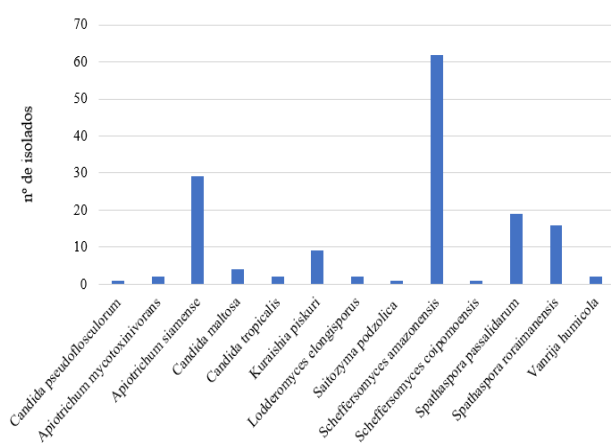


**Figura 1** - Besouros (Passalidae) em madeira em decomposição.

Leveduras isoladas do intestino de insetos têm levado à descoberta de muitas novas espécies (RIVERA et al, 2009; SUH et al, 2003, 2006; SUH; BLACKWELL, 2005, 2006; URBINA et al, 2013). Neste trabalho, foram identificados até o momento 150 isolados de levedura distribuídas em 13 espécies, provenientes do intestino de besouros (Figura 2). Até o momento, as linhagens mais abundantes encontradas foram *Apiotrichum*, *Scheffersomyces* e *Spathaspora*. Podendo observar um número elevado de isolados da espécie *Scheffersomyces amazonensis*.

Corroborando com nossos resultados, Urbina et al (2013) amostraram leveduras no intestino de besouros passalides na Guatemala obtendo 771 leveduras de 16 espécies, incluindo espécies não descritas dos clados *Phanomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella* e *Sugiyamaella*.

Em um levantamento da diversidade de leveduras realizado entre 2009-2011 na Bulgária em duas localidades, cinco linhagens de uma nova espécie de levedura ascomiceta (novo gênero *Nematodospora*) foram isoladas a partir do intestino do besouro *Valgus hemipterus* (Cetoniinae) (GOULIAMOVA et al, 2015). Portanto, o número reduzido de espécies de leveduras até o momento descritas e estudadas, motivam a busca por novas espécies e sua caracterização.



**Figura 2** – Identificação dos isolados do intestino de besouro

#### 4 Conclusões

A riqueza de espécies no bioma Amazônico permanece ainda relativamente pouco explorada em relação à diversidade. Assim a associação entre leveduras e besouros auxilia a expandir o conhecimento da diversidade de leveduras isoladas do intestino de besouros Passalidae.

#### 5 Apoio Financeiro

CNPq.

#### 6 Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca (INPA) por suas orientações sobre coleta de besouros, identificação e preservação de espécimes

#### 7 Referências

ABREU, R. L. S. D. et al. Passalid (Insecta: Coleoptera: Passalidae) collected from trunks of *Scleronema micranthum* (Malvaceae). **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p. 71-74, 2017.

BIEDERMANN, P. H. W; NUOTCLÀ, J. A. Sociais Beetles. Em: Starr C (eds) Encyclopedia of Social Insects. Springer, Cham. 2020  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4\\_108-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4_108-1).

BLACKWELL, M. Made for each other: ascomycete yeasts and insects. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.

GOULIAMOVA, D.E. et al. DNA barcoding revealed *Nematodospora valgi* gen. nov., sp. nov. and *Candida cetoniae* sp. nov. in the *Lodderomyces* clade. **Fungal Biology**, vol. 120, n. 2, p. 179-190, 2015.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: A taxonomic**. 5<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier. p. 87-110, 2011.

RAVELLA, R. S. et al. *Candida northwykensis* sp. nov., a novel yeast isolated from the gut of the click beetle *Melanotus villosus*. **Current Microbiology**, vol. 63, n. 2, p. 115–120, 2011.

RIVERA, F. N. et al. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 98, n. 2, p. 325–342, 2009.

STEFANINI, I. Yeast-insect associations: It takes guts. **Yeast**, n. 35, p. 315-330, 2018.

SUH, S.O.; BLACKWEL, M. Four new yeasts in the *Candida mesenterica* clade associated with basidiocarp-feeding beetles. **Mycologia**, vol. 97, n.1 , p. 167-177, 2005.

SUH, S.O.; BLACKWEL, M. Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. **Mycological Research**, vol. 110, n. 1, p. 220-228, 2006.

SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; MCHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, vol. 12, n. 11, p. 3137–3145, 2003.

URBINA, H.; SCHUSTER, J.; BLACKWELL, M. The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. **Fungal Ecology**, vol. 6, n. 5, p. 339–355, 2013.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## FUNGOS DE SOLO RIZOSFÉRICO EM *Citrus sinensis* (L.) Osbeck PARA BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Speltri<sup>1</sup>, N. F. B; Andrade<sup>1</sup>, C. J., Alves<sup>1</sup>, F. C. e Attili-Angelis<sup>1,2</sup>, D.

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *campus* Rio Claro, Centro de Estudos Ambientais/Laboratório de Microbiologia Ambiental – Táxon.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

E-mail: natalia.speltri@unesp.br

**Resumo:** O objetivo desse trabalho foi triar isolados de fungos de solo rizosférico de *Citrus sinensis* para avaliar seu potencial de biocontrole frente a fitopatógenos que acometem os cultivares. Um total de 54 fungos filamentosos foram reativados, purificados e preservados pelo método *Castellani*, sendo 24 selecionados para os testes de antagonismo. Foi observado que o gênero *Trichoderma* destaca-se no teste inibindo/diminuindo o crescimento dos fitopatógenos. O gênero *Chaetomium* representou um microrganismo promissor para ser explorado, uma vez que retardou o crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides*

**Palavras-chave** Citros; Biocontrole; Fungos de solo Rizosférico; Bioeconomia.

### 1. Introdução

A laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), é um fruto da família Rutaceae, originalmente da China. Por ser uma fonte comprovada de fibras e vitaminas, tornou-se amplamente consumida no âmbito mundial. Segundo Couto e Canniatti-Brazaca (2010), contém antioxidantes como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides e limonoides importantes para a saúde humana (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007).

Segundo a Pesquisa de Estimativa de Safra (PES), o Brasil produziu mais de 15,4 bi de kg de laranja na safra 2019/20 (FUNDECITRUS, 2020) e no mesmo período exportou mais de 1 mi de toneladas de suco de laranja (CITRUSBR, 2020), sugerindo o fruto como importante para a bioeconomia do país.

Contraopondo esse atraente cenário econômico, os pomares de laranja ainda são alvos de diversas doenças causadas por fitopatógenos. Dentre esses agentes, os fungos são os mais agressivos, capazes de exterminar um pomar em pouco tempo, devido aos seus ciclos de vida e reproduções altamente especializadas.

Microrganismos associados às plantas estão sendo amplamente estudados para o controle biológico, promoção de crescimento, fixação de nutrientes e desenvolvimento vegetal (DRESCH; LANA; MACIEL, 2019). Neste contexto, o biocontrole representa uma alternativa viável para o tratamento de pragas, pois visa um menor impacto ambiental aliado à otimização e eficiência do combate ao fitopatógeno, alavancando a produtividade (FONTES; INGLIS, 2020).

O microbioma rizosférico é fundamental para as plantas, proporcionando defesa contra pragas e doenças, facilitando a aquisição de nutrientes e ajudando as plantas a suportarem desequilíbrios abióticos (PÉREZ-JARAMILLO *et al.*, 2016)

Levando em conta os fitopatógenos relatados em *Citrus sinensis*, este trabalho investigou táxons potenciais antagonistas, os quais são considerados fungos polífagos. O objetivo foi avaliar o potencial de biocontrole de fungos rizosféricos da laranja, além de triar a coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia ambiental (<https://www2.unesp.br/portal#!/cea/laboratorios/laboratorio-de-microbiologia-ambiental---lma/>) do Centro de Estudos Ambientais – CEA, UNESP de Rio Claro. Após purificados, preservados e autenticados, os fungos depositados em acervos representam confiáveis recursos para pesquisa e desenvolvimento tecnológico.



## 2. Metodologias

### 2.1 Triagem dos fungos

Os fungos filamentosos triados foram isolados da rizosfera de *Citrus sinensis* na área experimental de Citros na Fazenda Santo Antônio do Lageado em Mogi Guaçu, interior de São Paulo e preservados pelo método Castellani (ELLIS, 1979) por Scotton e colaboradores (2018). Tais isolados encontram-se depositados no acervo de fungos do LMA.

Neste trabalho, foram triados 54 isolados de diferentes morfotipos. Primeiramente, os fungos foram reativados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), purificados pelo método de repique contínuo e cultura monospórica, quando necessário e após a triagem, os fungos foram preservados pelo método *Castellani* novamente, garantindo a viabilidade através de uma preservação mais recente.

### 2.2 Microcultivo

A técnica de microcultivo, descrita por Koneman e colaboradores (2001) e adaptada, tem por objetivo observar as estruturas reprodutivas dos isolados para identificação morfológica. Numa placa de Petri com BDA foram cortados 4 cubos, de aproximadamente 5 a 8mm com uma lâmina de aço estéril e depositados na mesma placa. Com o auxílio da agulha estéril, o fungo de interesse foi inoculado nas extremidades e centro do cubo de ágar. Em seguida, foi colocada cuidadosamente uma lamínula estéril sob o fungo inoculado, permitindo que o fungo se desenvolva sob a lamínula. As placas foram incubadas à 28°C e em até 7 dias as lamínulas contendo fungos sob a superfície foram depositadas sob uma lâmina estéril com uma gota de corante (azul de metileno). Após a secagem da lâmina, as lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e levadas para observação no microscópio de luz. Quando presentes, as estruturas reprodutivas foram observadas e fotografadas.

### 2.3 Teste de antagonismo

Foi realizado para verificar a interação entre os fungos rizosféricos e fitopatógenos. Através dos mecanismos de ação os tipos de interações entre os microrganismos foram propostos, baseados em Badalyan *et al.*, (2002), separados em três tipos de atuação do antagonista em relação ao fitopatógeno: (a) pelo crescimento do micélio de uma linhagem sob o da outra, (b) inibição por contato, onde o micélio de um fungo termina na linha de crescimento do micélio do outro e (c) inibição a

distância, quando uma espécie não cresce na presença da outra. Para tal procedimento, foram utilizados 3 fungos rizosféricos e 1 fitopatógeno.

Para confecção do teste, o meio de cultura de uma placa de Petri foi cortado em formato de cruz, sendo posteriormente inoculados da seguinte maneira: 1 cubo de ágar contendo cada um dos fungos rizosféricos antagonistas de interesse, ao centro de cada uma das tiras da cruz, e o fitopatógeno foi inoculado próximo ao centro em uma das tiras. Assim, cada tira continha 1 microrganismo de forma que todos os rizosféricos apresentaram a mesma distância do fitopatógeno. Os fitopatógenos analisados são descritos abaixo:

LMA 1800: *Fusarium Solani*

LMA 1802: *Colletotrichum boniense*

LMA 1803: *C. gloesporioides*

LMA 1805: *F. oxysporum*

## 3 Resultados e Discussão

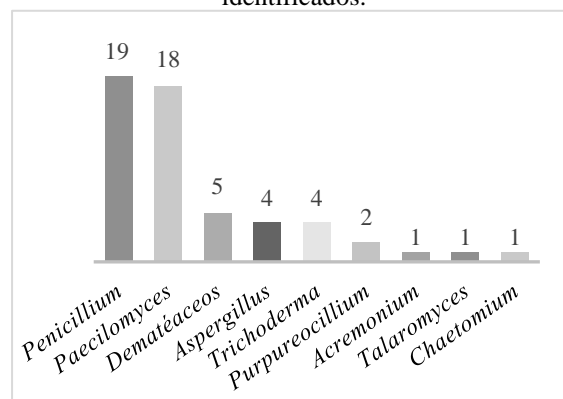
### 3.1 Microcultivo

Foram identificados 54 táxons divididos em 8 gêneros e 1 grupo.

Os gêneros encontrados foram *Aspergillus*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Chaetomium* e Dematiáceos.

Os gêneros *Penicillium* e *Paecilomyces* foram os mais abundantes, com 19 e 18 linhagens respectivamente (Figura 1).

**Figura 1** - Gêneros e frequência de fungos identificados.



Fonte: Elaborado pelas autoras

O amplo reconhecimento do grupo *Penicillium* teve início em 1928 com Alexander Fleming, quando este descobriu o primeiro antibiótico a partir do gênero. Desde então, alavancaram-se pesquisas relacionadas com esse gênero. A importância do referido fungo filamentoso na agricultura também é notável. *Penicillium* é capaz de sintetizar elevada

quantidade de metabólitos secundários e exsudatos com importância biotecnológica. Algumas espécies produzem 73% mais subprodutos quando comparados com outros gêneros (SILVA *et al.*, 2010). Uma espécie vegetal que realiza associações mutualísticas com este gênero, pode indicar boa vitalidade, uma vez que o *Penicillium* promove o crescimento, protege o hospedeiro contra fitopatógenos, além de seu potencial como antibiótico (TOGHUEO; BOYOM, 2020).

Silva *et al.*, (2010), comprovaram em seu estudo a ação antimicrobiana desse gênero contra as bactérias *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, corroborando com a nossa hipótese do *Penicillium* ser um dos protagonistas para solos saudáveis estabelecendo associações importantes entre planta, solo e outros microrganismos.

O gênero *Paecilomyces*, destaca-se na literatura por seu potencial nematófago, sendo antagonista natural de helmintos. O *Purpureocillium lilacinum* (antigo *Paecilomyces lilacinus*), por exemplo, parasita a parte interna do ovo provocando o rompimento do ciclo do helminto (MOUSUMI *et al.*, 2020)

O gênero *Chaetomium*, também está associado ao controle biológico, principalmente de sementes, pois produz o antibiótico “chetomin” conhecido por seu potencial contra bactérias gram-positivas. Além disso, o gênero estimula o crescimento do vegetal e melhora a camada de húmus do solo, através da produção de ergosterol (MAGALHÃES, 2013).

O gênero *Trichoderma*, representa um dos mais usados em produtos biológicos para biocontrole. Empregado desde 1950 no Brasil por Foster, que descreveu a inativação do vírus mosaico do fumo através de linhagens desse gênero. Bettiol *et al.*, (2019), relatam em sua obra informações sobre 246 produtos biocontroladores a base de *Trichoderma*, bem como recomendações de uso, porém ressaltam que no mercado mundial há muito mais bioprodutos que as indústrias não tiveram acesso.

Marfetán e colaboradores (2020), reiteram através de testes *in vitro*, o potencial antagonista do *Trichoderma* contra o crescimento micelial do fitopatógeno *Phytophthora cactorum*, *P. quercina*, *P. capsici*, *P. infestans*, *P. plurivora* e foi avaliado como um promissor agente pois os resultados obtidos foram positivos.

### 3.2 Teste de Antagonismo

Das 54 linhagens reativadas, foram selecionadas 24 para os testes antagonistas, sendo selecionadas através da observação de produção de exsudatos,

pigmentos, menor tempo de crescimento *in vitro* e já relatados na literatura como agentes antagonistas.

Os gêneros selecionados foram *Talaromyces* (1), *Purpureocillium* (4), *Penicillium* (7), *Paecilomyces* (4), *Acremonium* (1), *Trichoderma* (2), *Aspergillus* (4) e *Chaetomium* (1).

Os fitopatógenos e isolados antagonistas foram selecionados para confrontar-se, de acordo com o tempo de crescimento da colônia e tempo de esporulação, respeitando o desenvolvimento de cada microrganismo para que pudessem confrontar-se sob mesmas condições e diminuir as interferências dos resultados, seguindo Badalyan *et al.*, (2002).

O delineamento conteve 4 placas, sendo 3 fungos rizosféricos antagonistas e 1 fitopatógeno em cada. O tempo de realização do teste foi de 7 dias. Os resultados estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1-** Resultados dos testes de antagonismos por placa.

Placa	Fitopatógeno	Resultado
1	1805	O micélio do <i>Trichoderma</i> cresceu sob todos as linhagens presentes.
2	1802	O fitopatógeno inibiu parcialmente o crescimento dos rizosféricos.
3	1800	Fitopatógeno inibiu o crescimento de todos os fungos.
4	1803	O <i>Chaetomium</i> apresentou inibição por contato contra o fitopatógeno.

Fonte: elaborado pelas autoras

Baseado no teste de antagonismo, pudemos observar que o antagonista mais eficiente pertence ao gênero *Trichoderma*. Embora seja relatado na literatura outros gêneros com tal capacidade, os resultados obtidos são preliminares e necessitam de maiores investigações. Deve-se considerar uma maior investigação para o gênero *Chaetomium* (LMA 1982), que apresentou uma inibição por contato no teste *in vitro*, conta com um baixo tempo de crescimento, produção de exsudato (72 h) e pigmentação quando comparado aos outros rizosféricos.

## 4 Conclusões

Os fungos rizosféricos de *Citrus sinensis* analisados ao longo deste trabalho estão disponíveis

no acervo de fungos do LMA, representando recursos genéticos puros e confiáveis para eventuais pesquisas/empresas interessadas.

Os testes confirmaram que o gênero *Trichoderma*, dentre os demais gêneros testados, é considerado promissor no antagonismo, corroborando com o que relata a literatura. Além disso, esse trabalho mostrou a importante atuação de fungos de solos rizosféricos que atuam frente aos fitopatógenos nas culturas.

São necessários estudos com maior profundidade acerca da capacidade de antagonismo deste e dos demais isolados de solos rizosféricos, afim de contribuir para a construção de um conhecimento robusto sobre os fungos como agentes de biocontrole.

## 5 Apoio Financeiro



## 6 Agradecimentos

À pesquisadora Juliana Cristina Scotton, pelo trabalho de isolamento dos fungos.

Ao Centro de Estudos Ambientais pelo apoio e suporte no período desta pesquisa.

## 7 Referências

BADALYAN, S. M. *et al.*, Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 41, p. 200-225, 2002.

BETTIOL, W. *et al.*, Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: MEYER, M. C. *et al.* **Trichoderma, uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 45-160.

CITRUS BR. **Exportações totais de suco de laranja em toneladas de FCOJ equivalente e milhares de US\$ FOB: julho de 2019 - abril de 2020**. São Paulo: Citrus BR, 2020. Disponível em: [http://www.citrusbr.com/download/Relatorio\\_%20ABRIL\\_2020\\_ano-safra.pdf](http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_%20ABRIL_2020_ano-safra.pdf). Acesso em: 3 out 2020

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e a capacidade

antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. Campinas, v. 30, p. 15-19, mai 2010.

DRESCH, F.; LANA, D. F. D.; MACIEL, M. J. Evaluation of fungal communities found in soil samples: a systematic review of literature. **Revista Ibero-americana de ciências Ambientais**, [s. l], v. 10, n. 6, p. 67-76, 2019.

ELLIS, J. J. Preserving fungus strains in sterile water. **Mycologia**, Illinois, v. 71, n. 5, p. 1072-1075, 1979.

FONTES, E. M. G.; INGLIS, M. C. V. **Controle Biológico de pragas da agricultura**. Brasília: EMBRAPA, 2020. 514 p.

FUNDECITRUS. **Reestimativa da safra de laranja 2019/20 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**:

Fechamento em Abril/2020. Araraquara, 2020.

Disponível em:

[https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/0420\\_Reestimativa\\_da\\_Safra\\_de\\_Laranja.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0420_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf).

Acesso em: 03 out 2020.

JAYAPRAKASHA, G. K.; BHIMANAGOUDA, S. P. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, United States, p. 410-418, 2007.

KONEMAN, E. W. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6. ed. Buenos Aires: **Médica Panamericana**, 2008. 1696 p.

MAGALHÃES, S. C. **Chaetomium spp: filogenia e controle biológico de fungos fitopatogênicos transmissíveis por sementes**. 2013. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

MARFETÁN, J. A. *et al.* Rhizospheric microorganisms as potential biocontrol agents against *Phytophthora austrocedri*. **European Journal of Plant Pathology**, [s.l], v. 158, 2020.

MENDES, R. *et al.*, Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science, New York**, v. 332, p. 1097-1100, may 2011.

MOUSUMI, M.; HARIDAS, M.; SABU, A. Process development for the enhanced production of bio-nematicide *Purpureocillium lilacinum* KU8 under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. [s.l], p. 1-5, 2020.

PÉREZ-JARAMILLO, Juan E.; MENDES, Rodrigo; RAAIJMAKERS, Jos M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant molecular biology**, 90.6: 635-644, 2016.

SCOTTON, J. C. *et al.* Transition management for organic agriculture under citrus cultivation favors fungal diversity in soil. **Renewable Agriculture and Food Systems**. [s.l], p. 1-8, 2018.

SILVA, J. C. *et al.* Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**. [s.l], v. 30, p. 48-54, 2010.

TOGHUEO, R. M. K.; BOYOM, F. F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **3 Biotech**. Riyadh, v. 10, p. 1-35, 2020.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Candida albicans*

Valério<sup>1</sup>, A. D.; Fernandes<sup>2</sup>, B.; Rosa<sup>1</sup>, C. A.; Johann<sup>1</sup>, S.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos

<sup>2</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa de Belo Horizonte

E-mail: alinediasvalerio@gmail.com

**Resumo:** *Candida albicans* é um fungo ubíquo, podendo ser encontrado em diversos ambientes na natureza e vivendo como comensal na microbiota de animais, inclusive no homem. Em situações de desequilíbrio do sistema imune humano, este fungo pode se comportar como patógeno oportunista. Apesar da característica ubíqua, pouco se sabe sobre sua ecologia, fatores de virulência e resistência na natureza já que a maioria dos estudos focam nos aspectos clínicos deste fungo. Neste trabalho avaliamos aspectos de virulência e resistência de isolados ambientais de *C. albicans*. Treze isolados ambientais obtidos em locais com baixa influência antrópica e 9 isolados ambientais obtidos em locais com elevada influência antrópicas foram avaliados quanto sua termotolerância, produção de enzimas hidrolíticas, morfogênese, susceptibilidade antifúngica e virulência *in vivo* no modelo *Tenebrio molitor*. Os dois grupos avaliados apresentaram capacidade de crescer até 45°C. Quanto a produção de enzimas hidrolíticas e morfogênese, os isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram ligeiramente superiores na produção enzimática e filamentação. Os isolados ambientais com alta influência antrópica foram resistentes a fluconazol e ao itraconazol. A virulência em *T. molitor* mostrou que os isolados ambientais com baixa influência antrópica apresentam taxa de virulência alta nas primeiras 24 horas experimentais, mas esta se estabiliza no decorrer do experimento. Já os isolados com alta influência antrópica aumentam sua letalidade durante o transcorrer do período experimental. É importante conhecer as características de virulência e resistência dos isolados ambientais de *C. albicans* pois os nichos que eles ocupam na natureza podem ser possíveis fontes de contaminação humana.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; virulência; resistência; *Tenebrio molitor*.

### 1. Introdução

*Candida albicans* é um fungo amplamente estudado no meio científico principalmente pelo seu papel na microbiota humana e como agente etiológico de infecções. Como comensal, a *C. albicans* pode ser isolada da microbiota humana, principalmente nas mucosas oral, intestinal e urogenital (HUFFNAGLE, 2013). Em situações de equilíbrio esta espécie não causa prejuízo aos seus hospedeiros. Porém quando este equilíbrio é desfeito, principalmente por um desequilíbrio do sistema imune, estas leveduras se comportam como patógenos oportunistas e são agentes etiológicos de infecções fúngicas, as quais podem se manifestar desde simples micoses cutâneas até infecções invasivas, atingindo a corrente sanguínea e chegando aos órgãos (SPELLBERG, 2012). O aspecto clínico deste fungo é amplamente estudado no meio científico, porém pouco se sabe sobre o comportamento destes microrganismos no ambiente. *C. albicans*, assim como outros microrganismos pertencentes ao gênero *Candida*, apresentam caráter ubíquo de distribuição e além de serem encontrados na microbiota humana podem ser isolados em solos, rios e plantas por exemplo (OPULENTE, 2019; KURTZMAN, 2011). Com os estudos voltados para âmbito clínico pouco se sabe sobre o comportamento de *C. albicans* na natureza. Poucas também são as informações sobre como estes microrganismos, isolados de fontes naturais, poderiam impactar a saúde humana em um possível contato. Os trabalhos científicos mostram que as infecções por *C. albicans* tem em sua maioria caráter endógeno, porém não pode ser descartada a

possibilidade de infecções por fontes externas (NEVILLE et al. 2015). Por isso, o isolamento de *C. albicans* na natureza pode implicar em um novo nicho de contaminação com estes fungos (OPULENTE, 2019). A fim de aprofundar o conhecimento acerca de isolados ambientais de *C. albicans*, nosso trabalho avaliou aspectos de virulência e resistência deste fungo. Entender os mecanismos de virulência e resistência desses microrganismos pode contribuir para a busca de estratégias que ajudem a mitigar a evolução da resistência e diminuir o número de mortes em decorrência de infecções causadas por esses patógenos oportunistas.

## 2. Metodologias

### 2.1 Origem das leveduras

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram obtidas em ambientes naturais, sendo divididas em dois grupos experimentais: isolados ambientais obtidos em ambientes com baixa influência antrópica (13 isolados oriundos de substratos como solo, plantas e madeira em decomposição) e um segundo grupo com isolados ambientais obtidos em ambientes com elevada pressão antrópica (9 isolados provenientes de água de rio). Todos os isolados utilizados pertencem a Coleção de Cultura e Células da UFMG e estão mantidos a -80. O isolado *C. albicans* SC5314 foi utilizada como controle em todos os experimentos.

### 2.2 Termotolerância

Para avaliação da termotolerância as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud por 24 horas. Posteriormente foi preparada uma suspensão fúngica em salina na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Dez microlitros da suspensão de leveduras foram inoculados em placas de ágar Sabouraud e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C, durante um período de 48h. A avaliação dos resultados foi realizada de modo visual, analisando o grau de crescimento da levedura (ZEUTHEN et al., 1989).

### 2.3 Morfogênese

Para a avaliação da capacidade de filamentação as leveduras foram usados 3 meios de cultura: Spider, Slad e Lee. A princípio um cultivo prévio dos isolados de *C. albicans* foi realizado em ágar Sabouraud por 24 horas. Passado este período uma colônia da cultura foi transferida para tubos de

ensaio contendo salina. Esta suspensão fúngica foi lida em espectrofotômetro 530 nm, e ajustada para 75% de transmitância ( $\sim 0,5-5 \times 10^6$  cél/mL). Dez microlitros da suspensão fúngica foi inoculada em três diferentes meios de cultura contendo diferentes fontes nutricionais, posteriormente as placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C por 7 dias. Passado o período experimental uma colônia foi fotografada para a análise do processo de filamentação (CALERA et al., 2000; AZADMANESH et al., 2017).

### 2.4 Produção de enzimas hidrolíticas

A produção das enzimas hidrolíticas proteinase e fosfolipase foram avaliadas no trabalho. A produção de proteinase foi realizada seguindo protocolo descrito por CASSONE et al., 1987. As placas foram armazenadas em estufa 28°C e após 7 dias os resultados foram avaliados. Já a produção da enzima fosfolipase foi avaliada seguindo metodologia descrita por PRICE et al. 1982. Após 4 dias em estufa 37°C, as placas foram avaliadas para a presença de halo ao redor da colônia, indicando a atividade enzimática.

### 2.5 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da susceptibilidade dos isolados foi realizada em teste de microdiluição em placa, utilizando os seguintes antifúngicos: fluconazol (64-0,125 µg/mL), itraconazol (16-0,03 µg/mL) e anfotericina B (8-0,015 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). A metodologia seguida foi baseada nas diretrizes prescritas pelo CLSI no protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). A leitura dos resultados foi realizada de modo visual em 24 e 48 horas. Foi considerado CIM para os azós o poço em que foi observado 80% de inibição e para a anfotericina B foi avaliada o CIM no poço com 100% de inibição. Três experimentos independentes foram realizados.

### 2.6 Virulência de *C. albicans* em modelo invertebrado *Tenebrio molitor*

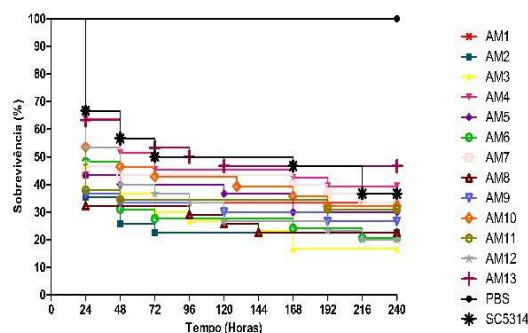
A virulência *in vivo* dos isolados foi avaliada utilizando o modelo invertebrado de *T. molitor*. A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de De Souza et al. (2015). Para cada isolado testado 10 larvas foram utilizadas, a mesma quantidade de larvas foi utilizada no grupo controle positivo (*C. albicans* SC5314) e no controle negativo (PBS). As larvas foram inoculadas com  $1 \times 10^5$  cel/5µL. Após a inoculação as larvas foram armazenadas em placas

de Petri de 90 mm, em estufa a 37°C, durante 10 dias. A cada 24 horas o experimento foi monitorado, e as larvas foram consideradas mortas quando não responderam ao toque. Os testes foram realizados em triplicata (DE SOUZA et al., 2015).

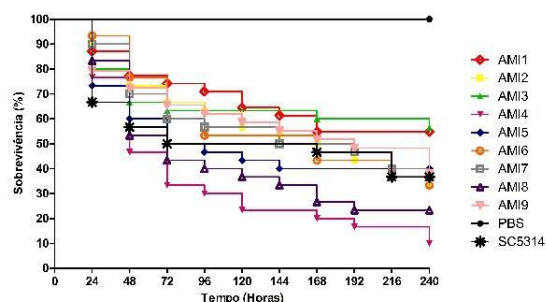
### 3. Resultados e Discussão

As leveduras pertencentes aos dois grupos avaliados no presente trabalho apresentaram crescimento em temperatura de 45°C, com exceção de um isolado com baixa influência antrópica o qual só cresceu até 40°C. Trabalhos mostram que a temperatura de crescimento do microrganismo pode estar relacionada com fatores de virulência e que a transcrição de genes relacionados a estes fatores pode ocorrer concomitantemente com a transcrição de proteínas de Heat shock (LEACH et al., 2016). Setenta e sete por cento dos isolados com baixa influência antrópica de *C. albicans* produziram fosfolipase e 54% produziram proteinase. Estes números foram superiores nos isolados ambientais de *C. albicans* com elevada influência antrópica, sendo 100% e 55% respectivamente. As enzimas apresentam papel essencial na patogênese de *C. albicans*, provocando danos teciduais no hospedeiro e propiciando a obtenção de nutriente para o fungo (SCHALLER et al., 2005; RAPALA-KOZIK et al., 2018). Quanto a filamentação, 3 isolados ambientais com baixa influência antrópica não filamentaram em meio SPIDER, 7 não filamentaram em meio SLAD e 8 em meio LEE. Quase todos isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram algum nível de filamentação nos meios testados, sendo que apenas um isolado não conseguiu filamentar no meio SLAD. A capacidade de filamentação de *C. albicans* está diretamente ligada a processos de adesão, invasão, dano tecidual, disseminação e evasão do sistema imune, ou seja, contribui diretamente para a virulência deste microrganismo (KUMAMOTO & VINCES, 2005; JACOBSEN et al., 2012). Nos testes de susceptibilidade antifúngica, todos os isolados testados foram sensíveis a anfotericina B. Todos os isolados ambientais com baixa influência antrópica também foram sensíveis a fluconazol e itraconazol. Diferentemente, todos os isolados ambientais com elevada influência antrópica foram resistentes aos azóis testados. Uma possível explicação para este fato se deve a resistência cruzada. Como a região de isolamento das amostras ambientais com elevada influência antrópica é fortemente influenciada pela atividade agrícola, o uso de agroquímicos azólicos pode ter induzido a resistência nestes isolados. O teste de virulência *in*

*in vivo* mostrou que os isolados ambientais com baixa influência antrópica apresentam taxa de virulência alta nas primeiras 24 horas experimentais, mas esta se estabiliza no decorrer do experimento (Figura 01). Já os isolados com alta influência antrópica aumentam sua letalidade durante o transcorrer do período experimental (figura 02).



**Figura 01:** Curva de sobrevivência de *T. molitor* infectado com isolados ambientais de *C. albicans* com baixa influência antrópica.



**Figura 02:** Curva de sobrevivência de *T. molitor* infectado com isolados ambientais de *C. albicans* com alta influência antrópica.

### 4. Conclusões

Isolados de *C. albicans* obtidos de fontes naturais podem apresentar fatores de virulência e resistência que os capacitam para serem possíveis patógenos oportunistas. Desta forma, os ambientes nos quais estes microrganismos são isolados podem ser considerados um nicho alternativo de contato com estes fungos oportunistas com potencial patogênico, podendo implicar diretamente na saúde humana.

### 5. Apoio Financeiro

CNPq, Capes, Fapemig.

### 6. Referências



- AZADMANESH, J. et al. Filamentation Involves Two Overlapping, but Distinct, Programs of Filamentation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. **Genes|Genomes|Genetics**, v. 7, n. 11, p. 3797–3808, nov. 2017.
- CALERA, J. A.; ZHAO, X.-J.; CALDERONE, R. Defective Hyphal Development and Avirulence Caused by a Deletion of the SSK1 Response Regulator Gene in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 518–525, 1 fev. 2000.
- CASSONE, A. et al. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 5, p. 777–783, 1 nov. 1987.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts. Approved Standard, Third Edition. **CLSI document M7-A3**, v. 28, n. 14, 25p., 2008.
- DE SOUZA, P. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, nov. 2015.
- HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 334–341, jul. 2013.
- JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85–93, jan. 2012.
- KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence: *Candida albicans* morphogenesis and virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1546–1554, 6 set. 2005.
- KURTZMAN C., FELL J.W., BOEKHOUT T. The Yeasts: A Taxonomic Study. London, United Kingdom: **Elsevier**, 2011.
- LEACH, M. D. et al. Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans*. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11704, set. 2016.
- NEVILLE, B. A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M.-E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 7, 1 nov. 2015.
- OPULENTE, D. A. et al. Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 3, p. foz032, 1 maio 2019.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7–14, jan. 1982.
- RAPALA-KOZIK, M. et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. **Molecular Oral Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 113–124, abr. 2018.
- SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, nov. 2005.
- SPELLBERG B., MARR K., FILLER S.G. *Candida*: What Should Clinicians and Scientists Be Talking About? In: Calderone RA, Clancy, C.J., ed. *Candida and Candidiasis*: **ASM Press**, Washington, DC, pp. 225-242., 2012.
- ZEUTHEN, M. L.; HOWARD, D. H. Thermotolerance and the Heat-shock Response in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 135, n. 9, p. 2509–2518, 1 set. 1989.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## OTIMIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE DERMATOMICOSSES ANALISADAS NO LABORATÓRIO DO POSTO MÉDICO DE GUARNIÇÃO DE BELO HORIZONTE-MG

Vieira, L.P.S.<sup>1,2</sup>; Costa, M.C.<sup>2</sup>; Resende-Stoianoff, M.A.<sup>2</sup>; Santos, D.A.<sup>2</sup>; Peres, N.T.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posto Médico de Guarnição de Belo Horizonte/Laboratório de Análises Clínicas.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Microbiologia/Laboratório de Micologia

E-mail: lpsvieira@yahoo.com.br

**Resumo:** As infecções fúngicas causam grande comprometimento à população, com tratamentos insatisfatórios, visto como um problema estético e muitas vezes negligenciado. Há um aumento na prevalência destas infecções, pela incidência de imunodeficiências e idade da população, aliados aos cuidados médicos em geral. Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as metodologias utilizadas no diagnóstico micológico e realizar um estudo epidemiológico das dermatomicoses, em atendimento ambulatorial no Laboratório de Micologia do Posto Médico de Guarnição de Belo Horizonte. Através da anamnese, foi possível traçar o perfil epidemiológico relativo à idade, gênero e patologia de base, bem como a localização da lesão, resultado do exame direto e cultura fúngica. Das amostras suspeitas, no período de setembro de 2019 a agosto de 2020, 33,7% apresentaram cultura negativa. Dentre os isolados fúngicos, foram encontrados 42,6% de casos positivos para dermatofitoses, principalmente tinea unguium dos pododáctilos. Com relação às espécies de dermatófitos encontradas, 24,8% foram causadas por *Trichophyton mentagrophytes*, 15% por *Trichophyton rubrum* e 1% por *Epidermophyton floccosum*. Candidíase em 16,8% dos casos, sendo 12,9% por *Candida albicans*, 1% *Candida tropicalis* e 3% *Candida* spp. Dermatomicose não dermatofítica em 4,9%, sendo 4% por *Scytalidium dimidiatum* e 1% por *Fusarium* spp. Pitiríase versicolor por *Malassezia* em 2% dos casos. O conhecimento dos casos de infecções fúngicas nos pacientes atendidos neste Posto Médico, associando à clínica, hábitos e atividades proporcionou a prospecção dos dados epidemiológicos com impacto para a comunidade acadêmica e divulgação científica de incidência de espécies fúngicas em pacientes a nível ambulatorial.

**Palavras-chave** Diagnóstico micológico; Dermatomicoses; Epidemiologia; Belo Horizonte MG.

### 1. Introdução

No Brasil, as infecções fúngicas são um problema de saúde pública que demonstra o nível de educação sanitária da população (Heidrich et al., 2015; Sanguino; Jarros; Negri, 2019). Estudos epidemiológicos indicam que estas infecções causam grande constrangimento aos indivíduos acometidos pelo aspecto e forma das lesões fúngicas, pela similaridade com outras patologias e pela parte estética durante as práticas desportivas (Faure-Cognet, 2016). Tem-se registrado um aumento na incidência de infecções fúngicas em hospitais (Friedman; Schwartz, 2019). Um estudo de lesões de pele em um hospital indiano mostrou que 78% se tratavam de dermatofitoses, o que estava bem acima da prevalência mundial de 20 a 25%, e que estas se mostravam resistentes à terbinafina, antifúngico oral e tópico que tem sido a primeira linha de terapia para dermatofitose superficial (Verma, 2017; Panda, 2017; Nenoff, 2019). A não regulamentação do uso de antifúngicos está acarretando o aumento da incidência de dermatofitose com resistência antifúngica emergente. Tem sido relatado o aumento do uso de cremes e combinação de drogas contendo esteroides, antifúngicos e antibacterianos, em lesões de pele indiferenciadas na Índia (Verma, 2017). No entanto, dados sobre a epidemiologia de micoses em pacientes ambulatoriais ainda são escassos.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Delineamento e descrição da área em estudo

Trata-se de um estudo transversal sobre o perfil epidemiológico das infecções fúngicas de pacientes em atendimento ambulatorial ou através do serviço domiciliar de *Home Care*, bem como a otimização da metodologia empregada no diagnóstico de micoses superficiais e cutâneas no Laboratório de Micologia do Posto Médico de Guarnição de Belo Horizonte. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa: CAAE 35520720.2.0000.5149.

## 2.2 Isolamento e identificação fúngica

Foi solicitada a autorização dos pacientes como voluntário para participar do projeto. O procedimento de coleta das amostras biológicas foi realizado por meio de raspagem das regiões afetadas como unhas dos pés e das mãos, raspados de pele, pelos, urina, aspirado traqueal e swabs de secreções de feridas. O material foi clarificado com 40% KOH em casos de escamas de pele, unhas e pelos e visualizado ao microscópio, buscando por estruturas vegetativas - hifas e/ou blastoconídeos. O material biológico foi semeado de imediato, dependendo do tipo de material em tubos contendo ágar Sabouraud Dextrosado, ágar Sabouraud com Cloranfenicol e Mycosel, incubadas a 25 °C e 37 °C por dez a trinta dias. O cultivo foi acompanhado diariamente e a identificação dos fungos foi realizada pela visualização através da análise macro e micro morfológico das colônias.

## 2.3 Análise dos dados

A fonte de coleta de dados foram as Fichas de Identificação dos pacientes preenchidas no momento da colheita das amostras para exames micológicos. Os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os dados foram analisados em plataforma de Excel, sem identificação dos participantes do estudo, submetidos à avaliação de perfil epidemiológico.

## 3 Resultados e Discussão

Tivemos um total de 101 laudos de exames micológicos analisados, entre os meses de Setembro de 2019 a Agosto de 2020. Estas análises foram realizadas por solicitação de médicos em

atendimento de pacientes ambulatoriais e através do serviço de Home Care.

Foram identificados 67 resultados positivos para dermatomicoses superficiais e cutâneas, classificados de acordo com a distribuição do local das lesões nos pacientes participantes. Deste número de isolados, 43 foram Fungos Filamentosos da classe dos dermatófitos, sendo *T. mentagrophytes* (25), *T. rubrum* (17) e *E. floccosum* (01). Das leveduras, 22 eram do gênero *Candida* e 5 pertenciam a outros gêneros de leveduras. As espécies mais isoladas foram *C. albicans* (17), *Candida* spp. (04) e *C. tropicalis* (01). Fungos Filamentosos não Dermatófitos, foram *Scytalidium dimidiatum* (04) e *Fusarium* spp (01). Pelo método direto, foi analisado (02) casos de Pitíriase versicolor, sugestivos do gênero *Malassezia*.

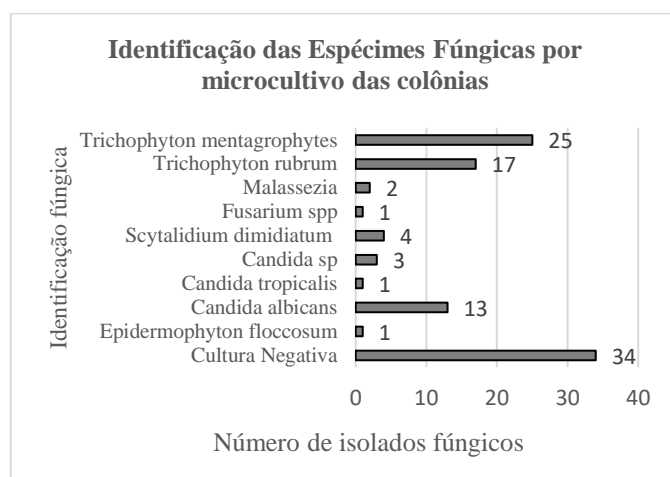
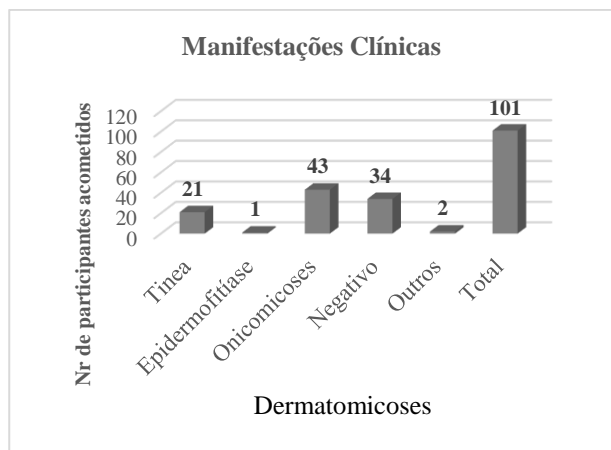


Gráfico 1 – Identificação das Espécies Fúngicas por microcultivo das colônias.

O Gráfico 2 mostra entre as 101 amostras analisadas, 34 foram negativas e das amostras positivas com isolados fúngicos, 43 se tratava de Onicomicoses, seguidos de 21 Tineas, 01 Epidermofitíase e 2 amostras sugestivas de *Malassezia*.



**Gráfico 2** – Distribuição das manifestações clínicas em participantes acometidos por Dermatomicoses.

A distribuição das amostras colhidas foram estratificadas por sexo, idade e doença de base dos 50 participantes. O maior número de atendimentos ocorreu em participantes do sexo masculino, sendo este muito próximo aos do sexo feminino. A faixa etária entre 41-50 anos foi preponderante em relação às demais faixa etárias, sendo recuperados 14 (28%) isolados clínicos. Com relação às patologias de base, a Síndrome Metabólica em suas diferentes formas clínicas foram os processos primários com a maior frequência de isolamento (18%).

Infecções fúngicas superficiais estão relacionadas a vários fatores predisponentes, incluindo condições climáticas, migrações de pessoas, atividades esportivas, contato prolongado com água, estilo de vida, estado imunológico, terapia medicamentosa e idade dos pacientes. Além disso, as condições de vida e o ambiente onde as pessoas estão inseridas influenciam as características epidemiológicas das doenças infecciosas (Faure-Cognet, 2016). Fatores relacionados ao estado clínico do paciente foram avaliados entre os participantes deste estudo, e demonstrou que condições facilitadoras da instalação das onicomicoses, como doenças da microcirculação (diabetes, hipertensão arterial e síndrome metabólica), assim como certos fatores ambientais como o hábito de pés descalços e trauma característico de unhas, podem ser facilitadores do aparecimento de dermatomicoses em humanos.

As onicomicoses estão frequentemente associadas a vários fatores predisponentes, como o uso prolongado de sapatos durante o dia, contato com animais, trauma na região, pés com suor excessivos e o hábito de não usar sandálias em banheiros de uso comum (Leite, 2014). Entre os

participantes analisados, não foi observado grande disparidade em relação ao sexo, sendo variável em ambos os sexos, como em todo o mundo. A prevalência de gênero em casos de infecções superficiais fúngicas podem ser igualmente equilibradas. O contato com o ambiente, associado aos diferentes hábitos cotidianos, estilo de vida, maior probabilidade de trauma e exposição a produtos químicos aumentam a incidência de infecções fúngicas superficiais neste local específico do corpo (Leite, 2014). Portanto, nossos dados corroboram com a literatura que indica que pacientes jovens são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas, sendo que em nosso estudo, as unhas foram as amostras clínicas positivas em 40% casos.

Observou-se uma correlação entre o Exame Micológico Direto e a Cultura em meios específicos, reafirmando que a alta qualidade e precisão do exame micológico realizado contribui significativamente para o desfecho clínico do paciente. Precisão do exame micológico depende de vários fatores, incluindo coleta de amostra correta seguido por um análise microscópica direta detalhada. Esses fatores associados com diferentes técnicas utilizadas para a cultura de amostras clínicas e um possível uso anterior de drogas antifúngicas pelo pacientes, contribuem para as diferenciações de correspondência entre os testes micológicos na literatura.

#### 4 Conclusões

Décadas de uso antifúngico prolongado e antibacteriano na agricultura e medicina alteraram o microbioma global, propiciando o surgimento de infecções fúngicas resistentes a medicamentos em animais e humanos (Fisher, 2018). Dentro desse contexto, o presente estudo reafirma a importância de exames micológicos em pacientes em atendimento ambulatorial, com o intuito de minimizar este acometimento que traz incômodo, tratamentos insatisfatórios por longo tempo e muitas vezes, com recidivas que trazem incertezas e constrangimento aos pacientes. As análises realizadas neste trabalho, bem como o isolamento adequado do agente infeccioso, demonstram o grande número de participantes que procuram atendimento ambulatorial e que mediante o correto diagnóstico e tratamento adequado e efetivo é possível minimizar os efeitos maléficos destas infecções fúngicas, bem como o agravamento delas.

Finalmente podemos contribuir, através deste estudo, para o conhecimento das dermatomicoses na população atendida, pelos dados epidemiológicos analisados e reafirmar a relevância das análises fúngicas ambulatoriais.

### 5 Apoio Financeiro

Financiamento próprio.

### 6 Referências

FAURE-COGNET O., et al. Superficial fungal infections in a French teaching hospital in Grenoble area: retrospective study on 5470 samples from 2001 to 2011. **Mycopathologia**, 2016;181:59—66.

FRIEDMAN, D. Z. P.; SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. **Journal of Fungi**, 20 jul. 2019, v. 5, n. 3, p. 67.

HEIDRICH, D., et al. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 29 ago. 2015, v. 9, n. 08, p. 865–871.

LEITE, Jr. D.P., et al. Dermatophytosis in military in the centralwest region of Brazil: literature review. **Mycopathologia** 2014; 177:65—74.

NENOFF, P., et al. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*—A molecular study. **Mycoses** 2019, 62, 336–356. [CrossRef]

PANDA, S.; VERMA, S. The menace of dermatophytosis in India: The evidence that we need. **Indian J. Dermatol.** Venereol. Leprol. 2017, 83, 281–284. [CrossRef]

SANGUINO, T. C.; JARROS, I. C.; NEGRI, M. Occurrence of dermatophytoses in patients from the Sistema Único de Saúde. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 29 maio 2019, v. 94, n. 3, p. 293–297.

SUZUKI, S., et al. Discovery of Terbinafine Low Susceptibility *Trichophyton rubrum* strain in Japan. **Biocontrol. Sci.** 2018, 23, 151–154. [CrossRef]

OLIVEIRA, J. C. Tópicos em Micologia Médica. 4ª ed. Rio de Janeiro, 2014. p. 23.

VERMA, S.; MADHU, R. The Great Indian Epidemic of Superficial Dermatophytosis: An Appraisal. **Indian J. Dermatol.** 2017, 62, 227.

YAMADA, T., et al. Terbinafine Resistance of *Trichophyton* Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2017, 61, e00115-17. [CrossRef].

## RESUMOS EDUCAÇÃO

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

### O uso de humor gráfico pelo “Clube da Biologia” como estratégia de ensino e divulgação científica no contexto da virologia

Barbosa<sup>1</sup>, C.C.; Silva<sup>2</sup>, R.M. e Di Azevedo<sup>3</sup>, M.I.N.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento de Ciências Exatas e Biológicas/ Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microorganismos.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina.

<sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense, Departamento de Microbiologia/Laboratório de Bacteriologia Veterinária.

E-mail: [contatoclubedabiologia@gmail.com](mailto:contatoclubedabiologia@gmail.com)

**Resumo:** Vivemos atualmente uma era digital baseada em redes sociais e tecnologia da informação, sem dúvidas caracterizada por intensa interconectividade entre pessoas, serviços e informação. Cabe a nós, como pesquisadores, aproveitar os atuais meios digitais e promover a popularização da ciência, visto que as redes sociais podem constituir importante ferramenta para divulgação de conhecimento científico. Diante disso, no ano de 2015, é fundado o “Clube da Biologia”, com o objetivo de promover a divulgação científica de qualidade e transmitir o conhecimento sobre inúmeros assuntos relacionados à ciência através de uma linguagem acessível e divertida. O objetivo desse trabalho foi identificar o alcance das publicações da página “Clube da Biologia”, com a temática “Vírus” utilizando o humor como estratégia. Foram analisadas quatro publicações e, para a obtenção do cálculo do engajamento, utilizamos o algoritmo da agência de marketing digital Emedia Agência Digital. Todas as publicações tiveram alcance maior que 15.000. Os resultados obtidos demonstram que o humor através de memes usados pelo “Clube da Biologia” é uma ferramenta eficaz para conscientizar e esclarecer o público em geral. O “Clube da Biologia” é um excelente exemplo de como a comunidade científica pode utilizar o humor gráfico como ferramenta de aproximação com a sociedade. Além disso, pode-se afirmar que o canal, por meio das suas publicações humorísticas, contribui significativamente para a popularização da ciência utilizando uma linguagem simples e acessível através de uma rede social.

**Palavras-chave:** popularização da ciência; ensino; mídias sociais; pandemia.

### 1. Introdução

Vivemos atualmente uma era digital baseada em redes sociais e tecnologia da informação, sem dúvidas caracterizada por intensa interconectividade entre pessoas, serviços e informação. As pessoas reservam uma boa parte de seu tempo navegando pelas mídias digitais, que já transpuseram a simples funcionalidade de passatempo social e hoje exercem grande influência para formação de opinião e senso crítico. É neste contexto que cabe a nós, como pesquisadores, aproveitar os atuais meios digitais e promover o ensino e popularização da ciência, visto que as redes sociais podem constituir importante ferramenta para divulgação de conhecimento científico.

A divulgação científica tem a responsabilidade de aproximar o indivíduo à comunidade científica, desmistificando a ideia de que o conhecimento seja restrito a um pequeno grupo ou instituição. Essa proximidade é crucial para o desenvolvimento de uma sociedade mais justa e igualitária (SANTOS; PORTO; OLIVEIRA, 2018). Diante disso, no ano de 2015, é fundado o “Clube da Biologia”, com o objetivo de promover a divulgação científica de qualidade e transmitir o conhecimento sobre inúmeros assuntos relacionados à ciência por meio de uma linguagem acessível e divertida.

Em paralelo, temos o surgimento das mídias sociais, o que mudou radicalmente a maneira como muitas pessoas, comunidades ou organizações se comunicam e interagem entre si (NGAI; TAO; MOON, 2015). Dentre elas, há o Instagram, uma rede social voltada para o visual e onde é possível curtir, comentar e compartilhar publicações. O Brasil conta hoje com 77 milhões de usuários desta rede, e a média de acesso diário/usuário é de 28 minutos (FLYON

MARKETING DIGITAL, 2020). Em outras palavras, é uma ferramenta gratuita, popular e acessível que pode contribuir positivamente para divulgação científica. Atualmente o “Clube da Biologia” conta com mais de 70 mil seguidores no Instagram.

A comunicação através do humor propõe maneiras diferentes de olhar a realidade, podendo ser considerada um recurso educacional, uma vez que permite ao público pensar naquilo que é transmitido (ADÃO, 2016). Aliado a comunicação humorística, temos o uso do humor gráfico, que são um fenômeno recente na internet e apresentam diversos formatos. Além disso, promovem novas experiências de ensino, aprendizagem e formação de maneira informal e sem espaço-tempo definido (OLIVEIRA; PORTO; ALVES, 2019).

O objetivo desse trabalho foi identificar o alcance das publicações da página “Clube da Biologia”, com a temática “Vírus” utilizando o humor como ferramenta para a divulgação científica.

## 2. Metodologias

Foram analisadas quatro publicações com a temática “Vírus”, usando a estratégia humor. Essas publicações foram feitas no período de março a agosto de 2020. Para a obtenção do cálculo do engajamento, utilizamos o algoritmo da agência de marketing digital Emedia Agência Digital, segundo a fórmula:  $\text{Comentários} + \text{Curtidas} + \text{Compartilhamentos} / \text{total de pessoas alcançadas pelo post} \times 100$ . Essa fórmula foi utilizada nas quatro publicações para obtenção dos dados. Os valores obtidos refletem as métricas usadas pelo Instagram para cálculo do engajamento, onde temos: (1) os comentários realizados na publicação, (2) o número de curtidas recebidas e (3) o compartilhamento, sendo a última uma métrica que é calculada através do envio do conteúdo por mensagem direta somada às repostagens. E por último, (4) o alcance, ou seja, o número total de pessoas que visualizar a postagem. Vale destacar que todas as publicações são acompanhadas por textos explicativos.

## 3. Resultados e Discussão

A primeira publicação (Figura 1A), tinha como finalidade desmistificar algumas *FakeNews* envolvendo o novo coronavírus e “alertou” aos seus seguidores da importância do isolamento social. Essa medida foi de suma importância nas primeiras semanas da pandemia, a fim de evitar o colapso do Sistema Único de Saúde (SUS). O

cálculo do engajamento dessa publicação foi de 17.7, com alcance de 23.007 pessoas.

A segunda publicação (Figura 1B), teve como objetivo criticar a posição das autoridades políticas perante a pandemia, onde muitas das vezes foi tratada como uma “gripezinha”. Resultou em um engajamento de 17.1 e um alcance de 33.626 perfis.

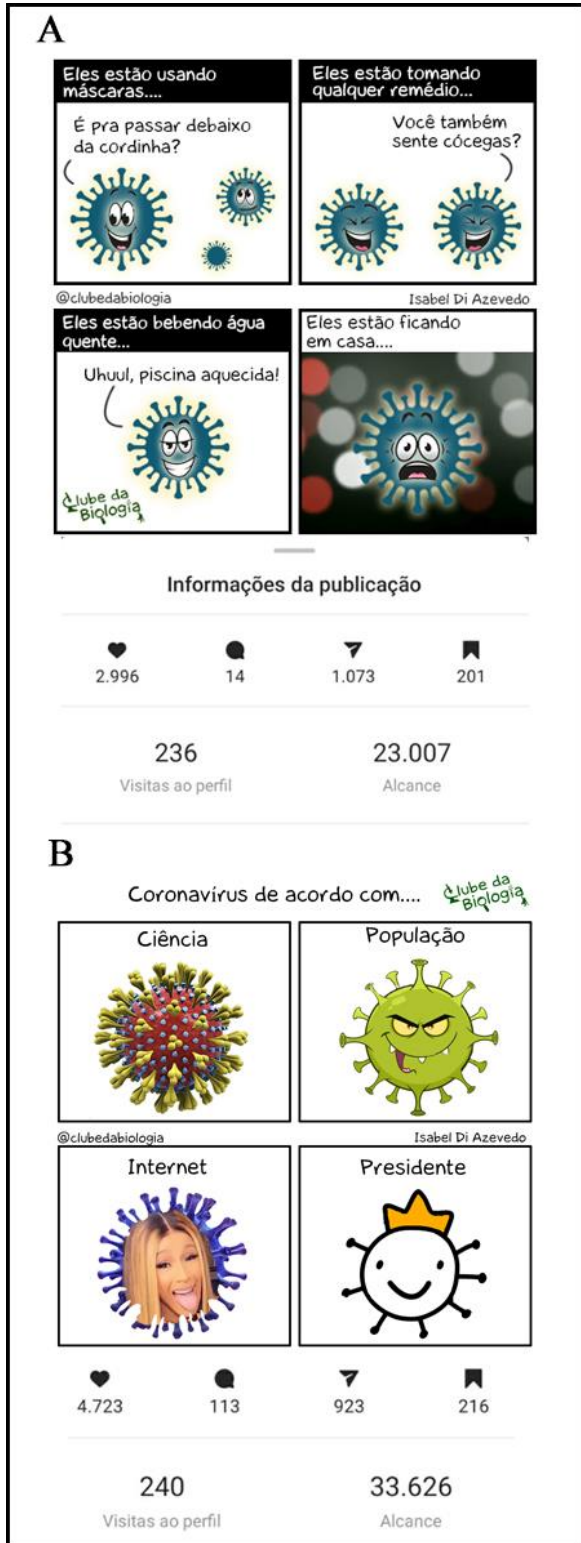
Já o propósito da terceira publicação (Figura 2A), foi criticar o uso indiscriminado de antibióticos, que muitas das vezes são usados para o tratamento de doenças virais. Obteve o valor de 12.5 para o engajamento e alcance de 16.295 perfis.

A quarta publicação (Figura 2B), tinha como intenção brincar com a ausência da parede celular nos vírus e nas células animais. Atingiu 16.799 pessoas e engajamento foi em torno de 8.3.

Os resultados obtidos demonstram que o humor através de memes usado pelo “Clube da Biologia” é uma ferramenta eficaz para conscientizar e esclarecer o público em geral. Foi possível verificar nas postagens citadas um engajamento expressivo e mais de 16 mil pessoas alcançadas com as publicações em questão.

Diante disso, é possível verificar que o uso do humor no contexto educacional, permite apresentar conceitos a uma vasta parcela da população por meio de recursos não formais, possibilitando o pensar e a criticidade do indivíduo. Outro ponto importante é associar o humor como ferramenta educacional, um facilitador para a memorização dos conteúdos contribuindo significativamente para o processo de ensino e aprendizagem (BARRIENTOS, 2013).





**Figura 1:** Tirinhas utilizando humor como ferramenta para reforçar a necessidade de isolamento durante a pandemia (A) e as inconsistências divulgadas por parte das autoridades (B).



**Figura 2:** Meme publicado com o objetivo de questionar o senso comum acerca do uso de antibióticos em casos de infecções virais (A) e piada biológica envolvendo a ausência de parede celular nos vírus (B).

#### 4. Conclusões

Diante do exposto, é possível verificar que o “Clube da Biologia” é um excelente exemplo de como a comunidade científica pode utilizar os memes como ferramenta de aproximação com a sociedade. Além disso, pode-se afirmar que o canal, através das suas publicações humorísticas contribui significativamente para a popularização da ciência utilizando uma linguagem simples e acessível através de uma rede social. Ressaltamos também a importância da página frente a esse cenário de pandemia, atuando principalmente no esclarecimento de notícias falsas e apresentando a temática vírus de forma clara, objetiva e prazerosa para os seus seguidores.

#### 5. Apoio Financeiro

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)  
Universidade Federal Fluminense (UFF)

#### 6. Referências

ADÃO, T. **Os processos cognitivos subjacentes à apreciação do humor**: Contributos para o professor/mediador de língua materna-português. 2016. Tese (Doutorado em Didática das Línguas) – Faculdade de Letras, Universidade do Porto, Porto, 2016.

BARRIENTOS, Cecilia Verónica González. El humor como instrumento pedagógico. 2013. Informe final de Seminario (Licenciado en Lengua y Literatura Hispánica con Mención en Literatura) -Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2013. 35f.

EMEDIA AGÊNCIA DIGITAL. **Como medir o engajamento da sua página**. Grupo Emedia Agência Digital. 2018. Disponível em: <<http://www.grupoemedia.com/blog/materia/como-medir-o-engajamento-da-sua-pagina-no-facebook>> Acesso em: 11 out. 2020.

FLYON MARKETING DIGITAL. **Você sabia? 17 fatos curiosos sobre o Instagram 2020!** Disponível em: <https://blog.flyon.com.br/fatos-curiosos-sobre-o-instagram-2020/>. Acesso em: 13 out. 2020.

NGAI, E. W.T.; TAO, S. S. C.; MOON, K. K. L. Social media research: theories, constructs, and conceptual frameworks. **International Journal of Information Management**, v. 35, n. 1, p. 33-44, 2015.

OLVIEIRA, Kaio Eduardo de Jesus; PORTO, Cristiane de Magalhães; ALVES, André Luiz. Memes de redes sociais digitais enquanto objetos de aprendizagem na Cibercultura: da viralização à educação. **Revista Acta Scientiarum**. v. 41, 2019.

SANTOS, Leandro Santana; PORTO, Cristiane de Magalhães; OLVIEIRA, Kaio Eduardo de Jesus. WhatsApp e Ciência: A Conectividade Científica por meio da divulgação. **Revista Eletrônica da FAINOR**, Vitória da Conquista, v. 11, n. 2, p. 271-289, 2018.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## UTILIZAÇÃO DO INSTAGRAM COMO FERRAMENTA DE DIVULGAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Martelo<sup>1</sup>, N. C.; Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Rodrigues<sup>1</sup>, M. F. R.; Teixeira<sup>1</sup>, C. W.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais (Unidade Ibirité), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP)

E-mail: natiellecm@gmail.com

**Resumo:** As redes sociais permitem uma grande interatividade entre os usuários, ampliando o acesso às informações. Em momento de combate às "fake news", o papel dos meios digitais é essencial para disponibilizar informações confiáveis e de qualidade. Com o intuito de divulgar trabalhos científicos com linguagem acessível, foi criado pelo grupo um Instagram. Durante a pandemia da Covid-19, cativamos o interesse dos usuários pela ciência, que interagem por meio de direct e compartilhamento de publicações.

**Palavras-chave:** Rede social; Divulgação científica; Microbiologia.

### 1. Introdução

O mundo vive o processo de globalização que pode ser definido como um aprofundamento internacional das relações entre os países através da comunicação e transporte (MACHADO; MASTSUSHITA; 2019). Essas relações promovem diversas interações e estão relacionadas com a política, economia, cultura, atividades sociais, dentre outros. Podemos perceber também um intenso desenvolvimento das tecnologias e dos meios de comunicação que estão intimamente presentes em nosso cotidiano. Desse intenso desenvolvimento podemos observar a rapidez com que as informações são transmitidas e apresentadas à população, os inúmeros meios de comunicação e a facilidade para a busca de notícias e saberes (ALENCAR; JUNIOR; 2017).

E esses meios online estão praticamente interligados com as redes sociais. Essas por sua vez já sofreram inúmeras mudanças e evoluções para estarem presentes assiduamente em nosso cotidiano. Segundo Juliani e colaboradores (2012) “desde os primeiros passos com a oferta de

comunicação via internet com o aplicativo MIRC, ICQ, MSN, SKYPE e em seguida com a chegada do orkut até ser ultrapassada pelo facebook” inúmeros aplicativos e plataformas com viés social sofreram aperfeiçoamentos.

Ao utilizar os recursos das redes sociais pode ocorrer diversas contribuições na área de ensino formal e informal, pois nesses meios várias informações são compartilhadas entre as pessoas que ficam cada vez mais interligadas e podem disseminar informações que sejam de fato instrutivas e formativas. Nesse contexto as redes sociais podem ser caracterizadas como uma ferramenta efetiva para o acesso de conhecimento que consequentemente contribui para os processos de ensino e aprendizagem em diversas disciplinas.

Diversas pesquisas apontam que a utilização de ferramentas digitais no ensino traz grandes vantagens pois os estudantes estão familiarizados com essa tecnologia e apresentam facilidade na busca de informações como por exemplo a busca por perfis informativos de determinado conteúdo, além da motivação desses discentes em utilizarem algo que está presente no seu cotidiano (MINHOTO, 2012; ZANCANARO et al., 2012).

Apesar dessa importância que os meios sociais trazem, há uma preocupação quanto à veracidade das informações e notícias. Atualmente muitas notícias falsas, que são denominadas de “fake news”, são embasadas em inverdades com objetivo de conspurcar os leitores.

As “fake news” vem se demonstrando bem presentes nos “feeds” das redes sociais e confundem a população que acaba por acreditar nela e compartilhar para mais pessoas causando a disseminação de inúmeras contradições. Podemos visualizar tal fato durante a pandemia da Covid-19. Inúmeras notícias falsas são compartilhadas a todo momento através dos canais interativos.

O Instagram possui um apelo visual que atrai mais usuários. Podemos observar também que a plataforma não cria hiperlinks, segundo GONZALES (2018) a instantaneidade de informações e leitura apenas pela tela sem ter que ficar redirecionando a outras plataformas atrai mais consumidores comparado a outras mídias como Facebook, Twitter, sites e blogs.

É nesse contexto que o presente trabalho apresenta a divulgação científica realizada por meio de um perfil em uma rede social para que a população tenha acesso a informações confiáveis, baseadas em artigos científicos divulgadas com uma linguagem simples a fim de que possam reconhecer o que é “fake” e o que é verdade.

## 2. Metodologias

Inicialmente, antes de fazer as publicações no perfil do Instagram, o grupo de pesquisa que coordena o referido perfil selecionou alguns artigos científicos com viés microbiológico. Após a escolha foram feitas algumas discussões dos trabalhos para que as informações mais importantes como descobertas, dados e características do mesmo fossem extraídas para a publicação.

Após a seleção das informações as mesmas são passadas por uma conversão de palavras para que qualquer público possa lê-las e entendê-las. Após essas etapas, imagens relacionadas com o artigo são separadas para que o público possa “concretizar” as informações lidas. Para a montagem final dos posts foi utilizado um programa de designer para que as informações e imagens sejam atrativas para o público e esse se interesse pelo conteúdo.

## 3. Resultados e Discussão

Apesar do perfil ter sido feito recentemente e das publicações serem ainda poucas, foi possível notar uma média de dois seguidores por dia.

Isso nos permitiu inferir que as pessoas buscam cada vez mais estarem inseridas em conteúdos informativos científicos de qualidade e credibilidade não duvidosa.

Com a popularização das *lives* à plataforma em tempos de pandemia, vem ganhando cada vez mais destaque, se tornando parte do dia a dia dos espectadores.

Além de proporcionar uma interação quase que imediata com o público, possibilitando a comunicação entre Comunidade e Universidade. Podendo ser abordados diversos temas que estão

restritos exclusivamente a comunidade acadêmica de uma forma dinâmica e interativa para um público mais amplo. Os dados iniciais de acesso são importantes e permitiram que fosse avaliada a necessidade de continuidade das divulgações com o intuito de manter um informativo científico com linguagem clara e simples que permita o acesso da população aos dados mais recentes sobre a ciência voltada para a área de microbiologia, imunologia e biologia molecular.

## 4. Conclusões

Os computadores, tablets, celulares, foram considerados por muito tempo como inimigos ao processo educacional, em alguns casos como distração em sala de aula (SEABRA, 2013). No entanto, com o ensino remoto esses dispositivos somam força ao aprendizado de estudantes e são ferramentas utilizadas para a busca de rápidas informações que não demandam muito tempo de leitura.

A tecnologia pode ser considerada um mecanismo eficaz para disseminação do conhecimento e atividades humanas em todos os segmentos sociais, atuando intensamente no processo de formação de opinião e conhecimento comum. A tecnologia digital tem representado a alternativa mais utilizada no contexto educacional pela necessidade de distanciamento em virtude da pandemia.

Desse modo, o uso do Instagram como ferramenta de divulgação científica se torna um grande aliado dos pesquisadores do mundo, encurtando a distância das informações científicas da população, contribuindo com o combate das “fake news” que estão sendo espalhadas principalmente durante este período.

Além disso, o Instagram é uma ferramenta de fácil acesso e já foi reportada como um dos principais meios de pesquisa pela população.

## 5. Apoio Financeiro

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG – Unidade de Ibirité).

## 6. Referências

ALENCAR, C. P.; JUNIOR, F. G. R. P. A Utilização das Redes Sociais Como Elementos Propulsor do Feminismo: Análise da Fanpage Não me Kalho. **Comunicação e sociedade: discussões**

**sobre práticas e impactos da comunicação e do cotidiano.** Porto Alegre, RS: Editora Fi, 2017.

GONÇALEZ, P. F. A circulação de notícias no Instagram no contexto da sociedade em midiaticização. In: **II SEEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PESQUISA EM MIDIATIZAÇÃO E PROCESSOS SOCIAIS**, 2018., São Leopoldo, RS: PPGCC- Unisinos, - 8 a 12 de abril de 2018. P 2-4.

JULIANI, D. P., et al. Utilização das redes sociais na educação: guia para o uso do Facebook em uma instituição de ensino superior. **RENOTE-Revista Novas Tecnologias na Educação**, v. 10, n. 3, 2012.

MACHADO, M. W; MATSUSHITA T. L. Globalização e Blocos Econômicos. **Revista de Direito Internacional e Globalização Econômica**, v: 1, n. 1, 2019.

MINHOTO, P. M. L. V. **A utilização do Facebook como suporte à aprendizagem da biologia: estudo de caso numa turma do 12º ano.** Bragança: Escola Superior de Educação. Dissertação de Mestrado em Ensino das Ciências, 2012.

SEABRA, C. **O celular na sala de aula.** Wordpress, mar. 2013. Disponível em:<<http://cseabra.wordpress.com/2013/03/03/o-celular-na-sala-de-aula/>>. Acesso em: 10 mai. 2020.

ZANCANARO, A., et al. Redes Sociais na Educação a Distância: uma análise do projeto e-Nova. Datagramazero: **Revista da Informação**, Florianópolis, v. 13, n. 2, abr. 2012.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## **ADAPTAÇÃO METODOLÓGICA DAS AULAS PRÁTICAS NA DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA FRENTE À NOVA REALIDADE CAUSADA PELA COVID-19**

**Resende<sup>1</sup>, J. G. O. S.; Resende<sup>2</sup>, J. D. S. A.**

<sup>1</sup> Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves – Curso de Enfermagem

<sup>2</sup> Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves – Curso de Enfermagem

E-mail: [jaine.resende@uniptan.edu.br](mailto:jaine.resende@uniptan.edu.br)

jane.resende@uniptan.edu.br

**Resumo:** O atual panorama vivenciado pelo mundo, causado pela COVID-19, e a consequente necessidade do isolamento social fez com que a educação se reinventasse na forma de ensinar. O ensino deixou de ser presencial e passou a ser remoto (síncrono). Isto pode ser observado através da realização de aulas práticas experimentais na disciplina de Microbiologia, realizada com os alunos do 2º período do Curso de Enfermagem do Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves (UNIPTAN). Este estudo teve como objetivo realizar aulas práticas em casa e apresentá-las on-line, utilizando materiais acessíveis e de baixo custo encontrado no ambiente domiciliar e registrar cada etapa da atividade através de fotos e vídeos. Para tanto, dividiu-se os discentes em 07 (sete) equipes com, aproximadamente, 06 alunos cada, os quais confeccionaram em suas residências, meios de cultura caseiros para crescimento bacteriano. Após a coleta das amostras e sementeira, os resultados encontrados foram discutidos e comparados com os outros grupos, uma vez que alguns grupos apresentaram resultados negativos e outros resultados positivos para o crescimento bacteriano, utilizando o mesmo procedimento metodológico. Concluiu-se que houve uma mudança significativa na forma de aprendizagem dos estudantes com a introdução das aulas remotas e que os experimentos apresentaram diferentes resultados em relação ao crescimento bacteriano. Os alunos também observaram que os micro-organismos estão presentes em todo lugar.

**Palavras-chave** Microbiologia; aulas práticas; materiais alternativos, ensino remoto.

### *1. Introdução*

O cenário emergencial atual que vivemos com esta pandemia fez com que as instituições de ensino migrassem para o regime de atendimento remoto (REAR), de modo a dar cobertura aos alunos, enquanto as instituições de ensino superior (IES) permanecem fechadas e as pessoas continuam em isolamento social (BEHAR, 2020).

Assim, diante desta pandemia e do atual cenário em que a educação se encontra, trabalhando de forma remota, a disciplina de Microbiologia, oferecida no ensino superior aos cursos das áreas de saúde, precisou se adaptar a este novo formato de aprendizagem. Esta disciplina necessita de atividades que permitam ao aluno enxergar “um mundo” dos organismos minúsculos. Este universo de seres infinitamente pequenos pode ser observado através de experimentos simples, que podem ser realizados em casa, com materiais alternativos, de fácil acesso e baixo custo. Estas aulas práticas estão sendo executadas previamente e apresentadas pelos alunos durante as aulas on-line (SILVA, 2018).

As atividades de Microbiologia são extremamente importantes para que o aluno compreenda, interprete e assimile estes conteúdos, inferindo, formulando hipóteses, elaborando questionamentos críticos a partir da análise de dados. Esta disciplina nos permite fazer descobertas importantes, mostrando ao aluno o quanto estes conteúdos pertencem ao dia-a-dia dele (SILVA, 2018).

O conteúdo abordado nestas aulas práticas, desenvolvidas com materiais alternativos, dá liberdade ao aluno para desenvolver os



experimentos em sua casa, no melhor horário, escolhendo o espaço que melhor se adequa à atividade, utilizando de materiais que possuem no ambiente domiciliar, seguindo um protocolo com cunho científico (SILVA, 2018).

O professor, neste formato de aula, ou seja, no ensino híbrido, constitui o mediador dessas atividades teóricas e práticas no ensino de Microbiologia para a educação superior, possibilitando ao aluno uma participação mais ativa e efetiva na construção de seu próprio conhecimento, visto as atividades práticas terem sido executadas sem a orientação presencial do docente. Ressalta-se que são novas habilidades adquiridas pelos docentes, pois tal recurso não sucede e nem inferioriza a presença do professor em sala, apenas modifica seu papel neste momento emergencial (MIRANDA *et.al.*, 2020). O aluno se torna agente, protagonista do processo, motivado e capaz de explicar os fenômenos ocorridos naquela prática realizada, com base em sua experiência profissional. Com a realização dessas atividades, o discente tem a oportunidade de perceber que a microbiologia não é um conteúdo exclusivamente teórico a ser decorado, mas uma ciência que está presente no seu cotidiano (ROMEIRO *et al.*, 2016).

Diante deste cenário, este estudo teve como objetivo realizar aulas práticas de Microbiologia em casa e apresentá-las on-line, utilizando materiais acessíveis e de baixo custo encontrado no ambiente domiciliar e registrar cada etapa da atividade através de fotos e vídeos.

## 2. Metodologias

### 2.1 Público-alvo

A metodologia utilizada neste estudo foi discutida na disciplina de Microbiologia, com os alunos do 2º período do Curso de Enfermagem do Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves (UNIPTAN), localizado na cidade de São João Del-Rei/MG, durante as aulas iniciais realizadas no 2º semestre/2020.

### 2.2 Amostragem

Foram formadas 07 (sete) equipes com, aproximadamente, 06 alunos cada, totalizando, aproximadamente 42 alunos.

### 2.3 Delineamento do estudo

Os grupos foram orientados e estimulados pela professora da disciplina a realizar buscas ativas em artigos científicos publicados na internet sobre

propostas didáticas de baixo custo e material acessível encontrado no ambiente domiciliar para a confecção de aulas práticas de Microbiologia.

O tempo para a realização da busca na internet, separação do material alternativo a ser utilizado na preparação e execução da aula prática e apresentação na aula remota síncrona foi de, aproximadamente, trinta dias.

Os alunos realizaram a aula prática em suas casas, documentando com fotos e vídeos e apresentaram durante duas aulas remotas ao vivo.

Em um dos experimentos apresentado na aula síncrona, o grupo utilizou os seguintes materiais: cotonete (swab), caldo de carne e/ou caldo de frango e gelatina incolor (meio de cultura), potes pequenos de plástico (placas de petri), água e objetos (amostra biológica/bactérias), conforme mostrado na figura 01.

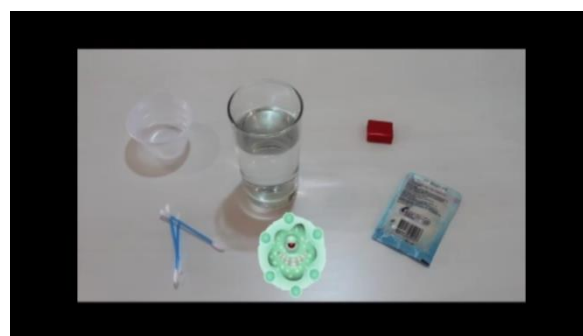


Figura 01: Materiais alternativos utilizados na realização da aula prática de Microbiologia

O meio de cultura caseiro foi confeccionado utilizando gelatina sem sabor, caldo de carne e/ou de frango e água, conforme orientações pré-estabelecidas.

A coleta das amostras dos materiais escolhidos pelos alunos (moeda, focinho de cachorro, chão, vaso sanitário, mucosa da boca, dentre outros), foi feita utilizando cotonetes e a semeadura realizada nos potes de plástico contendo o meio de cultura caseiro preparado previamente. As placas semeadas foram colocadas em estufa produzidas pelos próprios alunos. Um modelo de estufa confeccionada por um dos grupos foi uma casinha de cachorro de madeira com lâmpada acesa. Outros grupos deixaram as amostras em temperatura ambiente.

Ao final de cada apresentação, foram discutidos os resultados encontrados e comparados com os outros grupos. Este processo foi guiado pela professora da disciplina.



Observou-se que, a maioria dos grupos realizou o mesmo procedimento metodológico, porém, utilizando amostras biológicas diferentes. Assim, foram obtidos resultados diversos.

### 3. Resultados e Discussão

A utilização dessa metodologia permitiu uma melhor assimilação pelos alunos, do conteúdo abordado na disciplina, mantendo o aluno mais proativo, engajado, interessado em participar das aulas no formato remoto. O discente passa a ter mais autonomia, favorecendo um melhor desempenho (MIRANDA, *et. al.*, 2017).

A atividade proposta aos alunos compreendeu cinco pontos importantes: o aprendizado dos principais conceitos em Microbiologia; a investigação da presença microbiana no dia-a-dia do aluno; o desenvolvimento do pensamento crítico do discente ao apresentar resultados diferentes para uma mesma metodologia utilizada, a relação do que foi observado no experimento com as implicações do seu cotidiano e a adaptação das aulas experimentais no ensino remoto.

Foi observado que os resultados apresentados pelos alunos foram diversificados. Alguns grupos possuíam resultados positivos para o crescimento bacteriano, ao passo que os resultados de outras equipes não apresentaram crescimento microbiano nos meios de cultura utilizados. Os próprios alunos, tendo a professora como mediadora, desenvolveram um olhar e pensamento crítico em relação aos resultados obtidos, elucidando possíveis erros ocorridos ao longo do desenvolvimento do processo experimental. Percebeu-se também que, a Microbiologia é uma ciência que está presente no nosso cotidiano, e que os micro-organismos são ubíquos (ROMEIRO *et.al.*, 2016).

Neste novo cenário de pandemia em que estamos vivendo, faz-se necessário reinventar e readaptar metodologias alternativas como recurso didático para fomentar o aprendizado do aluno e estimular práticas contextualizadas ao seu cotidiano. A disciplina de Microbiologia exige atividades práticas para enriquecer, facilitar e fixar os conceitos básicos relacionados aos micro-organismos (BARBOSA & BARBOSA, 2010).

### 4. Conclusões

Perante a real necessidade do isolamento social da população mundial, em que as informações atuais disponíveis sugerem que a transmissão do

vírus denominado SARS-CoV-2 se faz de pessoa para pessoa e ocorre por meio de gotículas respiratórias, que são expelidas durante a fala, tosse ou espirro e por contato com as superfícies contaminadas por essas gotículas, fez-se necessário uma readaptação do ensino presencial para o ensino remoto. A realização de aulas experimentais em domicílio foi uma das alternativas encontradas para que os alunos mantivessem contato com a experimentação e percebessem a relação entre teoria e prática. A disciplina de Microbiologia foi uma das que sofreu essa adaptação. Foi uma mudança significativa na forma de aprender.

As aulas práticas realizadas com materiais alternativos foram satisfatórias, uma vez que esta metodologia pode ser trabalhada em qualquer realidade.

A percepção dos alunos em relação à importância desta ciência culminou com os resultados obtidos através da experimentação e os discentes perceberam a grande variedade de micro-organismos existentes ao seu redor.

### 5. Apoio Financeiro

UNIPTAN (Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves)

### 6. Agradecimentos

Aos alunos do 2º período da disciplina de Microbiologia do Curso de Enfermagem pelo empenho e dedicação na realização das atividades propostas.

### 7. Referências

- BARBOSA, F.H. F.; BARBOSA, L. P. J. L. PAULA, L. Alternativas metodológicas em Microbiologia viabilizando atividades práticas. **Revista de biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 2, 2010. Disponível em: <  
<https://www.redalyc.org/pdf/500/50016922015.pdf>  
> Acessado em 12 out. 2020.
- BEHAR, P.A. **O Ensino Remoto Emergencial e a Educação à Distância**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2020. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/coronavirus/base/artigo-o-ensino-remoto-emergencial-e-a-educacao-a-distancia/> Acessado em 12 out. 2020.

MIRANDA, C.C.; VARGES, R.G.; CHAVES, T.A.; PÓVOA, H.C.C.; IORIO, N.L.P.P.

**Metodologia ativa para o ensino de Microbiologia: Inovação nas monitorias. III Congresso de Inovação e Metodologias no Ensino Superior. 2017.**

MIRANDA, R. V.; MORET, A.S.; SILVA, J.C.; SIMÃO, B. Híbrido: Novas Habilidades Docentes Mediadas pelos Recursos Tecnológicos. **EaD em Foco**, 2020; 10(1): e913

ROMEIRO, S. S.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, L. S. **Microbiologia: uma abordagem através de aulas práticas/experimentais. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL.**, 1., 2016 . In: Anais... Jaboticabal-SP: FATEC-JB, v. 8, Número Especial, 2016.

SILVA, F. G. L. **Microbiologia no Ensino Médio: proposta de um roteiro de aulas práticas experimentais com materiais alternativos.** Vitória de Santo Antão, 2018.

Resumo submetido, avaliado e aceito no formato expandido, com autorização para publicação no formato expandido.

## O USO DE UM MODELO 3D DE BACTERIÓFAGO PARA O ENSINO SOBRE VÍRUS

Rodrigues<sup>1,2</sup>, M. F. R.; Pereira<sup>1</sup>, L. P.; Santos<sup>3</sup>, J. R. E.; Viana<sup>2</sup>, A. V. R.; Amaral<sup>4</sup>, S. S.; Costa<sup>2</sup>, F. J.; e Casteluber<sup>1</sup>, M. C. F.

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibitaré, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP).

<sup>2</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibitaré, Departamento de Ciências Biológicas, Grupo de Ensino de Biologia e Tecnologias Digitais de Informação e Comunicação Aplicadas à Educação (BIOTEC).

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia (LabMic).

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

E-mail: [matheusfelipe2552@gmail.com](mailto:matheusfelipe2552@gmail.com)

**Resumo:** O presente trabalho foi desenvolvido com acadêmicos de licenciatura em Ciências Biológicas de uma Universidade Pública do Estado e objetivou verificar as contribuições da utilização de um modelo em 3D de bacteriófago para o ensino da Virologia. Os dados foram obtidos por meio da observação e sugerem que houve contribuições no processo de ensino-aprendizagem. Isso permite inferir que a utilização de outros modelos em 3D pode favorecer o aprendizado nos demais grupos de microrganismos.

**Palavras-chave:** Microbiologia; Vírus, Modelo em 3D.

### 1. Introdução

A Microbiologia é a Ciência que se dedica ao estudo dos microrganismos. Os seres que são alvos de estudo dessa área são os protozoários, algas unicelulares, bactérias, fungos e vírus. Para cada um desses há uma subárea da Microbiologia para melhor estudá-los.

Uma dessas subáreas é a virologia, dedicada ao estudo dos vírus. Eles são as menores entidades biológicas e são parasitas intracelulares obrigatórios, já que não possuem metabolismo próprio e necessitam do maquinário de uma célula hospedeira para nela se multiplicarem. Os vírus normalmente possuem como ácido nucléico apenas o DNA ou o RNA, mas em alguns casos, podem possuir ambos. Seu material genético é protegido

por um envoltório proteico denominado capsídeo. Em algumas espécies, esse capsídeo é protegido por uma camada fosfolipídica chamada de envelope (TORTORA, et al, 2012).

Podemos observar a aplicabilidade dos conhecimentos da Virologia em diversas áreas do nosso cotidiano como, por exemplo, a utilização de vírus na agricultura, atuando principalmente no controle de pragas agrícolas (CASTRO, et al, 2020). Na área da saúde, há a produção de vacinas recombinantes, terapias gênicas e o desenvolvimento de fármacos.

Apesar dessa relevância, verifica-se que a compreensão e entendimento dos benefícios dos vírus é pouco conhecida e divulgada nas mídias. Observa-se que a concepção da população a respeito deles está inteiramente relacionada a doenças ou situações pejorativas como Oliveiros e colaboradores (2011) demonstram em seu trabalho.

Nesse contexto, o ensino da Microbiologia se torna importante e necessário para ampliar a visão acerca dos vírus e desmistificar os preconceitos a eles relacionados no ambiente escolar. O docente, além de apresentar questões epidemiológicas, também deve contemplar a utilização desses seres microscópicos no desenvolvimento de tecnologias e os benefícios que essas podem trazer aos seres vivos.

Porém, ensinar Virologia é, de um modo geral, uma tarefa árdua para os docentes e desestimulante para os discentes. Isso se deve a diversos fatores, mas o principal deles é relacionado às dimensões manométricas dos vírus.

A visualização e identificação desses seres só pode ser realizada com técnicas ou materiais específicos que possuem um valor aquisitivo elevado.

Outro aspecto que não contribui para o entendimento desse grupo de organismos é a utilização de metodologias tradicionais realizadas principalmente com a utilização dos livros didáticos.

Nesse cenário, o uso de metodologias inovadoras pode favorecer o processo de ensino-aprendizagem. Porém, Rodrigues e colaboradores (2020) destacam que metodologias alternativas devem ser empregadas em conjunto com outras para que as contribuições sejam significativas.

Impressões em 3D podem ser utilizadas nesse contexto, contribuindo para o uma aprendizagem tangível e, conseqüentemente, significativa. Segundo Aguiar (2016) o modelo de impressão em 3D “consiste na construção automatizada de objetos sólidos, camada por camada, a partir de um arquivo digital com a imagem do objeto”.

Para Patreze e colaboradores (2018) a modelagem em 3D caracteriza-se como algo novo, sendo que as impressoras são capazes de construir objetos tridimensionais a partir de material plástico fundido. Os mesmos autores também destacam que a elaboração desses materiais é de grande relevância para o processo de ensino-aprendizagem em Ciências e Biologia, principalmente em conteúdos que abordam o intangível, como é o caso da Virologia.

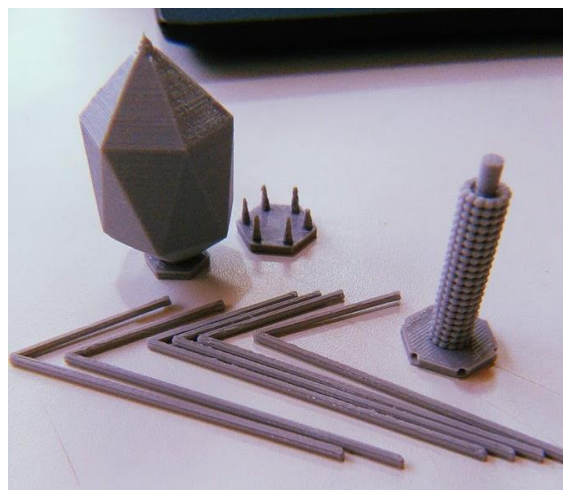
Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as contribuições da utilização de um modelo didático em 3D de um bacteriófago com acadêmicos de licenciatura em Ciências Biológicas de uma Universidade Pública do Estado.

## 2. Metodologias

Inicialmente, foi realizada uma busca por modelos de vírus já idealizados para a impressão em 3D. Após a visualização de alguns modelos no software “Cliever Studio”, foi selecionado o bacteriófago para os testes de impressão. O procedimento foi realizado em uma impressora 3D modelo “CL2 Pro Extrusor Duplo” da marca Cliever, no FabLab da Escola Técnica Sandoval Soares de Azevedo, no Município de Ibité.

A impressão durou 18 horas e 17 minutos, sendo 25 minutos gastos apenas para a impressão da base em que o bacteriófago seria impresso. O material usado pela impressora foi um filamento plástico, fundido na máquina para criar as partes do vírus.

Quando o bacteriófago ficou pronto, suas partes foram destacadas da base e sua montagem foi realizada com supercola (figura 1).



**Figura 1:** Partes do fago destacadas para montagem.

Após a secagem, o modelo foi utilizado em uma aula sobre os vírus na Universidade em questão. Durante a sua utilização, os comentários dos acadêmicos foram observados e anotados para posterior análise acerca da relevância desse modelo no ensino de Virologia.

## 3. Resultados e Discussão

O bacteriófago montado possui 13 centímetros de altura e apresenta grande fidelidade às estruturas de um fago (uma característica da impressão em 3D), como é mostrado na figura 2 abaixo:



**Figura 2:** Modelo didático 3D de um bacteriófago.

O bacteriófago foi utilizado em uma aula de Microbiologia Geral sobre os vírus, tendo sido mostrado aos graduandos e passado para que os mesmos pudessem tocá-lo e visualizar de perto suas estruturas.

Dentre os comentários feitos pelos acadêmicos durante a observação do material, destaca-se que alguns não imaginavam que o vírus possuía tantos detalhes por ser um organismo tão pequeno e que outros achavam que ele seria frouxo e sem nenhuma organização, por mais que já tivessem visualizado imagens na internet e em livros didáticos.

Observa-se, então, que os graduandos compreenderam de forma prática que os vírus possuem organização estrutural, apesar de seu tamanho manométrico.

Eles também perceberam que a proposta da modelagem em 3D pode contribuir de forma significativa no ensino de Ciências e Biologia. Os acadêmicos mencionaram que esse tipo de modelo poderia ser utilizado em escolas para auxiliar no ensino-aprendizagem sobre vírus, posto que esse, muitas vezes, depende da imaginação dos estudantes.

Dessa forma, a aplicação do modelo de fago permitiu que os licenciandos compreendessem melhor as estruturas dos vírus. Para Patreze e colaboradores (2018), os modelos em 3D no ensino permitem que “o aprendizado seja aprimorado principalmente quando são envolvidos conceitos difíceis de serem visualizados e entendidos abstratamente”.

Além disso, destaca-se que a utilização das impressoras 3D permite o desenvolvimento de “minifábricas” de materiais didáticos, que podem ser distribuídos e utilizados em atividades práticas realizadas em escolas (AGUIAR, 2016).

Por fim, a utilização desses modelos em 3D pode ser agregada a outras metodologias, como jogos didáticos, atividades que contemplem o ensino de ciências por investigação, práticas experimentais, dentre outras (RODRIGUES, et al., 2020). Ou seja, a utilização de diferentes metodologias favorece a inovação e o processo de ensino-aprendizagem.

Sendo assim, destaca-se que a utilização do presente modelo para o ensino dos vírus na disciplina de Microbiologia Geral de uma Universidade Pública gerou contribuição para a aprendizagem dos acadêmicos, uma vez que eles demonstraram uma compreensão acerca dos conceitos relacionados à temática destacada.

#### 4. Conclusões

O presente trabalho demonstrou que a utilização de um modelo em 3D gerou benefícios para a aprendizagem de acadêmicos de licenciatura de uma Universidade Pública.

Destaca-se, ainda, que a impressão de outros modelos relacionados aos vírus e demais grupos de microrganismos será realizada para que o ensino-aprendizagem de Microbiologia. Isso contribuirá para uma aprendizagem mais significativa tanto no ensino básico como no ensino superior, estimulando as percepções e questionamentos científicos dos estudantes, principalmente deficientes visuais

#### 5. Apoio Financeiro

O presente trabalho teve o apoio financeiro da Fundação Helena Antipoff (FHA).

#### 6. Referências

AGUIAR, Leonardo de Conti Dias. **Um processo para utilizar a tecnologia de impressão 3D na construção de materiais didáticos para o ensino de Ciências**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Educação para a Ciência. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137894>>. Acesso em: 02 Out. 2020.

CASTRO, Maria Elita Batista de.; et al. Controle de artrópodes-praga com vírus entomopatogênicos. **Embrapa Milho e Sorgo- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1121910/1/Controle-atropodes.pdf>>. Acesso em: 05 Out. 2020.

OLIVEROS, Paula Bergantin; SILVEIRA, Mariana Leite Da; ARAÚJO, Magnólia F. De. Concepções espontâneas sobre vírus dos alunos do 6º ao 9º ano. **VIII Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências (ENPEC)**, Campinas, 2011. Disponível em: <<http://www.nutes.ufrj.br/abrapec/viii/enpec/resumos/R0346-1.pdf>>. Acesso em: 02 Out. 2020.

PATREZE, Camila Maistro; PALAIO, Sueny Calazans dos Santos; DE ALMEIDA, Marcus Vinicius Lima. Desenvolvimento de modelos impressos em 3D para o ensino de ciências. **Revista ENCITEC**, [S.l.], v. 8, n. 3, p.

70-82, dez. 2018. ISSN 2237-4450. Disponível em: <<http://srvapp2s.urisan.tche.br/seer/index.php/encitec/article/view/2369>>. Acesso em: 10 Out. 2020.

RODRIGUES, Matheus Felipe dos Reis.; et al.. O USO DOS LACTOBACILOS PARA O ENSINO DA MICROBIOLOGIA NO 7º ANO DO ENSINO FUNDAMENTAL EM UMA ESCOLA PÚBLICA DO MUNICÍPIO DE IBIRITÉ/MG.. **In: Anais do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia**. Anais...Diamantina(MG) Online, 2020. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/icobicet2020/260487-o-uso-dos-lactobacilos-para-o-ensino-da-microbiologia-no-7?-ano-do-ensino-fundamental-em-uma-escola-publica-do-mu>>. Acesso em: 11 Out. 2020.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2012. p. 934-934.