



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**WEVERSON ALVES DOS REIS**

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR  
*Klebsiella pneumoniae*, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO COM BLOQUEIO  
DE TNF- $\alpha$ .**

**BRASÍLIA, 2018**

WEVERSON ALVES DOS REIS

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR  
*Klebsiella pneumoniae*, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO COM BLOQUEIO  
DE TNF-  $\alpha$ .**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia,  
Universidade de Brasília.

**Orientadora: Profa. Dra. Jamila Reis de Oliveira**

BRASÍLIA, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ae Alves dos Reis, Weverson  
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR  
Klebsiella pneumoniae, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO COM  
BLOQUEIO DE TNF-?. / Weverson Alves dos Reis; orientador  
Jamila Reis de Oliveira. -- Brasília, 2018.  
38 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2018.

1. pneumonia. 2. Klebsiella pneumoniae. 3.  
histopatologia. 4. TNF-?. I. Reis de Oliveira, Jamila,  
orient. II. Título.

WEVERSON ALVES DOS REIS

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR  
*Klebsiella pneumoniae*, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO COM BLOQUEIO  
DE TNF-  $\alpha$ .**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Jamila Reis de Oliveira  
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB  
Orientadora

---

Prof. Dr. Alex Leite Pereira  
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Ramos Lavich  
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB

Brasília, 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Refletir sobre o trajeto percorrido é a melhor forma de agradecer a todos que estiveram comigo durante minha trajetória acadêmica. O caminho, em alguns momentos, foi tranquilo ora agitado, mas muito intenso e enriquecedor. Estou certo de que nunca chegaria onde cheguei se estivesse sozinho. Portanto, presto aqui meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho e do meu curso de graduação.

A Deus, agradeço imensamente por me conceder inúmeras bênçãos - entre elas, o privilégio de estudar em uma instituição federal e a realização de tantas conquistas ao longo desses cinco anos. A virgem Maria, que antes de mim, aceitou a vontade de Deus e é exemplo concreto de obediência ao autor da vida, e a Jesus Cristo, Aquele que busco imitar em todos os meus passos como homem.

Aos meus amados pais, Santino e Edivina, que sempre me ofereceram o melhor. Obrigado por muitas vezes abdicarem dos vossos sonhos para que eu realizasse os meus e pudesse chegar até aqui. Vocês são o meu maior exemplo e maior inspiração para seguir em busca dos meus sonhos. É por vocês e para vocês que busco ser melhor a cada dia. Obrigado pelos conselhos, pelo apoio e pela motivação diária em me fazer acreditar que eu sou capaz de alcançar meus objetivos. Obrigado pelo amor e cuidado que sempre tiveram comigo, por não medirem esforços para me ajudar. Essa conquista é nossa, pai e mãe. Vocês são tudo para mim.

Aos meus familiares que de alguma forma me ajudaram, em especial a minha madrinha Márcia, meu primo Vinícius, meu irmão Renan, minha sobrinha e afilhada Lavínia e a minha cunhada Vanessa que me ajudou no início da graduação na adaptação ao meio acadêmico. A todos meus amigos, obrigado pela motivação e ajuda. Muito obrigado pelos momentos de descontração, alegrias e apoio nos momentos difíceis. Em especial aos meus amigos Alan e Matheus, pela amizade, apoio e ajuda durante a minha vida. A Tainá, obrigado pelo apoio incondicional e pelo incentivo a continuar seguindo em frente. Obrigado pela compreensão nos momentos de ausência.

A Universidade de Brasília, seus servidores e seu corpo docente, meus sinceros agradecimentos por ter me proporcionado um ensino de qualidade e contribuído para meu despertar profissional e pessoal. Em especial às professoras Flávia Nader e Carine Royer que sempre acreditaram no meu potencial e me concederam oportunidades durante a graduação.

Aos meus amigos que conheci durante os cinco anos na universidade, por compartilharem comigo muitas descobertas e experiências. Em especial a Thaynara e Hellen que estiveram comigo no início da graduação, nas primeiras disciplinas e nas caronas. Ao meu grupo de estágio da Anvisa, “os paleteros”, por me ajudaram na primeira experiência profissional, e deixarem os dias mais agradáveis. Ao Victor, Samara, Jenyffer e Daniel pela amizade construída durante esta caminhada. Ao Fernando minha dupla na iniciação científica, pelo companheirismo durante os dois anos de pesquisa, apoio e palavras de incentivo quando o experimento não dava certo.

Por fim, não poderia deixar de expressar o meu enorme agradecimento e reconhecimento à minha orientadora, Jamila Reis, pela presença amiga e afetuosa. Obrigado pela confiança em mim depositada no início da graduação, pela orientação que vai além da esfera acadêmica. Por não desistir da execução deste, mesmo quando eu já havia desistido. Pela disponibilidade, paciência e generosidade, minha enorme admiração e gratidão.

“Eu sei que o conceito de Deus me ajudou a lidar com muitas questões na vida, me guiou em situações críticas e o vejo confirmado em muitas ideias profundas sobre a beleza do funcionamento do mundo” (Werner Arber)

## SUMÁRIO

1. Resumo .....	10
2. Abstract.....	11
3. Lista de figuras e siglas .....	12
4. Revisão Bibliográfica do tema a ser estudado.....	13
4.1. Pneumonia.....	13
4.2. Klebsiella pneumoniae.....	14
4.3. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	15
4.4. Fisiopatologia da infecção pulmonar .....	16
4.5. Modelo experimental de inoculação endotraqueal.....	17
5. Justificativa .....	18
6. Objetivos (Objetivo geral e objetivos específicos) .....	18
7. Artigo científico .....	19
7.1. Resumo.....	19
7.2. Introdução.....	20
7.3. Materiais e métodos.....	20
7.3.1. Aprovação do comitê de ética .....	20
7.3.2. Animais.....	20
7.3.3. Determinação do padrão de crescimento da cepa .....	21
7.3.4. Definição da carga bacteriana.....	21
7.3.5. Protocolo experimental .....	21
7.3.6. Preparo do inóculo bacteriano.....	22
7.3.7. Técnica de inoculação .....	22
7.3.8. Eutanásia e coleta das amostras .....	23
7.3.9. Avaliação bacteriológica.....	24
7.3.10. Análise histopatológica .....	24

7.3.11. Análise dos dados .....	24
7.4. Resultados.....	25
7.5. Discussão .....	28
7.6. Agradecimentos.....	30
7.7. Referências .....	31
8. Anexos.....	36
8.1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	36
8.2. Normas da Revista Brasileira de Microbiologia (BJM) .....	37

## 1. Resumo

A alta prevalência e incidência de pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* em ambiente hospitalar, levanta a necessidade de estudos *in-vivo*, nos quais seja possível observar a patogênese da infecção e o comportamento desse bacilo “Gram negativo” que tem um elevado potencial de multirrestência como as conhecidas cepas produtoras de carbapenemases. Além de observar o curso clínico da infecção, é importante também evidenciar a importância da atuação do sistema imune na patogênese da infecção, através do bloqueio do TNF- $\alpha$ , que é uma importante citocina do sistema leucocitário. Dessa forma, a proposta desse trabalho foi estudar a histopatologia da infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae*, em modelo murino por instalação endotraqueal de um inoculo bacteriano proveniente de isolado clínico.

**Palavras-chave:** *pneumonia; Klebsiella pneumoniae; histopatologia; TNF-  $\alpha$ .*

## 2. Abstract

The high prevalence and incidence of pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* in a hospital environment, with a high morbidity and mortality rate, especially in immunocompromised and neonatal patients, increase the need for *in-vivo* experimental trials, with the intent to observe the pathogenesis of the infection and the behavior of this gram-negative strain, which has a high potential for multi-resistance, as the known strains carbapenemases producers. Besides observing the clinical course of the infection, it is also important to evidence the relevance of the immune system in the pathogenesis of infection by blocking TNF- $\alpha$ , an important cytokine of the leukocyte system. Thus, the purpose of this study was to study the histopathology of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in a murine model by endotracheal installation of a bacterial inoculum from a clinical isolate.

**Palavras-chave:** *pneumonia; Klebsiella pneumoniae; histopathology; TNF-  $\alpha$ .*

### 3. Lista de figuras e siglas

#### *Figuras*

Figura 1. Técnica de inoculação.....22

Figura 2. Coleta das amostras.....23

Figura 3. Cortes histológicos dos pulmões dos grupos estudados..... 27

#### *Siglas*

LPS (Lipopolissacarídeo)

KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase)

TNF (Fator de Necrose Tumoral)

DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)

NK (Natural Killer)

CEUA (Comitê de Ética em Uso de Animais)

LACEN/DF (Laboratório Central do Distrito Federal)

UCB (Universidade Católica de Brasília)

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

LBA (Lavado Bronco Alveolar)

ICAM 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)

MH (Muller Hinton)

## 4. Revisão Bibliográfica do tema a ser estudado

### 4.1. Pneumonia

A pneumonia é uma consequência da colonização pulmonar por agentes patogênicos que envolve lesão e inflamação tecidual. Além disso, o extravasamento vascular e o edema são causados por essas respostas do hospedeiro, permitindo que o patógeno obtenha acesso ao sangue e se espalhe sistematicamente causando sepse [1].

A pneumonia pode ser subdividida em comunitária e nosocomial. Elas têm como agente causador mais comum o *Streptococcus pneumoniae*, um patógeno oportunista extra celular cuja virulência é derivada principalmente da produção de uma cápsula que permite que o patógeno se fixe na mucosa e impeça as respostas imunes inatas do pulmão, como produção de surfactantes, complementos e fagocitose. Outros agentes como *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, causam principalmente infecções nosocomiais usando mecanismos similares ao *Streptococcus Pneumoniae* [1].

A pneumonia nosocomial é aquela ocorrida estritamente em ambiente hospitalar ou até 15 dias após a alta ou após 48 horas da internação, entre os fatores de risco relacionados à pneumonia bacteriana nosocomial estão os pacientes que foram submetidos a administração endovenosa de fármacos ou procedimentos invasivos nos últimos 30 dias da infecção atual [5].

Em países em desenvolvimento, a infecção pulmonar é responsável por altos índices de óbitos infantis, isso porque é uma patologia comum na prática diária da pediatria e pode ter prognósticos difíceis com consequências graves [2]. Em estudo de 2011 foi observada uma frequência de 22% para ocorrência de pneumonia em indivíduos internados, caracterizando assim a infecção pulmonar nosocomial como importante problema de saúde pública no Brasil [3].

A pneumonia comunitária é um importante problema de saúde nos Estados Unidos e está associada a uma alta morbidade e mortalidade, como também altos custos de cuidados de saúde. Em 2007, nos Estados Unidos, a pneumonia representava aproximadamente 4,5 milhões de visitas ambulatoriais

e 1,1 milhão hospitalizações, com uma duração média de 5 dias. Aproximadamente 10% a 20% dos pacientes hospitalizados com pneumonia são admitidos em uma unidade de terapia intensiva, e a taxa de readmissão de 30 dias foi de 20% [4].

#### 4.2. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo “Gram negativo”, membro da família das enterobactérias, encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto [6]. Sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais e este pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis. Entretanto no organismo de pessoas imunocomprometidas esta bactéria leva aos quadros de infecção, pelo fato de os mecanismos de defesa estarem prejudicados [7,8].

Estudos demonstraram que a instilação intranasal da cepa B5055 de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos BALB/c é capaz de induzir inflamação pulmonar aguda [9]. As razões pelas quais esse microrganismo pode ser tão patogênico estão intimamente ligadas aos aspectos morfológicos e moleculares da bactéria, como por exemplo os fatores de virulência capsulares e os lipopolissacarídeos que, devido à variação na sua estrutura, confere uma grande diversidade sorológica de antígenos [10].

A *Klebsiella pneumoniae* é um agente patogênico que possui mecanismos de resistência, um deles é o escape da fagocitose realizada por células do sistema imune, os principais responsáveis por isso são as estruturas de superfície, como por exemplo, o LPS [7]. Outro mecanismo de resistência é através da secreção de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) que é uma enzima produzida pela *Klebsiella pneumoniae* que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, como também inativam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos [11].

A *Klebsiella pneumoniae* pode ser encontrada no aparelho respiratório superior e aparelho gastrointestinal do homem e do camundongo e, portanto, é considerada um componente normal da microbiota. Normalmente, a via aérea inferior (pulmões) é mantida estéril devido aos mecanismos efetivos de defesa

do hospedeiro. A presença do microrganismo no espaço aéreo inferior pode resultar em infecção grave com altas taxas de mortalidade. Sendo assim, é considerado um patógeno oportunista clinicamente significativo e é a principal causa de pneumonia comunitária e nosocomial entre os “Gram negativos” [12].

A resistência da *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos carbapenêmicos representa uma ameaça para a saúde pública. Como essa classe de antibióticos tem sido considerada de último recurso para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, a disseminação da resistência entre bactérias patogênicas é considerada um problema mundial de saúde pública [13].

A alta mortalidade relacionada às infecções por *Klebsiella pneumoniae* é justificada pela capacidade elevada de causar bacteremia (65% das infecções), sendo que nesses casos a mortalidade é de 86,9% e nos casos que apresentam choque séptico é de 100% [15]. Sendo assim, evidencia-se a importância de uma terapia antimicrobiana eficaz para estas graves infecções, no entanto, o tratamento ideal para infecções causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase ainda não foi definido [14].

#### **4.3. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  é sintetizado principalmente por macrófagos, linfócitos T e células endoteliais. Pode ser sintetizado para atuar aderido a membrana celular ou solúvel no plasma, no qual várias evidências mostram que ambas as formas estão intimamente envolvidas na resposta inflamatória [16].

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel significativo em muitas doenças inflamatórias do pulmão. As doenças pulmonares mais importantes afetadas pelo TNF- $\alpha$  incluem bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, lesão pulmonar aguda e síndrome de dificuldade respiratória aguda [17].

Na infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae* o TNF- $\alpha$  tem um papel importante no recrutamento de polimorfonucleares, visto que quando bloqueado é reduzido o influxo celular no tecido pulmonar [18].

*In-vivo*, a administração de LPS bacteriano induz alto nível de produção de TNF- $\alpha$  com reações pró-inflamatórias severas. Um alto nível de TNF- $\alpha$  também é observado em seres humanos quando administrada endotoxina bacteriana. Estes estudos *in-vitro* e *in-vivo* indicam que a geração de TNF- $\alpha$  em alto nível leva à exacerbação de respostas inflamatórias e pró oxidativas que são importantes na patogênese de muitas doenças, incluindo vários distúrbios pulmonares [17].

O bloqueio do TNF- $\alpha$  em modelo experimental de indução de ferimentos leva a alterações nas respostas de cura, acelerando a taxa de cura macroscópica, pois leva a uma redução da área dos ferimentos [19].

O uso do anti-TNF- $\alpha$  tem melhorado o tratamento de doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatóide, artrite psoriática, doença de Crohn e artrite reumatóide juvenil idiopática. Vários medicamentos anti-TNF- $\alpha$  estão disponíveis no mercado: um receptor solúvel capaz de neutralizar TNF- $\alpha$  (Etanercepte); anticorpos monoclonais que podem ser anticorpos quiméricos de origem murina (Infliximabe), ou anticorpos humanizados (Adalimumabe), que têm como finalidade terapêutica, diminuir a ação do TNF- $\alpha$  na inflamação. [20].

#### **4.4. Fisiopatologia da infecção pulmonar**

Os macrófagos alveolares são as principais células de defesa nas infecções do trato respiratório, visto que desempenham o papel de fagocitose dos microrganismos invasores. Além dos macrófagos alveolares, são também células de defesa, as células do epitélio alveolar, as chamadas células endoteliais [18].

As citocinas e as quimiocinas produzidas pelas células epiteliais das vias aéreas estimulam rapidamente o recrutamento e a ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e células NK que são capazes de destruir a bactéria invasora [1].

Os papéis das moléculas de adesão celular na pneumonia em animais foram delineados principalmente usando anticorpos bloqueadores. As

evidências obtidas desses estudos demonstram que o ICAM-1 é importante para o recrutamento de neutrófilos nos pulmões em resposta a *Klebsiella pneumoniae* [21].

O recrutamento de neutrófilos é um mecanismo de defesa antibacteriano essencial no pulmão que envolve etapas múltiplas, incluindo a ativação de fatores de transcrição, produção de quimiocinas, regulação positiva das moléculas de adesão celular e aumento das interações célula-célula [22].

A maioria das infecções causadas por *Klebsiella sp.* são observadas em animais debilitados e de meia idade. Isso porque a progressão da pneumonia e seu prognóstico são principalmente relacionados à idade e a várias outras variáveis relacionadas ao modelo experimental adotado. Os animais saudáveis e jovens são mais propensos a combater efetivamente a infecção do que o animal idoso e debilitado. Isso pode explicar a mortalidade relativamente baixa e a maior cronicidade da infecção observada em estudos experimentais com animais jovens e saudáveis [23].

#### **4.5. Modelo experimental de inoculação endotraqueal**

Diferentes técnicas experimentais de indução de doenças pulmonares têm sido utilizadas para a indução da patologia, tal como a inoculação intranasal [24,25]. Entretanto, estudos realizados com “modelo animal experimental”, mostraram que a indução de infecção pulmonar por intubação traqueal é uma das técnicas mais efetivas a fim de assegurar uma infecção primária representativa para uma pesquisa, dentre as possíveis vias de inoculação existentes: traqueostomia, aplicação intranasal, via aerossol e intubação traqueal [26,27,30].

Atualmente nos estudos que utilizam modelos animais, têm obtido êxito no que diz respeito às novas ideias de tratamento de patogenicidades causadas por *Klebsiella pneumoniae* [27,28]. O método amplamente utilizado nas pesquisas com camundongos para administração de medicamentos, vacinas e/ou agentes infecciosos é o de instilação intranasal. Para o emprego deste método é necessário se atentar ao tipo de diluente utilizado como veículo, ao

posicionamento físico do animal, ao volume de amostra e ao tipo de anestesia utilizado no procedimento [29].

Dentre os modelos experimentais que utilizam camundongos, o modelo de infecção pulmonar considerado ideal é aquele que induz uma resposta inflamatória aguda, aumentando a permeabilidade vascular e alveolar, influxo de neutrófilos e proteínas nos alvéolos, associado a um exsudato rico em fibrina durante a fase aguda [30].

## **5. Justificativa**

O fato das pneumonias bacterianas serem prevalentes e de difícil tratamento quando desencadeadas por microrganismos multirresistentes, torna importante o estudo da fisiopatologia da infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* no ganho de conhecimento relacionado aos mecanismos biológicos dessa doença infecciosa bacteriana de caráter nosocomial, visando implementação de tratamentos mais eficazes, bem como na determinação de modelos experimentais adequados.

## **6. Objetivos (Objetivo geral e objetivos específicos)**

- Padronizar modelo experimental;
- Desenvolver pneumonia sem acometimento sistêmico;
- Realizar análise histopatológica da infecção;
- Avaliar o papel do TNF- $\alpha$  na infecção pulmonar;

## 7. Artigo científico

### **ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR *Klebsiella pneumoniae*, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO COM BLOQUEIO DE TNF- $\alpha$ .**

**Weverson Alves dos Reis<sup>1</sup>; Fernando Ricardo Sousa Carvalho<sup>1</sup> Octávio Luiz Franco<sup>2</sup>; Jamila Reis de Oliveira<sup>1</sup>**

1. Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília
2. Universidade Católica de Brasília

#### **7.1. Resumo**

A alta prevalência e incidência de pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* em ambiente hospitalar, com alta taxa de morbimortalidade, levanta a necessidade de estudos *in-vivo* onde seja possível observar a patogênese da infecção e o comportamento desse bacilo “Gram negativo”. Sendo assim, o propósito deste trabalho foi de realizar análise histológica da infecção pulmonar causada por inoculação endotraqueal de *Klebsiella pneumoniae* em modelo experimental murino, elucidando assim o grau de comprometimento tecidual como também as principais diferenças entre os grupos estudados, com ênfase no papel do TNF- $\alpha$ . Sendo que, na observação do curso clínico da infecção, foi possível identificar diferenças histológicas relevantes principalmente em comparação com animais que tiveram receptores de TNF- $\alpha$  bloqueados. Dessa forma, esse trabalho fornece importantes parâmetros de comportamento do microrganismo na pneumonia, como também um modelo experimental eficaz de desenvolvimento local de infecção pulmonar.

**Palavras-chave:** *pneumonia; Klebsiella pneumoniae; histopatologia; TNF-  $\alpha$ .*

## **7.2. Introdução**

A pneumonia tem sido evidenciada como a maior causa de mortalidade dentre as doenças respiratórias e ocupa o quarto lugar de mortalidade geral no Brasil, excluindo-se as causas externas. Estima-se a incidência mundial em 12 casos por 1000 habitantes/ano [5].

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, é produzida pelas enterobactérias, que pertencem à família de bacilos Gram-negativos, e sua detecção em isolado bacteriano confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e inativam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos [11].

Na infecção pulmonar o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um potente ativador de polimorfo nucleares e macrófagos, levando ao aumento da liberação de proteases, indução de leucócitos e expressão de moléculas de adesão, que são essenciais para transmigração destas células para os locais de infecção [31].

## **7.3. Materiais e métodos**

### **7.3.1. Aprovação do comitê de ética**

Os procedimentos dessa pesquisa foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em uso de Animais (CEUA) da UCB na data de 22 de outubro de 2015.

### **7.3.2. Animais**

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com idade entre 6-8 semanas, oriundos do Biotério Central do Laboratório de Bioensaios da UCB. Os animais foram condicionados à temperatura ambiente, em um ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum* até o momento da indução de pneumonia pela cepa 1410503 de *Klebsiella pneumoniae*. A eutanásia ocorreu após sedação, por exsanguinação.

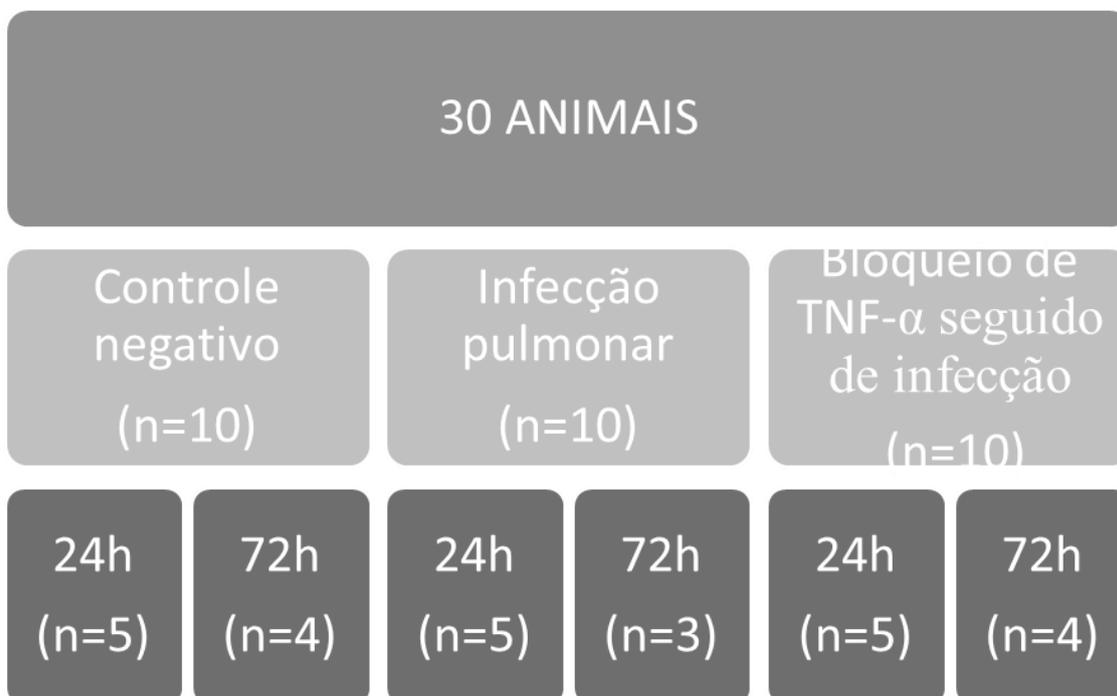
### 7.3.3. Determinação do padrão de crescimento da cepa

A cepa bacteriana disponibilizada pela UCB, foi a 1410503 de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de isolado clínico do LACEN/DF, isolada de amostra sanguínea de paciente internado no Hospital de Base de Brasília – HBDF. O padrão de crescimento da cepa foi determinado por meio da realização de três curvas de crescimento com tempo médio de 8 horas cada, obtidas pelas leituras pontuais de densidade ótica a cada 30 minutos.

### 7.3.4. Definição da carga bacteriana

Para determinação da concentração do inoculo, 18 animais foram utilizados, sendo os mesmos divididos em 3 grupos com 6 animais cada, sendo estes: inoculação de  $10^4$  UFC/mL<sup>-1</sup>, inoculação de  $10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup> e inoculação de  $10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>. Dentro de cada grupo, houve uma subdivisão mediante o tempo de eutanásia, no qual 3 animais de cada grupo foram eutanasiados 24 horas após inoculação e o restante 72 horas após inoculação.

### 7.3.5. Protocolo experimental



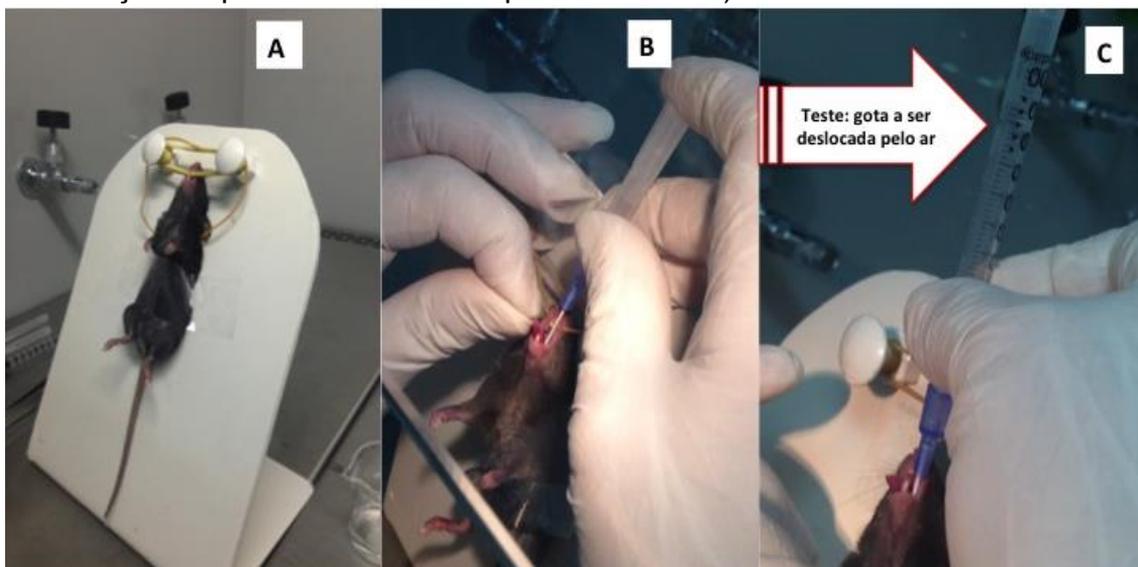
### 7.3.6. Preparo do inoculo bacteriano

Uma colônia da cepa 1410503 de *Klebsiella pneumoniae* foi cultivada em 5 mL de meio Muller Hinton (MH) e incubada a 37°C a 240 rpm por 14 horas. Posteriormente o pré-inóculo foi centrifugado a 5°C, 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante de bactéria foi retirado e suspenso em 1 mL de solução salina, obtendo assim o inoculo com concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

### 7.3.7. Técnica de inoculação

Para a inoculação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (ketamina 75 mg.kg<sup>-1</sup> e xilazina 7,5 mg.kg<sup>-1</sup>) e postos individualmente em uma placa metálica com inclinação de 70°, onde foram fixados com auxílio de uma liga plástica, pelos dentes superiores à superfície dessa, permitindo o acesso à traqueia (Figura 1-A). Para a instilação endotraqueal tanto da solução salina quanto do inoculo bacteriano (50µl) foi utilizado cateter venoso 22G (Figura 1-B). Após acesso oral à traqueia, foi procedido um teste de movimentação de gota de soro fisiológico, em uma seringa sem o êmbolo, a fim de certificar-se que o cateter estava realmente na traqueia (Figura 1-C).

**Figura 1.** Técnica de inoculação (A: Placa metálica com inclinação de 70°; B: Cateter venoso dando acesso a traqueia; C: Teste do deslocamento de ar – certificação de posicionamento traqueal do cateter).



Fonte: autoria própria.

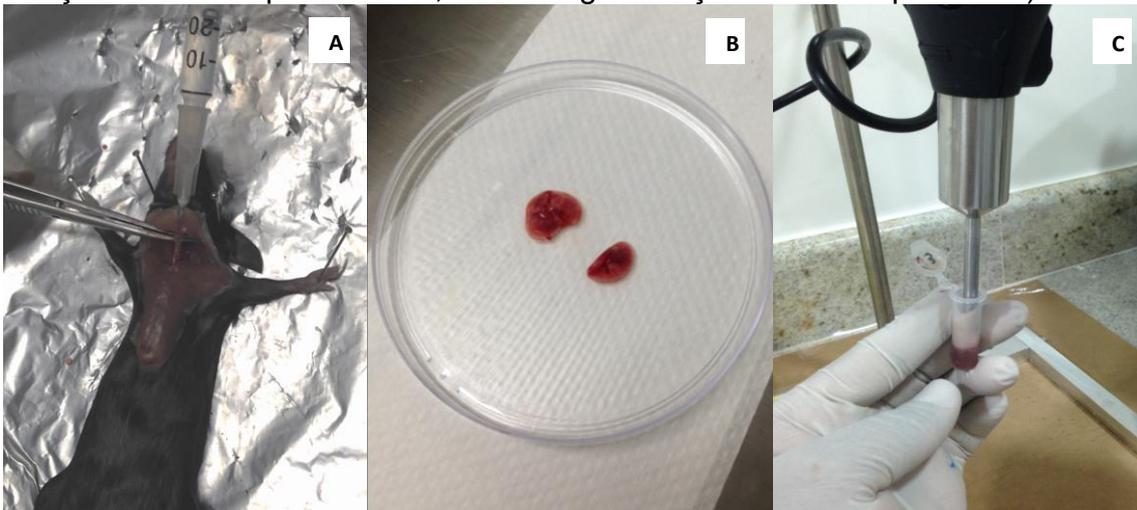
No controle negativo foram administrados 50µl de solução salina, e no grupo de bloqueio de TNF- $\alpha$  seguido de infecção foi realizado o bloqueio do receptor de TNF- $\alpha$  através da administração intraperitoneal do anticorpo numa concentração visando neutralização máxima de TNF (seguindo recomendação do fabricante PetroTech) com 15 minutos de antecedência à inoculação bacteriana.

### 7.3.8. Eutanásia e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados e logo após isso, por punção cardíaca coletou-se o sangue por meio de seringa de 1 mL sendo, logo após, aliquotados em eppendorfs contendo heparina, os mesmos foram eutanasiados por exsanguinação. A traqueia foi exposta após limpeza da região com álcool e realizada a lavagem bronco alveolar utilizando 1 mL de solução salina estéril a 0,9 % (Figura 2-A).

Os pulmões foram removidos assepticamente e após secção do lobo inferior direito obtiveram destinações diferentes (Figura 2-B). A porção lobar seccionada foi destinada ao estudo histopatológico e o restante homogeneizado em 1 mL de solução salina estéril a 0,9 % com auxílio de homogeneizador de tecidos (frequência de 20KHZ) e aliquotados (Figura 2-C).

**Figura 2.** Coleta das amostras (A: Realização de lavagem broncoalveolar; B: Secção dos lobos pulmonares; C: Homogeneização do tecido pulmonar).



*Fonte: autoria própria.*

### **7.3.9. Avaliação bacteriológica**

A presença de colônias bacterianas foi avaliada nas amostras de sangue, pulmão (homogeneizado) e LBA. Para a contagem de colônias um volume de 10 µl das amostras foram plaqueados, em triplicata, em meio ágar MH, após a realização de diluições seriadas 1:10 para análises microbiológicas. As placas ficaram incubadas a 37 °C por 24 horas para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

### **7.3.10. Análise histopatológica**

Os lobos inferiores direitos foram fixados em formaldeído 10% e, posteriormente, preparados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina. Cortes histológicos foram realizados, corados (Hematoxilina e Eosina) e levados para observação em microscopia de luz para avaliação qualitativa dos principais achados histopatológicos.

### **7.3.11. Análise dos dados**

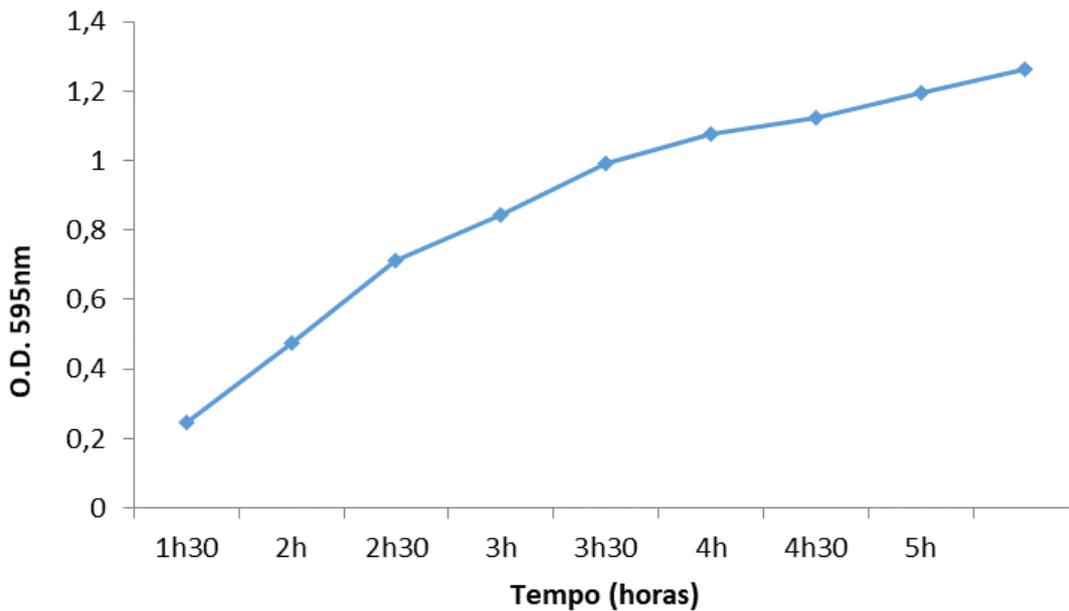
A contagem de UFC nas amostras foram submetidas a testes para determinação de diferenças significativas entre os grupos e posterior comparação entre a presença e quantidade de bactérias nas diferentes amostras, por meio de teste de Tukey e ANOVA.

Após dupla observação das lâminas, as mesmas receberam uma análise descritiva da composição celular do tecido e do desenvolvimento da pneumonia, sendo essa uma análise qualitativa.

#### 7.4. Resultados

O padrão de crescimento da cepa KP 1410503 foi determinado por meio da realização da curva de crescimento (Gráfico 1), onde, a partir da densidade ótica, foi possível determinar a concentração exata do inóculo bacteriano a ser administrado nos camundongos.

**Gráfico 1.** Curva de crescimento para determinação do tempo de crescimento do inóculo e carga bacteriana.



*Fonte: autoria própria*

Através do experimento prévio de determinação da concentração do inóculo foi possível determinar que as concentrações de  $10^4$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL eram insuficientes para desenvolvimento de pneumonia, e a concentração de  $10^8$  UFC/mL era ótima para desenvolver pneumonia sem levar a morte dos animais.

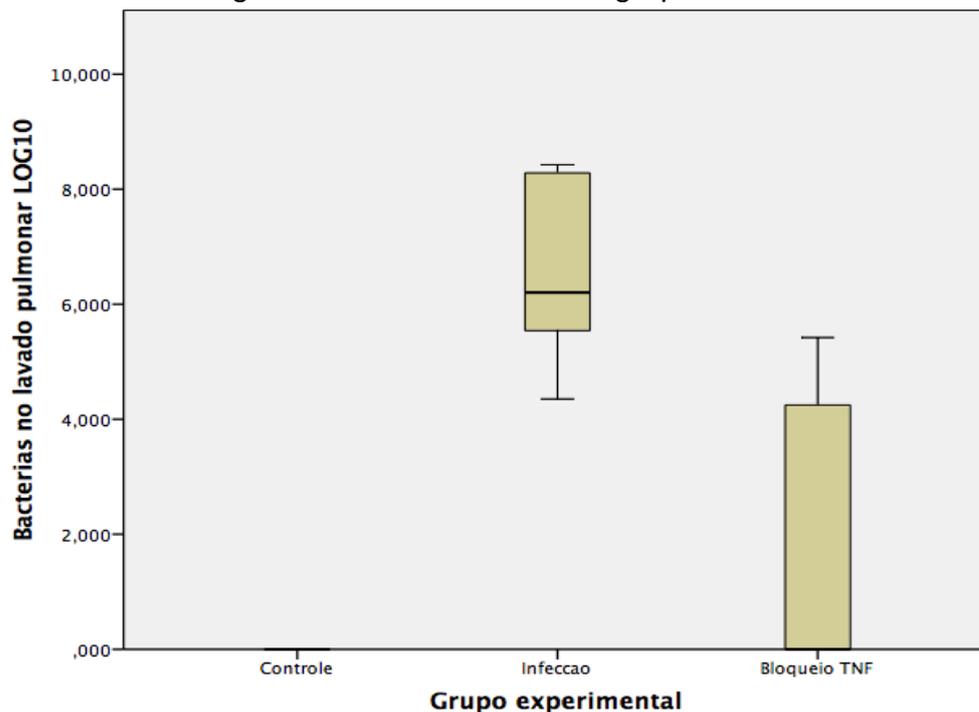
Sendo assim, a concentração de  $10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> administrada nos camundongos foi capaz de produzir pneumonia nos grupos estudados, exceto no grupo controle. Pôde-se recuperar bactérias nas amostras de pulmão e LBA dos grupos casos, mas não foram observados quadros de bacteremia em ambos os grupos, indicando que o método de inoculação produziu uma

infecção primária local. A contagem de UFC no LBA revela a colonização bacteriana localizada no trato respiratório.

Observou-se diferenças macroscópicas nos pulmões dos camundongos dos grupos infecção e bloqueio, como, por exemplo hiperemia. Já nos animais do grupo controle, observou-se aspecto normal no tecido pulmonar como também nenhuma contagem de UFC nas amostras de sangue, LBA e pulmão, comprovando assim nenhuma contaminação do grupo controle.

Foram comprovadas diferenças estatisticamente significantes entre as quantidades de UFCs, nas amostras de pulmão e do LBA, entre os grupos, tanto no tempo de 24 h, quanto de 72 h. Com teste de Tukey observou-se diferença entre os grupos: controle x infecção, controle e bloqueio e infecção e bloqueio (Tabela 1).

**Gráfico 2.** Contagem de UFCs no LBA dos grupos estudados.



*Fonte: autoria própria*

**Tabela 1.** Análise estatística das contagens de UFCs dos grupos estudados.

Tempo de eutanásia	Variável dependente	Grupo experimental	Grupo experimental	Significância
24 horas	Bactérias no pulmão (LOG 10)	Infecção	Controle	0,000*
			Bloqueio TNF- $\alpha$	0,042*
	Bactérias no LBA (LOG 10)	Infecção	Controle	0,002*
			Bloqueio TNF - $\alpha$	0,042*
	Bactérias no pulmão (LOG 10)	Bloqueio TNF - $\alpha$	Controle	0,000*
			Bloqueio TNF- $\alpha$	0,005*
Bactérias no LBA (LOG 10)	Infecção	Controle	0,264	
		Bloqueio TNF - $\alpha$	0,005*	
72 horas	Bactérias no pulmão (LOG 10)	Infecção	Controle	0,007*
			Bloqueio TNF- $\alpha$	0,521
	Bactérias no LBA (LOG 10)	Bloqueio TNF - $\alpha$	Controle	0,026*
			Bloqueio TNF- $\alpha$	0,521*
	Bactérias no pulmão (LOG 10)	Infecção	Controle	0,000*
			Bloqueio TNF- $\alpha$	0,603
Bactérias no LBA (LOG 10)	Bloqueio TNF - $\alpha$	Controle	0,000*	
		Bloqueio TNF- $\alpha$	0,603	

\* A diferença média é significativa ao nível de confiança de 0,05 (Teste de Tukey-ANOVA).

Os cortes histopatológicos dos pulmões (Figura 3) dos grupos inoculados mostraram presença de infiltrado neutrofílico em alveolos pulmonares, mas com maior intensidade inflamatória (congestão perivascular, bronquiolite, hemorragia) no grupo infectado sem bloqueio de TNF- $\alpha$ .

No grupo controle observa-se uma arquitetura tecidual pulmonar normal, sem presença de sinais de inflamação o que deixa o grupo como parâmetro para análise das mudanças morfológicas de células, alvéolos e vasos sanguíneos.

Nos grupos eutanasiados após 72 horas de infecção, observou-se o seguimento normal do padrão inflamatório, porém com maior influxo de macrófagos, sendo que não foram observadas diferenças na arquitetura tecidual entre os grupos infecção e bloqueio de TNF- $\alpha$ , havendo diferença entre tais grupos somente nos animais eutanasiados após 24 horas de infecção.



infecção pulmonar aguda primária sem quadro de bacteremia, utilizando-se uma concentração de  $10^8$  ufc/mL<sup>-1</sup>.

A inoculação intranasal é vista como aquela mais utilizada para administração de agentes infecciosos, entre outros [29], porém a inoculação endotraqueal mostrou-se mais efetiva já que se diminuem os riscos de não conseguir instalar a infecção pelo fato das narinas dos animais serem demasiadamente pequenas.

A padronização da via, utilizando uma plataforma metálica com inclinação de 70° para inoculação endotraqueal, revelou-se satisfatória tendo em vista a técnica de exposição traqueal, eliminando um ato cirúrgico, bem como garantiu a certeza de concentração e quantidade de inóculo a ser instalado em comparação com a via aerossol e via intranasal respectivamente.

A recuperação de bactérias no LBA e no macerado pulmonar evidencia uma colonização primária do trato respiratório superior e inferior, sendo essa colonização a causa da pneumonia, já que o trato respiratório inferior é estéril [12]. O LBA é utilizado para diagnóstico [32,33], o uso dele é seguro e permite a diferenciação dos microrganismos causadores de pneumonia já que no presente estudo foi possível recuperar *Klebsiella pneumoniae* e fazer contagem de UFC's.

Yadav et al, em um estudo com modelo experimental murino publicado em 2003 induziu pneumonia por via intranasal, inoculando-se  $10^4$  UFC/mL<sup>-1</sup> da cepa B5055, encontrando uma maior carga bacteriana com 72 horas de infecção. Tal estudo contrapõe os resultados aqui obtidos, pois a partir da cepa KP 1410503, proveniente de isolado clínico, utilizando uma concentração de  $10^8$  UCF/mL<sup>-1</sup>, isso se deve por diferenças no perfil de crescimento de cada cepa. Porém, salienta-se a coerência com o estudo de Yadav et al, pois nos grupos com tempo de infecção de 72 horas eram maiores as cargas bacterianas.

Conforme já esperado em infecções por *Klebsiella pneumoniae* [18], o bloqueio de TNF- $\alpha$  resultou em diminuição do influxo de neutrófilos e numa menor extensão inflamatória pulmonar, sobretudo na fase mais aguda. Como o TNF- $\alpha$  não é uma citocina quimiotática direta para polimorfonucleares, tal redução deve ser ocasionada por uma subregulação na expressão de moléculas de adesão. Adicionalmente, não percebeu-se um número reduzido de bactérias no pulmão e no LBA no grupo com TNF- $\alpha$  bloqueado, logo o controle da infecção deve ter ocorrido por meio da imunidade inata.

Em estudo de 2004 de Machado et al. foi descrito sobre a importância do TNF- $\alpha$  na defesa contra bactérias. Sendo essa uma citocina pró-inflamatória produzida na fase aguda da infecção que, promove, por meio da ação no hipotálamo, inibição do crescimento bacteriano através da febre. É também responsável pela expressão de moléculas de adesão (seletina P e ICAM) auxiliando a passagem de células do vaso para o tecido e também para produção de NO (óxido nítrico) para destruição das bactérias [34]. Sendo isso evidenciado pelo grupo de infecção sem bloqueio de TNF- $\alpha$ , onde o infiltrado leucocitário foi maior.

O bloqueio do TNF- $\alpha$  diminuiu o número de células do sistema imune no tecido pulmonar, podendo isso ser um fator que leva, em modelos experimentais, uma taxa de cura tecidual acelerada [19]. Houve diferença no mecanismo da infecção não somente entre os grupos citados, mas também entre os tempos de infecção em cada grupo. A ausência do TNF- $\alpha$  foi importante numa redução do processo inflamatório inicial, mas houve uma equiparação entre os grupos infectados com e sem bloqueio de TNF- $\alpha$ , no tempo de 72h, nas características do infiltrado crônico observado, indicando o papel da imunidade inata na condução do processo.

## **7.6. Agradecimentos**

Agradecemos a Universidade Católica de Brasília pela parceria durante a realização dos experimentos, e a todos profissionais do laboratório da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia do Campus da Asa Norte, como também do Biotério do Campus de Águas Claras.

## 7.7. Referências

1. EISELE, N. A.; ANDERSON, D. M. Host defense and the airway epithelium: frontline responses that protect against bacterial invasion and pneumonia. **Journal of pathogens**, v. 2011, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/249802>
2. IBIAPINA, C. C. et al. Pneumonias comunitárias na infância: etiologia, diagnóstico e tratamento. **CEP**, v. 30, p. 350, 2004.  
DOI:
3. OLIVEIRA, T. F. L. et al. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 6, p. 630-636, 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302011000600008>
4. MORAN, G. J.; ROTHMAN, R. E.; VOLTURO, G. A. Emergency management of community-acquired bacterial pneumonia: what is new since the 2007 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society guidelines. **The American journal of emergency medicine**, v. 31, n. 3, p. 602-612, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2012.12.002>
5. SCHWARTZMANN, P. V. et al. Pneumonia comunitária e pneumonia hospitalar em adultos. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 3, p. 238-248, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v43i3p238-248>
6. BRISSE, S. et al. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4982, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
7. MARCH, C. et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of Klebsiella pneumoniae with phagocytes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056847>

8. SHON, A. S.; BAJWA, R. PS; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107-118, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
9. KUMAR, V.; CHHIBBER, S. Anti-inflammatory effect of thalidomide alone or in combination with augmentin in *Klebsiella pneumoniae* B5055 induced acute lung infection in BALB/c mice. **European journal of pharmacology**, v. 592, n. 1-3, p. 146-150, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.019>
10. LAVIGNE, J. et al. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring blaKPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67847, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067847>
11. DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.  
DOI:
12. LAU, H. Y.; HUFFNAGLE, G. B.; MOORE, T. A. Host and microbiota factors that control *Klebsiella pneumoniae* mucosal colonization in mice. **Microbes and infection**, v. 10, n. 12-13, p. 1283-1290, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.040>
13. SCHWABER, M. J. et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1028-1033, 2008.  
DOI: 10.1128/AAC.01020-07
14. QURESHI, Z. A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2108-2113, 2012.  
DOI: 10.1128/AAC.06268-11

15. BORER, A. et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 10, p. 972-976, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1086/605922>
16. FRAGOSO, J. M. et al. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. **Gaceta Médica de México**, v. 150, n. 4, p. 334-344, 2014.  
DOI:
17. MUKHOPADHYAY, S.; HOIDAL, J. R.; MUKHERJEE, T. K. Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology. **Respiratory research**, v. 7, n. 1, p. 125, 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-125>
18. BROUG-HOLUB, E. et al. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. **Infection and immunity**, v. 65, n. 4, p. 1139-1146, 1997.  
DOI:
19. ASHCROFT, Gillian S. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 1, p. 38-49, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x>
20. FROMONT, A. et al. Inflammatory demyelinating events following treatment with anti-tumor necrosis factor. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 55-57, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.11.002>
21. LÓPEZ-MACAY, A. et al. Caracterización de un modelo hemodinámico ex vivo para el estudio de la activación endotelial por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en venas humanas perfundidas. **Gaceta medica de Mexico**, v. 151, n. 2, p. 206-215, 2015.  
DOI:
22. CRAIG, Ann et al. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. **Infection and immunity**, v. 77, n. 2, p. 568-575, 2009.  
DOI: 10.1128/IAI.00832-08

23. DOMENICO, P.; JOHANSON, W. G.; STRAUS, D. C. Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 37, n. 1, p. 327-335, 1982.  
DOI:
24. SAUNDERS, B. M.; CHEERS, C. Inflammatory response following intranasal infection with *Mycobacterium avium* complex: role of T-cell subsets and gamma interferon. **Infection and immunity**, v. 63, n. 6, p. 2282-2287, 1995.  
DOI:
25. SCHROEDER, T. H. et al. Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7410-7418, 2001.  
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7410>
26. MUNDER, A. et al. Pulmonary microbial infection in mice: comparison of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, n. 2, p. 127-133, 2002.  
DOI: <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00240>
27. BAKKER-WOUDENBERG, I. AJM. Experimental models of pulmonary infection. **Journal of microbiological methods**, v. 54, n. 3, p. 295-313, 2003.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00118-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00118-0)
28. YADAV, V. et al. Induction & resolution of lobar pneumonia following intranasal instillation with *Klebsiella pneumoniae* in mice. **Indian Journal of Medical Research**, v. 118, p. 47, 2003.  
DOI:
29. MILLER, M. A. et al. Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: effect of instillation volume and form of anesthesia. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31359, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031359>

30. MARTIN, T. R.; MATUTE-BELLO, G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. **Critical care clinics**, v. 27, n. 3, p. 735-752, 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2011.05.013>
31. LAICHALK, Lauri L. et al. Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine Klebsiella pneumonia. **Infection and immunity**, v. 64, n. 12, p. 5211-5218, 1996.  
DOI:
32. CARVALHO, J. E. M. et al. Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis patients with pulmonary involvement. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 134-139, 2004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132004000200010>
33. RADHA, S. et al. Diagnostic utility of bronchoalveolar lavage. **Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists**, v. 31, n. 3, p. 136, 2014.  
DOI: 10.4103/0970-9371.145636
34. MACHADO, Paulo RL et al. Mecanismos de resposta imune às infecções  
Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.  
DOI:

## 8. Anexos

### 8.1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

 
Brasília, 22 de Outubro de 2015
<b><u>DECLARAÇÃO</u></b>
Declaramos que o Projeto de pesquisa/Protocolo de ensino intitulado <b>Avaliação fisiopatológica de infecção pulmonar causada por Klebsiella pneumoniae, em modelo experimental murinho, através da proteômica</b> , UCB/DOC 029/15, sob responsabilidade do Professor(a)/Coordenador(a) Octávio Luiz Franco, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais da Universidade Católica de Brasília - CEUA /UCB.
 Coordenador(a) da CEUA/UCB Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Católica de Brasília

## 8.2. Normas da Revista Brasileira de Microbiologia (BJM)

### Estrutura do artigo

#### **Introdução**

Indique os objetivos do trabalho e forneça um contexto adequado, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados. A Introdução deve fornecer ao leitor informações suficientes para que os resultados relatados no artigo possam ser devidamente avaliados sem referência à literatura. No entanto, a introdução não deve ser uma revisão extensiva da literatura. A introdução também deve fornecer a justificativa e os objetivos do estudo que está sendo relatado.

#### **Material**

e

#### **métodos**

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: somente modificações relevantes devem ser descritas. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem ser descritas no documento. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado, país) devem ser mencionados no texto. Os nomes que são marcas registradas devem ser assim indicados. O subtítulo muitas vezes facilita a leitura e a compreensão dessa seção.

#### **Resultados**

Os resultados devem ser claros e concisos. A seção Resultados deve, por meio de texto, tabelas e / ou figuras, fornecer os resultados dos experimentos, mas a interpretação extensiva dos resultados deve ser evitada, mas na seção Discussão.

#### **Discussão**

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão de literatura publicada.

#### **Apêndices**

Se houver mais de um apêndice, eles devem ser identificados como A, B, etc. Fórmulas e equações nos apêndices devem receber numeração separada: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; em um apêndice subsequente, a Eq. (B.1) e assim por diante. Similarmente para tabelas e figuras: Tabela A.1; Fig. A.1, etc.

### **Informações essenciais da página de título**

- **Título.** Concise e informativo. Títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- **Nomes e afiliações dos autores.** Por favor, indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações

com uma letra em sobrescrito minúscula imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. As afiliações dos autores devem ser apresentadas em ordem hierárquica decrescente (por exemplo, Harvard University, Harvard Business School, Boston, EUA) e devem ser escritas como estabelecido em seu próprio idioma (por exemplo Université Paris-Sorbonne; Universidade de Harvard, Universidade de São Paulo). endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

• ***Autor correspondente.*** Indique claramente quem irá lidar com correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. **Assegure-se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os detalhes de contato sejam mantidos atualizados pelo autor correspondente.**

• ***Endereço presente / permanente.*** Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava em visita no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço principal de afiliação. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

### **Resumo**

Um resumo conciso e factual é necessário. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado em separado do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as Referências devem ser evitadas, mas se for essencial, então cite o (s) autor (es) e o (s) ano (s). Além disso, abreviações não-padrão ou incomuns devem ser evitadas, mas se essenciais devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo.

### **Abreviaturas**

Defina abreviações que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no abstrato devem ser definidas em sua primeira menção, assim como na nota de rodapé. Assegure a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

### **Agradecimentos**

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como uma nota de rodapé no título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda no idioma, escrevendo ajuda ou revisando o artigo, etc.).