



# PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

Danyelle Andrade Mota  
Clécio Danilo Dias da Silva  
(Organizadores)

  
Atena  
Editora  
Ano 2022



# PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

Danyelle Andrade Mota  
Clécio Danilo Dias da Silva  
(Organizadores)

  
Atena  
Editora  
Ano 2022

**Editora chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Editora executiva**

Natalia Oliveira

**Assistente editorial**

Flávia Roberta Barão

**Bibliotecária**

Janaina Ramos

**Projeto gráfico**

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

**Imagens da capa**

iStock

**Edição de arte**

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

**Conselho Editorial****Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



## Produção científica em ciências biológicas

**Diagramação:** Daphynny Pamplona  
**Correção:** Maiara Ferreira  
**Indexação:** Amanda Kelly da Costa Veiga  
**Revisão:** Os autores  
**Organizadores:** Danyelle Andrade Mota  
Clécio Danilo Dias da Silva

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Produção científica em ciências biológicas / Organizadores  
Danyelle Andrade Mota, Clécio Danilo Dias da Silva. –  
Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0021-9

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.219223003>

1. Ciências biológicas. I. Mota, Danyelle Andrade  
(Organizadora). II. Silva, Clécio Danilo Dias da (Organizador).  
III. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

contato@atenaeditora.com.br



**Atena**  
Editora  
Ano 2022

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



## DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



## APRESENTAÇÃO

As Ciências Biológicas, assim como as diversas áreas da Ciência, passam por constantes transformações, as quais são determinantes para o seu avanço científico. A produção científica tem papel essencial na avaliação da ciência, pois sustenta a avaliação qualitativa e quantitativa. A avaliação da produção científica permite inferir sobre os movimentos de institucionalização e desenvolvimento da pesquisa em campos científicos, períodos e contextos específicos. Além de permitir o entendimento dos processos de produção, difusão e uso do conhecimento, também pode orientar o desenvolvimento e a adaptação de políticas científicas, tecnológicas e de inovação.

Nessa perspectiva, o e-book “Produção Científica em Ciências Biológicas”, é uma obra composta de uma série de investigações e contribuições nas diversas áreas de conhecimento que interagem nas Ciências Biológicas, com uma leitura rápida, dinâmica e cheia de possibilidades de aprendizado. Assim, o e-book é para todos os profissionais pertencentes às Ciências Biológicas e suas áreas afins, especialmente, aqueles com atuação no ambiente acadêmico e/ou profissional.

Portanto, o resultado dessa experiência, que se traduz neste e-book, objetiva apresentar ao leitor a diversidade de temáticas inerentes as áreas da Saúde, Meio Ambiente, Biodiversidade, Biotecnologia e Educação, como pilares estruturantes das Ciências Biológicas. Por fim, desejamos que a obra contribua para o enriquecimento da formação universitária e da atuação profissional, com uma visão multidimensional com o enriquecimento de novas atitudes e práticas multiprofissionais nas Ciências Biológicas.

Agradecemos aos autores pelas contribuições que tornaram essa edição possível, e juntos, convidamos os leitores para desfrutarem as publicações.

Danyelle Andrade Mota  
Clécio Danilo Dias da Silva




## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

#### **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS E DERIVADOS SOBRE MICRORGANISMOS PATOGENICOS DE ORIGEM ALIMENTAR: UMA REVISÃO INTEGRATIVA**


Dayane de Melo Barros  
Marcelino Alberto Diniz  
Zenaide Severina do Monte  
Danielle Feijó de Moura  
Tamiris Alves Rocha  
Marllyn Marques da Silva  
Talismania da Silva Lira Barbosa  
Cléidiane Clemente de Melo  
Taciane Paulina da Silva  
Diego Ricardo da Silva Leite  
Tâmara Thaianne Almeida Siqueira  
André Severino da Silva  
Cleiton Cavalcanti dos Santos  
Andreza Roberta de França Leite  
Hélen Maria Lima da Silva  
Silvio Assis de Oliveira Ferreira  
Fábio Henrique Portella Corrêa de Oliveira  
Juliane Suelen Silva dos Santos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230031>

### **CAPÍTULO 2..... 9**

#### **EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTICÂNCER DA QUERCETINA NA PREVENÇÃO E REPARAÇÃO DE CELULAS CANCERIGENAS**

Fabricio de Jesus Mendes  
Lustarllone Bento de Oliveira  
João Marcos Torres do Nascimento Mendes  
Águida Maiara de Brito  
Gabriel Lipinski de Farias  
Anna Heloísa Lemos Barbosa  
Paula Lauane Araújo  
Thâmara Machado e Silva  
Giselle da Paz Cavalcanti  
Joselita Brandão de Sant'Anna  
Tulio Cesar Ferreira  
Alexandre Pereira dos Santos  
Melissa Cardoso Deuner


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230032>

### **CAPÍTULO 3..... 25**

#### **POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA PRÓPOLIS E SEU USO**

Willams Alves da Silva  
Vanessa Gomes Amaral Almeida


Sônia Pereira Leite  
Mary Anne Medeiros Bandeira  
Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva  
Renatha Claudia Barros Sobreira  
Marlon Claudener dos Santos Dantas  
Pedro Victor da Rocha Noé  
Juliana de Paula dos Santos Silva  
Isabela Malta Maranhão  
Larissa Temoteo de Albuquerque  
Kristiana Cerqueira Mousinho

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230033>

## **CAPÍTULO 4..... 35**

### **POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO *Croton heliotropiifolius* E SEU USO**


Willams Alves da Silva  
Vanessa Gomes Amaral Almeida  
Sônia Pereira Leite  
Mary Anne Medeiros Bandeira  
Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva  
Renatha Claudia Barros Sobreira  
Marlon Claudener dos Santos Dantas  
Pedro Victor da Rocha Noé  
Juliana de Paula dos Santos Silva  
Isabela Malta Maranhão  
Kayo Costa Alves  
Kristiana Cerqueira Mousinho

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230034>

## **CAPÍTULO 5..... 45**

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO NA FEIRA DA MANAUS MODERNA**

Gabriel José da Silva Serra  
Caroline Sobrinho Barros  
Gisele Macedo Souza  
Hudson Batista da Costa  
Ricardo Felipe de Souza Caramês


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230035>

## **CAPÍTULO 6..... 58**

### **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITOMETRIA DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Caio Lopes Borges Andrade  
Lília Ferreira de Moura Costa  
Ramon Mendes dos Santos  
Rogério Reis Conceição  
Luiz Gustavo Freitas Oliveira


Allan Souza dos Santos  
Mariane Melo dos Santos  
Alex José Leite Torres  
Maria da Conceição Aquino de Sá  
Fulvia Soares Campos de Sousa  
Marcos Borges Ribeiro  
Roberto José Meyer Nascimento  
Songeli Menezes Freire

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230036>

**CAPÍTULO 7..... 84**

**REVIEW ON MICROBIAL LEVAN: SOURCES AND POTENCIAL USES**


Beatriz Ferreira  
Camila Follador Lemos  
Fernanda Prehs Izar  
Thabata Maria Alvarez

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230037>

**CAPÍTULO 8..... 98**

**METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRUTURA DAS  
COMUNIDADES DE MELIPONÍNEOS (APIDAE; MELIPONINI) NA MATA ATLÂNTICA**

Marília Dantas e Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230038>

**CAPÍTULO 9..... 107**

**OCORRÊNCIA DE *Bemisia tabaci* NA CULTURA DA VIDEIRA NO NORDESTE**

Vanessa Gomes Amaral Almeida  
Nayana Bruschi Infante  
Willams Alves da Silva  
Marlon Claudener dos Santos Dantas  
Pedro Victor da Rocha Noé  
Isabela Malta Maranhão  
Kayo Costa Alves  
Juliana de Paula dos Santos Silva  
Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva  
Mary Anne Medeiros Bandeira  
Sônia Pereira Leite  
Kristiana Cerqueira Mousinho


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230039>

**CAPÍTULO 10..... 115**

**DEMANDA DE CONSULTAS DERMATOLÓGICAS E A OCORRÊNCIA DE SARNA  
DEMODÉCICA E SARCÓPTICA DOS CÃES ATENDIDOS EM JARAGUÁ DO SUL, SANTA  
CATARINA, BRASIL**

Charlene Ediane Longhi  
Daniela Brecht  
Carlos Eduardo Nogueira Martins

Marlise Pompeo Claus  
Viviane Milczewski

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300310>

**CAPÍTULO 11..... 124**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA NAS CLÍNICAS E CENTRO CIRÚRGICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM)**


Eduardo Aroucha Roland  
Sônia Maria da Silva Carvalho  
Maria Ivone Lopes da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300311>

**CAPÍTULO 12..... 140**

**OCORRÊNCIA DE ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA E NAS FEZES DE CANIS LUPUS FAMILIARIS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, BRASIL**


Adriele da Costa Trindade  
Isabella Santos Delavy  
Jean Carlos Machado da Costa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300312>

**CAPÍTULO 13..... 147**

**PRINCIPAIS ENTEROPARASIToses EM CRIANÇAS DE IDADE ESCOLAR NO BRASIL**


João Augusto Müller Pereira  
Karina Rodrigues Irigoyen  
Rafaely Piccioni Rosado  
Laura Silva de Vasconcellos  
Anna Müller Pereira  
Débora Liliâne Walcher  
Letícia Fiss

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300313>

**CAPÍTULO 14..... 152**

**MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Airton Vicente Pereira  
Gisele de Oliveira Krubniki Possa  
Rayza Assis de Andrade  
Solange Chopek  
Wesley Rogerio Negri


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300314>

**CAPÍTULO 15..... 169**

**A IMPORTÂNCIA DAS RIZOBACTÉRIAS PARA A CONSERVAÇÃO DA *Parkia multijuga Benth***

Ila Nayara Bezerra da Silva  
Monyck Jeane dos Santos Lopes  
Beatriz Silva Santiago

Ely Simone Cajueiro Gurgel

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300315>

**CAPÍTULO 16..... 177**

DERIVA NATURAL DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Scytalopus* (RHINOCRYPTIDAE: AVES, PASSERIFORMES) EN FUNCIÓN DE SU UMWELT

Alejandro Correa Rueda

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300316>


**CAPÍTULO 17..... 188**

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FASES IMATURAS DE *Nasonia vitripennis* (WALKER, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) EM PUPAS DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (Diptera: Calliphoridae)

Barbara Proença do Nascimento

Antonia de Castro Ribeiro

Valéria Magalhães Aguiar

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300317>

**CAPÍTULO 18..... 199**

ESTOQUE DE CARBONO EM FRAGMENTOS DE FLORESTAS ESTACIONAIS DO MS

Rita de Cassia Gonçalves Marques

Ana Beatriz Barros da Silva

Danielly Fernandez Silva

Gabrielli Duarte dos Santos

Isabella Giunco Estigarribia

Karen Rhaiza Schmidt Tavares


Luana Daviny dos Santos Silva

Luciana da Cruz Cortes

Nathalya Alice de Lima

Joab Doria Domingos

Zefa Valdivina Pereira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300318>

**CAPÍTULO 19..... 205**

DESAFIOS NA TRILHA: UM JOGO DIDÁTICO SOBRE O PASSADO E O PRESENTE DAS PTERIDÓFITAS

Geneildes Cristina de Jesus Santos

Adriana Pereira da Cruz

Lúcia Silva Correia

Luciara da Silva Aguiar

Silvana Rodrigues Moraes

Claudia Scareli-Santos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300319>

**CAPÍTULO 20..... 219**

O USO DO WEBSITE [www.geneticafacil.org](http://www.geneticafacil.org) COMO FERRAMENTA DIGITAL NO ENSINO

E DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DE ASSUNTOS RELACIONADOS À GENÉTICA

Rogério Carlos Novais

Monica Antonia Saad Ferreira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.21922300320>

<b>SOBRE OS ORGANIZADORES .....</b>	<b>227</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO.....</b>	<b>228</b>

# CAPÍTULO 6

## AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITÔMETRIA DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Data de aceite: 01/02/2022

Data de submissão: 31/01/2022

### **Caio Lopes Borges Andrade**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/3027186212966797>

### **Lília Ferreira de Moura Costa**

Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/6672994596587713>

### **Ramon Mendes dos Santos**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/2239694896220013>

### **Rogério Reis Conceição**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/1968670876252647>

### **Luiz Gustavo Freitas Oliveira**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/7157916155037746>

### **Allan Souza dos Santos**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/1583877522354653>

### **Mariane Melo dos Santos**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/3314656742166798>

### **Alex José Leite Torres**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/7288089475019880>

### **Maria da Conceição Aquino de Sá**

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/4867004601756729>

### Fulvia Soares Campos de Sousa

Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) -  
Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/0611165561750495>

### Marcos Borges Ribeiro

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da  
Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/7634265862645053>

### Roberto José Meyer Nascimento

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da  
Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/9574426480028427>

### Songeli Menezes Freire

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da  
Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.  
Salvador - Bahia  
<http://lattes.cnpq.br/8634866589762862>

**RESUMO: Introdução:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é o patógeno responsável pela Linfadenite Caseosa (LC) que é uma doença infecto-contagiosa que compromete economicamente a pecuária. A infecção em humano ocorre pelo manejo de animais, consumo de seus derivados crus ou em laboratórios, com poucos casos descritos e apenas um estudo no Brasil. A identificação bacteriana proveniente do conteúdo caseoso, seguido por testes bioquímicos constitui atualmente o teste padrão ouro de diagnóstico. **Objetivo:** O presente trabalho se propõe a avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos para avaliação da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Métodos:** Para contagem bacteriana e estudo da viabilidade celular em FACSCalibur (BD) foram realizados cultivos da cepa VD57 para os três tempos (24, 48, 72 horas) e comparação com cepas CAP3W(21) e CAPJ4(76) em 24 e 48 horas. Para produção do antígeno, foi utilizado o sobrenadante do cultivo com 48 horas das cepas VD57, CAP3W(21) e CAPJ4(76), semi-purificados por técnica de partição em três fases (TPP). Foi produzido extrato em meio com e sem Tween-80 somente para cepa CAPJ4(76). O perfil eletroforético dos quatro extratos foi analisado por SDS-PAGE em gel 12% e a sororreatividade avaliada em Western Blot com pool de amostras séricas do grupo Não Contactante (composto por 4 participantes sem histórico de contato com a bactéria ou consumo de carne crua ou mal cozida), grupo Contactante laboratório (composto por 4 indivíduos com histórico de contato por atividade em laboratório de microbiologia) e grupo Contactante fazenda (composto por 4 indivíduos com histórico de contato com animais infectados). **Resultados:** Na avaliação por FACs, evidenciou-se crescimento celular mais acelerado para cepa VD57 com resultado



10 vezes superior ao registrado por CAP3W(21) e CAPJ4(76). O ápice da viabilidade celular registrado foi de 48 horas, porém não foi identificada variação considerável da mortalidade celular com 72 horas. O perfil eletroforético dos extratos produzidos revelou diferenças na expressão de proteínas entre as três cepas, bem como para cultivos em condições diferentes para CAPJ4(76). Foi registrada intensa sororreatividade humana aos quatro extratos, confirmando a presença de proteínas antigênicas em todas as cepas, porém foi possível identificar diferença no perfil de reconhecimento entre os grupos Contactantes e Não Contactantes apenas no extrato VD57. **Conclusão:** A cepa VD57 apresenta ápice do crescimento e viabilidade no tempo de 48 horas de cultivo e na comparação entre as três cepas, demonstra crescimento e viabilidade superiores ao das demais. O perfil eletroforético dos extratos de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e diferença no peso molecular. A utilização de Tween-80 no meio de cultivo, gera um acréscimo de 50% no número de bandas para CAPJ4(76). Todos os extratos produzidos apresentam antigenicidade para soro humano, porém é possível evidenciar diferença no perfil de Contactantes do perfil de Não Contactantes apenas em VD57.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Contagem Bacteriana; Sororreatividade Humana.

**ABSTRACT:** Introduction: *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the pathogen responsible for Caseous Lymphadenitis (CL) which is an infectious disease that economically compromises livestock. Infection in humans occurs by handling animals, consumption of their raw derivatives or in laboratories, with few cases described and only one study in Brazil. Bacterial identification from caseous content, followed by biochemical tests, is currently the gold standard diagnostic test. Objective: The present work aims to evaluate and compare bacterial growth and antigen production for the evaluation of human seroreactivity of three strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Methods: For bacterial counts and cell viability studies in FACSCalibur (BD), cultures of the VD57 strain were performed for the three times (24, 48, 72 hours) and compared with CAP3W(21) and CAPJ4(76) strains in 24 and 48 hours. For antigen production, 48-hour culture supernatant of strains VD57, CAP3W(21) and CAPJ4(76), semi-purified by three-phase partition technique (TPP) was used. Extract was produced in medium with and without Tween-80 only for the CAPJ4 strain(76). The electrophoretic profile of the four extracts was analyzed by SDS-PAGE in 12% gel and the seroreactivity was evaluated by Western Blot with a pool of serum samples from the Non-Contacting group (composed of 4 participants with no history of contact with the bacteria or consumption of raw or undercooked), laboratory contact group (composed of 4 individuals with a history of contact due to activity in a microbiology laboratory) and farm contact group (composed of 4 individuals with a history of contact with infected animals). Results: In the evaluation by FACs, faster cell growth was observed for strain VD57, with a result 10 times higher than that recorded by CAP3W(21) and CAPJ4(76). The peak of cell viability recorded was 48 hours, but no considerable variation in cell mortality was identified at 72 hours. The electrophoretic profile of the extracts produced revealed differences in protein expression between the three strains, as well as for cultures under different conditions for CAPJ4(76). Intense human seroreactivity to the four extracts was recorded, confirming the presence of antigenic proteins in all strains, but it was possible

to identify a difference in the recognition profile between the Contacting and Non-Contacting groups only in the VD57 extract. Conclusion: The VD57 strain presents apex of growth and viability in the time of 48 hours of cultivation and in the comparison between the three strains, it demonstrates growth and viability superior to the others. The electrophoretic profile of extracts of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains cultivated under the same conditions, show similarity in the number of bands and difference in molecular weight. The use of Tween-80 in the culture medium generates a 50% increase in the number of bands for CAPJ4(76). All extracts produced have antigenicity for human serum, however, it is possible to show a difference in the profile of Contacts from the profile of Non-Contactants only in VD57.

**KEYWORDS:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Bacterial Count; Human Seroreactivity.

## 1 | INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura correspondem a importantes setores da atividade pecuária. No mercado internacional destaca-se fortemente a produção de lã, no entanto a produção de carne e leite, consistem em uma vital fonte de renda para diversas famílias do nordeste e de outras regiões brasileiras, assim como de vários países em desenvolvimento (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; PAPACHRISTOFOROU e MARKOU, 2006; BRASIL, 2006; VALERIO et al., 2009; BRASIL, 2015).

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente patogênico responsável pela linfadenite caseosa (LC), um bacilo pleomórfico gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos (PASCUAL et al, 1995; VALE et al., 2003; IVANOVIĆ et al., 2009). Identificada pela primeira vez em ovinos por Preisz em 1891 e descrita como causadora da Linfadenite Caseosa, *C. pseudotuberculosis* passou a ter sua nomenclatura atual em 1948 (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA, 2006). Este bacilo apresenta dois possíveis biovar, biovar equi, causador de linfangite ulcerativa em eqüinos e bovinos, e biovar ovis, causador de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos (SONGER et al. 1988).

O primeiro caso diagnosticado como infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos foi registrado em 1966 na cidade do Panamá (LOPEZ et al., 1966). A infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos apresenta quadro clínico similar ao da *Mycobacterium tuberculosis*, doença endêmica em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o que dificulta o diagnóstico no início da infecção (HEGGELUND et al., 2015). O diagnóstico em humanos descrito, foi realizado com cultivo bacteriano a partir de amostras de lavagem brônquica ou biópsia do paciente, com os microrganismos cultivados identificados por meio de provas bioquímicas e confirmada a identidade do patógeno por meio de PCR e Sequenciamento Genômico (HEGGELUND et al., 2015).

A citometria de fluxo fornece uma técnica de alta sensibilidade para detecção e avaliação individual de células, que não demanda tratamentos complexos da amostra ou isolamento de alvo da mesma. Esta técnica é bem estabelecida nas ciências da saúde como método de diagnóstico para diversas doenças. A partir destes modelos, diversos protocolos para avaliação de contaminação, crescimento e características bacterianas têm

sido desenvolvidos (BERGQUIST et al., 2009; GIVAN, 2010).

O presente trabalho tem a finalidade de avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos e análise da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

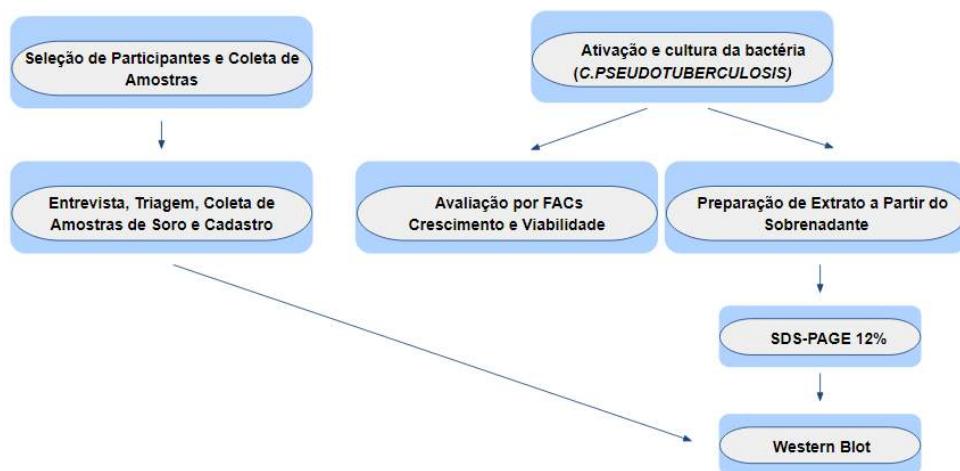


Figura 01: Fluxograma da metodologia.

### 2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA), com CAAE: 57018116.9.0000.5662. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a entrevista clínico-epidemiológica.

### 2.2 Critério de seleção de indivíduos

Aos participantes da pesquisa foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e com o aceite os voluntários foram entrevistados, n = 12. Foram realizados testes para confirmar o não contato dos participantes com antígenos de *M. tuberculosis* (Mtb), os quais podem apresentar reatividade cruzada com os antígenos de *C. pseudotuberculosis* devido a sua proximidade filogenética. Após o teste cutâneo tuberculínico e o teste IGRA, todos os resultados foram entregues aos participantes pela pesquisadora farmacêutica bioquímica, responsável técnica e o especialista infectologista do grupo encontrava-se disponível para eventuais consultas pelos participantes, nos dias e horários para atendimento previsto no ambulatório especializado em doenças infecciosas

do Complexo Hospitalar Universitário.

O Teste Cutâneo Tuberculínico utilizado foi o Derivado Proteico Purificado de *Mtb* TCT/PPD - (Statens, Dinamarca) para investigar o possível contato com *Mycobacterium tuberculosis* conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA. Foram coletadas amostras de sangue para o teste IGRA (QTF-TBGGold), para diagnóstico *in vitro* de infecção pelo *Mtb* (conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA Brasil para IGRA QTF) e para obtenção de soro. Após coleta e separação do sangue, as alíquotas de soro e plasma foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. Assim foram selecionadas as amostras de voluntários que apresentaram resultados negativos nos testes de contato com *Mtb*.

Os participantes foram categorizados nos grupos Contactantes (trabalhadores de fazenda com pequenos ruminantes ou estudantes de laboratório de microbiologia com contato com o bacilo) e Não Contactantes (sem contato com caprinos e ovinos ou seus derivados alimentícios crus ou com o bacilo) todos com resultado TCT <5mm (negativo) e IGRA negativo. O presente trabalho fez uso de uma fração dos soros obtidos por SANTOS (2018) e previamente testados para o reconhecimento de antígenos secretados da cepa PAT10, cepa proveniente da região da Patagônia na Argentina, sendo a seleção de quatro soros do grupo Não Contactante e oito soros do grupo Contactante (quatro de fazenda e quatro de laboratório), realizada de forma aleatória com auxílio de aplicativo de sorteio. A metodologia seguiu como ilustrado no fluxograma da Figura 1.

### 2.3 Seleção e preparação das bactérias

As cepas VD57, CAP21 (não formadora de biofilme) e CAP76 (formadora de biofilme) de *C. pseudotuberculosis* identificadas como de interesse entre as disponíveis na coleção da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – Universidade Federal da Bahia (UFBA), foram ativadas para uso nas análises de crescimento e produção de antígenos. As cepas foram previamente avaliadas com testes de identificação e caracterização bioquímica e coloração de Gram, após ativação do banco de amostras preservadas a -20 °C. As três cepas são caracterizadas por kit API-Coryne (BioMérieux) e sequenciadas, VD57 GenBank com o número de acesso CP009927, CAP76 GenBank com o número de acesso CP026499 e CAP21 GenBank com o número de acesso CP026500 (ALMEIDA et al., 2016; SÁ, 2018).

### 2.4 Análise da concentração bacteriana por Citometria de Fluxo - FACS

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 °C por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada descartável (10 µL), uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 °C por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500 µL foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo com 0,5% de TWEEN-80, a 37°C com agitação de 120

rpm, por 72 horas para VD57 (cepa definida como padrão para avaliação) e 48 horas para CAP21 e CAP76 (EMBRAPA 2007; SAMPAIO 2012). Das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nos tempos 24, 48 e 72 horas de cultura, amostras de 100  $\mu$ L foram retirados e diluídos em 900  $\mu$ L de PBS-TWEEN-80 0,5%, e homogeneizadas. Desse volume, 50  $\mu$ L foram transferidos para tubos BD TruCount™ contendo 450  $\mu$ L de PBS-T 0,5%. A esses tubos foram então adicionados 5  $\mu$ L (diluído em água a concentração final de 1:2) do corante Diamond™ Nucleic Acid Dye (10.000x, PROMEGA), após homogeneizado e incubado por 20 minutos sob proteção da luz e à temperatura ambiente, foram adicionados 5  $\mu$ L de Iodeto de propídio (solução 0,25 mg/mL). Finalmente homogeneizada a suspensão, foi procedida a aquisição pelo citômetro de fluxo para mensuração, com algumas modificações a partir de Sampaio (2012). As aquisições nos tempos previstos foram realizadas em quadruplicata para VD57 e em duplicata para as cepas CAP21 e CAP76. Foi determinada aquisição de 400.000 eventos por tubo, com velocidade de aquisição entre 2.000 e 3.000 eventos por segundo. A aquisição foi realizada com o programa BD CellQuest™ Pro e os valores obtidos foram analisados em Microsoft Office Excel. A fórmula para cálculo do número de células por microlitro foi, N° de eventos bactérias x N° de beads adquiridas / N° de beads do tubo x Volume do teste em  $\mu$ L, seguindo protocolo do kit BD TruCount™.

## 2.5 Cultivo bacteriano e preparação de antígeno secretado semi-purificado

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 °C por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada, uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 °C por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500  $\mu$ L foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo a 37°C por 48 horas (EMBRAPA 2007; SÁ 2018; SANTOS 2018). Para a cepa CAP76, foi realizada uma segunda expansão com as mesmas condições exceto pela adição de 0,5% de TWEEN-80 ao meio e crescimento em agitação de 120 rpm (SAMPAIO, 2012).

Para separação da massa úmida bacteriana e do meio de cultura contendo antígenos secretados foi realizada centrifugação em tubo Falcon de 50 mL a 6.000 xG, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para semi-purificação de proteínas secretadas utilizando o método de partição em três fases (Three Phase Partitioning - TPP), o qual foi filtrado a vácuo com um filtro bacteriológico de Nitrocelulose 0,22  $\mu$ m (BioRad). Foram adicionados 176 g/L de Sulfato de Amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ao sobrenadante obtido e ajustado para pH 4.0 com HCl. Em uma garrafa de 1 L foi adicionado 250 mL do sobrenadante contendo Sulfato de Amônio e 250 mL de N-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O), homogeneizado com vigorosa agitação manual por 10 minutos. Após repouso de 1h, a interface contendo as moléculas de interesse foi cuidadosamente coletada com uma pipeta graduada e transferida para um tubo Falcon de 50 mL, após retirar o excesso de Butanol e BHI do tubo, foi adicionado Tampão Fosfato de Sódio (TFS) 0,01M pH 7.3 até atingir o volume final de 5 mL. Por fim, esse extrato semi-

purificado obtido de cada cepa foi dialisado (membrana cut-off 10 KDa - SIGMA) com 4 trocas de TFS (PAULE et al., 2004).

A concentração de proteínas do extrato de cada cepa foi dosada pelo método de Lowry (BioRad), obtendo 1,46 mg/mL (VD57), 0,914 mg/mL (CAP21), 2,67 mg/mL (CAP76 c/T) e 2,79 mg/mL (CAP76 s/T), sendo armazenados em alíquotas de 400  $\mu$ L a -20 °C.

## **2.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O SDS-PAGE dos antígenos das três cepas foi realizado segundo metodologia padronizada previamente por Paule e colaboradores (2003), com modificações. Utilizando gel de migração com 12% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% SDS, 0,75% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED (tetrametiletilenodiamina) em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; e gel de empilhamento com 4% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% de SDS, 0,4% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED e tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

As aplicações nos géis foram realizadas com ajuste para 12  $\mu$ g de extrato protéico por poço do gel considerando a concentração de cada extrato obtido. Em um poço foi aplicado 1,5  $\mu$ L do padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 KDa (Thermo Scientific™). A migração ocorreu sob corrente elétrica de 30 mA e voltagem livre (para dois géis).

Para revelação das proteínas em gel foi utilizado o método de coloração por Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad). A análise do gel corado foi realizada com o programa GelAnalyzer2010.

## **3 | ANÁLISE DE REATIVIDADE ANTIGÊNICA POR WESTERN BLOTTING**

### **3.1 Transferência eletroforética de proteínas do gel para o papel de NC**

Após a eletroforese contendo 79,2  $\mu$ g de extrato protéico de cada cepa em um poço de 3,3 cm o "sandwich" foi montado em uma bandeja contendo o tampão de transferência para manter todas as camadas umedecidas, seguindo a sequência organizacional colocando-se a esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulose (BioRad) de 0,22  $\mu$ m de porosidade, gel contendo as proteínas, papel filtro e esponja, as bolhas entre as camadas foram removidas, o cassete foi fechado e o procedimento repetido para o segundo gel. Cada cassete foi então colocado no Kit Mini-Protean (BioRad), imerso em tampão de transferência. A fonte (BioRad) foi ligada com voltagem fixa de 100 V. A cuba de acrílico foi mantida dentro de recipiente com gelo para evitar superaquecimento. Após uma hora o sistema foi desligado e desmontado, o papel de nitrocelulose foi então identificado para a orientação dos lados e posição da corrida. Posteriormente o papel de nitrocelulose foi corado com Ponceau S para confirmação da transferência, descorado e cortado em fitas de 4 mm.

## 3.2 Imunoblotting

Cada fita contendo o extrato protéico da *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi devidamente posicionada e colocada em tubos pré-rotulados e lavados com PBS. Após as lavagens os tubos foram imersos em solução de bloqueio contendo tampão salina 0,15M com fosfato 0,01M (pH 7,2-7,4) contendo 0,05 % de Tween-20, 5% de leite desnatado e submetidos a agitação mecânica overnight a 4°C. Após o bloqueio cada fita foi lavada com PBS-Tween 0,5% e posterior incubação com o pool de soro dos participantes sob agitação a 37°C por 1h. As fitas foram lavadas quatro vezes e incubadas com conjugado anti-IgG humana (Life technologies) sob agitação a 37°C por 1h. Após cinco lavagens com PBS-Tween-20 as fitas foram imersas em solução reveladora, 0,024g de 4-Cloro- $\alpha$ -Naftol (Sigma), 8 mL de metanol, 32 mL de PBS e 13,3 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sob agitação por 20 - 30 min. A revelação foi interrompida com lavagem em água destilada.

O padrão de migração eletroforética das bandas transferidas e identificadas pela reação Ag-Ac foi calculado a partir do PM relativo calculado no GelAnalyzer2010, superposto ao padrão do gel considerando as distâncias individuais de cada banda identificada. Foi analisado o padrão de bandas identificadas no gel e nas fitas após reação com soro de cada grupo estudado. Os dados encontrados foram tabulados e os resultados comparados entre os quatro extratos. Procedeu-se uma busca por similaridade entre os resultados obtidos no presente estudo e peso molecular de bandas reativas descritas em trabalhos prévios realizados com *C. pseudotuberculosis* nos preparados similares e que reagiram nos modelos de infecção humana (SANTOS, 2018) e infecção natural e experimental de ovino e caprino (MEYER, 2000; VALE et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2013; Sá, 2018; RIBEIRO, 2019).

## 4 | RESULTADOS

### 4.1 Citometria de fluxo

Da aquisição das amostras de suspensão bacteriana, nos dados obtidos por FACs, foi estabelecida uma máscara com dois gráficos para avaliação dos eventos totais adquiridos (Figura 02). O gráfico representativo A (Figura 02-A) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise de tamanho no eixo X (FSC) e complexidade interna no eixo Y (SSC), na qual foram estabelecidas duas regiões (R1; R2). Em R1 foram identificados na maior parte eventos correspondendo a células bacterianas. Em R2 encontra-se a população de beads provenientes do tubo BD-TruCount. Foi evidenciada a concentração de eventos que não correspondiam a células ou beads, sendo considerados artefatos, com maior concentração da população abaixo do ponto 10<sup>1</sup> do eixo Y. O gráfico representativo B (Figura 02-B) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise da fluorescência identificada pelo aparelho e avaliada no gráfico do canal FL1, leitura no espectro verde no qual identifica-se o corante



Diamond™, no eixo X e do canal FL2, leitura no espectro vermelho no qual identifica-se o corante Iodeto de propídio, no eixo Y. O gráfico B é dividido em quatro quadrantes, para diferenciação entre população duplo negativa (Low/Left - LL), fluorescência no espectro verde (Low/Right - LR), fluorescência no espectro vermelho (Up/Right - UL) e fluorescência em ambos espectros (Up/Right - UR). Sendo assim, LL representa ausência de corantes e foi considerado como artefatos da leitura, LR representa presença apenas do corante Diamond™ e foi considerado como células bacterianas viáveis íntegras, UL representa presença apenas do corante Iodeto de propídio e foi considerada como células bacterianas mortas, e UR representa a presença de ambos os corantes e foi considerado como células bacterianas danificadas (com perda da integridade da membrana plasmática). As beads apresentam fluorescências com comprimento de onda específico dos canais FL-1 e FL-2 e foram subtraídas para o cálculo do número de células danificadas.

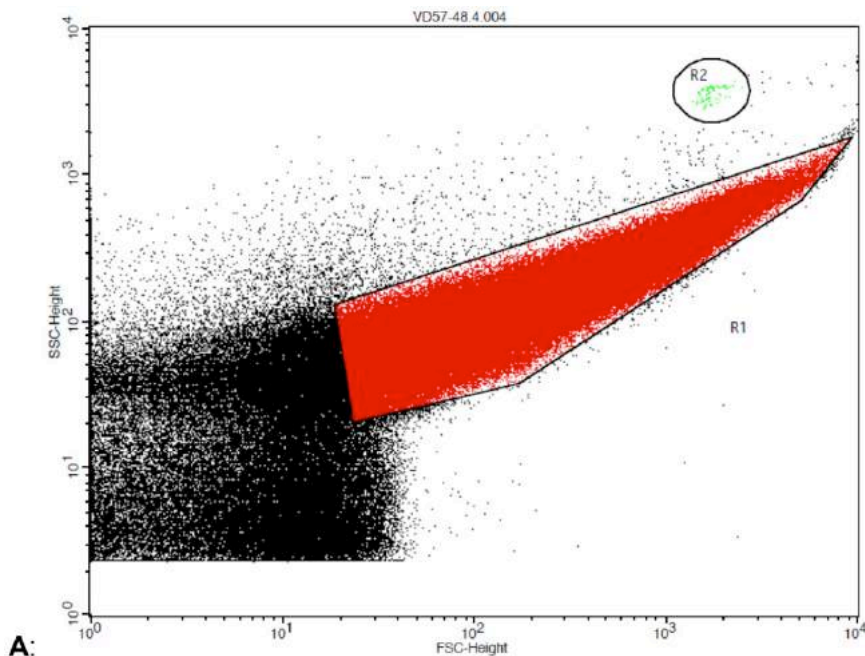


Figura 02: Parâmetros estabelecidos na Contagem bacteriana por FACs.



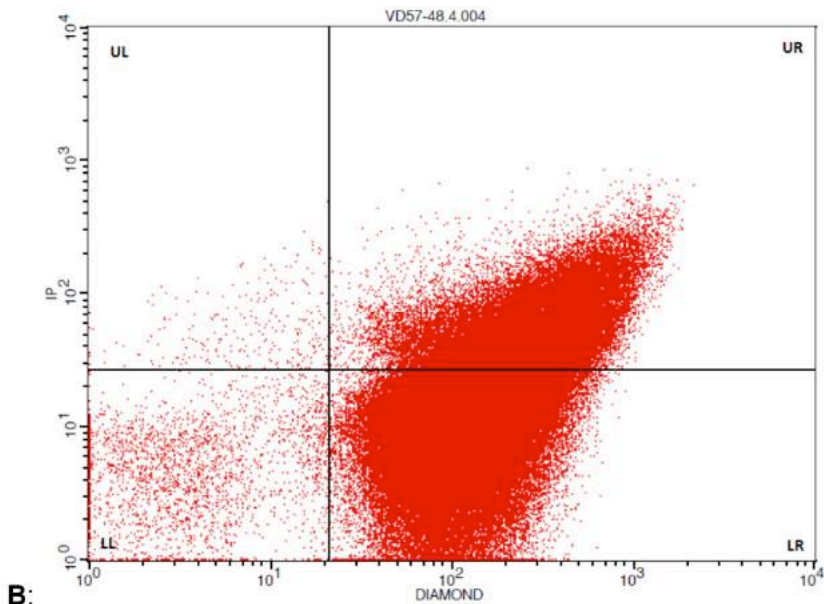


Figura 2: **A** – Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount, em gráfico de Tamanho x Complexidade interna (FSC x SSC), com delimitação de Gates R1 (população bacteriana) e R2 (população de beads). **B** – Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount™, em gráfico de intensidade de fluorescência Diamond™ x Iodeto de propídio (DIAMOND x IP), com divisão por quadrantes LL (duplo negativo), LR (Diamond™ positivo), UL (IP positivo) e UR (duplo positivo).

## 4.2 Comparação dos métodos de crescimento bacteriano e análise quantitativa de *C. pseudotuberculosis*

No Quadro 01 (cepa VD57), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e bactérias mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de  $1 \times 10^6$  bac/ $\mu$ L em 24hs,  $2 \times 10^7$  bac/ $\mu$ L em 48 horas e  $4 \times 10^5$  bac/ $\mu$ L em 72hs. Entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 31% em 24hs, 72% em 48hs e 35% em 72hs. A taxa de células com dano foi cerca de 57% no início e no final da incubação da curva de crescimento com cerca de 27% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos, cerca de 11% com 24hs e que diminui no decorrer das 48 e 72 horas para 0,7% e 2%, respectivamente.

A cepa CAP21, descrita como não formadora de biofilme (SÁ, 2017) pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/

agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de  $7,9 \times 10^6$  bac/ $\mu$ L em 24hs,  $1,4 \times 10^6$  bac/ $\mu$ L em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 58% em 24hs, 68% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 40% em 24hs e cerca de 30% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1,6% nas 24hs e que diminuiu no decorrer das 48 horas para 0,7% (Quadro 01).

A cepa CAP76, descrita como formadora de biofilme (SÁ, 2017), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24 e 48hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de  $5 \times 10^5$  bac/ $\mu$ L em 24hs e  $7 \times 10^5$  bac/ $\mu$ L em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 91% em 24hs e 83% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 7% em 24hs e cerca de 15% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1% nas 24hs e que diminuiu no decorrer das 48 horas para 0,3% (Quadro 01).

No Gráfico 01 (A), células vivas íntegras, é possível observar o crescimento da cepa VD57 com ápice no tempo de 48 horas. A variação da porcentagem de células vivas íntegras para CAP21 e CAP76 foi menor que 10%, sendo evidenciado queda na viabilidade com 48h em CAP76. Em (B), células danificadas, é possível identificar relação inversamente proporcional ao apresentado em (A). O Gráfico 01 (C), células mortas, demonstra resultados baixos de porcentagem de células mortas para todas as cepas, apresentando apenas em 24 horas para VD57 valor superior a 5% de células mortas.

Amostra	Celulas vivas totais / $\mu$ L	Celulas danificadas totais / $\mu$ L	Celulas mortas totais / $\mu$ L	Amostra	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas contadas	% de celulas mortas contadas
VD57 24h	11950,25	21943,24	4405,40	VD57 24h	31,37	57,06	11,56
VD57 48h	181147,02	67924,21	1626,35	VD57 48h	72,51	26,83	0,66
VD57 72h	25588,11	51153,88	1725,52	VD57 72h	34,75	63,11	2,14
CAP21 24h	79886,16	54823,54	2167,37	CAP21 24h	59,00	39,41	1,59
CAP21 48h	14055,34	6214,95	134,86	CAP21 48h	68,88	30,44	0,68
CAP76 24h	5507,00	437,25	69,26	CAP76 24h	91,56	7,28	1,16
CAP76 48h	7054,57	1286,67	25,06	CAP76 48h	84,24	15,46	0,30

Quadro 01: Análise da contagem e viabilidade celular.

Quadro 01: **(A)** Médias do número de células vivas integras, danificadas e mortas totais por microlitro de cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo. **(B)** Média da porcentagem de células vivas integras, danificadas e mortas da cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo.

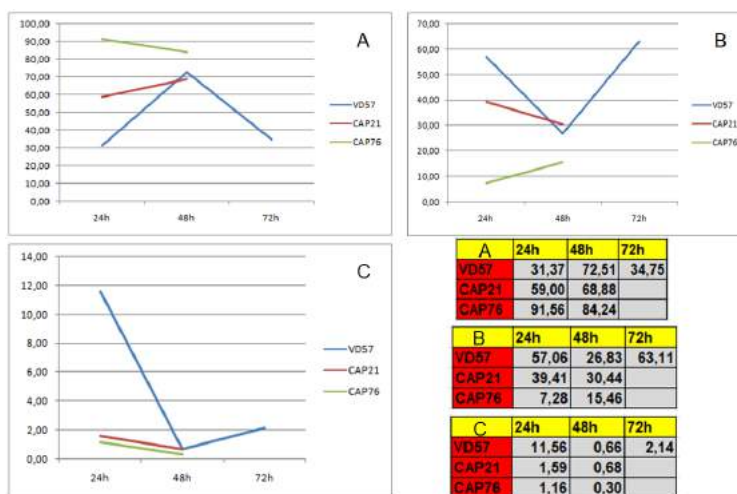


Gráfico 01: Variação da viabilidade celular de cepas de *C. pseudotuberculosis*.

Gráfico 01: **(A)** Gráfico da média da variação de células viáveis integras em porcentagem x tempo. **(B)** Gráfico da média da variação de células danificadas em porcentagem x tempo. **(C)** Gráfico da média da variação de células mortas em porcentagem x tempo.

## 5 | ELETROFORESE

### 5.1 O perfil eletroforético em SDS-PAGE do extrato de proteínas secretadas de três cepas de *C. pseudotuberculosis*.

Com a análise da eletroforese do extrato protéico das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80) em SDS-PAGE 12% corado pelo método de Coomassie blue, utilizando o programa GelAnalyzer2010, foi possível observar a presença de bandas com pesos moleculares que variam de 16 KDa a 213 KDa (Figura 3 a e b).

O extrato protéico da cepa VD57 possui 17 bandas entre 16 KDa e 167 KDa, CAP21 possui 19 bandas entre 16 e 168 KDa, CAP76 cultivada com Tween-80 possui 27 bandas entre 16 e 213 KDa e, CAP76 cultivada sem Tween-80 possui 15 bandas entre 16 e 170 KDa (Figura 4c-1h).

Os pesos moleculares das bandas reveladas em cada cepa estão descritas na figura 03 e, f, g e h. Destacam-se pela presença nas três cepas estudadas sem Tween-80 as bandas de ~16, ~17, ~20, ~22, ~24, ~27, ~31, ~33, ~38, ~42, ~46, ~52, ~54, ~58, ~60, ~63, ~70, ~75, ~81, ~89, ~96, ~102, ~115, ~121, ~131, ~146, ~151, ~158, ~161, ~169,

~185 e ~213 KDa (a variação de um ponto acima ou abaixo está representando aqui com o símbolo ~).

Das bandas identificadas no gel SDS-PAGE 12% foram comuns nas três cepas, as de 169, 102, 75, 70, 31, 24, 16 KDa e entre as preparações semi-purificadas de CAP76 com e sem Tween-80 observavam-se as de 169, 161, 131, 102, 75, 70, 38, 31, 27, 24, 16 KDa.

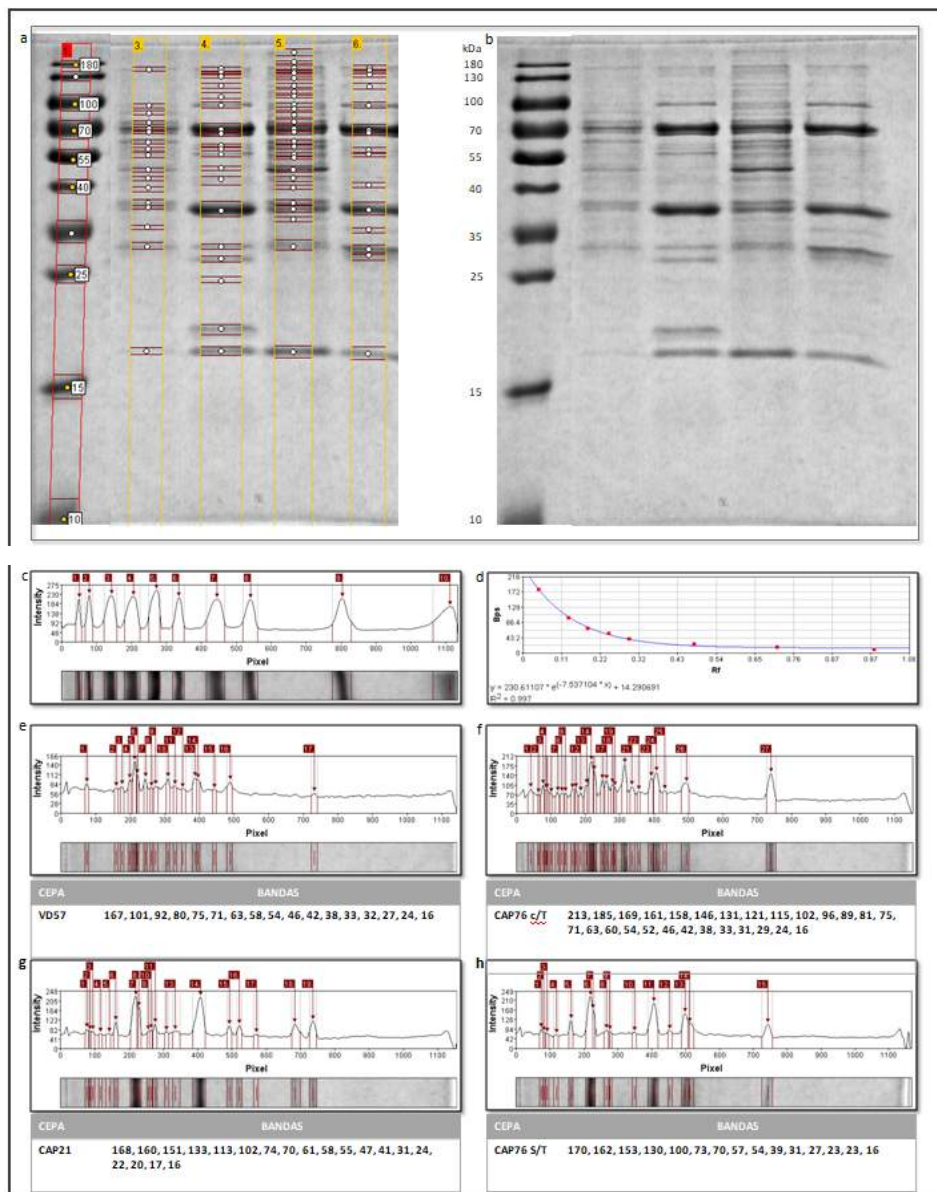


Figura 03: Perfil eletroforético dos extratos semi-purificadas de cepas cultivadas de *C.*

Figura 03: Análise de eletroforese de extratos semipurificados de *C. pseudotuberculosis* crescida em caldo BHI por 48h em gel SDS-PAGE de 12% corado com Coomassie Blue em GelAnalyzer2010. (a) Perfil de bandas reveladas no Gel – **coluna 1:** PM 10-180 KDa -Thermo Scientific™, **coluna 3:** extrato VD57, **coluna 4:** CAP21, **coluna 5:** CAP76 c/Tween-80, **coluna 6:** CAP76 s/Tween-80 ; (b) Identificação as banda do PM e dos extratos no GelAnalyzer ; (c) Análise do perfil eletroforético do padrão de peso molecular PM (10 a 180 KDa – Thermo Scientific™); (d) Curva de calibração para o cálculo do peso molecular; (e- h) Determinação do PM das bandas identificadas nos quatro extratos, na ordem descrita nos respectivos quadros identificados.

Extrato proteico	213	185	169	161	158	151	146	131	121	115	102	96	89	81	75	70	63	60	58	54	52	46	42	38	33	31	27	24	22	20	17	16	
VD57			X								X		X	X	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X					X
CAP21			X	X		X		X		X	X				X	X		X	X	X		X	X			X		X	X	X	X	X	X
CAP 76 c/T	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CAP 76 s/T			X	X		X		X			X				X	X			X					X		X	X	X	X				X

Quadro 02: Relação de bandas protéicas presentes de PM coincidentes no gel de eletroforese SDS-PAGE 12%.

## 6 I IMUNOBLOTTING

### 6.1 Imunorreatividade de indivíduos contactantes e não contactantes com a *C. pseudotuberculosis* à antígenos semi-purificados das cepas VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80.

Na figura 04 e quadro 03 observa-se reconhecimento pela reatividade IgG com as bandas identificadas nas amostras séricas de pool de indivíduos dos grupos contactante com a *C. pseudotuberculosis* em laboratório, fazenda e também no grupo de indivíduos que relataram não contato com a bactéria ou lida com pequenos ruminantes (não contactante).

No extrato VD57 foi reconhecida a banda de aproximadamente 151 KDa, e no CAP21 a banda de aproximadamente 135 KDa, ambas exclusivas para as respectivas cepas (Quadro 03).

Os diferentes extratos apresentaram reatividade da banda de 89 KDa no grupo não contactante, e apenas na VD57 ela aparece nos três grupos.

A banda de 68 KDa foi reconhecida em todos os extratos no grupo de contato laboratório. Em VD57, CAP21 e CAP76 S/Tween-80 apresentaram a referida banda para o grupo contactante em fazenda, apenas nos extratos CAP21 e CAP76 S/Tween-80 no grupo não contactante (Quadro 03).

Todos os extratos apresentaram a banda de 64 KDa, exceto no grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 S/Tween-80.

Em todos os extratos a banda de aproximadamente 42 KDa apresentou reatividade, com exceção do grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 sem Tween-80.

Os extratos CAP21 e CAP76 cultivados com Tween-80 apresentaram a banda de aproximadamente 38 e 36 KDa em todos os grupos. O extrato CAP76 sem Tween-80 apresentou apenas a banda de 38 KDa nos grupos contactante em laboratório e não

contactante. Não foram detectadas as referidas bandas no VD57.

Apenas o extrato CAP21 apresentou a banda de aproximadamente 25 KDa, contudo é possível observar uma possível banda desta altura no CAP76 sem Tween-80 no grupo contactante em laboratório. Apenas no de CAP76 cultivada com Tween-80 apresentou uma banda na altura de 18 KDa, no grupo contactante em laboratório.

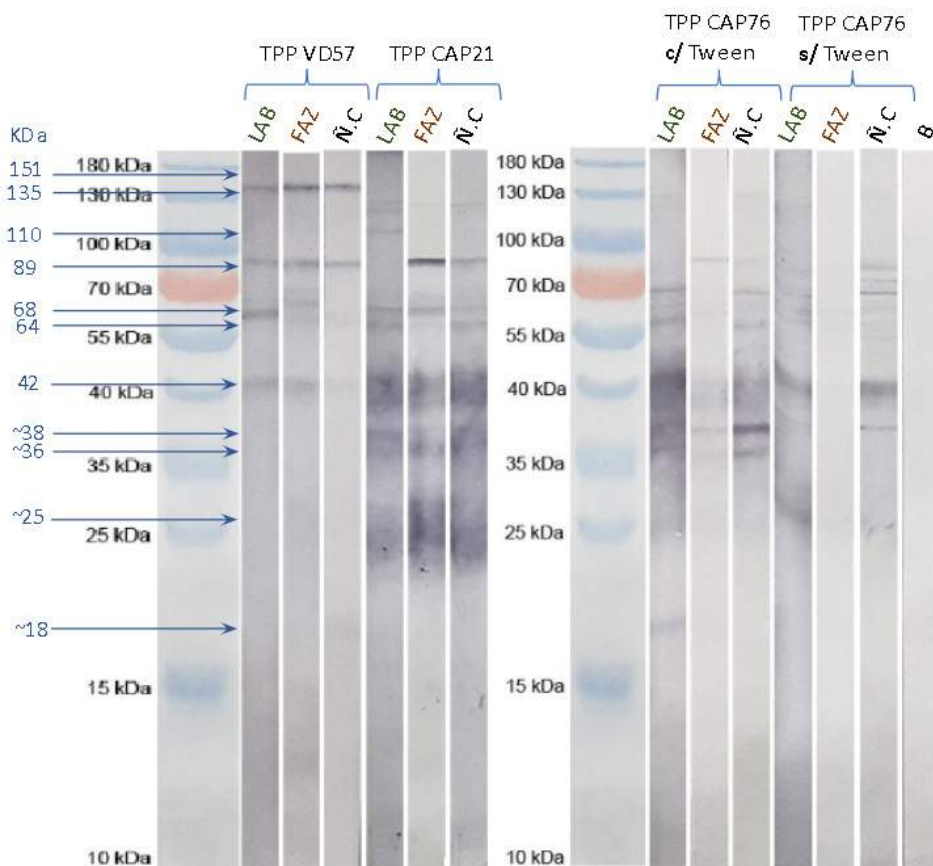


Figura 04: Western blot dos antígenos de *C. pseudotuberculosis* com soro humano.

Figura 04: Western blotting em membrana de NC (0.2 micra – Bio-Rad), a partir da eletroforese em SDS-PAGE 12%. Revelação com anti-IgG humana (Life technologies) após reatividade de pool de soros de indivíduos contactantes e não contactantes com *C. pseudotuberculosis*. Extrato semipurificado por partição em três fases (*Three Phase Partitioning* – TPP, de cepas VD57, CAP21, CAP76 com e sem Tween-80 cultivada em BHI caldo. Pesos moleculares analisados utilizando o programa GelAnalyzer2010. As setas indicam peso molecular aproximado. LAB - indivíduos com contato em laboratório; FAZ - indivíduos com contato em fazenda; N.C - indivíduos sem contato; B - branco.



Extrato proetico	Bandas reconhecidas no pool de Contactantes e Não Contactantes	Bandas reconhecidas apenas no pool de Contactante
CapVD57	151; 89; 68; 64;42	68; 64
CAP21	135; 110; 89; 68; 64; 42; 38; 36; 25	110
CAP 76 c/T	89; 68; 64; 42; 38; 36; 25; 18	X
CAP 76 s/T	89; 68; 64; 42; 38; 25	X

Quadro 03: Relação de PM de bandas reconhecidas nos diferentes extratos com reconhecimento pelos grupos contactantes e não contactantes.

## 7 | DISCUSSÃO

### 7.1 Análise comparativa da contagem e rendimento de crescimento bacteriano em diferentes tempos

Métodos como avaliação da concentração por D.O., escala de Mc Farland e cultura para contagem de unidade formadora de colônia (UFC), são comumente aplicados na avaliação do crescimento de uma cultura microbiana. Apesar do baixo custo e fácil aplicação, esses métodos apresentam baixa precisão para contagem bacteriana, além de serem incapazes de avaliar a viabilidade das cepas do microrganismo em análise, visto que *C. pseudotuberculosis* cresce em paliça (NEBE-VON-CARON et al., 2000; SAMPAIO, 2012). Dessa maneira a aplicação da citometria de fluxo para contagem bacteriana é a opção mais adequada para realização de procedimentos que exigem velocidade e precisão nos resultados, como infecção experimental em modelo animal e controle de qualidade (GUNASEKERA, ATTFIELD, VEAL, 2000; HOEFEL et al.,2003; HAMMES et al., 2008; SÁ, 2018) .

Devido a sua aplicação em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa e colaboradores do LABIMUNO-UFBA, a cepa VD57 foi selecionada como modelo para avaliação do crescimento e viabilidade celular através de técnica de citometria de fluxo em três tempos de crescimento por 72 horas (MOURA-COSTA et al., 2008; BASTOS, 2011; RIBEIRO, 2019). As cepas CAP76 e CAP21 foram avaliadas apenas em dois tempos por 48 horas, tempo no qual esses cultivos são aplicados na obtenção de antígenos para teste em imunodiagnóstico animal e humano. Diferente de estudos prévios realizados por Sampaio (2012), em que se estabeleceu o uso da concentração final de 2x para SYBR-safe, no presente trabalho foi possível realizar a marcação de células viáveis aplicando a concentração final de 1:2 de Diamond™, reduzindo o consumo de corante por reação.

Na Figura 01, evidencia-se uma distribuição prolongada no gráfico A que se estende do ponto 10<sup>0</sup> ao ponto 10<sup>4</sup> do eixo X (bactérias), uma pequena distribuição uniforme e isolada no canto superior direito do gráfico (beads) e uma grande distribuição de eventos no canto inferior esquerdo (artefatos). Estas distribuições foram avaliadas com o uso de Gates para avaliação da fluorescência dos eventos ali presentes de forma isolada. A

distribuição prolongada das bactérias no gráfico A é resultante da estrutura em forma de bacilo da *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA et al., 2008; SAMPAIO, 2012). O gráfico B apresenta a fluorescência de todos os eventos adquiridos, presentes no gráfico A. O quadrante inferior esquerdo representa dupla negatividade dos marcadores IP e Diamond™ (artefatos), que foram definidos após avaliação da autofluorescência de amostras do mesmo cultivo sem adição de corante. Apesar da elevada concentração de artefatos identificados, estes permaneciam em concentrações similares em diferentes testes da metodologia realizados, não apresentados neste trabalho. Nos quadrantes UR, UL e LR, observou-se distribuição com elevada concentração de eventos em LR, indicando que dentre os eventos caracterizados com células bacterianas marcadas, cerca de 70% correspondem a células viáveis (HOEFEL et al., 2003; SAMPAIO 2012).

Foi evidenciado crescimento superior ao descrito na literatura para a cepa VD57 em 48 horas, atingindo uma concentração de  $2 \times 10^{10}$  bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). As cepas CAP21 e CAP76 apresentaram crescimento compatível com o descrito por outros autores, atingindo as concentrações de  $1,4 \times 10^9$  e  $7 \times 10^9$  bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). Estes resultados referem-se apenas às células viáveis íntegras. Em comparação com o crescimento celular da cepa T1 evidenciado por Sampaio (2012), apresentou declínio da viabilidade e número de células totais após 24 horas de cultivo, enquanto as cepas VD57 e CAP21 avaliadas no presente estudo, apesar de atingirem concentrações similares de células viáveis, apresentaram crescimento tardio atingindo o ápice com 48 horas de cultivo. Para CAP76 não foi evidenciada variação da concentração e viabilidade celular até 48 horas de cultivo.

## 7.2 Análise comparativa do perfil eletroforético dos extratos (SDS-PAGE)

Provas bioquímicas realizadas pela microbiologista do setor responsável pela coleção (dados não mostrados neste trabalho) confirmaram a ausência de contaminantes nos cultivos das cepas de *C. pseudotuberculosis*. As três cepas foram cultivadas sob as mesmas condições físicas, químicas e de tempo. Entretanto, o perfil eletroforético dos extratos secretados apresenta pequena variação na presença e no número de bandas, fenômeno já previsto para micro-organismos de mesma espécie que evoluíram em condições ambientais distintas (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018).

Em comparação com perfil eletroforético de antígenos das cepas VD57, CAP21, CAP76, T1, Cp1002 e PAT10 obtidos por TPP, os resultados no presente trabalho reafirmam a diferença no perfil de proteínas secretadas entre as diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, apesar de outros autores utilizarem coloração com Nitrato de Prata (MEYER, 2000; VALE, 2003; PAULE et al., 2003; BASTOS, 2011; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

Apesar das cepas VD57, CAP21 e CAP76 apresentarem número de bandas similar



(17, 19 e 15 respectivamente), o perfil eletroforético evidencia a diferença de expressão entre as cepas, cujas proteínas secretadas possuem diferentes pesos moleculares (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018). Ao avaliar o perfil eletroforético dos dois cultivos da cepa CAP76, foram reveladas maior número de bandas quando cultivada com Tween-80, com um acréscimo de quase 100% no número de bandas visualizadas na eletroforese.

### 7.3 Análise comparativa do perfil de reconhecimento dos antígenos presentes nos extratos por soro humano (Western Blot)

As bandas reveladas no Immunoblotting condizem com o visualizado no gel corado com Comassie Blue, apesar da menor sensibilidade deste corante em comparação ao Nitrato de Prata na detecção de proteínas (CHEVALLET, LUCHE, RABILLOUD, 2007).

Dentre as diversas bandas visualizadas por coloração com Comassie Blue na eletroforese dos quatro extratos, de 16 a 213 KDa, onze bandas foram reveladas no immunoblotting (150, 135, 110, 89, 68, 64, 42, 38, 36, 25 e 18 KDa), sendo apenas quatro destas presentes em todos os extratos (89, 68, 64 e 42 KDa).

A sororreatividade humana avaliada em Western Blot reconheceu bandas já descritas por outros autores com as mesmas cepas ou cepas diferentes em ovinos e caprinos experimentalmente infectados (PAULE et al., 2003; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; RIBEIRO, 2019). Em comparação com o descrito por Santos (2018), dentre as principais bandas descritas pelo autor no extrato de antígeno secretado da cepa PAT10, nenhuma destas bandas foi evidenciada em Western blot com os extratos do presente trabalho.

O extrato antigênico da cepa PAT10 produzido e avaliado por Santos (2018), permitiu a discriminação entre indivíduos contactantes e não-contactantes, por revelação das bandas de 31, 71, 164 e 275 KDa, enquanto que no presente estudo as bandas de 64 e 68 KDa em VD57 são reconhecidas apenas pelos grupos Contactantes e não foi possível identificar bandas cuja reatividade permita evidenciar diferença entre Contactantes e Não Contactantes em CAP21 e CAP76. A phospholipase D (PLD) com peso molecular de 31 KDa, é um fator de virulência da *C. pseudotuberculosis* comumente descrito em experimentos de imunodiagnóstico com extratos de antígenos somáticos ou secretados de diferentes cepas, com soro humano, caprino ou ovino (PAULE et al., 2003; MOURA-COSTA et al., 2008; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

A sororreatividade de antígenos de *C. pseudotuberculosis* é bem estudada para fins de diagnóstico de infecção ou vacinas para animais (REBOUÇAS et al, 2013), e mais recentemente para humanos (SANTOS, 2018). No presente trabalho com as cepas VD57, CAP21 e CAP76 provenientes da mesma região geográfica, submédio São Francisco - Juazeiro, Bahia, Brasil (MOURA-COSTA et al, 2008; SÁ et al, 2013 e 2018), utilizando a técnica de Western blot, foi possível evidenciar diferença do grupo Contactante para grupo Não Contactante com *C. pseudotuberculosis* apenas no extrato da cepa VD57.

## CONCLUSÕES

- A cepa VD57 apresenta crescimento tardio.
- A VD57 apresenta crescimento superior e viabilidade inferior em comparação às cepas CAP21 e CAP76 nos tempos estudados de 24 e 48 horas.
- Observa-se baixa mortalidade das três cepas em meio BHI nos tempos estudados.
- O perfil eletroforético dos extratos das cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e grande diferença no perfil eletroforético.
- A utilização de Tween-80 no meio de cultivo de CAP76 induziu um grande aumento no número de bandas.
- Os extratos apresentam antigenicidade em soro humano. Há diferença no perfil de reconhecimento de Contactantes e Não Contactantes nos extratos de VD57 e CAP21.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: Imunologia Celular e Molecular. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 89-107, 2011.

ALMEIDA, S., TIWARI, S., MARIANO, D., SOUZA, F., JARNAL, S. B., COIMBRA, N., RAITTZ, R. T., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., PEREIRA, F. L., SOARES, S. C., LEAL, CARLOS, A. G., BARH, D., GHOSH, P., FIGUEIREDO, H., MOURACOSTA, L. F., PORTELA, R. W., MEYER, R., SILVA, A., AZEVEDO, A. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. Standards in Genomic Sciences, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

BASTOS, B. L. Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de Quillaja saponaria como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico. Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. Commonwealth Bureau of Animal Health, n. 32, p. 645-657, 1962.

BERGQUIST, P. L.; HARDIMAN, E. M.; FERRARI, B. C.; WINSLEY, T. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. Extremophiles, v. 13, n. 3, p. 389-401, 2009.

BOYAZOGLU, J.; HATZIMINAOGLOU, I.; MORAND-FEHR, P. The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. Small Ruminant Research, v. 60, p. 13-23, Jul. 2005.

BRASIL. Censo Agropecuário 2006. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. 2006. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro\\_2006.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf)> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL. Produção da Pecuária Municipal. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. v.43, 2015. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL b. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil livre da tuberculose. Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 52 p. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/0B0CE2wqdEaReVc5V3cyMVFPcTA/view>. Acesso em: 18 de Jun. de 2019.

BUZATU D. A.; MOSKAL, T. J.; WILLIAMS, A. J.; COOPER, W. M.; MATTES, W. B.; WILKES, J. G. An Integrated Flow Cytometry-Based System for Real- Time, High Sensitivity Bacterial Detection and Identification. PLoS One, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; FERREIRA DE MOURA COSTA, L.; JEAN, B.; PAULE, A.; LÚCIA VALE, V.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 2, n. 1, p. 88–93, 2003.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Author manuscript, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. Van; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Veterinary Microbiology, v. 75, p. 167-175, Abr. 2000.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary Research, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

ELLIS, T. M.; SUTHERLAND, S. S.; WILKINSON, F. C.; MERCY, A. R.; PATON, M. W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. Australian Veterinary Journal, v. 64, n. 9, p. 261–263, Set. 1987.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. Vet. Immunol. Immunopathol., n. 28, p. 289-301, 1991a.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Vet. Immunol. Immunopathol., n. 28, p. 303-316, 1991b.

EMBRAPA. Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos. Divulgação digital. v.1, 2007. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/526524/linfadenite-caseosa-o-estado-da-arte>> Acesso em: 26 Jan. 2017.

Estevao-Belchior, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Jensen, D. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Ve. Argentina, 23, p. 258–278, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, v. 76, p. 42 – 48, 2008.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley T., Hawley R. (eds) *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, ed. 3, v. 699, p. 1-29, Humana Press, 2011.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL D. A. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1228-1232, 2000.

HAMMES, F.; BERNEY, M.; WANG, Y.; VITAL, M.; KO'STER, O.; EGLI, T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, v. 42, p. 269-277, 2008.

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÅVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGES, L.; SUNDSET, L.; SØRUM, H.; FRØLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. In: *Open forum infectious diseases*. Oxford University Press, 2015.

HOEFEL, D.; GROOBY, W. L.; MONIS, P. T.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*, n. 55, p. 585 – 597, 2003.

HOELZLE, L. E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary microbiology*, v. 164, n. 3-4, p. 359-365, 2013.

IVANOVIĆ, S.; ŽUTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; ŽUJOVIĆ, M. Caseous lymphadenitis in goats. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v. 25, n. 5-6-2, p. 999-1007, 2009.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J. L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 25, n. 9, p. 848-851, 2006.

KESLIN, M. H.; McCOY, E. L.; McCUSKER, J. J.; LUTCH, J. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: A New Cause of Infectious and Eosinophilic Pneumonia. *The American Journal of Medicine*, v. 67, n. 2, p. 228-231, 1979.

KUMAR, J. S.; PARIDA, M. M.; LAKSHMANA RAO, P. V. Development & evaluation of biotinylated DNA probe for clinical diagnosis of chikungunya infection in patients' acute phase serum & CSF samples. *Indian Journal of Medical Research*, v. 138, p. 117-124, Jul. 2013.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K.; WAHOME, R. G.; Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Veterinary Research Communications*, v. 25, p. 89–97, 2001.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 1, p. 15-22, 2010.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.

- MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. *Small Ruminant Research*, n. 98, p. 39-45, 2011.
- MATOS, E. D.; LEMOS, A. C. M.; BITTENCOURT, C.; MESQUITA, C. L. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 11, n. 3, p. 331-338, 2007.
- MCGUIRE, A. M.; WEINER, B.; PARK, S. T. WAPINSKI, I.; RAMAN, S.; DOLGANOV, G.; PETERSON, M.; RILEY, R.; ZUCKER, J.; ABEEL, T.; WHITE, J.; SISK, P.; STOLTE, C.; KOEHRSEN, M.; YAMAMOTO, R. T.; LACOBELLI-MARTINEZ, M.; KIDD, M. J.; MAER, A. M.; SCHOOLNIK, G. K.; REGEV, A.; GALAGAN, J. Comparative analysis of Mycobacterium and related Actinomycetes yields insight into the evolution of Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 120, 2012.
- MOURA-COSTA L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.*, v.1, n.1, p.105-115, 2002.
- MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, n. 1-2, p. 131-141, 2008.
- MEYER, R. J. N. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência.** 2000. Tese (Doutorado em Imunologia)- Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2000.
- MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 42-48, nov. 2002.
- NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J.; HEWITT, C. J.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, n. 42, p. 97-114, 2000.
- NÓBREGA, K. F. Linfadenite caseosa: Revisão e considerações sobre a utilização de vacinas no Brasil. Monografia - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.
- PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, n. 56, p. 480-486, 2007.
- PAPACHRISTOFOROU, C.; MARKOU, M. Overview of the economic and social importance of the livestock sector in Cyprus with particular reference to sheep and goats. *Small Ruminant Research*, n. 62, p. 193-199, 2006.

PASCUAL, C. LAWSON, P. A.; FARROW, J. A.; GIMENEZ, M. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* Based on 16s rRNA Gene Sequences. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Reino Unido, v. 45, n. 4, p. 724-728, out. 1995.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, R. C.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 96, n. 3-4, p. 129-139, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of tem cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, n. 2, p. 185- 191, 1997.

PEPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. M. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Veterinary Research*, n. 1, p. 63-82, 1994.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JÚNIOR, G.; LISTONI, F. J. P. Punção Aspirativa Com Agulha Fina No Diagnóstico do *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Na Linfadenite Caseosa Caprina. *Arquivo Instituto Biologia*, São Paulo, v.68, n.1, p.23-28, jan./jun. 2001.

RIBEIRO, M. B. **Aspectos da resposta imune ovina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa cp\_VD57 em infecção experimental**. 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2019.

SÁ, M. C. A. GOUVEIA, G. V.; KREWER, C. DA C.; VESCHI, J. L.; DE MATTOS-GUARALDI, A. L.; DA COSTA, M. M. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, Brasil, v. 36, n. 2, p. 265-268, fev. 2013a.

SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUVEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, M. C. A. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*: Aspectos moleculares de cepas produtoras e não produtoras de biofilme e da resposta imune por elas induzida numa infecção experimental em caprinos**. 2018. 155 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO))-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SAMPAIO, G. P. Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. 42 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia. 2012.

SANTIAGO, L. B. et al. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 46., 2009, Paraná.

SANTOS, R. M. **Estudo da Imunorreatividade Humana *in vitro* a Antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, v. 88, p. 50-55, 2010.

SILVA, W. M.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A. V.; CASTRO, T. L.; PACHECO, L. G.; SANTOS, A. R.; CIPRANDI, A.; DORELLA, F. A.; ANDRADE, H. M.; BARH, D.; PIMENTA, A. M.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. *Microbial Pathogenesis*, p. 37-42, 2013.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 2, p. 223-226, 1988.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8.ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 894p, 2005.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; PAULE, A.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* n. 2, p. 192–200, Jan/Dez. 2003.

VALERIO, D.; GARCÍA, A.; PEREA, J.; ACERO, R.; GÓMEZ, G. Caracterización social y comercial de los sistemas ovinos y caprinos de la región noroeste de república Dominicana. *Interciencia*, v. 34, n. 9, Set. 2009.

WILLIAMSON, L. H. Caseous Lymphadenitis en Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. n. 2,v.17, p.359-371, 2001.



## Análise da concentração e viabilidade celular das três cepas de *C. pseudotuberculosis* por FACS

04.02.19	V057.24h	6749	11855	2443	378902	51	49750	500	13167,17	23029,37	4766,25	739230,37	32,14	56,22	11,64	94,75
04.02.19	V057.24h	7328	12634	2452	3717529	61	49750	500	12971,86	21954,59	4280,25	659019,92	33,78	56,26	10,97	94,41
04.02.19	V057.24h	4984	8850	1911	384194	61	49750	500	8129,64	14336,16	3117,12	626677,10	31,78	66,04	12,18	96,08
04.02.19	V057.24h	6615	13774	2633	376930	48	49750	500	13712,24	28452,85	5457,99	781344,48	28,79	59,75	11,46	94,26
05.02.19	V057.48h	196940	70414	1886	130263	497	49750	500	39427,63	13997,47	377,58	26078,81	73,28	26,02	0,70	32,65
05.02.19	V057.48h	207154	73651	1850	117248	97	49750	500	212493,02	75449,72	1897,68	120269,86	73,31	26,03	0,65	29,33
05.02.19	V057.48h	206546	78585	1823	112954	92	49750	500	223383,99	84891,89	1971,61	122162,21	72,00	27,36	0,64	28,25
05.02.19	V057.48h	207945	81296	1884	108792	83	49750	500	249283,46	97357,75	2258,53	130419,53	71,45	27,90	0,65	27,21
06.02.19	V057.72h	85746	132554	5022	173500	3178	49750	500	2684,62	4050,63	157,23	5432,11	38,95	58,77	2,28	44,08
06.02.19	V057.72h	92770	178219	5031	122023	1957	49750	500	4716,72	8961,71	255,79	6204,03	33,85	64,31	1,84	30,81
06.02.19	V057.72h	98424	187038	6477	106511	1550	49750	500	6318,19	11907,13	415,78	6837,22	33,89	63,88	2,23	26,84
06.02.19	V057.72h	94423	191541	6470	107460	106	49750	500	88632,91	179696,06	6073,25	100870,47	32,30	65,49	2,21	26,88
400000																
eventos adquiridos		celulas vivas contadas	Nº de celulas identificadas contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contados	Nº de Beads contadas: do Kit	Nº de Beads do Kit	Volume do teste /µL	Cellulas vivas totais	Cellulas identificadas totais /µL	Cellulas mortas totais /µL	Artefatos totais /µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas identificadas contadas	% de celulas mortas contadas	% de artefatos contados
Amostra																
04.02.19	CAP21.24h	58821	36477	1569	303024	109	49750	500	53694,40	33198,31	1432,25	276613,65	60,79	37,59	1,62	75,80
04.02.19	CAP21.24h	87421	63085	2392	247020	82	49750	500	10607,92	76448,76	2902,49	299737,68	57,21	41,23	1,57	61,78
05.02.19	CAP21.48h	86676	39518	894	271648	1264	49750	500	6822,99	3011,29	70,37	21383,68	68,89	30,40	0,71	68,34
05.02.19	CAP21.48h	188487	84276	1765	124591	881	49750	500	21287,69	9418,62	199,34	14071,29	68,88	30,48	0,64	31,29
200000		celulas vivas contadas	Nº de celulas identificadas contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contados	Nº de Beads contadas: do Kit	Nº de Beads do Kit	Volume do teste /µL	Cellulas vivas totais	Cellulas identificadas totais /µL	Cellulas mortas totais /µL	Artefatos totais /µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas identificadas contadas	% de celulas mortas contadas	% de artefatos contados
eventos adquiridos																
Amostra																
03.01.19	CAP76.24h	95979	9179	1097	292144	1661	50600	500	5947,73	454,39	66,64	17799,50	91,82	7,13	1,05	73,65



## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Analfabetismo botânico 206

Animais domésticos 125, 140, 141

Antioxidante 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 22, 29, 31, 32, 34, 42, 43

Apoptose 10, 12, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 153, 164

Atividade farmacológica 26

Atividade pecuária 61

Autofagia 10, 15, 19

### B

Bactérias 2, 3, 4, 5, 7, 26, 31, 33, 41, 46, 47, 51, 52, 54, 63, 64, 68, 69, 74, 75, 116, 140, 141, 142, 143, 144, 170, 172, 174

Biodiversidade 28, 104, 105, 169, 170, 174, 176, 202, 217, 227

### C

Câncer 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 32, 33

Células cancerígenas 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24

Citometria 58, 61, 63, 66, 74, 81, 159

Conservação de alimentos 2, 3, 7

Covid-19 127, 138, 219, 220, 223, 224, 225

Cropoparasitologia 140

Cultura de células 152

### D

Demodicose canina 115, 117, 123

Deriva natural 177, 178, 179, 180, 181, 182, 185

Dermatologia veterinária 115

Divulgação científica 219, 222, 223, 225

### E

Eletroforese 65, 70, 72, 73, 76

Endoparasitas 141

Ensaio animal 152

Ensino de biologia 226

Ensino remoto 219, 224

Enteroparasitoses 147, 148, 149, 150

Escabiose canina 115, 118, 122

## **F**

Farmacologia 36, 38

Faveira 169, 170, 171

Fibroblastos 152, 153, 156, 157, 162, 164

Fitoterapia 36, 38, 152

Florestas naturais 170, 171

Florestas plantadas 170, 171

FORAGEIO 98, 102, 103

Fungos 12, 26, 31, 33, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138

## **G**

Genética 45, 57, 116, 117, 145, 152, 171, 217, 219, 221, 222, 223, 224, 225

## **H**

Helmintos 141, 146, 147, 149, 151

## **I**

Indústria alimentícia 2

## **J**

Jogo didático 205, 207, 208, 209, 214, 216, 217, 218

## **M**

Meliponíneos 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105

Mercado consumidor 2

Micélio 124, 125, 131, 133

Micoses 127

Microbiologia 45, 55, 58, 59, 63, 82, 139, 144, 145, 227

Microrganismos 1, 2, 3, 26, 27, 29, 32, 47, 55, 61, 127, 130, 139, 169, 170, 172, 173, 174

## **N**

Necroptose 10, 21, 22, 24

Nidificação 98, 100, 101, 102, 103, 105, 106

## **P**

Passeriformes 177, 178, 180, 182, 184

Produtos naturais 26, 27, 31

Própolis 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 102

Proteínas 10, 15, 19, 22, 32, 60, 64, 65, 70, 75, 76, 144, 161, 163

Protozoários 31, 141, 142, 147, 149

## **Q**

Qualidade microbiológica 45, 46, 55, 56, 57

Quercetina 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27

## **S**

Saúde pública 2, 10, 46, 78, 139, 147, 148, 150, 189

Segurança alimentar 45

Sequestro de carbono 200

Serviços ambientais 200, 201, 203





## **Z**

Zoonose 115, 117



# PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS





---

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)



# PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)