

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

RAISSA GUARÁ ASSUNÇÃO

***Pseudomonas aeruginosa* INDUZ PNEUMONIA SEVERA EM
MODELO MURINO DE INFECÇÃO LEVANDO A DANOS
PULMONARES E SEPSE LETAL**

São Luís

2024

RAISSA GUARÁ ASSUNÇÃO

***Pseudomonas aeruginosa* INDUZ PNEUMONIA SEVERA EM
MODELO MURINO DE INFECÇÃO LEVANDO A DANOS
PULMONARES E SEPSE LETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para obtenção do título
de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

São Luís

2024

Assunção, Raissa Guará.

Pseudomonas aeruginosa Induz Pneumonia Severa Em Modelo Murino de Infecção Levando A Danos Pulmonares e Sepses Letal / Raissa Guará Assunção. - 2024.

94 p.

Orientador(a): Afonso Gomes Abreu Junior.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. *Pseudomonas Aeruginosa*. 2. *Pneumonia*. 3. *Sepses*.
4. . 5. . I. Abreu Junior, Afonso Gomes. II. Título.

RAISSA GUARÁ ASSUNÇÃO

***Pseudomonas aeruginosa* INDUZ PNEUMONIA SEVERA EM
MODELO MURINO DE INFECÇÃO LEVANDO A DANOS
PULMONARES E SEPSE LETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em 28/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior/ Universidade Ceuma

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Prof. Dr. Luís Cláudio da Silva Nascimento

Profª. Dra. Marliete Carvalho da Costa

Profª. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa

Dedico esta pesquisa a minha mãe Socorro Guará
e ao meu marido Rafael Giacomini.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este trabalho primeiramente a Deus, cuja graça e orientação foram essenciais no meu caminho durante toda a jornada deste doutorado.

Ao meu orientador, pai científico, Afonso Gomes Abreu expresse minha profunda gratidão. Sua paciência e apoio incondicional foram essenciais para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos ao longo desses 8 anos de pesquisa científica. Suas orientações foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional ao longo desses anos de convivência.

À minha família, especialmente aos meus pais José Ribamar Cabral e Olimpio Filho, Cristiane Guará e Socorro Guará, agradeço por todo o amor, encorajamento e sacrifício ao longo dos anos. Sei que mesmo no plano espiritual, minha mãe Cristiane está sempre comigo.

As minhas tias Viviane e Luciane Guará e a minha avó Vilma que sempre estiveram presentes torcendo para que mais essa etapa da minha vida acadêmica fosse concluída com êxito.

Ao meu marido Rafael Giacomini, agradeço por ser meu companheiro de vida e por estar ao meu lado em todos os momentos, proporcionando o apoio emocional e auxílio em tudo que foi solicitado, mesmo possuindo uma área de atuação diferente.

Aos meus sogros, Ivaneide Giacomini e Júlio Licá e minha cunhada Jullie Giacomini por todo estímulo e apoio ao longo dessa trajetória.

As minha amigas Lorena Araujo, Carliane, Lara Duailibe, ao meu amigo Wellison Amorim e aos meus primos Leonardo Guará, Layanna Guará, Mariane Guará, Macela Guará por ouvirem minhas preocupações e por compartilharem minhas alegrias ao longo deste percurso acadêmico.

Agradeço também ao meu grupo de pesquisa Gepat, só eles sabem o quanto foi difícil chegar até aqui depois de tantos experimentos refeitos, choros e angústias. Sem eles, tudo seria mais difícil.

A Universidade Ceuma e o laboratório LAPMIC pelo material disponibilizado para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os professores, colegas e instituições que contribuíram de alguma forma para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria comum no ambiente, encontrada em solo, água e hospitais, capaz de causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos ou hospitalizados. Quando infecta os pulmões, pode levar a doenças como pneumonia, manifestada por febre, tosse, falta de ar e dor no peito. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de virulência do isolado clínico de *P. aeruginosa* PAV112 em um modelo de infecção pulmonar. Inicialmente foi realizado um teste de sensibilidade aos antimicrobianos para avaliar o perfil de resistência do isolado, bem como a detecção de genes de virulência (*exoU*, *exoT*, *exoS*, *phzI*, *phzM*, *oprI*, *lasA*, *apr*, *pilA*, *pilB*, *lasB*, *plcH*, *plcN*, *oprL* e *ehaJ*) e resistência (*Oxa23*, *Oxa51*, *KPC*, *CTX-M*, *SHV*, *NDM-1*, *ampC*, *TEM*) por PCR. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de produção de biofilme pela amostra, bem como a avaliação do perfil de virulência de PAV112, *in vivo*, utilizando tanto larvas de *Tenebrio molitor* como camundongos C57BL/6, com idade entre 8 e 12 semanas. Para o modelo de pneumonia, os animais foram instilados por via intratraqueal com 40 µL de PAV112 na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL e a sobrevivência dos mesmos foi monitorada a cada 12 horas durante 5 dias. Um outro grupo de animais foi eutanasiado após 24 horas para coleta de amostras biológicas, utilizadas para quantificação celular, avaliação de parâmetros imunológicos e histológicos, bem como para quantificação da carga bacteriana nos tecidos. A partir da PCR foi possível detectar a presença de genes de virulência (*exoU*, *exoT*, *exoS*, *phzI*, *phzM*, *oprI*) e de resistência (OXA-23, OXA-51). PAV112 foi capaz de formar biofilme e de causar alta letalidade em larvas de *T. molitor*. Na pneumonia experimental, a infecção bacteriana afetou significativamente a sobrevivência dos animais, causando pneumonia acompanhada de sepse letal em 24 horas. Foi possível observar uma queda significativa de leucócitos totais e aumento de células na medula e lavado broncoalveolar, bem como a disseminação da bactéria do pulmão para a circulação sanguínea e para outros órgãos como sangue, fígado e rins. Além disso, houve um aumento significativo na produção de óxido nítrico tanto no sangue como no lavado broncoalveolar, bem como da citocina inflamatória IL-6 nos animais infectados com PAV112. A análise histológica do grupo infectado mostrou a presença de lesões características de pneumonia, com infiltrado inflamatório, áreas multifocais de edema e congestão de leve a moderada. Sendo assim, esses achados indicam que *P. aeruginosa* PAV112 foi capaz de induzir pneumonia severa nos animais com evolução rápida para sepse, demonstrando um grande potencial de virulência da amostra e sua importância no contexto clínico.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, pneumonia, sepse.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a common environmental bacterium, found in soil, water and hospitals, capable of causing serious infections in immunocompromised or hospitalized individuals. When it infects the lungs, it can lead to illnesses such as pneumonia, manifested by fever, cough, shortness of breath and chest pain. The objective of this study was to evaluate the potential virulence of the clinical isolate of *P. aeruginosa* VAP112 in a pulmonary infection model. Initially, an antimicrobial sensitivity test was carried out to evaluate the resistance profile, as well as the detection of virulence (*exoU*, *exoT*, *exoS*, *phzI*, *phzM*, *oprI*, *lasA*, *apr*, *pilA*, *pilB*, *lasB*, *plcH*, *plcN*, *oprL* and *ehaJ*) and resistance genes (*Oxa23*, *Oxa51*, *KPC*, *CTX-M*, *SHV*, *NDM-1*, *ampC*, *TEM*) by PCR. Subsequently, biofilm production was evaluated, as well as the virulence profile of VAP112, *in vivo*, using both *Tenebrio molitor* larvae and C57BL/6 mice. For the pneumonia model, the animals were instilled intratracheally with 40 μ L of VAP112 at a concentration of 1.5×10^7 CFU/mL and their survival was monitored every 12 hours for 5 days. Another group of animals was euthanized after 24 hours to collect biological samples, which were used for cell quantification, the evaluation of immunological and histological parameters, as well as the quantification of bacterial load in tissues. Using PCR, it was possible to detect the presence of virulence (*exoU*, *exoT*, *exoS*, *phzI*, *phzM*, *oprI*) and resistance (OXA-23, OXA-51) genes. VAP112 was capable of forming biofilm and causing high lethality in *T. molitor* larvae. In experimental pneumonia, bacterial infection significantly affected the survival of animals, causing pneumonia accompanied by lethal sepsis. It was possible to observe a significant drop in total leukocytes and an increase in cells in the marrow and bronchoalveolar lavage, as well as the spread of bacteria from the lung to the blood circulation and to other organs such as the blood, liver and kidneys. Furthermore, there was a significant increase in the production of nitric oxide in both blood and bronchoalveolar lavage, as well as the inflammatory cytokine IL-6, in animals infected with VAP112. Histological analysis of the infected group showed the presence of lesions characteristic of pneumonia, with inflammatory infiltrate, multifocal areas of edema, and mild to moderate congestion. Therefore, these findings indicate that *P. aeruginosa* VAP112 was capable of inducing severe pneumonia in animals with rapid progression to sepsis, demonstrating the sample's great potential for virulence and its importance in the clinical context.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, pneumonia, sepsis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAL	Lavadobroncoalveolar
IACS	Infecções associadas à assistência à saúde IACS
UTI	Unidade de terapia intensiva
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
QS	<i>Quórum sensing</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
SST3	Sistema de secreção tipo III
MDR	Organismos multirresistentes
PAH	Pneumonia adquirida em hospital
PAC	Pneumonia associada à comunidade
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças
NHSN	Rede Nacional de Segurança em Saúde
EUA	Estados Unidos da América
UE	União Europeia
OMS	Organização Mundial da Saúde
FC	Fibrose cística
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
NO	Oxido nítrico
HE	Hematoxilina-eosina
ODS	Objetivo de Desenvolvimento Sustentável

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Pneumonia	15
2.2 Sintomas e causas da pneumonia.....	15
2.3 Tipos de pneumonia.....	17
2.4 <i>P. aeruginosa</i> e fatores de virulência	18
2.5 Diagnóstico e tratamento	21
2.6 Prevenção.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Amostra.	25
4.3 Detecção de genes de virulência e resistência	25
4.4 Purificação e sequenciamento genético	26
4.5 Formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i> PAV112	27
4.6 Ensaio de sobrevivência em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após infecção por <i>P. aeruginosa</i> PAV112	27
4.7 Modelo in vivo de pneumonia induzida por <i>P. aeruginosa</i> PAV112.	27
4.7.1 Animais.....	27
4.7.2 Infecção pulmonar por inoculação intratraqueal de <i>P. aeruginosa</i> PAV112	28
4.7.3 Ensaio de sobrevivência após inoculação intratraqueal de <i>P. aeruginosa</i> PAV112.	28
4.7.4 Avaliação de parâmetros clínicos após inoculação intratraqueal de <i>P. aeruginosa</i> PAV112	28
4.7.5 Obtenção de células do Lavado broncoalveolar (BAL).	29
4.7.6 Contagem de células da medula óssea e baço.	29
4.7.7 Determinação das unidades formadoras de colônias (UFCs).	29
4.7.8 Dosagem de óxido nítrico.	29
4.7.9 Dosagem da citocina inflamatória IL-6.	30

4.7.10 Avaliação Histopatológica.....	30
4.8 Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Capítulo I: Artigo de Revisão publicado na Revista “ <i>Saúde e Desenvolvimento Humano</i> ”.31	
5.2 Capítulo II: Artigo submetido à Revista “ <i>Microbial Pathogenesis</i> ”.	46
6. CONCLUSÃO.....	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.	78
ANEXOS.	89

