



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

1. Diagnóstico das doenças infecciosas

- . Os laboratórios
- . Os tipos de Análises

2. Produção de Compostos farmacologicamente ativos

- Antimicrobianos: antibióticos e antivirais
- Empregados no diagnóstico de doenças
- Medicamentos para tratamento
- Vitaminas, hormônios

3. Que atuam na prevenção de doenças Infecciosas

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- Vacinas

4. Novas estratégias de combate às Infecções

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- Novos Biopolímeros de aplicação médica (Ex: pele artificial)
- Bacteriófagos e Fagoterapia

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- **"Target-based drug design"** – Baseado em técnicas computacionais
- **"Triagem fenotípica para reposicionamento e descoberta de Novos Fármacos"** (Dr. Lucio Freitas Jr.)



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

1. Diagnóstico das doenças infecciosas

- . Os laboratórios
- . Os tipos de Análises

1. Diagnóstico das doenças infecciosas – Os Laboratórios

Os **laboratórios de microbiologia clínica** devem identificar os patógenos com segurança, rapidez e eficiência.

O **microbiologista clínico**, para a identificação dos patógenos, examina as amostras dos pacientes utilizando:

- Coleta,
- Observação direta,
- Cultura,
- Provas Bioquímicas,
- Ensaio imunológicos,
- Ferramentas moleculares:
 - Baseadas em análise de DNA
 - Baseadas em análise de proteína.

A identificação dos patógenos guia o controle da infecção, identificando **fármacos antimicrobianos específicos** que agem contra para o patógeno em questão.

O **Departamento de Microbiologia do ICB/USP** tem um laboratório de Biossegurança equivalente ao **NBS4**. Ele foi montado e está sob a direção do Prof. **Edson Durigon** (virologista). Este é um laboratório de referência nacional e tem direta colaboração com o **CDC de Atlanta/EUA**.

Há “Normas de segurança para laboratórios de microbiologia”, Os laboratórios são classificados de acordo com seu potencial de contenção, do menor para o maior, por meio do seu **Nível de BioSsegurança (NBS)**, sendo designados: **NBS-1, NBS-2, NBS-3 e NBS-4**



Figura 27.1 Um profissional em um laboratório NBS-4 (nível de biossegurança 4). NBS-4 corresponde ao maior nível de controle biológico, oferecendo ao profissional maior segurança e maior contenção do patógeno. O profissional usa uma vestimenta totalmente selada, adaptada com um dispositivo para fornecimento de ar externo e um sistema de ventilação. Válvulas de ar controlam todos os acessos ao laboratório. Todo o material que deixa o laboratório é autoclavado ou descontaminado quimicamente.

1. Diagnóstico das doenças infecciosas – Os Laboratórios

Certificado de Qualidade em Biossegurança

TODOS os **laboratórios** do **ICB** possuem certificação perante uma Comissão Interna de Biossegurança (**CIBio**), de acordo com a Legislação Nacional. A maioria está entre os níveis NBS-1 e NBS-2.

O ICB/USP possuiu **2 Laboratórios** com muito maior nível de Biossegurança.

Num deles estão sendo realizadas pesquisas com vírus altamente patogênicos, como: **Zika**, **Chikungunya**, **COVID-19**, entre outros.

O Dr. **Edison Luiz Durigon** é professor de Virologia e coordenador do Laboratório **BSL3+** (equivalente ao **NBS4**) do Departamento de Microbiologia ICB./USP: “Os laboratórios que vão fazer o diagnóstico precisam de um controle para dizer que o teste funciona, isto é, de uma amostra que dê positivo”.

A importação de amostras da Europa e dos Estados Unidos para ser empregada como controle positivo encarece muito o diagnóstico.

“Enviar o vírus por correio é muito complicado, então o que mandam é um **RNA sintético**. (Porém), só o transporte custa por volta de R\$ 12 a 14 mil, segundo a última cotação que fizemos”.

Então, conseguiram isolar e cultivar em laboratório o **coronavírus SARS-CoV-2**, vírus causador da doença covid-19.

Em 2021, **apenas quatro laboratórios da rede pública estavam fazendo os testes**: Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo; Instituto Evandro Chagas, no Pará; Fiocruz, no Rio de Janeiro; e o Laboratório Central de Goiás.

Veja a matéria na integra:

[USP cultiva amostra de coronavírus em laboratório para distribuir a rede de saúde](#)



O Departamento de Microbiologia do ICB/USP tem um laboratório **BSL3+** (equivalente ao **NBS4**). Ele foi montado e está sob a direção do Prof. **Edson Durigon** (virologista). Este é um laboratório de referência nacional e tem direta colaboração com o CDC de Atlanta/EUA.

<http://www.jornaldocampus.usp.br/index.php/2020/03/coronavirus-e-cultivado-em-laboratorio/>

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

1. Diagnóstico das doenças infecciosas – Os Tipos de Análises

Diagnóstico das infecções

Importância:

O diagnóstico precoce de uma **infecção bacteriana** é fundamental para assegurar o seu tratamento imediato. Uma infecção bacteriana é por vezes difícil de distinguir de uma **infecção viral**.

Contudo, regra geral, as infecções bacterianas têm tendência para provocar mais febre (por vezes atingem os 41°C) e provocam um aumento maior do número de glóbulos brancos.

Para o isolamento e identificação de bactérias patogênicas podem ser **coletadas amostras** diretamente de: **sangue, expectoração, urina, fezes, muco, pus, secreções** da parte anatómica afetada.

Se uma **infecção pulmonar** é suspeita, o médico pode pedir um raio-X ou fazer uma **biopsia**, retirada de células de uma área infectada para ser examinada.

Se houver **suspeita de meningite**, pode ser feita **punção lombar**, utilizando uma agulha para obter uma amostra do **fluido espinhal** para teste.

Se houver suspeita de **hanseníase (lepra)** material do lóbulo da orelha poderá ser coletado, e após coloração submetido a **exame microscópico** (ver adiante).

Comunicação entre Médico e Laboratório:

- O diagnóstico pode levar dias ou até semanas. Assim, o médico deve notificar o diagnóstico presuntivo (tipo de infecção ou agente infeccioso suspeito)

- As amostras devem ser adequadamente rotuladas (dados clínicos, nome paciente, nome do médico)

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

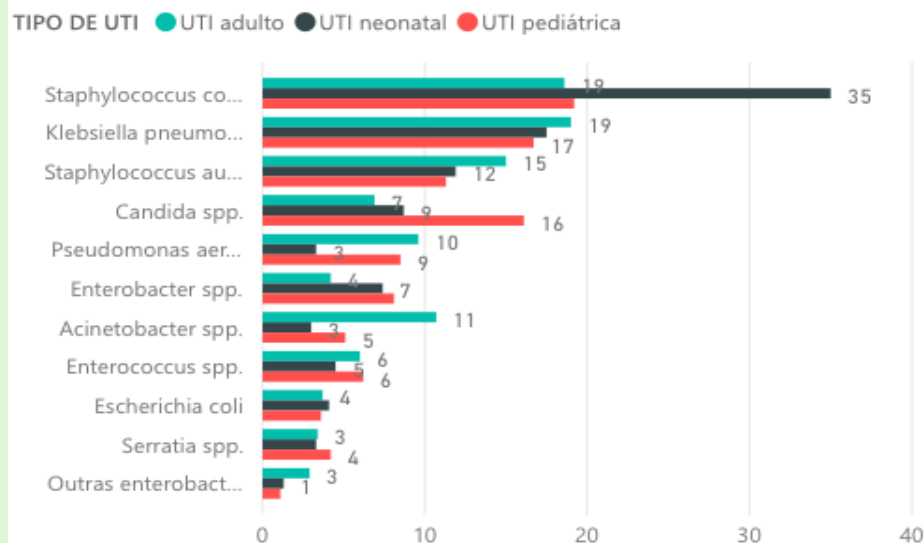
1. Diagnóstico das doenças infecciosas – Os tipos de Análises

IRAS :

As “**Infeções Hospitalares**” que também eram chamadas de ou “**Infeções nosocomiais**” (*nosocomium*, do latim “hospital”) passaram a ser combatidas de forma sistemática nos países desenvolvidos e, desde meados da década de 1990, este termo foi substituído por “**Infeções Relacionadas à Assistência em Saúde**” (IRAS).

IRAS são infecções **locais** ou **sistêmicas** adquiridas por um **paciente** (ou por um **profissional de saúde**) em uma unidade de saúde durante a sua estadia na instalação. As IRAS causam significativa **morbidade*** e **mortalidade***.

Figura 5: Distribuição percentual dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL em pacientes hospitalizados em UTI adulto. Brasil, 2017



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017.

Fonte: Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA)

Obs: *morbidade: Taxa de portadores de determinada doença em relação à população estudada, em determinado local e determinado momento;

***mortalidade:** Número de indivíduos que morreram num determinado intervalo de tempo, em decorrência de uma determinada doença.

O **microbiologista clínico**, para a identificação dos patógenos, examina as amostras dos pacientes utilizando:

- Sequencia possível de procedimentos:

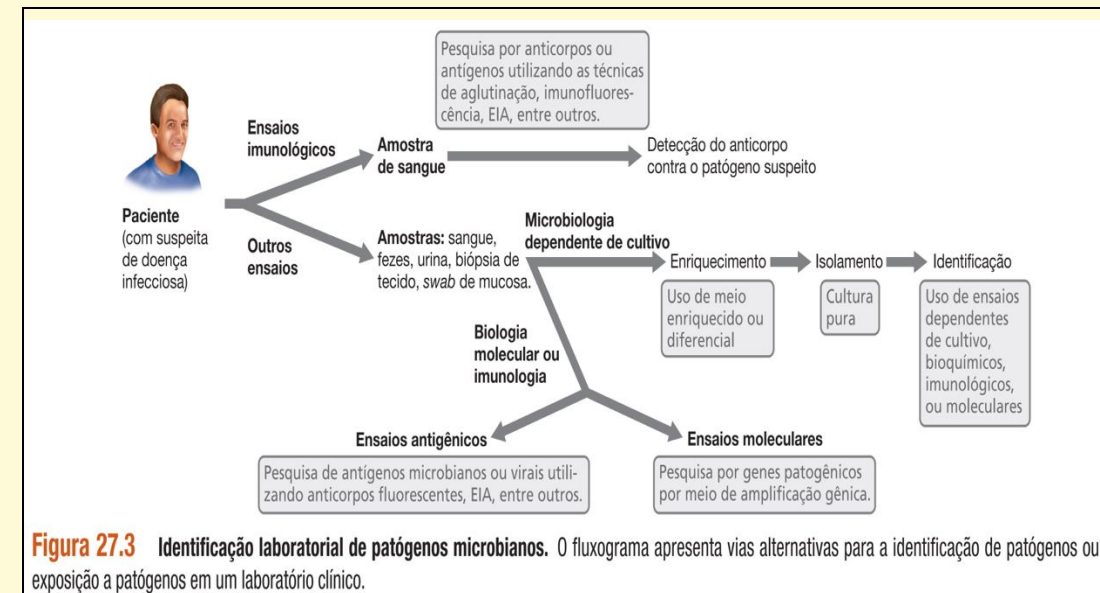


Figura 27.3 Identificação laboratorial de patógenos microbianos. O fluxograma apresenta vias alternativas para a identificação de patógenos ou exposição a patógenos em um laboratório clínico.

- Coleta (1º passo)

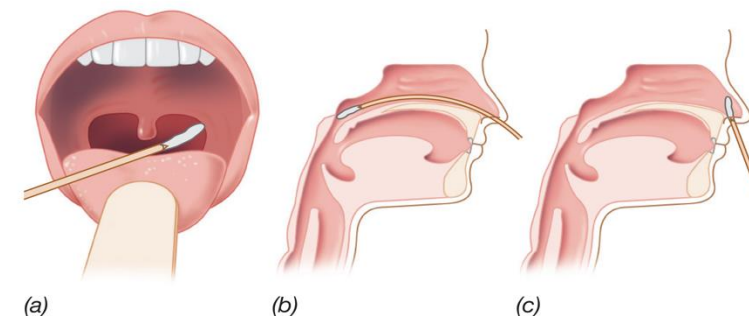
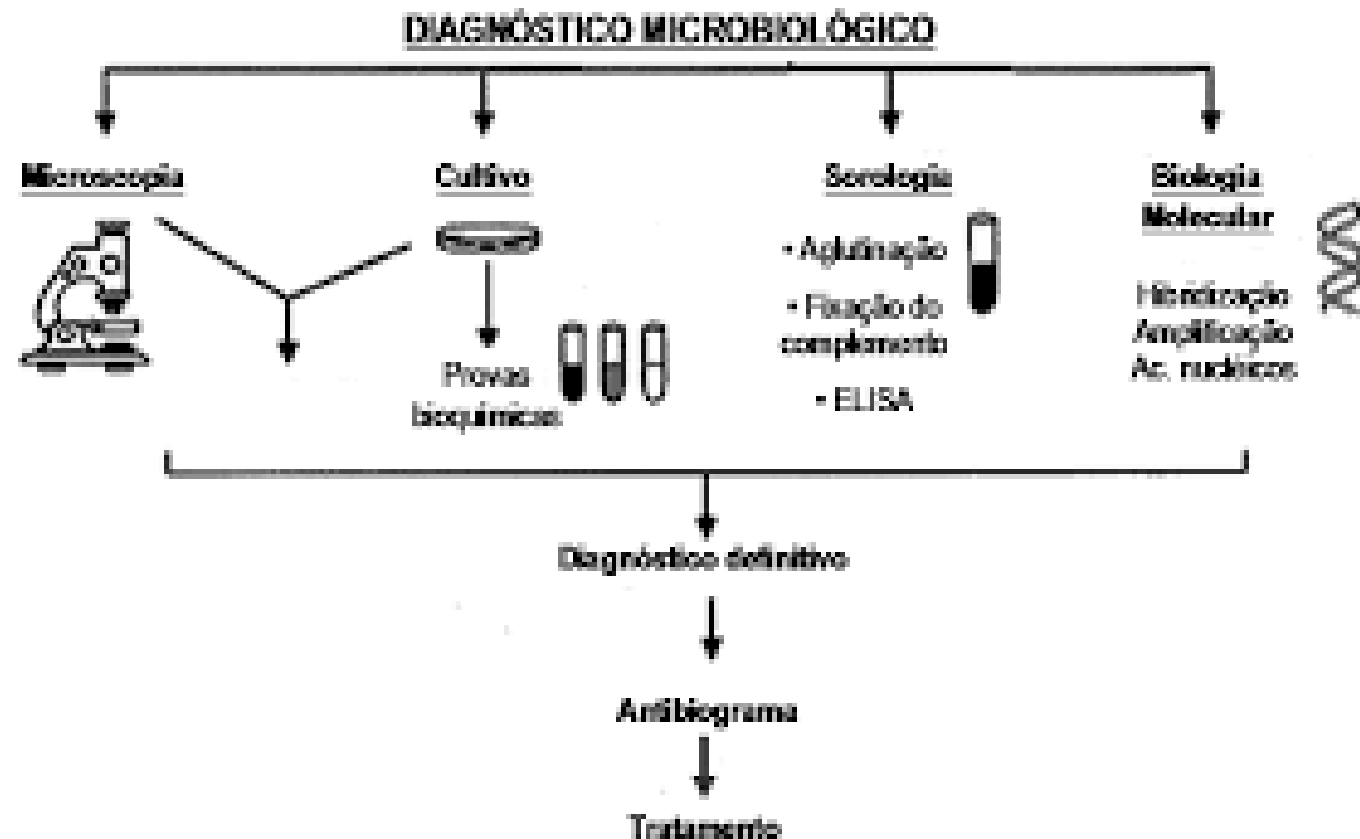


Figura 27.4 Métodos de obtenção de espécimes a partir do trato respiratório superior. (a) Swab de garganta. (b) Swab nasofaríngeo aplicado por meio do nariz. (c) Swab no interior do nariz.

1. Diagnóstico das doenças infecciosas – Os tipos de Análises

O **microbiologista clínico**, para a identificação dos patógenos, examina as amostras dos pacientes utilizando:

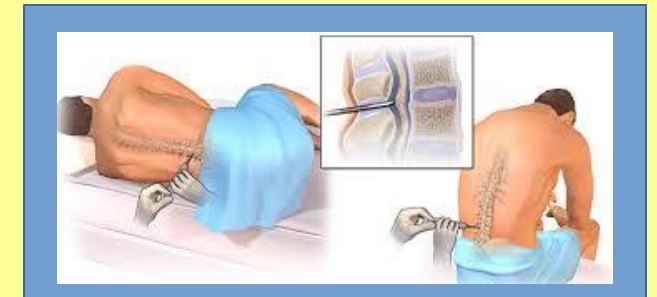
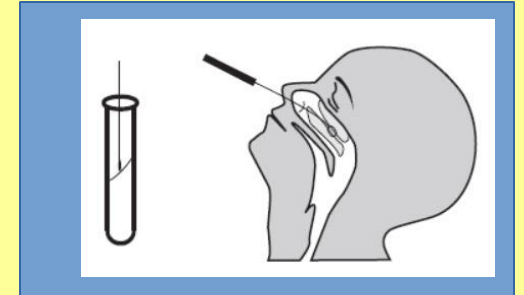
- Coleta,
- Observação direta,
- Cultura,
- Provas bioquímicas,
- Ensaio imunológico, e
- Ferramentas moleculares:
 - Baseadas em análise de DNA
 - Baseadas em análise de proteína.



Diagnóstico das infecções

1. Coleta de Amostra:

- Utilizar apenas equipamentos esterilizados e procedimentos que evitem contaminação
- Quantidade deve ser adequada
- **Deve ser realizada ANTES do inicio de antibióticoterapia**
- Amostra deve ser representativa do processo infeccioso, exs:
 - Escarro – e não saliva
 - Pus da lesão – e não do trato fistuloso
 - Swab da porção profunda da ferida – e não da superfície
- A amostra deve ser levada o mais rápido possível para o lab análises, podendo ser utilizado meios especiais de transporte
- O tipo de amostra deve corresponder ao quadro clinico. Na ausência de sinais ou sintomas que indiquem a localização, deve ser coletados para cultura: **Sangue**, **Urina**.
- Deve ser considerado:
 - **Colela de sitio normalmente estéril** (sangue, liquido cefalorraquidiano, liquido articular, cavidade pleural): Qualquer achado é significativo
 - **Coleta de sitio com Microbiota normal do corpo humano**: Considerar as alterações



Diagnóstico das infecções

- Observação direta:

Após a coleta, as amostras são Coradas e visualizadas ao Microscópio óptico (M.O.) para identificação da morfologia e da reação à “**Coloração de Gram**”.

Na grande maioria dos casos, isto permite já classificar a bactéria em um dos tipos:

- Bacilo Gram-negativo,
- Bacilo Gram-positivo,
- Coco Gram-positivo, ou
- Coco Gram-negativo.

Em alguns casos, são realizadas colorações especiais, como ocorre com amostras coletadas de

- escarro de pacientes com **suspeita de TB** ou de
- lóbulo de orelha pacientes com **suspeita de Hanseníase**,

ocasiões em que o método de coloração que é empregado é a “Coloração de **Ziehl-Neelsen**”



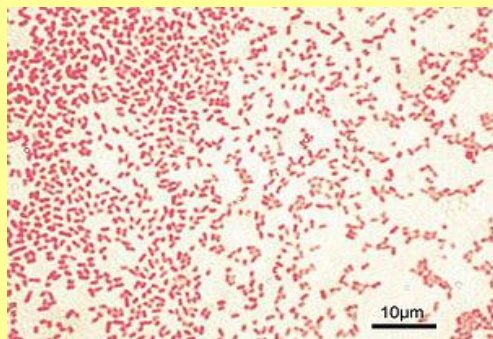
- Observação direta:

Coloração e Microscopia óptica

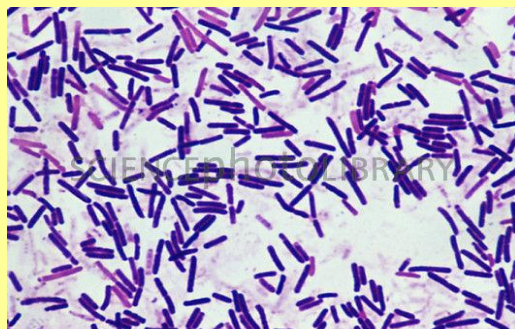
Pode permitir o diagnóstico presuntivo de alguns GÊNEROS bacterianos

Principais técnicas:

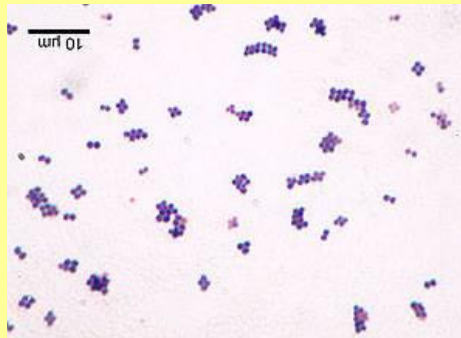
- Coloração de Gram (abaixo exemplos):



Escherichia coli
(bacilo Gram-negativo)



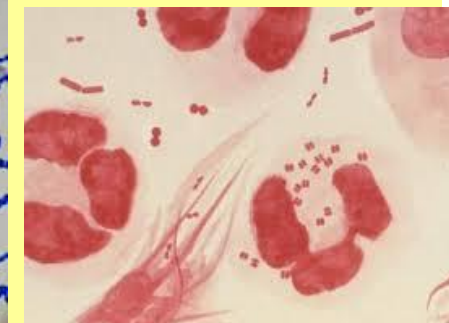
Clostridium tetani
(bacilo Gram-positivo)



Staphylococcus aureus
(coco Gram-positivo)

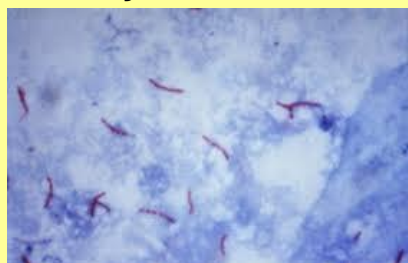


Streptococcus pyogenes
(coco Gram-positivo)



Neisseria gonorrhoeae
(coco Gram-negativo)

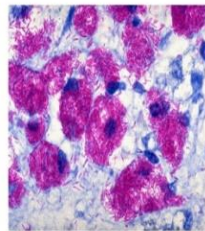
- Coloração de Ziehl-Neelsen



Mycobacterium tuberculosis
(coletado de escarro)

Mycobacterium leprae
- Laboratory diagnosis -

- Collection of specimens:
 - skin lesion biopsy, skin scraping
 - Nasal exudate
- Microscopy:
 - Ziehl-Neelsen stained smear: acid fast bacilli, accumulated in intracellular, encapsulated globular masses - "leprosy globi" - in lepromatous leprosy
- (Cultivation - not applicable)



Mycobacterium leprae (coletado do lóbulo da orelha)

- Microscopia de Campo escuro



Leptospira interrogans



Treponema pallidum

A coloração de Ziehl-Neelsen

Exemplo de Diagnóstico que pode ser obtido por observação direta de extrema importância:

A coloração de Ziehl-Neelsen é um método usado para pesquisa de micobactérias em diferentes matérias clínicos, sendo grande o seu valor diagnóstico de:

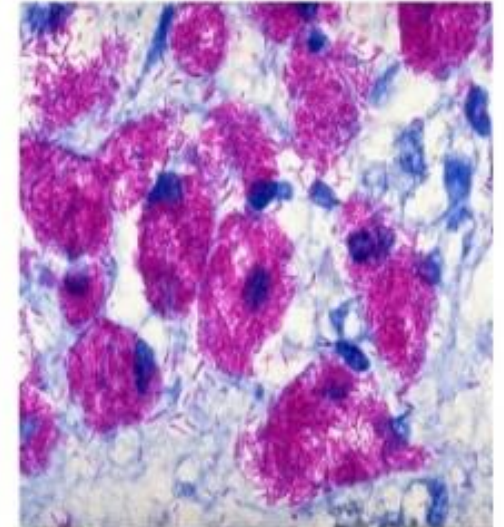
- **Tuberculose** e
- **Hanseníase**

● Diagnóstico: Tuberculose (TB):

A presença de **bacilos álcool-ácido-resistente** no escarro é fortemente sugestiva de tuberculose pulmonar.

Mycobacterium leprae - Laboratory diagnosis -

- Collection of specimens:
 - skin lesion biopsy, skin scrapping
 - Nasal exudate
- Microscopy:
 - Ziehl-Neelsen stained smear: acid fast bacilli, accumulated in intracellular, encapsulated globular masses - "leprosy globi" - in lepromatous leprosy
- (Cultivation – not applicable)



● Diagnóstico: Hanseníase (Lepra):

O encontro de bactérias deste gênero nas secreções nasais ou no sangue colhido no lóbulo da orelha praticamente confirmam o diagnóstico clínico da lepra.

Diagnóstico das infecções

- Observação direta:

Após os dados Obtidos da observação de lâminas coradas ao M.O. estarem disponíveis, é realizada o Cultivo em **Meio de Cultura** adequado.



- Cultivo

A amostra é semeada em **Meio de Cultura sólido**, para a obtenção de colônias isoladas que permitiram sua futura identificação.

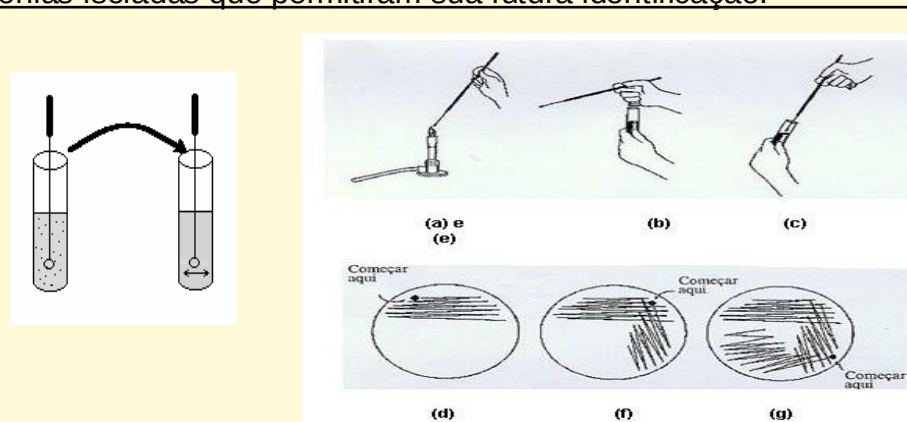


Figura: Etapas da Sementeira por esgotamento em meio Sólido:

- a) Flambar a alça de platina, esperar esfriar próximo a chama,
- b) Abrir cuidadosamente a Cultura bacteriana,
- c) Introduzir a alça de platina na cultura bacteriana,
- d) Com a alça de platina, delicadamente, semear na placa de Petri, conforme indicado no desenho,

- e) flambar novamente,
- f) esfriar a alça numa parte do meio sólido sem bactérias e a partir de um ponto já semeado, distribuir o material na placa,
- f), g) repita a operação e), f) fazendo estrias no restante da placa

Ao final, flambar novamente a alça de platina

Exemplo: cultivo em Meio de Cultura Ágar sangue

É utilizado para o cultivo da maioria das bactérias de interesse clínico Gram-positivas e Gram-negativas, de modo geral.



Contém entre 3 a 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

Ele é muito empregado especialmente para o cultivo de **microrganismos fastidiosos** (exigentes) tais como: estreptococos, pneumococos e meningococos.

- Cultivo - Meios de Cultura mais comuns empregados para o Isolamento de bactérias Gram-negativas:

Meio Ágar sangue

É utilizado para o cultivo da maioria das bactérias de interesse clínico Gram-positivas e Gram-negativas de modo geral.



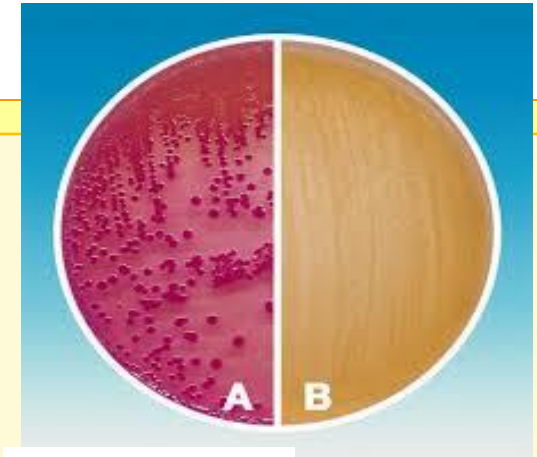
Mixed-culture of *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* on XLD (Xylose lysine deoxycholate) Agar.

Meio Ágar MacConkey

É empregado como auxiliar na identificação de ***Enterobactérias***, bacilos Gram-negativos (BGN):

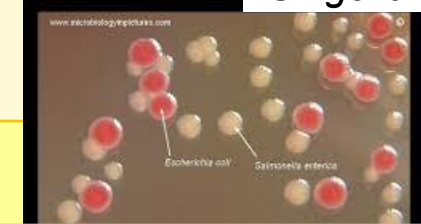
É um meio de cultura:

- Diferencial (contém o açúcar lactose, cuja fermentação resulta na alteração do indicador de pH vermelho neutro: rosa -> vermelho; não fermentadoras: rosa -> branco devido alcalinização do meio), e é também
- Seletivo (contém sais biliares, que inibe o crescimento de várias bactérias Gram-positivas)



Escherichia coli (lac⁺)

Salmonella ou *Shigella* (lac⁻)



Meio Ágar Chocolate

É utilizado para o cultivo de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que sejam sensíveis a fatores antibacterianos presentes no sangue, como:

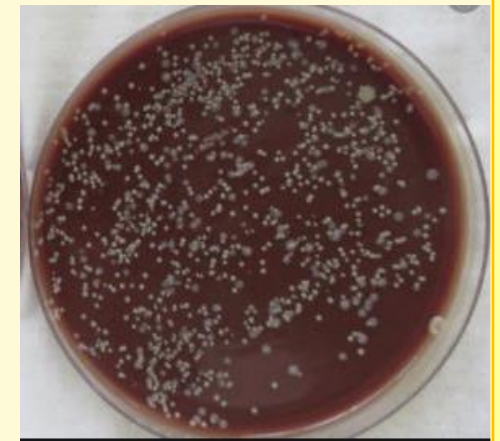
- *Neisseria*,
- *Haemophilus*



Ágar Thayer-Martin chocolate

É derivado de Meio Ágar chocolate e contém adicionado antibióticos (vancomicina, colistina e trimetoprim). Permite o bom crescimento de:

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Neisseria meningitidis*



- Cultivo - Meios de Cultura mais comuns empregados para o Isolamento de bactérias Gram-positivas:

Meio Ágar sangue

É utilizado para o cultivo da maioria das bactérias de interesse clínico Gram-positivas e Gram-negativas de modo geral.

Ágar sangue de carneiro a 5,0%

Tipos de hemólise (alfa, beta e gama)



É empregado para identificar o padrão de hemólise de bactérias do gênero ***Streptococcus***:

- α -hemólise (Parcial), como *S. viridans* e *S. pneumoniae*;
- β -hemólise (Total), como *S. pyogenes* e *S. agalactiae*;
- γ -hemólise (Ausente) como *S. difficile*

Ágar Manitol Salgado

É empregado para o isolamento de ***Staphylococcus*** de amostras clínicas.

É empregado para o isolamento de ***Staphylococcus*** de amostras clínicas.

É um meio de cultura:

- Seletivo (contem 7,5% de NaCl, que inibe o crescimento de varias bactérias)

e é também

- Diferencial (contém o açúcar manitol, cuja fermentação resulta na alteração do indicador de pH vermelho de fenol: de vermelho -> para amarelo

(*S. aureus*: meio amarelo)
(*S. epidermidis* e outros: meio vermelho)

Staphylococcus epidermidis



Staphylococcus aureus

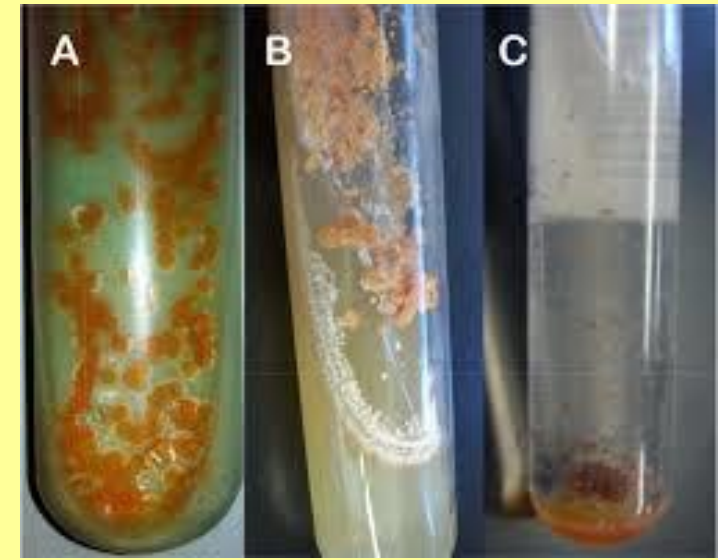
- Cultivo - Meios de Cultura mais comuns empregados para o Isolamento de micobactérias:

- Lowestain-Jenssen

É empregado para cultivo de bactérias do Gênero *Mycobacterium*, que têm crescimento muito lento,

Contém:

- Gema de ovo, para suprimento de lipídeos necessários para a síntese de parede celular bacteriana, e
- Antimicrobianos, para impedir crescimento de contaminantes



Cultivo - de bactérias anaeróbias:

É necessário que o cultivo seja realizado em condições de anaerobiose

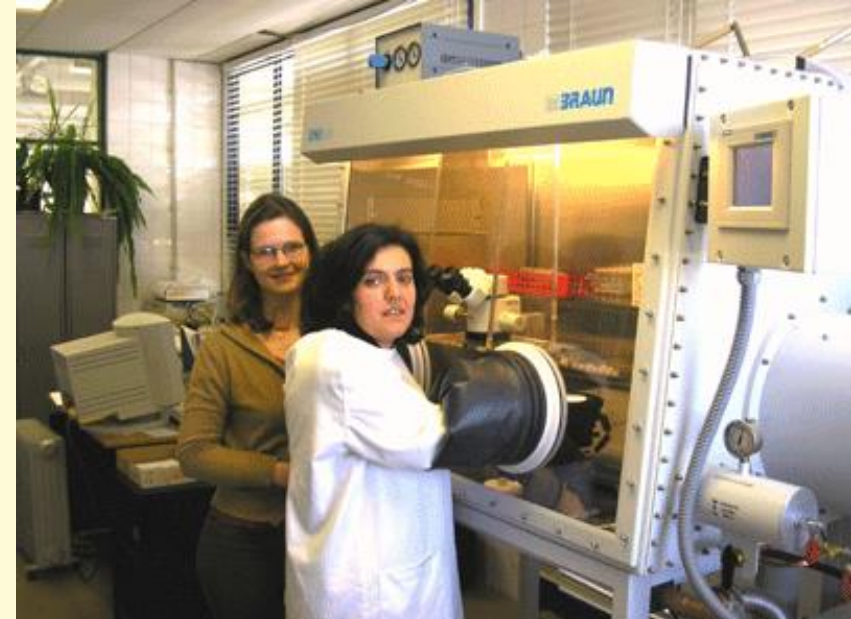
Parcial



Jarra de Anaerobiose (com gerador de CO_2)
Laboratório da Profa. Elisabete Vicente ICB/IIUSP

ou

Total



Câmara de Anaerobiose (com N_2) Laboratório da Profa.
Marcia Mayer ICB/IIUSP

Meio Tioglicolato de sódio

É um meio de Cultura liquido especial para cultivo de bactérias anaeróbias.



A. B. C

Bactérias cultivadas em caldo Tioglicolato de sódio:

- A) *Pseudomonas* (aeróbia estrita);
- B) *Escherichia coli* (aeróbia facultativa)
- C) *Clostridium sp.* (anaerobia estrita)

Diagnóstico

- Cultivo - Antibiograma

O antibiograma

é um teste que permite a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria a vários antibióticos. Este método foi desenvolvido por **Kirby-Bauer**. A sensibilidade é demonstrada pela zona ou halo de inibição de crescimento que se forma ao redor do disco de antibiótico.

O tamanho do **diâmetro do halo de sensibilidade** é medido em mm e é analisado frente aos valores de um padrão em uma Tabela fornecida pelo fabricante dos antibióticos em análise (**Tabela 1**). Este procedimento permite se saber se a bactéria é: **Sensível**, apresenta **Sensibilidade Intermediária**, ou é **Resistente** ao antibiótico presente no disco.

O antibiograma é uma técnica fundamental, pois permite a escolha do antimicrobiano apropriado para o controle de infecções bacterianas. Assim, tem como objetivo determinar a sensibilidade aos antibióticos da bactéria em análise causadora da infecção.



Após o cultivo da bactéria,
Com auxílio de uma régua,

é feita a leitura

do
diâmetro do halo de
inibição de
crescimento.



Os valores são
analisados em
referência aos de da
Tabela Padrão
fornecida pelo
fabricante dos discos
de antibióticos.

Antibiograma:

- O que é !
- Para que serve !
- Como é realizado!
- Quando é importante ser realizado!



Foto de: Nathalia Oliveira (F. Enfermagem, BMM 400/2016)

Diagnóstico

- Provas Bioquímicas

Provas Bioquímicas são empregadas para Identificação do Gênero e da Espécie bacteriana.

Após análise ao M.O. e cultivo em meio de cultura sólido, colônias das bactérias isoladas são submetidas a uma série de cultivos, que permitem a análise de sua resposta metabólica (Provas Bioquímicas).

Provas bioquímicas empregadas para identificação de bacilos Gram-negativos (BGN)



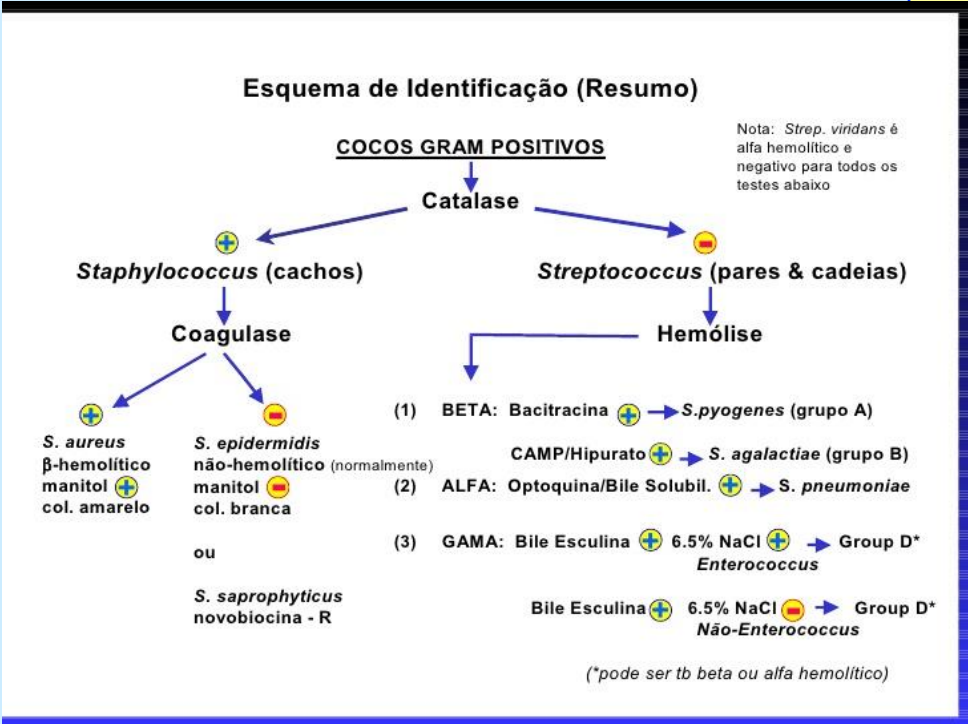
DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTÉRIAS

TESTES/ESPÉCIES	Escherichia coli	Salmonella	Shigella dysenteriae	Shigella sonnei	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella rhinoschlerae	Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes	Shigella flexneri	Shigella sonnei	Shigella boydii	Shigella dysenteriae	Shigella sonnei	Shigella flexneri	Shigella sonnei
GLUCOSE GAS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARABINOSE	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	++	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MANITOL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACAROSE	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREALOSE	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CITRATO	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALONATO	-	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VERMELHO DE METILA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PRODIGER	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REDUÇÃO DE NITRATO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIPOCLORÍDE DE NITRATO	-	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PRODUÇÃO H ₂ S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INDOL	+	-	d	-	d	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LISINA	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
UREASE	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
FENILALANINA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MOTILIDADE	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

D... = diferentes reações em diferentes espécies de um gênero
d... = diferentes reações em diferentes isolados
(d)... = diferentes reações em diferentes isolados tardiamente
K... = reações tardias e irregularmente positivas (mutantes)
(+)... = reações tardias, mas sempre positivas
(++)... = liqueficação muito lenta

(Fonte: Manual BERGEY 8ª edição)

Provas bioquímicas empregadas para identificação de cocos Gram-positivos (CGP)



Diagnóstico

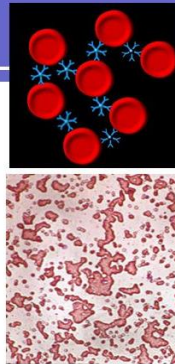
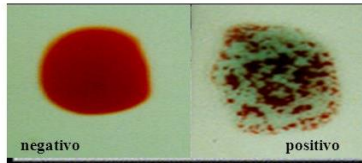
- Análises Sorológicas

Após terem sido realizadas as Provas Bioquímicas, em alguns casos, são empregadas **Análises sorológicas**, para obter mais informações sobre a espécie bacteriana. Muitas vezes este tipo de análise é empregada para identificar a origem (Fonte) da bactéria causadora da doença (casos de múltiplos casos como epidemias), ou para se obter mais informações sobre os determinantes de virulência da bactéria.

✓ Reação de Aglutinação e Precipitação

AGLUTINAÇÃO DIRETA

5) Leitura do resultado:

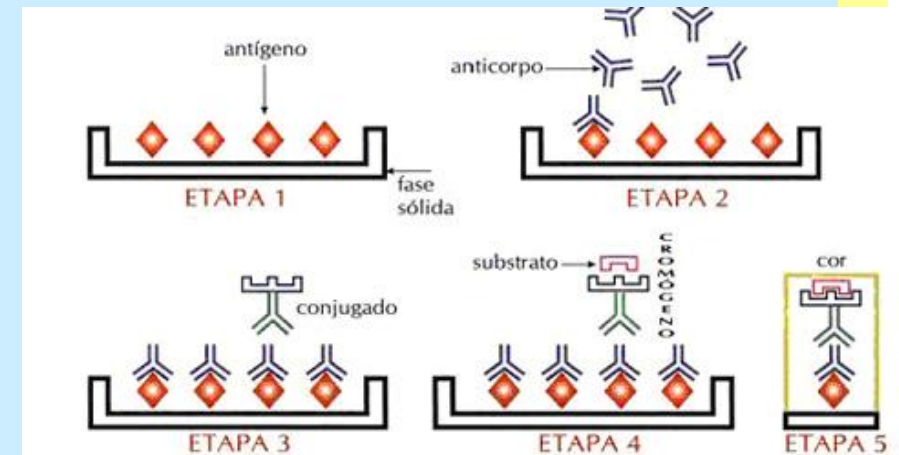


→ Um resultado positivo é indicado por uma aglutinação visível (aglomeração dos eritrócitos na placa teste), como ilustrado acima.

✓ ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

É um **Ensaio Imunoenzimático**: uma enzima é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo.

Caso ocorra esse reconhecimento, a enzima irá reagir com um substrato incolor para produzir um produto colorido



Veja mais na prox.

✓ Pesquisa de hipersensibilidade tardia



Diagnóstico

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

ELISA é uma técnica imunoenzimática (também considerada sorológica) de grande valor diagnóstico, muito empregada nos dias atuais.

Pode ser usada para dosagem de **Anticorpos** no soro do paciente, particularmente importante em dois casos:

✓ Pesquisa de bactérias não cultiváveis *in vitro*, como:

- *Riquétsias*,
- **Algumas bactérias que causam DST**

Para esta finalidade, é necessário que o nível de anticorpos específicos seja dosada:

- No início (antes do início da antibióticoterapia) e
- Após duas semanas da doença, para se verificar a ocorrência de aumento nos títulos séricos.

✓ Pesquisa de Exotoxinas microbianas circulantes no **sangue** e **soro** do paciente.

Diagnóstico

- Testes com Biologia Molecular - PCR

Quando é importante:

O **PCR** (Reação em Cadeia da DNA Polimerase) é uma técnica cuja análise de que impõe custos/amostra maiores, pois envolve pessoal técnico altamente treinado, equipamentos (Termociclador ou “Equipamento de PCR”), Análise em géis de agarose e itens de consumo especiais.

É particularmente MUITO importante, pois

permite a **detecção de patógenos** em geral (bactérias, vírus, fungos) isolados ou diretamente em material clínico, **a partir de pequenas quantidades** de amostras de DNA como ocorre nos casos de:

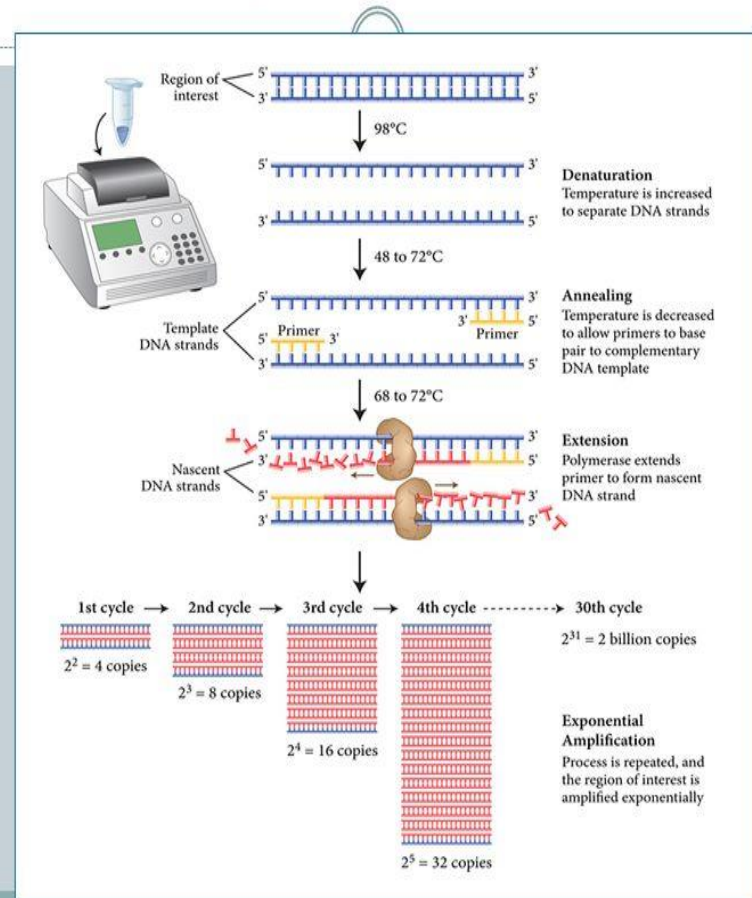
- **Infecções virais** (Ex. Covid-19)

- **Biópsias**,

- ***Mycobacterium tuberculosis*** (TB)– casos de diagnóstico tradicional duvidoso,

- Esperma, pele, folículos pilosos encontrados em cenas de crime.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA - PCR



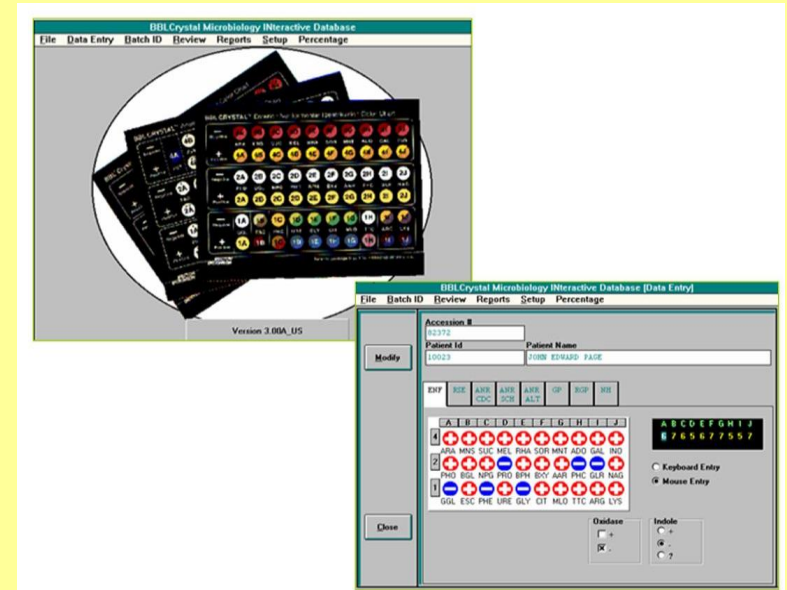
Obs: O PCR pode também ser empregado para diagnóstico de doenças não infecciosas

Diagnóstico automático

A. De Bactérias

- Ex1: Sistema BACTEC da Empresa BD

Cada kit contém 20 painéis e 20 tubos com fluido para preparação da suspensão bacteriana a ser inoculada nos painéis de maneira rápida e segura. Os substratos são degradados pelos microrganismos submetidos ao teste, o que resulta em **alteração do pH** do meio e **mudança da coloração dos substratos**. A leitura dos resultados é visual e a identificação é realizada utilizando-se o software Crystal Mind.



Diagnóstico automático

B. De Bactérias

- **Ex2: MALDI-TOF** (Fácil execução) – **Fabricante bioMérieux**
- (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight”)
(Matrix Assistida de Tempo-de-voo de dessorção de Ionização a Laser)

1 – Preparação da Amostra

- Depositar o microrganismo na lâmina
- Adicionar a lista para usar a solução de matriz

2 – Inserir a Amostra

- Inserir a lâmina no sistema VITEK e os resultados surgem em minutos



Fundamentação da Técnica:

Emprega **Espectrometria de massa (MS)** - técnica analítica usada para determinar a composição elementar de uma amostra.

O princípio é o MS por ionização química dos compostos para gerar moléculas carregadas e determinar a proporção em massa /carga.

O equipamento examina e compara o **padrão de proteínas diretamente a partir de bactérias intactas**, e

vem com uma extensa **base de dados** de padrões de inúmeras bactérias e fungos de importância clínica.

O padrão da amostra é comparado pelo software e o equipamento emite o resultado com o nome (mais provável) da bactéria analisada.

Diagnóstico automático

C. De Antígenos bacterianos

O teste também pode ser realizado para detecção direta e qualitativa dos antígenos de ***Streptococcus* grupo B** em **fluído cerebrospinal** e **soro**, além da confirmação e agrupamento sorológico a partir de colônias suspeitas de:

- ***H. influenzae* tipo b**,
- ***S. pneumoniae***,
- ***Streptococcus* grupo B**,
- ***N. meningitidis* grupos A/Y, B ou C/W135**.

A aglutinação visível positiva ocorre quando uma amostra contendo qualquer um desses antígenos bacterianos reage com as partículas de látex recobertas com os respectivos anticorpos.

Obs: Testes de aglutinação em látex não se destinam a substituir a cultura bacteriana. O diagnóstico de confirmação de uma meningite bacteriana só é possível com os procedimentos de cultura apropriados.

Exemplo:

BD Directigen™ Meningitis Combo Test Kit Catalog # 252360

O kit **BD Directigen™ Meningitis Combo Test** é um teste presuntivo de aglutinação em látex para detecção direta e qualitativa de antígenos de *H. Influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y ou W135 e *Escherichia coli* K1 em fluído cerebrospinal (CSF), soro ou urina.



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

2. Produção de Compostos Farmacologicamente Ativos

- Antimicrobianos: antibióticos e antivirais
- Empregados no diagnóstico de doenças
- Medicamentos para tratamento
- Vitaminas, hormônios



Instituto de Ciências Biomédicas /
USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

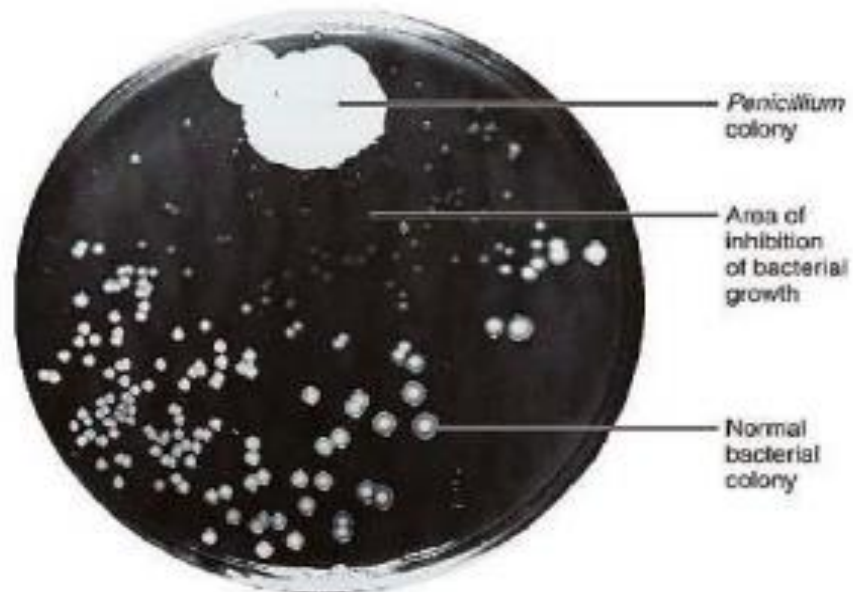
Aplicações do melhoramento de microrganismos

Penicilina: o exemplo mais conhecido de seleção de cepas

Penicillium chrysogenum

Produto: penicilina, ativa contra bactérias gram-positivas

“Contaminante inibia o crescimento de *Staphylococcus* mesmo diluído 800 vezes.”



Sir Alexander Fleming

□ 1881 □ 1955

Nobel Medicina 1945

2. Produção de Compostos farmacologicamente ativos:

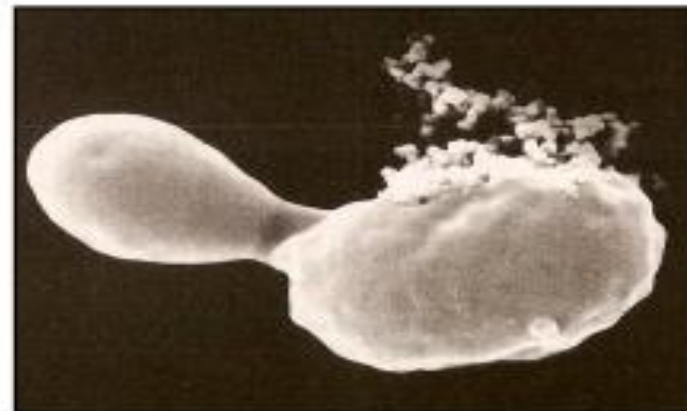
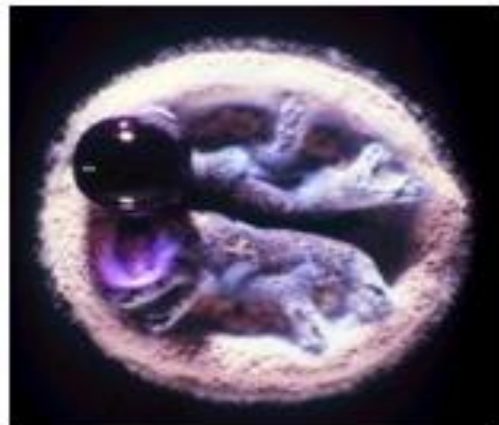
- Desenvolvimento da “Produção do Antibiótico **Penicilina**” (1/3)

Aplicações do melhoramento de microrganismos

PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

Metabólitos secundários de diversas bactérias e fungos.

- Melhoramento visando aumento de produtividade e diminuição de custos de produção.
- Mutagênese e ferramentas moleculares.



Tratamento de infecções: Antibióticos

A maioria das infecções bacterianas pode ser curada com antibióticos. Trata-se de uma classe de fármacos com pouca utilidade nas infecções virais, mas muito eficazes no tratamento das infecções bacterianas.

Como qualquer medicamento, deve ser utilizado com muito cuidado, e apenas por indicação do seu médico. Cada tipo de bactéria reage de forma diferente aos diferentes antibióticos. Por isso, o médico escolhe o medicamento em função da bactéria que pretende tratar, de forma a diminuir a resistência a estes fármacos. Este é atualmente um dos grandes problemas da utilização dos antibióticos.

Alexander Fleming foi médico militar durante a 1ª Guerra Mundial e quando retornou a Londres, trabalhou como **médico microbiologista** no Hospital St. Mary. Em 1929, publicou sua descoberta da penicilina no **British J. Experimental Pathology**, mas não obteve o devido reconhecimento na época e nem recursos financeiros para prosseguir sua pesquisa.

Linhagem ***Penicillium chrysogenum*** inicialmente descoberta

A primeira linhagem produtora de **Penicilina** descoberta por **Fleming**, em 1928, produzia apenas 2 µg/ml deste antibiótico. Esta produção estava longe de ter valor comercial, pois seria necessário um biorreator de volume útil muito grande para a produção de poucas **Unidades bioativas** terapêuticas.

Melhoramento genético de ***Penicillium chrysogenum***

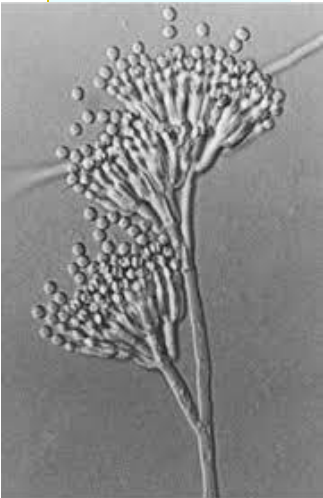
- Os americanos Florey e Chain coordenaram um vasto projeto de “Melhoramento Genético”:
- Introdução de Mutações;
 - Cruzamentos com outras cepas deste fungo que haviam sido especialmente isoladas;
 - Melhoramento do Processo de Produção;
 - Melhoramento do Processo de Purificação.

A questão de PATENTES

Fleming **não patenteou** sua descoberta, pois achava que assim seria mais fácil a difusão de um produto necessário para o tratamento das numerosas infecções que castigavam a população.

Aplicações do melhoramento de microrganismos

Linhagem Fleming	2 µg.mL ⁻¹
↓ ambiente / seleção natural	
Linhagem NRRL-1951	60 µg.mL ⁻¹
↓ mutantes espontâneos	
Linhagem NRRL- 1951.325	150 µg.mL ⁻¹
↓ raio-X	
Linhagem X-1612	300 µg.mL ⁻¹
↓ ultra-violeta	
Linhagem Wis Q-176	550 µg.mL ⁻¹
↓ ultra-violeta	
↓ nitrogênio mostarda	
↓ mutantes espontâneos	
Linhagem Wis51-20	
Linhagem E-1	
↓ nitrogênio mostarda	
↓ mutantes espontâneos	
↓ ultra-violeta	
Linhagem E-15-1	7 000 µg.mL ⁻¹
↓↓↓↓	
Várias Linhagens Industriais	50 000 µg.mL ⁻¹



Fonte: Vicente, E.J. Melhoramento Genético Bacteriano. In Genéticos Melhoramento Microrganismos, Cap. 8, EMBRAPA, 2016

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

2. Produção de Compostos farmacologicamente ativos:

- Vitaminas, hormônios

Microbial Production of Vitamins

Vitamin	Enzyme (Microorganism)
Vitamin C	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase (<i>Corynebacterium</i> sp.).
Biotin	uccu Fermentation (<i>Serratia marcescens</i>); Multiple enzyme system (<i>Bacillus sphaericus</i>).
Riboflavin	Fermentation (<i>Eremothecium ashbyii</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Bacillus</i> sp.).
Vitamin B ₁₂	Fermentation (<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Pseudomonas denitrificans</i>)
Vitamin E	Freshwater microalgae, <i>Euglena gracilis</i> .

Shimizu S: Vitamins and related compounds: microbial production

B7 -

2. Produção de Compostos farmacologicamente ativos:

- Antimicrobianos: antibióticos e antivirais
- Empregados no diagnóstico de doenças
- Medicamentos para tratamento
- Vitaminas, hormônios

Como vimos até o momento muitos fármacos são empregados com vários propósitos: diagnóstico, tratamento, aprimorar a saúde, prevenção de doenças.

Neste momento, são exemplos de desenvolvimento de Fármacos:

- Desenvolvimento da “Produção do Antibiótico **Penicilina**” ,
- Produção de Vitaminas

Convite: Descreva como foram os “Casos de desenvolvimento de alguns Fármacos”, tais como:

- Aspirina,
- Vitamina C,
- Metiformina
- “Microbial Bio-Skin”

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

3. Que atuam na prevenção de doenças:

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- Vacinas



Instituto de Ciências
Biomédicas / USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

✓ O que é M.N.C.H.?

**Alguns microrganismos de interesse médico
produzem doenças**

sempre

Frequentemente

**Raramente
m.n.c.h.**

Interações benéficas entre o homem e os microrganismos

A microbiota normal desenvolveu uma relação simbiótica mutualística com seu hospedeiro mamífero:

- A microbiota contribui para a saúde e o bem-estar do hospedeiro por meio da geração de produtos microbianos e inibindo o crescimento de microrganismos perigosos.
- Em contrapartida, o hospedeiro disponibiliza diversos microambientes que permitem o crescimento microbiano.

A microbiota normal é, inicialmente, introduzida no hospedeiro durante o seu nascimento.

• Microbiota Normal do Corpo Humano (M.N.C.H.) - Importância

Quando uma pessoa é tratada com antibiótico, este mata ou inibe o crescimento das bactérias patogênicas mas também destrói a sua microbiota normal. Esta alteração da comunidade microbiana intestinal é frequentemente indicada por fezes brandas ou diarreia.

Na ausência da microbiota normal completa, patógenos oportunistas, como *Staphylococcus*, *Proteus*, *Clostridium difficile* resistentes a antibióticos, ou a levedura *Candida albicans*, podem se estabelecer e alterar funções digestivas, ou até mesmo causar doenças. Por exemplo *C. difficile*, que normalmente está presente no intestino em baixas concentrações na ausência de competição com a microbiota normal, provoca o quadro de infecção intestinal chamado colite.

Após o término da terapia antimicrobiana, a microbiota normal é restabelecida de forma bastante rápida nos adultos. Para acelerar este processo, a recolonização do intestino por espécies desejáveis pode ser realizada pela administração de probióticos (culturas vivas de bactérias intestinais) que, quando administradas ao hospedeiro, podem promover benefícios à saúde.

Uma rápida recolonização intestinal pode restabelecer a microbiota local competitiva capaz de se impor sobre os patógenos e fornecer os produtos metabólicos microbianos desejáveis. (ver: MicroBiotec - Indústria de Alimentos: Probióticos e Prebióticos).

Tabela 23.3 Contribuições bioquímicas/metabólicas dos microrganismos intestinais	
Processo	Produto
Síntese de vitaminas	Tiamina, riboflavina, piridoxina, B ₁₂ , K
Produção de gás	CO ₂ , CH ₄ , H ₂
Produção de odor	H ₂ S, NH ₃ , aminas, indol, escatol, ácido butírico
Produção de ácidos orgânicos	Ácidos acético, propiônico, butírico
Reações de glicosidases	β-glucuronidase, β-galactosidase, β-glicosidase, α-glicosidase, α-galactosidase
Metabolismo de esteroides (ácidos biliares)	Esteroides esterificados, desidroxilados, oxidados ou reduzidos

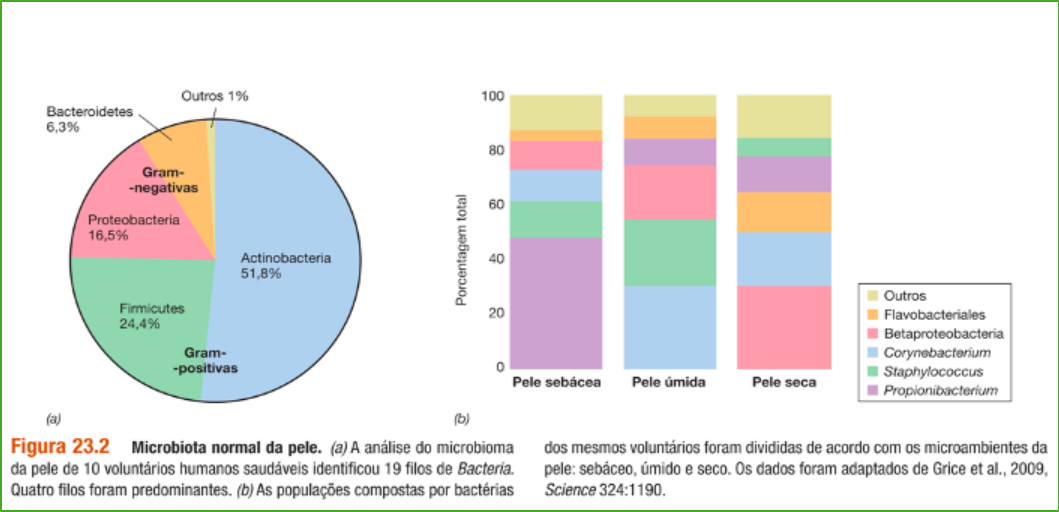


Figura 23.2 Microbiota normal da pele. (a) A análise do microbioma da pele de 10 voluntários humanos saudáveis identificou 19 filos de Bacteria. Quatro filos foram predominantes. (b) As populações compostas por bactérias dos mesmos voluntários foram divididas de acordo com os microambientes da pele: sebácea, úmida e seca. Os dados foram adaptados de Grice et al., 2009, Science 324:1190.

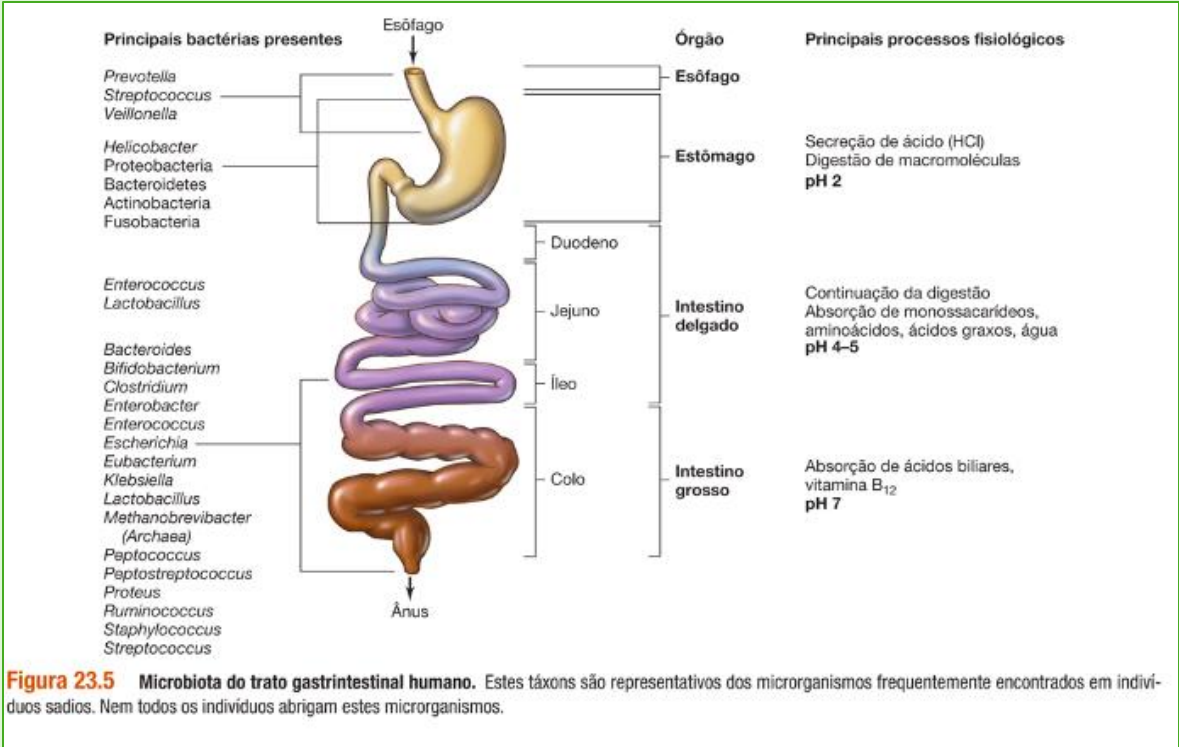


Figura 23.5 Microbiota do trato gastrointestinal humano. Estes táxons são representativos dos microrganismos frequentemente encontrados em indivíduos saudáveis. Nem todos os indivíduos abrigam estes microrganismos.

Microbiota Normal do Corpo Humano – Aplicação Biotecnológica

✓ Transplante Fecal

Conceito Inicial: O transplante da microbiota fecal surgiu como uma alternativa para pessoas que, devido ao uso de antibióticos, sofreram preda de sua microbiota normal, ou seja, entraram num estado chamado **disbiose intestinal**.

Este desequilíbrio da microbiota bacteriana intestinal reduz a capacidade de absorção de nutrientes e causa carência de vitaminas.

O Transplante da microbiota fecal de uma pessoa sadia para a pessoa em disbiose promove a restauração de sua microbiota fecal e devolve sua qualidade de vida.

Atualmente :

Já está sendo realizada:

- Tratamento de Recuperação da microbiota intestinal visando conter infecções contra *Clostridium difficile* que surge após antibióticoterapia.

Estão em Fase de pesquisas, com diferentes graus de avanços:

- Tratamento de Obesidade,
- Tratamento de Diabetes,
- Tratamento de Depressão,
- Aumento de Longevidade,
- Restauração geral da saúde promovida por:
 - infecções microbianas,
 - disfunções metabólicas em geral.

No Brasil, o transplante da microbiota fecal foi realizado pela primeira vez no Hospital Israelita Albert Einstein, em 2013 na cidade de São Paulo.

O método está sendo pesquisado e testado para tratar outras doenças. Mas, por enquanto, tem oficialmente apenas indicação para tratar a infecção pelo bacilo *Clostridium difficile*.

O tratamento é indicado apenas depois de o paciente ter passado pelas etapas tradicionais da terapia, que são o uso de antibióticos e a lavagem intestinal. **Se nada disso funcionar, então é a vez do transplante fecal.**

O transplante pode ser realizado por convênio e pelo SUS.

Surge a Nova Proposta Terapêutica – Guardar a própria Microbiota:

Surge a ideia de a pessoa, quando está vivenciando boa qualidade de vida, envie a um Laboratório credenciado uma amostra de sua própria microbiota.

O Laboratório, a purifica a microbiota e a mantém estocada e, no futuro, quando necessário, a pessoa solicita ao Laboratório uma amostra e toma capsulas de sua própria microbiota. Assim, recupera sua microbiota normal dos tempos em que esta estava sadia.

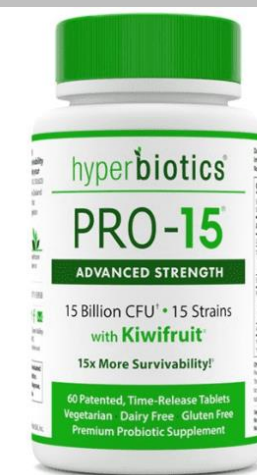
Este procedimento poderá restaurar sua saúde, qualidade de vida e até promover o REJUVENESCIMENTO.

Veja:

[HC-UFG cria o 1º Centro de Transplante de Microbiota Fecal do Brasil](#)

Veja: Hospital da Rede Ebserh

<http://www.ebserh.gov.br/noticias/201912101311-hospital-da-rede-ebserh-no-espirito-santo-passa-realizar-transplante-fecal>



Convite: Procure mais atualizações sobre este Tema.

Prevenção de infecções:

1) VACINAÇÃO

A vacinação é um dos métodos mais eficazes na prevenção das infecções bacterianas. Existem atualmente no **Programa Nacional de Vacinação** várias vacinas administradas na infância que previnem, por exemplo, o tétano, a tosse convulsa, difteria. Existem outras, fora do plano de vacinação obrigatório, que imunizam contra a cólera, a meningite, infecções pneumocócicas ou a febre tifóide.

2) CUIDADOS COM HIGIENE:

Por outro lado, existem cuidados de higiene diários que devem ser tido em conta para evitar estas infecções. Por exemplo:

- **Lavar as mãos** antes de preparar os alimentos, antes de comer, depois de usar o WC, tocar em animais ou de ter tido contato com pessoas infectadas,
- Armazenar e cozinhar alimentos adequadamente para evitar intoxicações alimentares,
- Evitar o consumo de carne crua ou mal cozida,
- Lavar frutas e verduras antes de as consumir,
- Abster-se do contato sexual sem o uso de preservativo.

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

4. Novas estratégias de combate às Infecções

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- “BioSkin” (pele artificial)
- Bacteriófagos e Fagoterapia



Instituto de Ciências
Biomédicas / USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

4. Novas estratégias de combate às Infecções

- “BioSkin” (pele artificial)

“Bio-skin” (pele artificial)

A **celulose microbiana (MC)** sintetizada em abundância pela bactéria ***Acetobacter xylinum*** mostra um vasto potencial para aplicação como um novo sistema de cicatrização de feridas.

A alta resistência mecânica e as notáveis propriedades físicas resultam da nanoestrutura exclusiva de uma membrana que nunca seca.

Há um vasto campo emergente para aplicação da MC como:

- Novos curativos e para
- Substitutos da pele.

São consideradas:

- as propriedades do material sintetizado,
- seu desempenho clínico e
- o progresso na comercialização de MC para produtos de tratamento de feridas.

Considera-se que ainda sejam necessários o desenvolvimento de “Técnicas de fermentação eficientes e baratas”, não disponíveis no momento, para produzir grandes quantidades de **Biopolímero**.



Fonte: [Microbial cellulose—the natural power to heal wounds, 2006](#)

Convite: Procure mais atualizações sobre este Tema

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

4. Novas estratégias de combate às Infecções

- Bacteriófagos e Fagoterapia

O que são Bacteriófagos ?

VÍRUS:

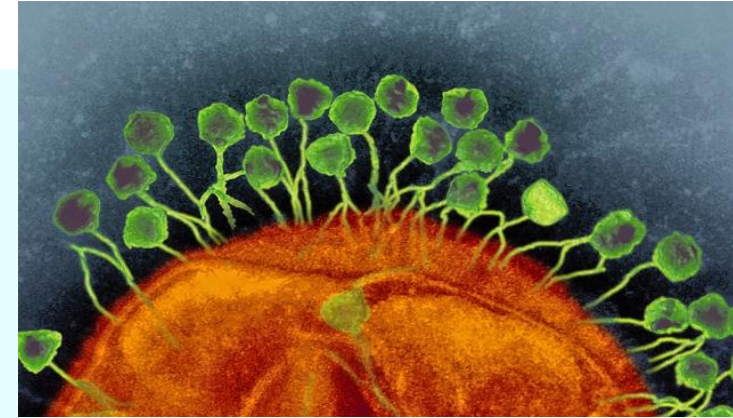
Todos os VIRUS necessitam de células hospedeiras para permitir sua replicação nas mesmas. Seu material genético pode ser DNA ou RNA de fita simples ou dupla.

FAGOS:

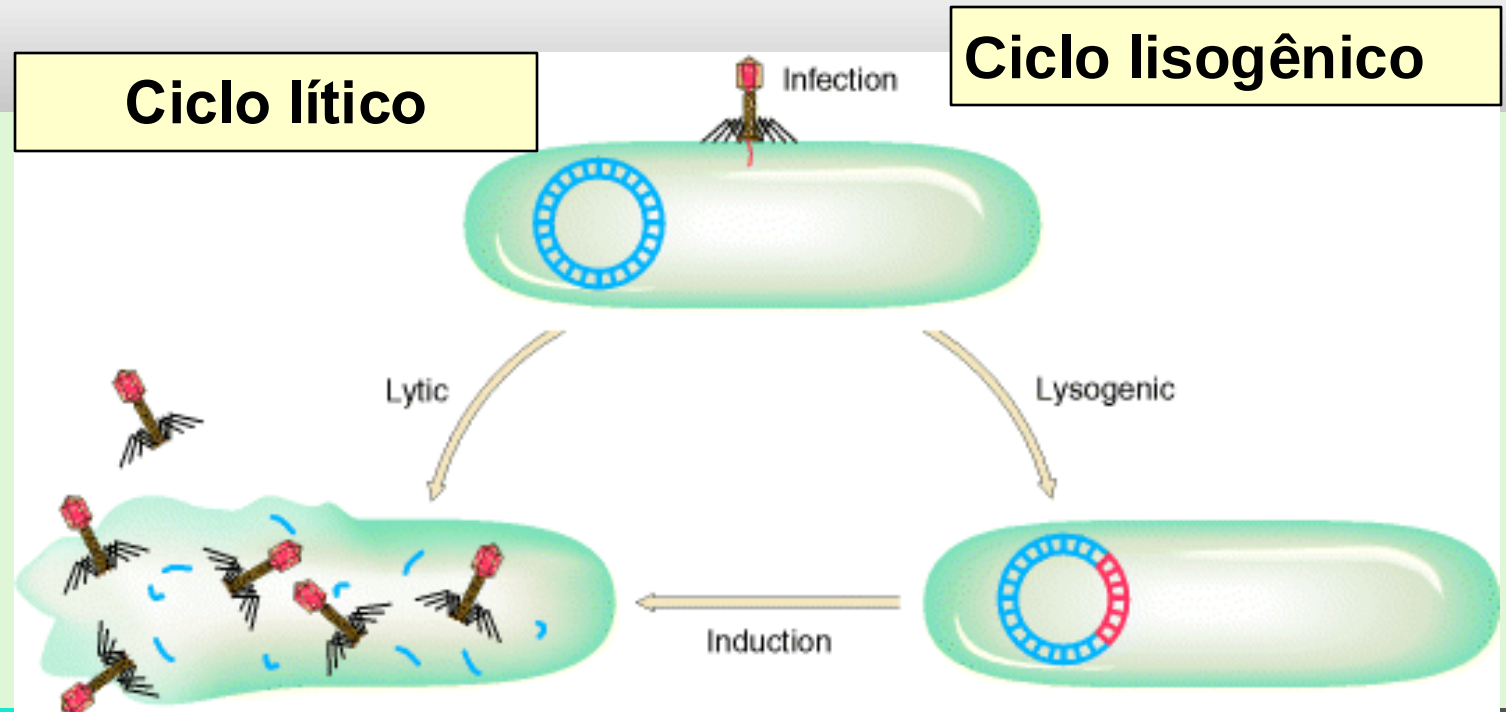
Os bacteriófagos (FAGOS) são vírus de bactérias.

Quando um vírus adentra uma célula bacteriana, podem ocorrer 2 possibilidades:

- Ciclo Lítico: o fago interrompe a replicação bacteriana e passa a usar toda máquina bioquímica da bactéria para produzir múltiplas partículas virais;
- Ciclo Lisogênico: o material genético do fago é inserido no genoma bacteriano formando um “prófago” e, neste sítio, o genoma fágico fica hospedado durante muitas divisões bacterianas. A bactéria que contém fago em seu genoma é dita que sofreu uma conversão lisogênica. Quando a bactéria é submetida a um estresse (térmico, radiação, químico, etc) o fago se excisa do genoma e entra em “ciclo lítico.



Bacteriófago (Fago) se ligando a superfície de uma bactéria



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

• Bacteriófagos e Fagoterapia

O que são Placas de lise ?

Quando o vírus infecta células hospedeiras em crescimento sobre a superfície plana, forma-se uma zona de lise celular denominada **placa de lise**, que aparece como uma área clara no tapete de células hospedeiras.

Uma suspensão de fagos pode ser quantificada para determinar sua concentração por unidade de volume de líquido (**titulo**). Isto é feito usando um "**Ensaio de placas**".

As placas podem ser obtidas quando os vírions são homogeneizados em um pequeno volume de ágar fundido contendo bactérias hospedeiras que são espalhadas sobre a superfície de um meio de ágar. Durante a incubação, as bactérias crescem e formam uma camada turva (tapete) que é visível a olho nu. As placas são reveladas como zonas limpas na camada de células de cultura.

Por contagem do número de placas, **titulo** da amostra pode ser calculado, muitas vezes expressa como "Unidades Formadoras de Placas/mL" - **UFP**).

Como quantificar os fagos e uma suspensão?

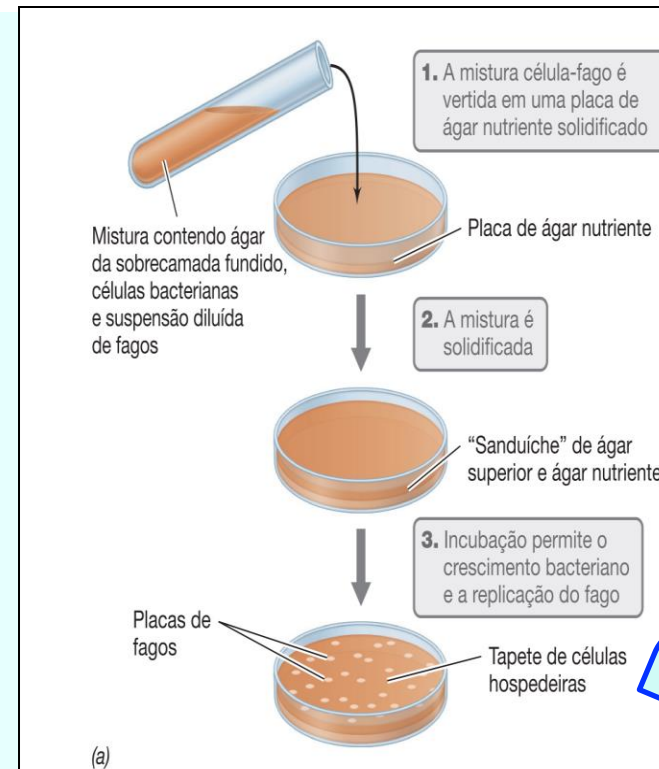
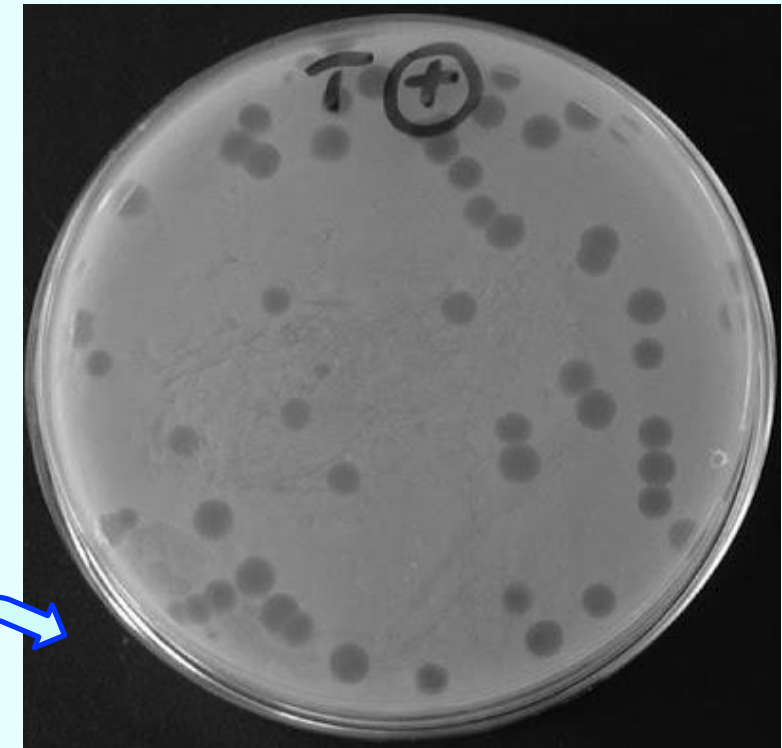


Figura 8.8 Quantificação de vírus bacterianos utilizando o ensaio de formação de placas de lise. (a) "Ágar superior" contendo uma diluição de vírus homogeneizada com uma célula bacteriana hospedeira é vertida sobre



Placas de lise

Bacteriófagos e Fagoterapia

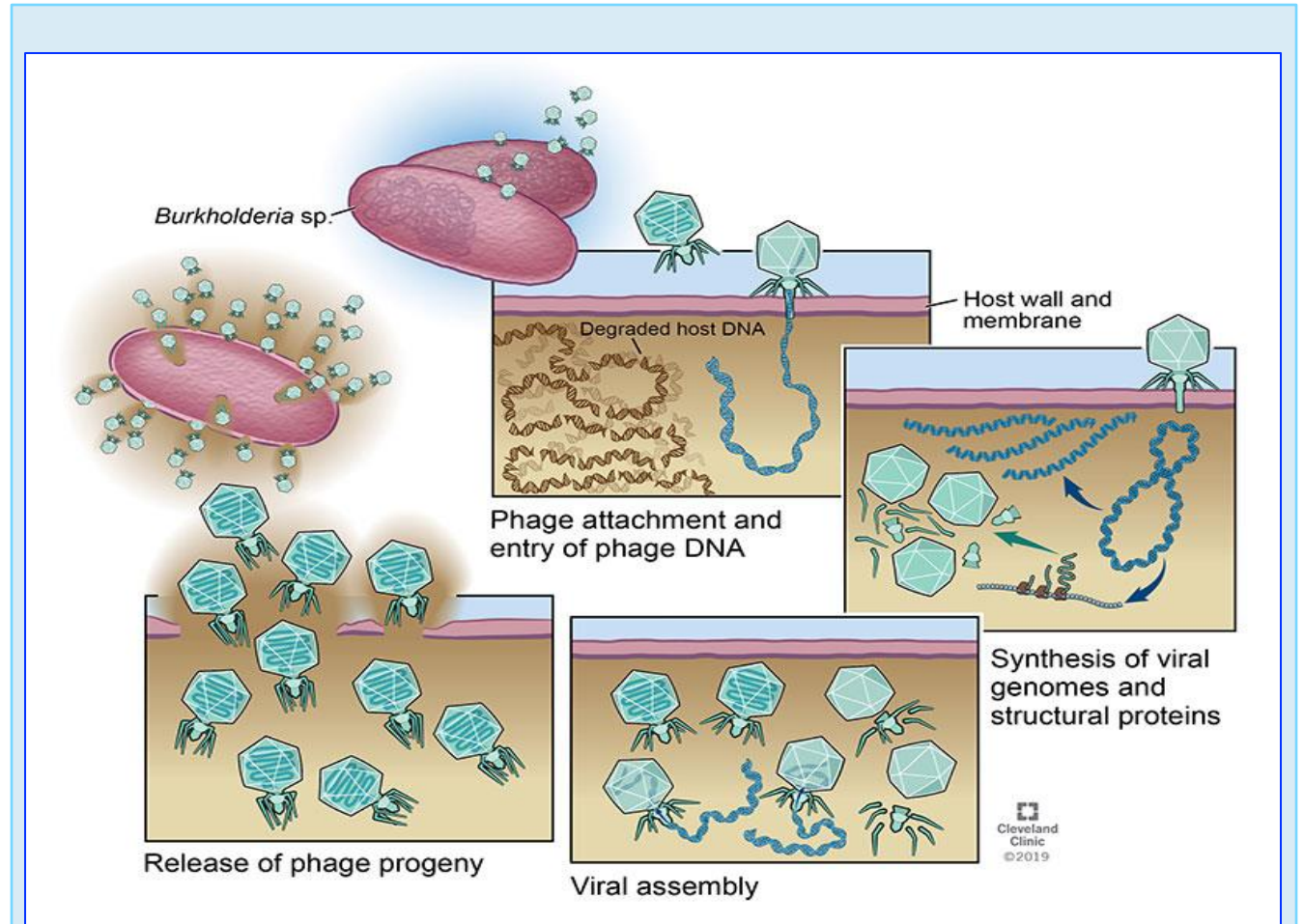
O que é Fagoterapia ?

Fagoterapia é o tratamento de uma infecção bacteriana empregando fagos.

Trata-se de uma técnica já conhecida há tempos, de extremo baixo custo, mas que perdeu seu uso devido:

- Competição com o sucesso promovido pelos dos Antibióticos,
- Baixo conhecimento de seu potencial embora nunca tenha sido amplamente explorado,
- Suas próprias limitações técnicas para aplicação.

Atualmente, devido aos problemas relacionados ao surgimento de infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, esta técnica vem despertando atenção como uma alternativa promissora para tratamento



Bacteriófagos estão presentes em altas concentrações nas mais diversas fontes ambientais, incluindo águas do mar, pântano e esgoto. Estão presentes onde as bactérias que infectam estiverem presentes. Infectam bactérias do trato digestivo humano, animal e outros nichos.

Bacteriófagos e Fagoterapia

Os bacteriófagos são vírus onipresentes, encontrados onde quer que existam bactérias. Estima-se que existam mais de 10³¹ bacteriófagos no planeta.

São dez milhões de trilhões, ou seja, mais do que qualquer outro organismo na Terra.

Cada um deles é desenvolvido para infectar um hospedeiro bacteriano específico a fim de se replicar, sem afetar outras células de um organismo.

A ideia de usá-los **terapeuticamente** não é nova. **Descrita há um século**, a terapia de fagos era popular nas décadas de 1920 e 1930 para tratar vários tipos de infecções e condições, mas os resultados eram inconsistentes e careciam de validação científica.

O surgimento de antibióticos na década de 1940 afastou a terapia de fagos, exceto em partes da Europa Oriental e da antiga União Soviética, onde permaneceu um tópico de pesquisa ativa.



Video: Phage Therapy - Bill and Melinda Gates Foundation

<https://medschool.ucsd.edu/som/medicine/divisions/idgph/research/center-innovative-phage-applications-and-therapeutics/patient-care/Pages/default.aspx>

Bacteriófagos e Fagoterapia



Caso:

No final de 2015, **Tom Patterson**, um professor de 69 anos do Dep. de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da UC San Diego, e sua esposa, Steffanie Strathdee, chefe da Divisão de Saúde Pública Global do Departamento de Medicina, passaram o feriado de Ação de Graças **no Egito**, quando Patterson **ficou doente, atormentado por dor abdominal**, febre, náusea, vômito e batimentos cardíacos acelerados. Os médicos locais diagnosticaram **pancreatite** (inflamação do pâncreas).

A condição de Patterson piorou, ele foi levado para Frankfurt, Alemanha, em 3 de dezembro de 2015, onde os médicos descobriram um pseudocisto pancreático (uma coleção de fluido ao redor do pâncreas).

O fluido foi drenado e o conteúdo foi cultivado. Patterson havia se infectado com um isolado (cepa) multirresistente de ***Acinetobacter baumannii***, um patógeno oportunista e muitas vezes **mortal**.

A **bactéria se mostrou particularmente problemática** em ambientes hospitalares e no Oriente Médio, com muitos veteranos feridos e soldados retornaram aos EUA com infecções persistentes.

Inicialmente, os únicos antibióticos com qualquer efeito (último recurso) provou ser uma combinação de 3 antibióticos: “meropenem, tigeciclina e colistina”, sendo que alguns destes antibióticos muitas vezes causam danos nos rins, entre outros efeitos colaterais.

A condição de Patterson estabilizou-se o suficiente para que ele fosse transportado por helicóptero em 12 de dezembro de 2015, **da Alemanha para a Unidade de Cuidados Intensivos (UTI) do Hospital Thornton, na UC San Diego Health**. Na chegada, descobriu-se que o **isolado bacteriano se tornara resistente a todos os antibióticos empregados**.

Finalmente, Tom Patterson foi curado de pancreatite causada pela bactéria multiR usando terapia com bacteriófagos

Video: [Novel phage therapy saves patient with multidrug-resistant bacterial infection](#)

Bacteriófagos e Fagoterapia

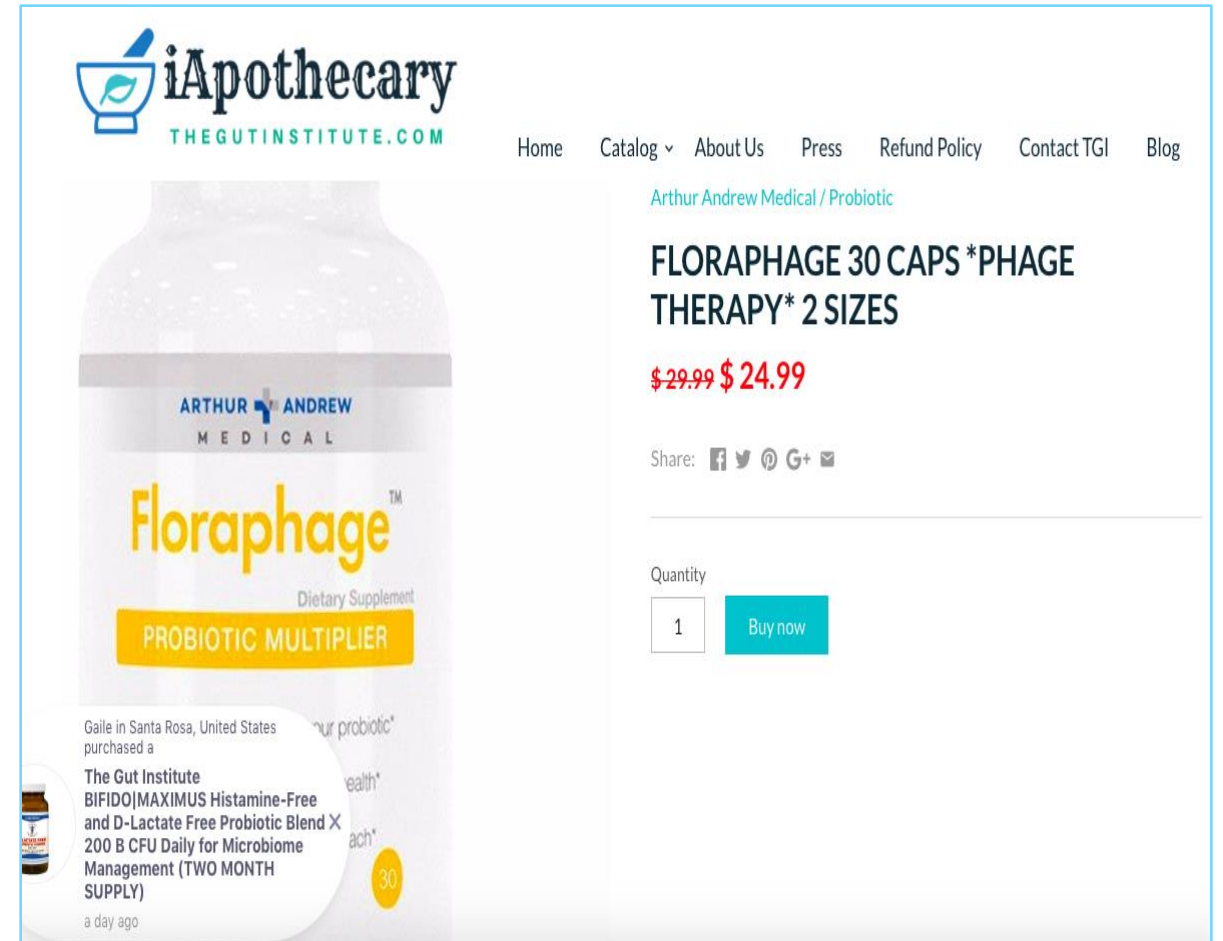
O que é Fagoterapia?

Os **bacteriófagos (fagos)** são vírus que matam e seletivamente as bactérias.

Eles são as entidades biológicas mais comuns na natureza e demonstraram combater e destruir eficazmente as bactérias resistentes a múltiplas drogas.

Ou seja, quando todos os antibióticos falham, os fagos ainda conseguem matar as bactérias e podem salvar uma vida de uma infecção.

Considerando a taxa alarmante de aumento de **"superbactérias"** que são **resistentes à maioria - se não a todos - antibióticos.**



The screenshot shows the iApothecary website (THEGUTINSTITUTE.COM) with a navigation bar including Home, Catalog, About Us, Press, Refund Policy, Contact TGI, and Blog. The main product is "FLORAPHAGE 30 CAPS *PHAGE THERAPY* 2 SIZES" by Arthur Andrew Medical / Probiotic. The price is listed as \$29.99 (crossed out) and \$24.99. A "Buy now" button is visible. The product image shows a white bottle with a yellow label that reads "Floraphage Dietary Supplement PROBIOTIC MULTIPLIER". A testimonial from Gaille in Santa Rosa, United States, is displayed, mentioning a purchase of "The Gut Institute BIFIDO|MAXIMUS Histamine-Free and D-Lactate Free Probiotic Blend X 200 B CFU Daily for Microbiome Management (TWO MONTH SUPPLY)".

Convite: Procure mais atualizações sobre este Tema

Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- **ABORDAGEM: "Target-based drug design"** – Baseado em **técnicas computacionais**
- **ABORDAGEM: "Triagem fenotípica para reposicionamento e descoberta de Novos Fármacos"** (Convidado: Dr. Lucio Freitas Jr.)



Instituto de Ciências
Biomédicas / USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

✓ ABORDAGEM: Computacional

A busca por **Novos Fármacos** também está realizada empregando outros novos métodos, como o chamado **“Descoberta de Fármacos baseada no Alvo”** (**‘Target-based Drug Design’**).

Esta técnica consiste em empregar **“Técnicas Computacionais”** para identificar o alvo terapêutico desejado.

O alvo terapêutico pode ser um sítio na bio-estrutura de um patógeno que esta causando uma infecção microbiana ou pode ser um sítio alvo alterado no próprio corpo humano que está causando a doença.

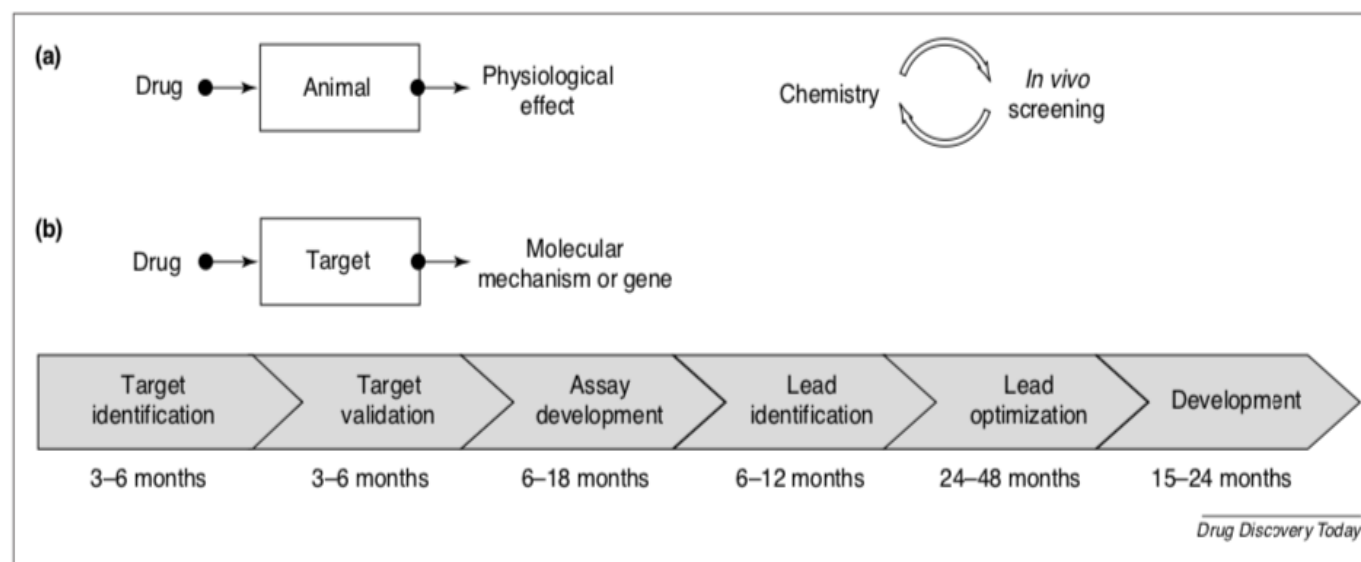
Após o alvo terapêutico ter sido identificado, um Fármaco é selecionado (realizado um “screening”) a partir de bancos de formulas já conhecidas, ou um novo Fármaco que venha a ter a ação desejada pode ser produzido por síntese química dirigida (tradicional ou empregando biocatálise ou bioconversão).

A técnica **‘Target-based Drug Design’** será descrita em **“Tópicos de Bioinformática”**

Veja: [Target-based drug discovery: is something wrong?](#)

Na última década, a indústria farmacêutica experimentou um declínio constante na produtividade e uma observação impressionante é que o declínio coincidiu com a introdução da descoberta de medicamentos com base em alvos.

A abordagem baseada em alvos pode efetivamente desenvolver novos tratamentos para um alvo validado, mas o processo de validação de alvos é complexo e associado a um alto grau de incerteza.



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

✓ ABORDAGEM: Computacional

A busca por **Novos Fármacos** também está realizada empregando outros novos métodos, como o chamado **“Descoberta de Fármacos baseada no Alvo”** (‘Target-based Drug Design’).

Esta técnica consiste em empregar **“Técnicas Computacionais”** para identificar o alvo terapêutico desejado.

O **alvo terapêutico** pode ser um **sítio na bio-estrutura de um patógeno** que esta causando uma infecção microbiana **ou** pode ser **um sítio alvo alterado no próprio corpo humano que esta causando a doença**.

Após o alvo terapêutico ter sido identificado, um Fármaco é selecionado (realizado um “screening”) a partir de bancos de formulas já conhecidas, ou um novo Fármaco que venha a ter a ação desejada pode ser produzido por síntese química dirigida (tradicional ou empregando biocatálise ou bioconversão).

A técnica ‘Target-based Drug Design’ será descrita em **“Tópicos de Bioinformática”**

BBA - Proteins and Proteomics 1867 (2019) 17–21

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Proteins and Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

Review

Applications of proteomics in pharmaceutical research and development[☆]

Hiroyuki Yokota

Astellas Pharma Inc., 21 Miyukigaoka, Tsukuba-shi 305-8585, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:
Proteomics
Proteome
Pharmaceutical
Drug discovery
Chemical proteomics
Post-translational modification

ABSTRACT

The significance of proteomics in the pharmaceutical industry has increased since overcoming initial difficulties. This review discusses recent proteomics publications from pharmaceutical companies to identify new trends in proteomics applications to research and development. Applications of proteomics such as chemical proteomics, protein expression profiling, targeted protein quantitation, analysis of protein-protein interactions and post-translational modification are widely used by various sections of the industry. Technological advancements in proteomics will further accelerate pharmaceutical research and development.

1. Introduction

The significance of proteomics in the pharmaceutical industry has been increasing. When proteomics was first applied to drug discovery research around 20 years ago, protein expression profiling using 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was the gold standard for identifying differentially expressed proteins between disease and control samples. However, due to the associated technological limitations at the time, proteomics did not significantly contribute to drug discovery research. A history of the difficulties associated with proteomics applications in the pharmaceutical industry was reviewed by Cutler and Voshell [1].

Technological advancements in mass spectrometry (MS) such as improved resolution, accuracy and sensitivity have changed the position of proteomics in drug discovery research. Today, proteomics is integrated into pharmaceutical research and development. For example, chemical proteomics has become indispensable for phenotypic screening in the drug discovery process. Chemical proteomics has also been used to successfully elucidate the precise molecular mechanisms of drugs discovered in phenotypic screenings [2,3]. Targeted protein quantifications such as by selected reaction monitoring (SRM) and multiple reaction monitoring (MRM) are widely used to measure disease- and drug-related proteins. Applications of proteomics are widespread among various sections of pharmaceutical companies, such as in drug absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME); toxicology; and chemistry, manufacturing and control (CMC) laboratories (Fig. 1).

2. Protein expression profiling

Protein expression profiling is a standard proteomics application in pharmaceutical research. Protein expression profiles between disease and control samples are compared to search for disease-related proteins such as disease biomarkers. As mentioned above, 2D-PAGE was initially used when proteomics was first applied to pharmaceutical research; however, important protein species such as low-abundance or hydrophobic proteins were difficult to analyze using 2D-PAGE. Low throughput was another disadvantage of 2D-PAGE, which required large amounts of human resources and time for analysis. Therefore, liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) and antibody-based technologies are now widely used for protein expression profiling in pharmaceutical research, including multiplexed protein quantitation using isobaric labeling reagents such as isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and tandem mass tags (TMT) [4].

Protein profiling is often performed for focused protein species such as cell surface and phosphorylated proteins. Tzouras et al. applied a 5-plex stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) method with immunoprecipitation of tyrosine phosphorylated peptides to understand the mode of action of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor [5]. Luerman et al. quantitatively evaluated changes in protein phosphorylation by a leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)

Abbreviations: 2D-PAGE, 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; MS, mass spectrometry; SRM, selected reaction monitoring; MRM, multiple reaction monitoring; ADME, absorption, distribution, metabolism and excretion; CMC, chemistry, manufacturing and control; SILAC, stable isotope labeling with amino acids in cell culture; LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; CSF, cerebrospinal fluid; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; GPCR, G protein-coupled receptor; RPPA, reverse phase protein arrays; HCP, host cell proteins

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Electrophoresis in Proteomics, edited by Dr. Tadashi Kondo.

E-mail address: hiroyuki.yokota@astellas.com.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.05.008>

Received 16 February 2018; Received in revised form 10 April 2018; Accepted 8 May 2018

Available online 09 May 2018

1570-9639/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

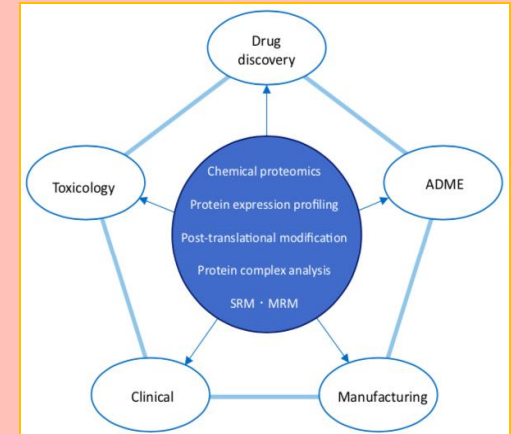


Fig.1: A aplicação da Proteômica em várias sessões da Indústria Farmacêutica geralmente inclui a identificação do alvo para o “screening” de drogas e sua otimização.

As moléculas candidatas são avaliadas quanto a sua toxicidade.

Contribuem para validação da droga :

- Proteômica química,
- Modificações pós-traducionais,
- Análises de complexos proteicos

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.05.008>



Instituto de Ciências Biomédicas / USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- ✓ **ABORDAGEM: Reposicionamento de fármacos**
(Convidado: Dr. Lucio Freitas Jr)



Vídeo [#CiênciaUSP](#) [#CanalUSP](#) [#JornaldaUSP](#) USP Vida - Lucio Freitas-Junior :
https://www.youtube.com/watch?v=FxQi5jR68Mg&ab_channel=CanalUSP

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

✓ **ABORDAGEM: “Triagem fenotípica para reposicionamento e descoberta de Novos Fármacos”** (Convidado: Dr. Lucio Freitas Jr.)

Dr. Lucio Freitas-Junior, coordenador do Laboratório “**Triagem fenotípica para reposicionamento e descoberta de Novos Fármacos**”

(“Phenotypic Screening Platform”) – ICB/USP.

O Laboratório de “**Triagem fenotípica de Novos Fármacos**” emprega a tecnologia “**High throughput Content Screening**” que permite analisar dezenas de milhares de fármacos simultaneamente toda semana.

Segundo o **Dr. Lucio Freitas-Jr**, um medicamento pode levar até dez anos para ser produzido, testado e aprovado e, muitas vezes, como agora está ocorrendo com os casos de **covid-19**, “nós não temos esse tempo”.



Neste momento (1º. sem 2021) é prioridade deste Lab as análises atividades antivirais de compostos em células infectadas com o **SARS-CoV-2**, em testes *in vitro*.

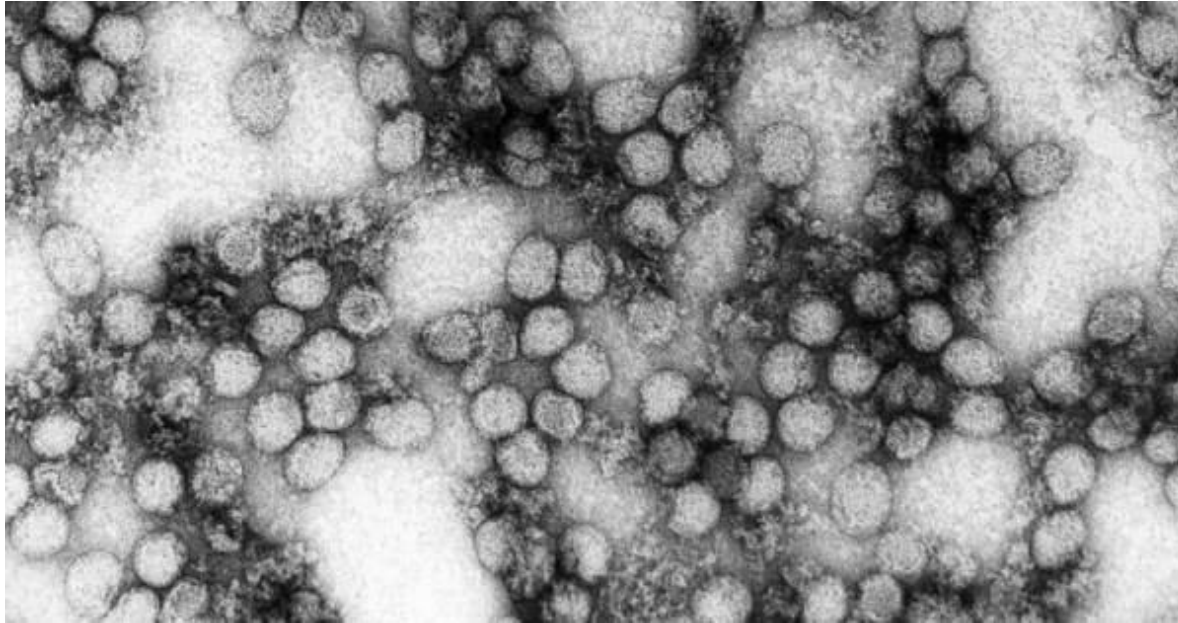
Para tanto, as células são colocadas em placas de ensaio e cada uma recebe diferentes compostos. As análises são feitas de modo automatizado. As moléculas estudadas são **fármacos já aprovados** para o tratamento de outras doenças e produzidos em território brasileiro. “A grande vantagem é agilizar o processo de descoberta de um tratamento.

Por se tratar de um vírus que causa doença potencialmente letal e para o qual ainda não existem vacinas ou tratamento específico, o estudo de “**triagem fenotípica**” é desenvolvido no **Laboratório de Nível de Biossegurança 3 (NB3)** do **Departamento de Microbiologia/ICBII** coordenado pela **Profa. Ana Marcia Sá Guimarães**.

O projeto está sendo possível graças ao cultivo do novo covid-19 pelo grupo do **Prof. Edison Luiz Durigon ICBII/USP** que conseguiu, a partir dos primeiros Brasileiros infectados, amplificar a sequência genômica do vírus e emprega-la como controle positivo nos testes de PCR.

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- ✓ **ABORDAGEM: Reposicionamento de fármacos**
(Convidado: **Lucio Freitas Jr**)



Eletromicrografia de transmissão do vírus da **febre amarela** – Foto: Erskine Palmer, Ph.D. – Centers for Disease Control and Prevention Public Health Image Library / Domínio público via Wikimedia Commons

O desenvolvimento de uma nova molécula terapêutica, pode-se levar de **10 a 12 anos**, a um custo de até **alguns bilhões de reais**.

Isso porque os processos de desenvolvimento de fármacos seguem fases de teste:

- *in vitro*
- *in vivo* em modelos experimentais,
- além de testes de segurança,

para **só depois** sejam iniciadas as fases de **teste clínico em humanos**. Esse processo leva muito tempo e dinheiro.

“A partir da estratégia de **“reposicionamento de fármacos”**, quando você começa a partir de algo que já foi testado e que já existe uma indicação boa, você está encurtando esse tempo para 2 a 4 anos, a um custo reduzido”, afirma o cientista.

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- ✓ **ABORDAGEM: Reposicionamento de fármacos**
(Convidado: Lucio Freitas Jr)

Estratégia “reposicionamento de fármacos”

Compostos (moléculas) e farmacologicamente **ativos para outras doenças e já testados** que apresentam potencial para tratamento de novas doenças como a **febre amarela**.

Os testes foram realizados em culturas de células humanas de fígado infectadas pelo vírus causador da doença. Foram testados **1.280** compostos e **88** deles (**6,9%**) reduziram a infecção em **50% ou mais**.

A estratégia pode **encurtar em vários anos** a chegada de medicamentos do laboratório até as farmácias.

O estudo traz resultados inéditos ao localizar compostos de amplo espectro de funções farmacológicas. Das moléculas mais promissoras, duas delas também tiveram eficácia contra:

- **vírus da dengue;**
- **anti-febre amarela,**



Emprego de Microrganismos na Indústria Farmacêutica



Instituto de Ciências
Biomédicas / USP



Profa. Elisabete
Vicente
bevicent@usp.br

Muito grata
pela sua
atenção !

1. Diagnóstico das doenças infecciosas

- . Os laboratórios
- . Os tipos de Análises

2. Produção de Compostos farmacologicamente ativos:

- Antimicrobianos: antibióticos e antivirais
- Empregados no diagnóstico de doenças
- Medicamentos para tratamento
- Vitaminas, hormônios

3. Que atuam na prevenção de doenças Infecciosas:

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- Vacinas

4. Novas estratégias de combate às Infecções:

- Microbiota Normal do Corpo Humano
- Novos Biopolímeros de aplicação médica (Ex: pele artificial)
- Bacteriófagos e Fagoterapia

5. Novos métodos para o desenvolvimento de Fármacos

- "Target-based drug design" – Baseado em técnicas computacionais
- "Triagem fenotípica para reposicionamento e descoberta de Novos Fármacos"
(Convidado: Dr. Lucio Freitas Jr.)

Convite:

Vocês tem aqui nesta AULA
SUGESTÕES de muitos TEMAS
para
desenvolver o seu TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE DISCIPLINA.
Aproveitem bem !