

Desenvolvimento de método para avaliar a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies abióticas com o modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*

Rodrigo Campos da Silva

Orientador: Alexandre José Macedo

Co-orientador: Danielle da Silva Trentin

Laboratório de Biofilme e Diversidade Microbiana, Faculdade de Farmácia, UFRGS

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são a principal causa de morte no mundo, sendo que as infecções bacterianas contribuem substancialmente com esta alta taxa de mortalidade. A formação de biofilmes é um fator de virulência que corrobora para o estabelecimento e cronicidade de doenças infecciosas. Cerca de 80% das infecções microbianas estão associadas à formação de biofilmes e nestas estruturas as bactérias são menos sensíveis aos antibacterianos e à resposta imune do hospedeiro.

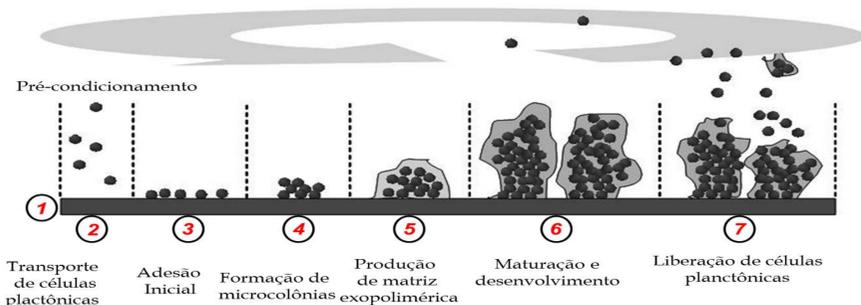


Figura 1: Etapas na formação de um biofilme

Estudos focados no entendimento da virulência e da patogenicidade bacteriana assim como na identificação de compostos bioativos requerem a utilização de modelos experimentais animais. Sabe-se que os custos relacionados com modelos mamíferos são bastante elevados e existe uma tendência mundial na redução do uso de modelos mamíferos para experimentação. Este cenário impulsionou o desenvolvimento de modelos animais alternativos e o uso de invertebrados, como os insetos, representa uma opção promissora, pois além da manutenção laboratorial envolver menor custo, ainda não há restrição ética para o seu uso. Atualmente larvas de *Galleria mellonella* têm se destacando na comunidade científica como hospedeiros experimentais para estudos de virulência microbiana. A figura 2 representa as fases do ciclo evolutivo da espécie *G. mellonella*.

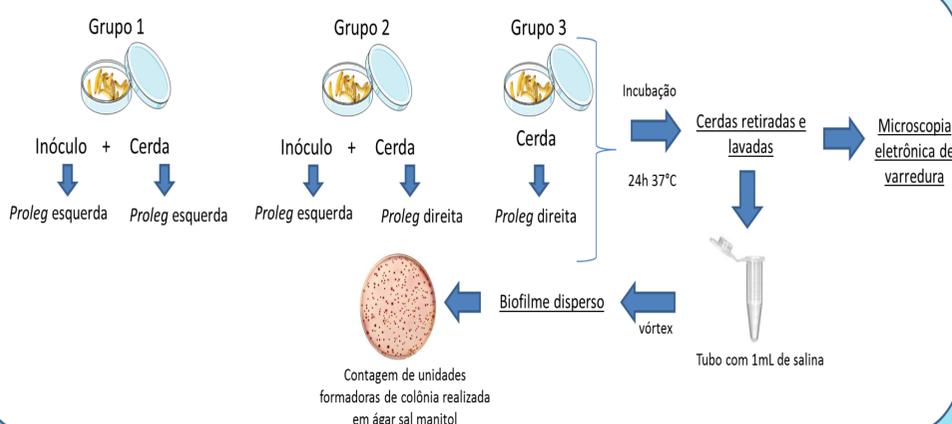


Figura 2: Ciclo evolutivo da espécie *G. mellonella*

Levando em consideração a problemática dos biofilmes e a falta de metodologias que avaliem a sua formação no modelo de larvas de *G. mellonella*, este estudo tem como objetivo desenvolver uma metodologia que permita analisar a formação de biofilme de *S. aureus* em uma superfície abiótica que mimetize um implante. Tal metodologia possibilitará também futuros estudos para avaliação da eficácia de compostos na prevenção da formação de biofilmes ou na erradicação de biofilmes já formados por bactérias patogênicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 e larvas pesando de 0,22 - 0,26 g. As larvas foram criadas em nosso laboratório com alimentação artificial e mantidas a 26°C. Primeiramente foi realizada a padronização do inóculo a ser administrado via sistêmica nas larvas de forma que não causasse a morte das larvas nas primeiras 24h (inóculo inicial de $\sim 3 \times 10^4$ UFC/mL). Em seguida, este inóculo e uma cerda de escova dental estéril de 1 cm foram inseridos na última *proleg* das larvas, e seguiu-se o fluxograma como demonstrado no esquema abaixo. A formação de biofilme nas cerdas foi avaliada pela determinação do número de UFC de *S. aureus* aderidas ao material após 24 h de infecção e por microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados os seguintes controles (i) para demonstrar que as larvas não possuem microbiota que pudesse interferir com os resultados obtidos tanto de contagem quanto de microscopia (Grupo 3) e (ii) para verificar se as cerdas não impediriam o crescimento bacteriano nas larvas, sendo que as larvas foram infectadas, não receberam a cerda, e então maceradas para determinar a contagem de UFC/larva (Grupo homogenato). Os experimentos foram repetido 3 vezes com duas larvas por experimento para cada parâmetro analisado, sendo a contagem de UFC realizada em placas de ágar sal manitol para impedir o crescimento de bactérias da microbiota das larvas. A análise estatística foi realizada entre os Grupos 1 e 2 com o teste t-Student ($p < 0,01$).



RESULTADOS

Os Grupos 1 (grupo infectado através da mesma proleg que recebeu a cerda) e Grupo 2 (grupo infectado em proleg diferente da que recebeu a cerda) não apresentaram diferença estatística em relação a contagem de UFC/cerda, sugerindo uma distribuição homogênea do inóculo bacteriano de *S. aureus* durante a infecção das larvas. A contagem de UFC do homogenato realizada e comparada com os Grupos 1 e 2 demonstrou que a presença das cerdas não interferem no crescimento bacteriano. Além disso, quando comparamos os Grupos (1 e 2) e o homogenato com o inóculo inicial, evidencia-se um aumento significativo da concentração de bactérias demonstrando a capacidade destes micro-organismos em se multiplicarem neste hospedeiro. O controle Grupo 3 confirma a ausência de micro-organismos na microbiota larval que pudesse crescer no meio ágar sal manitol e interferir nos resultados.

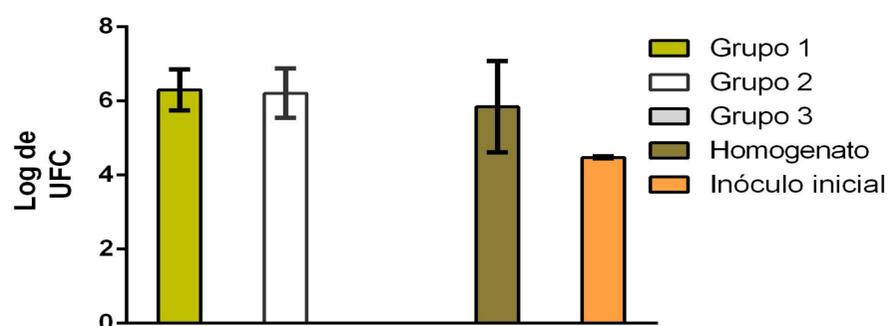


Figura 4: Contagem de UFC de *S. aureus*. Grupo 1, 2, 3 (UFC/cm de cerda); Homogenato e Inóculo inicial (UFC/mL)

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a adesão das células bacterianas e formação de biofilmes em ambos grupos testados: Grupos 1 (D, E, F) e 2 (G, H, I). Nas imagens do Grupo 3 (larvas contendo somente cerdas) não foi observada a presença de bactérias, confirmando o resultados de determinação de UFC. O controle de adesão (A, B, C) foi realizado a partir de uma cerda incubada, *in vitro*, em caldo nutriente contendo suspensão bacteriana, demonstrando a capacidade do *S. aureus* em aderir ao material das cerdas.

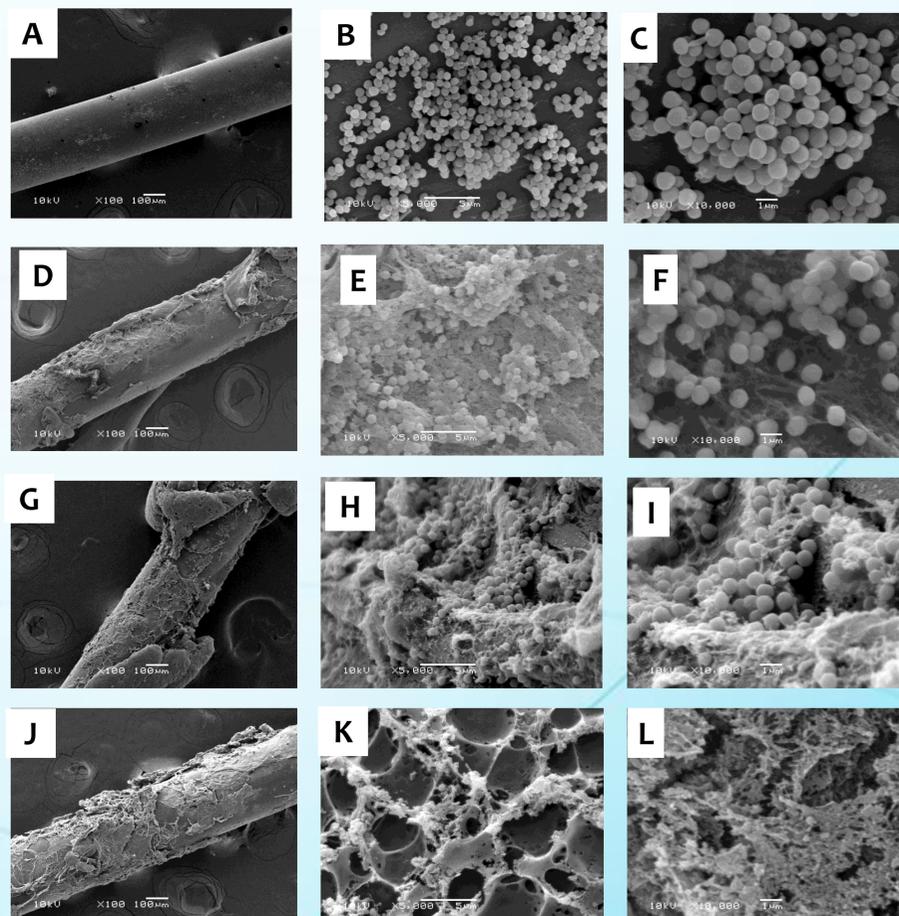


Figura 5: As imagens A, B e C representam o controle de adesão do material; D, E e F o Grupo 1; G, H e I o Grupo 2 e J, K e L o Grupo 3. Primeira, segunda e terceira coluna apresentam manificação de 100 x, 5000x e 10000x, respectivamente.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados é possível propor um método rápido e factível para avaliar a formação de biofilme em uma superfície abiótica implantada em larvas de *G. mellonella*. Devido à escassez de métodos que avaliem a formação de biofilme *in vivo*, este protocolo se torna de grande interesse para melhor entender a formação de biofilme, bem como, para determinar a eficácia de compostos antibiofilme *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

