

Avaliação de ferramenta nanotecnológica para o controle de linfadenite caseosa – dados preliminares

Albuquerque, Vinícius de Queiroz^{1}; Medeiros, Rômulo Halley Gonçalves de²; Pinheiro, Raymundo Rizaldo³; Azevedo, Dalva Alana Aragão de⁴; Sousa, Ana Lídia Madeira de⁵; Faccioli-Martins, Patrícia Yoshida⁶*

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença de pequenos ruminantes causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. O agente é resistente à fagocitose, replicando-se dentro de macrófagos e formando abscessos de difícil tratamento com antibióticos. Trabalhos têm avaliado nanopartículas como facilitadoras da entrega de fármacos em regiões não alcançadas convencionalmente. A Embrapa Gado de Leite tem desenvolvido nanopartículas de cloxacilina para tratamento de mastite por *Staphylococcus* e diante dos resultados obtidos, iniciou-se experimento piloto com sua utilização na LC. O objetivo foi avaliar a eficácia deste antibiótico no tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *C. pseudotuberculosis*. A concentração inibitória mínima (CIM) de cloxacilina sódica foi determinada pelo método de macrodiluição em cepas provenientes de animais naturalmente infectados. Os leucócitos foram isolados de sangue ovino por meio de centrifugações e lise com cloreto de amônio. As células foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas e ressuspendidas em RPMI (5% de soro fetal bovino). Foram adicionados 500 µL dessa suspensão (25000 macrófagos/poço) nos testes 1 e 2, e as placas incubadas a 37°C, com 5% de CO₂, por 48h. O inóculo bacteriano foi obtido em caldo BHI a 37°C por 24 h, ajustado em espectrofotômetro a 107 UFC/mL e 25µL foram transferidos para os poços MB e MBN. No

terceiro teste dobrou-se a quantidade de macrófagos/poço (50.000) e bactérias/poço (500.000) mantendo proporção 10 UFC/macrófago. As células foram infectadas por 4 h e tratadas com as nanopartículas por 18-24 h Na sequência realizou-se contagem das bactérias do sobrenadante, lavaram-se os poços e descolaram-se as células com tripsina-EDTA. Uma alíquota foi utilizada para a contagem celular e a outra lisada por três ciclos de congelamento-descongelamento para contagem das bactérias intracelulares. A CIM foi de 8 µg/mL para a cloxacilina sódica, mas utilizou-se 4 µg/mL para as nanopartículas não sobrecarregarem os poços. Não houve efeito bactericida na maior concentração (256 µg/mL). Os dados preliminares foram promissores, visto que a viabilidade dos macrófagos nos dois testes foi maior no poço tratado com nanopartículas (MBN) que no não tratado (MB) – Teste 1: MBN 25.250 x MB 15.750 macrófagos; Teste 2: MBN 27.500 x MB 10.000 macrófagos. Além disso, houve redução de 89 a 100% da contagem bacteriana pelo antibiótico. No terceiro teste, os poços MB e MBN apresentaram crescimento bacteriano intenso, demonstrando a necessidade de se manter o limite da infecção em 250.000 UFC/poço. As contagens de macrófagos oscilaram nas réplicas, sendo o próximo passo otimizar o protocolo de cultivo e descolamento dos macrófagos em placas não tratadas para cultivo celular.

Palavras-Chave: Nanopartícula, Cloxacilina, Cultivo celular, Microbiologia, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Suporte financeiro: CNPq (PIBIC e Auxílio à pesquisa - nº 448011/2014-0).

¹Aluno do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário UNINTA, Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa.

²Farmacêutico, Especialista em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêuticos pela Escola Superior da Amazônia.

³Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos.

⁴Aluna de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Bolsista CAPES.

⁵Aluna de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Bolsista FUNCAP.

⁶Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Orientadora.

*Apresentador do pôster: viniciusqalbuquerque@gmail.com