

Método alternativo em larvas de *Galleria mellonella* para estudar a infecção e tratamento de biofilmes

Rodrigo Campos da Silva
Orientador: Alexandre José Macedo

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.

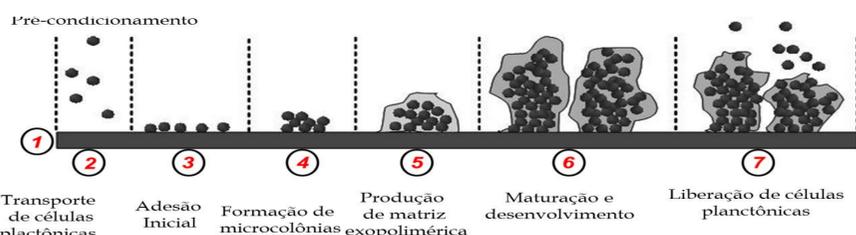


Figura 1: Etapas na formação de um biofilme

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.

Levando em consideração a problemática dos biofilmes e a falta de metodologias que avaliem 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 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em uma superfície abiótica (cerda de escova dental) que mimetize um dispositivo médico.

MATERIAIS E MÉTODOS

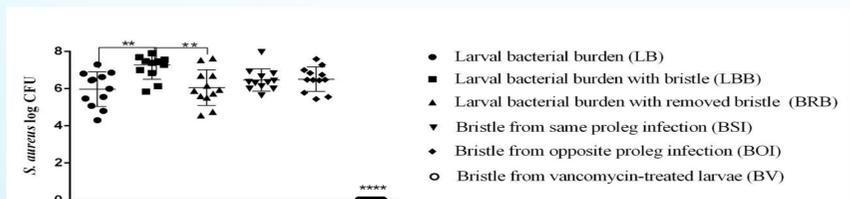
Inicialmente um inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 e *Staphylococcus . epidermidis* ATCC 35984 foi padronizado a fim de ser injetado de forma sistêmica de modo que não ocorresse morte de nenhuma larva em um período de 48h. Larvas pesando de 0,22 - 0,26 g, criadas em nosso laboratório com alimentação artificial e mantidas a 26°C, foram utilizadas. Após padronização quatro grupos foram formados:

- (I) **Mesma Proleg (BSI)** – Uma cerda de escova dental de 1 cm foi inserida na ultima proleg com o inóculo e cerda inseridos na mesma proleg.
- (II) **Proleg Oposta (BOI)** – Igual ao grupo anterior, mas a cerda foi inserida na proleg oposta ao inóculo.
- (III) **Cerda e salina(BS)** – A cerda foi inserida junto a uma administração de salina
- (IV) **Cerda de larvas tratadas com vancomicina (BV)** – 30 minutos após inserção das cerdas e do inóculo as larvas foram tratadas com vancomicina 50mg/Kg
- (V) **Homogenato (LB)** – Homogenato de larvas que sofreram apenas o inóculo

Após 24h de incubação as cerdas foram removidas, das larvas vivas, e lavadas duas vezes em uma solução salina. As células aderidas foram desprendidas utilizando-se vórtex/sonicador e a quantidade de bactéria total foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)/cerda em ágar sal manitol após 24h de incubação a 37°C .

Duas cerdas de cada grupo, depois de retiradas das larvas e lavadas, foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV)

RESULTADOS



O grupo BS não apresentou contagem de UFC após 24h demonstrando, assim, que a microbiota das larvas não interferiram com os resultados obtidos. Os grupos BSI e BOI não apresentaram diferenças significativas em relação à contagem de UFC/cerda indicando uma homogeneidade do inóculo bacteriano.

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a adesão das células bacterianas e formação de biofilmes em ambos grupos testados: Grupos BSI (D, E, F) e BOI (G, H, I). Nas imagens do Grupo BV ,larvas tratadas com vancomicina não foram observadas 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.

CONCLUSÃO

Em conclusão, obteve-se um método capaz de analisar a adesão microbiana *in vivo* simulando um modelo de dispositivo médico para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Futuramente esta metodologia pode ser utilizado para avaliar a eficácia de potenciais fármacos com atividade antibiofilme e diminuir o número de animais vertebrados em experimentos.

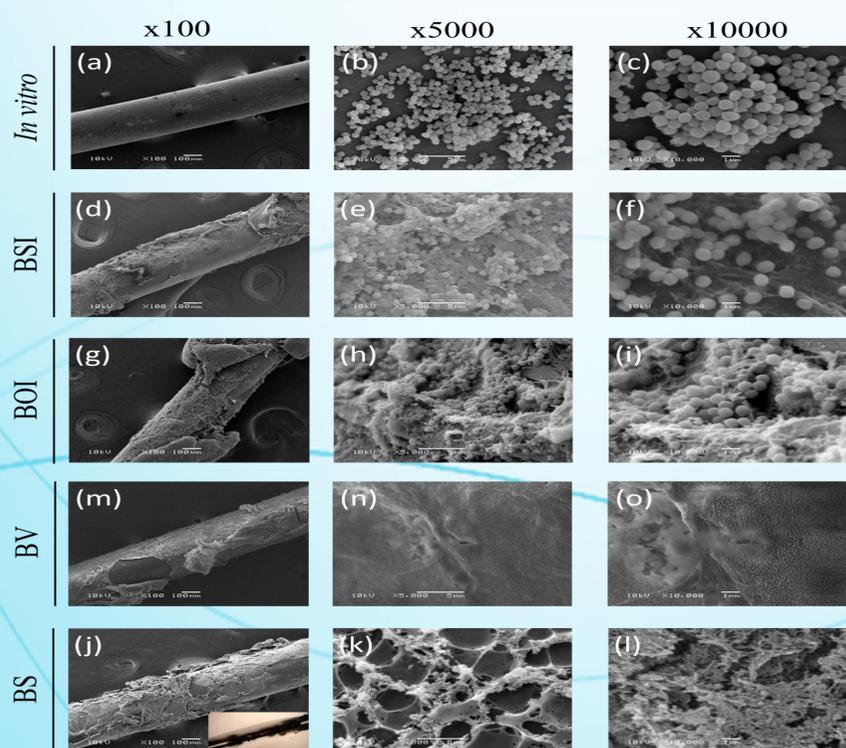


Figura 3: (A) : Gráfico referente as contagens realizadas nas cerdas e no corpo das larvas. (B) As imagens A , B e C representam o controle de adesão do material; D, OE e F o Grupo e G, H e I o Grupo BSE e BOI. M, N o Grupo BV. E por último J, K e L o Grupo BS Primeira segunda e terceira coluna apresentam magnificação de 100 x, 5000x e 10000x, respectivamente.