

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

SABRINNA WOLNEY GROSSI VIERA

SELEÇÃO DE APTÂMEROS CONTRA CEPAS E ISOLADOS BACTERIANOS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

UBERLÂNDIA-MG
ABRIL DE 2025

SABRINNA WOLNEY GROSSI VIEIRA

**SELEÇÃO DE APTÂMEROS CONTRA CEPAS E ISOLADOS BACTERIANOS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira
Coorientadora: Ana Carolina Costa Santos

UBERLÂNDIA-MG

ABRIL DE 2025

AGRADECIMENTOS

A realização deste Trabalho de Conclusão de Curso representa o encerramento de uma etapa muito importante da minha vida acadêmica, marcada por diversos desafios, como a pandemia de COVID-19, greves e contratemplos ao longo da pesquisa desenvolvida. No entanto, nada disso teria sido possível sem o apoio e a colaboração de pessoas especiais, às quais sou profundamente grata.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, pelo apoio constante ao longo dessa jornada, especialmente aos meus pais. Sem o incentivo e a presença de vocês, realizar o sonho de cursar Biotecnologia em uma universidade na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) não teria sido possível. Obrigada, mãe, por ser minha base, minha fortaleza, e por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. Seu amor incondicional e suas palavras de incentivo foram fundamentais para que eu não desistisse. Ao meu pai, agradeço pelos conselhos e pelo exemplo de dedicação e esforço, que sempre me inspiraram a buscar o meu melhor em tudo o que faço.

Ao Artur Franco, meu amor e gratidão por estar ao meu lado em todos os momentos, acompanhando de perto cada desafio, conquista e resultado, e por me apoiar nos períodos mais difíceis. Obrigada por acreditar em mim, por me motivar a seguir em frente e por ser meu porto seguro enquanto todo o resto parecia desmoronar. Aos meus amigos, minha sincera gratidão por estarem presentes nos momentos mais desafiadores, me aconselhando e tornando a jornada mais leve. Obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelo apoio nos dias difíceis e pela companhia constante que tornou essa caminhada muito mais significativa.

Agradeço também ao meu orientador, professor Carlos Ueira-Vieira, pelas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho. À minha coorientadora, professora Ana Carolina Santos, deixo meu sincero agradecimento pela orientação, pelos conselhos e pelas contribuições valiosas que enriqueceram esta pesquisa. Sou especialmente grata a ambos pela oportunidade de fazer parte do LabGen e por me permitirem trabalhar com as áreas da Biotecnologia que mais admiro e nas quais encontrei verdadeira paixão.

RESUMO

A crescente ameaça da resistência antimicrobiana (RAM) representa um dos principais desafios à saúde pública global, sendo considerada uma das maiores preocupações atuais pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esse cenário é agravado pela disseminação de bactérias resistentes, como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Diante da escassez de novos antibióticos e da urgência por diagnósticos rápidos e eficazes, os aptâmeros surgem como ferramentas promissoras. Esses oligonucleotídeos de fita simples, selecionados por meio da técnica SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial), demonstram alta especificidade e afinidade por alvos moleculares diversos. Este trabalho teve como objetivo selecionar aptâmeros com potencial biotecnológico contra cepas bacterianas Gram-negativas resistentes, utilizando metodologias SELEX alvos moleculares externos e internos as células bacterianas. O processo experimental envolveu as etapas de subtração, seleção, purificação, lise celular, eletroforese em gel de agarose e amplificação por PCR, permitindo a análise qualitativa e quantitativa das amostras. Além disso, foi incorporada a aplicação de ultrassom após o SELEX como etapa de refinamento, com o intuito de eliminar aptâmeros de baixa afinidade. Os resultados obtidos da quantificação fluorométrica Qubit dos produtos da seleção indicam a presença de material genético com tamanho entre 80 e 60 pares de base, o esperado devido a biblioteca utilizada. Esses resultados enaltecem a necessidade do sequenciamento e aprofundamento de pesquisas para futuras aplicações dos aptâmeros selecionados.

Conclui-se que a metodologia SELEX, integrada a ferramentas da biologia molecular e ao uso do ultrassom, demonstrou-se eficaz na seleção de aptâmeros com elevada especificidade. Os oligonucleotídeos obtidos apresentam grande potencial biotecnológico, com possibilidades de aplicação terapêutica direcionada, além de uso em biossensores e no desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico rápido, contribuindo para um tratamento mais rápido, eficaz e direcionado contra cepas bacterianas resistentes.

Palavras-chave: Aptâmeros; SELEX; resistência antimicrobiana; *Acinetobacter baumannii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*

ABSTRACT

The growing threat of antimicrobial resistance (AMR) represents one of the main challenges to global public health and is considered one of the greatest current concerns by the World Health Organization (WHO). This scenario is exacerbated by the spread of resistant bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. In light of the scarcity of new antibiotics and the urgency for rapid and effective diagnostics, aptamers have emerged as promising tools. These single-stranded oligonucleotides, selected through the SELEX technique (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), demonstrate high specificity and affinity for a variety of molecular targets.

This study aimed to select aptamers with biotechnological potential against resistant Gram-negative bacterial strains using both exogenous and endogenous SELEX methodologies. The experimental process involved subtraction, selection, purification, cell lysis, agarose gel electrophoresis, and PCR amplification, allowing qualitative and quantitative analysis of the samples. In addition, the application of ultrasound was incorporated after the SELEX process as a refinement step to eliminate low-affinity aptamers.

The results obtained from Qubit fluorometric quantification of the selected products indicate the presence of genetic material ranging from 80 to 60 base pairs in length, which was expected due to the library used. These findings highlight the need for sequencing and further research to explore the future applications of the selected aptamers.

It is concluded that the SELEX methodology, integrated with molecular biology tools and ultrasound application, proved effective in selecting aptamers with high specificity. The obtained oligonucleotides show great biotechnological potential, with possibilities for targeted therapeutic application, as well as use in biosensors and the development of tools for rapid diagnostics — contributing to faster, more effective, and targeted treatment against resistant bacterial strains.

Keywords: Aptamers; SELEX; antimicrobial resistance; *Acinetobacter baumannii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 –	Representação do processo de seleção de aptâmeros por <i>Cell</i> -SELEX...	8
Figura 2 –	Etapas de subtração e seleção de aptâmeros.....	12
Figura 3 –	Géis de eletroforese com a metodologia de aptâmeros exógenos.....	15
Figura 4 –	Gel de eletroforese com amostras do SELEX endógeno.....	15
Figura 5 –	Gel de eletroforese após a reação de PCR.....	18
Figura 6 –	Quantificação fluorimétrica Qubit.....	21
Figura 7 –	Resultados quantitativos da quantificação fluorimétrica Qubit.....	21

GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1 –	Gráfico sobre a quantificação das amostras antes da PCR.....	17
Gráfico 2 –	Comparação das análises quantitativas de amostras exógenas...	19
Gráfico 3 –	Comparação das análises quantitativas de amostras endógenas.	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – *Acinetobacter baumannii*

ADC – *Acinetobacter-derived cephalosporinase*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Brain Heart Infusion

BSA – Albumina de Soro Bovino

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ITU – Infecção do Trato Urinário

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MCR – *Escherichia coli* portadora do gene mcr-1

MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

OMS – Organização Mundial da Saúde

OXA – Oxacilinas OXA

PAO1 – *Pseudomonas aeruginosa strain 1*

PBS – Salina Tamponada com Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RAM – Resistência Antimicrobiana

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotações Por Minuto

SELEX – Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	OBJETIVOS.....	9
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivo específico	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1	Cepas e isolados utilizados:	10
3.2	Preparo dos reagentes:	11
3.3	Subtração dos aptâmeros:	11
3.4	Seleção de aptâmeros:.....	13
3.5	Lise celular e quantificação das amostras:	13
3.6	Amplificação dos ligantes:.....	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Médica Brasileira, aproximadamente 45 mil pessoas morrem anualmente devido a complicações tardias decorrentes de infecções hospitalares (ANS, 2021). As infecções adquiridas durante ou após o período da internação hospitalar são denominadas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Essas infecções representam a principal causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), totalizando 65% dos casos no Brasil, superando os índices de óbitos por infarto do miocárdio e câncer, em contraste com a média mundial, que varia entre 30% e 40% (FIOCRUZ, 2021). Um fator relevante para o aumento dos óbitos por IRAS está relacionado à Resistência Antimicrobiana (RAM), adquirida por diversas bactérias ao redor do mundo. A RAM tornou-se uma das ameaças mais graves à saúde pública mundial (WHO, 2024).

O relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2017 revelou altos níveis de resistência em cepas causadoras de sepse em hospitais (PAHO, 2017). Nessa época, 8% das sepSES causadas por *Klebsiella pneumoniae* eram resistentes aos carbapenêmicos, aumentando a possibilidade de morte, enquanto mais de 20% das cepas isoladas de *Escherichia coli* apresentavam resistência aos medicamentos de primeira linha, como a ampicilina e o Cotrimoxazol, e aos de segunda linha, como as fluoroquinolonas (WHO, 2017). Entre 2020 e 2023, registrou-se um aumento em mais de 150 variantes da enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), responsável pela hidrólise dos carbapenêmicos, documentando a capacidade de alterações na estrutura enzimática o que gera um aumento da virulência bacteriana e o risco à saúde pública (DING, 2023).

Em 2024 a OMS publicou uma lista atualizada de patógenos bacterianos prioritários para pesquisas e desenvolvimento de fármacos. Entre eles, a *Acinetobacter baumannii* (AB), resistente a carbapenêmicos, foi classificada como prioridade crítica, juntamente com outras espécies da ordem *Enterobacterales* resistentes à cefalosporina de terceira geração e *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos, *Klebsiella pneumoniae* pertence a essa ordem juntamente com *Escherichia coli* (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Como alta prioridade, estão *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) resistente a carbapenêmicos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, além de espécies dos gêneros *Salmonella* e *Shigella* (WHO, 2024).

Acinetobacter baumannii é o patógeno Gram-negativo que mais tem gerado preocupação. As elevadas taxas de resistência são atribuídas à disseminação de clones que

contêm genes codificadores de, oxacilinases, di-hidropteroato sintase resistente à sulfonamida e outras enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, inibidores de β -lactamases tradicionais, e cefalosporinas até a terceira geração (KYRIAKIDIS, 2021).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é uma espécie Gram-negativa oportunista naturalmente resistente a penicilinas (DING, 2023). Está entre os patógenos nosocomiais mais comuns do mundo e está associada à resistência aos fármacos antimicrobianos β -lactâmicos e aos carbapenêmicos de espectro estendido (DING, 2023). Por isso, gera preocupações à saúde pública, principalmente em pacientes hospitalizados, sendo a principal responsável por sepse neonatal no mundo (DING, 2023).

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa presente na microbiota normal, encontrada na pele, garganta e fezes (GRACE, 2022). Considerada oportunista, é capaz de infectar plantas, animais e seres humanos. Essa bactéria apresenta grande preocupação para saúde pública, sendo considerada de alta prioridade pela OMS por seu perfil de resistência a antibióticos, incluindo carbapenêmicos (OMS, 2024). Existe uma grande variedade nos mecanismos de resistência da *P. aeruginosa* entre eles, mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos (LANGENDONK; NEILL; FOTHERGILL, 2021).

Escherichia coli pertence à microbiota normal, encontrada no sistema digestório animal e humano, classificada como bacilo Gram-negativa (SANTOS, 2023). Embora seja comum, pode causar infecções e doenças quando o sistema imunológico do hospedeiro está enfraquecido, sendo responsável por Infecções no Trato Urinário (ITU), gastroenterites, infecções intestinais e sepse (SANTOS, 2023). Segundo dados da ANVISA (2023), aproximadamente 34% dos casos de ITU por bactérias Gram-negativas em adultos são decorrentes de infecção por *E. coli*, entre essas, foram isoladas cepas resistentes às polimixinas, incluindo a polimixina E (colistina) e a polimixina B (ANVISA, 2023).

As polimixinas são antimicrobianos de amplo espectro, eficazes contra bactérias Gram-negativas. Elas possuem em sua estrutura polipeptídeos cíclicos não ribossomais (SANTOS, 2023). O mecanismo de ação dessas moléculas envolve a interação com os lipídios A da membrana externa bacteriana, comprometendo sua permeabilidade seletiva. Essa classe de fármacos é crucial, pois representa a última alternativa terapêutica para infecções causadas por cepas resistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (DINKEL, 2020).

O gene plasmidial *mcr-1* codifica a proteína MCR-1, uma enzima fosfoetanolamina transferase intramembranar, responsável por modificar o lipídio A presente na membrana celular das bactérias Gram-negativas, reduzindo sua afinidade pelas polimixinas (SANTOS,

2023). A produção dessa proteína pode aumentar de 4 a 8 vezes a concentração inibitória mínima de polimixinas. O primeiro plasmídeo identificado como carreador do gene *mcr-1* pertence ao grupo IncI2, contudo, devido à sua elevada disseminação foi encontrado em mais de sete grupos plasmidiais (DINKEL, 2020). Além disso, o sistema PmrAB desempenha um papel essencial na resistência antimicrobiana em *Escherichia coli*, regulando a expressão de genes envolvidos na modificação da membrana celular. Esse sistema é ativado por íons Fe^{3+} e Al^{3+} em pH ácido, induzindo a transcrição dos genes do operon *arnBCADTEF-ugd*, *eptA* e *naxD* (SANTOS, 2023).

Diante desse cenário preocupante, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou um Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência aos Antimicrobianos nos serviços de saúde. Esse plano estabelece estratégias para mitigar as IRAS e a RAM, com o intuito de preservar a eficácia dos fármacos antimicrobianos e reduzir os casos de infecção por bactérias resistentes. O controle da disseminação da RAM no Brasil e no mundo requer esforços conjuntos entre governos e sociedade. No entanto, a escassez de novos antimicrobianos permanece um problema global, afetando países de diferentes níveis de desenvolvimento (ANVISA, 2023).

Atualmente, há uma carência de testes de diagnóstico rápido, eficiente e preciso para detectar infecções bacterianas, o que dificulta a implementação de tratamentos direcionados (RESENDE, 2016; KOLM, 2020). Os métodos mais utilizados incluem cultura, moleculares e imunológicos. O método de cultivo microbiológico consiste em crescer as bactérias em meios de cultura apropriados para identificação e teste de sensibilidade a antibióticos. Entretanto, essa metodologia é limitada porque o tempo estimado é de 24h a 72h, além disso, alguns microrganismos são difíceis de cultivar (MANCINI, 2022).

Os testes moleculares são majoritariamente baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tanto na versão convencional quanto em tempo real (qPCR). A PCR é amplamente utilizada para amplificação de sequências específicas de DNA, garantindo alta precisão na identificação dos patógenos. No entanto, sua eficácia pode ser comprometida pela presença de antígenos em concentrações muito baixas, o que pode resultar em falsos negativos, dificultando o diagnóstico precoce da infecção (RESENDE, 2016). Dentre os testes imunológicos, o mais utilizado é o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e rapidez. Esse método baseia-se na reação antígeno-anticorpo, em que um anticorpo específico captura o alvo (antígeno), gerando um sinal detectável por meio de uma reação enzimática (RESENDE, 2016).

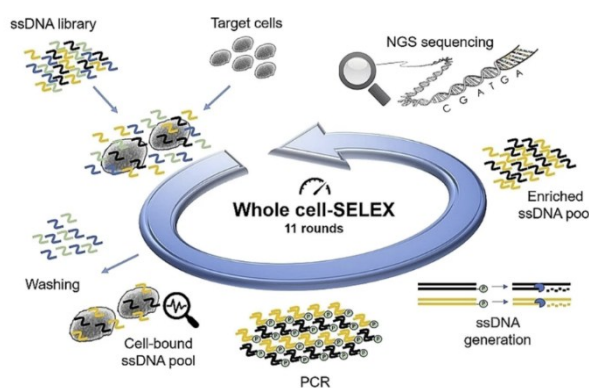
Diante das limitações associadas a métodos tradicionais como PCR e ELISA, especialmente quanto à sensibilidade e estabilidade, os aptâmeros têm se destacado como uma alternativa inovadora e promissora para diagnóstico e terapia. São curtas sequências de oligonucleotídeos (DNA ou RNA de fita simples), que apresentam alta especificidade e afinidade por seus alvos. O termo “aptâmero” origina-se do latim “*aptus*” que significa ligar ou encaixar, e do grego “*meros*” que significa partícula. Essas moléculas podem ter até 100 nucleotídeos e são selecionadas pelo método SELEX (RESENDE, 2016; ZHU, 2023).

Os aptâmeros apresentam vantagens significativas em relação aos anticorpos, pois podem ser sintetizados por vias químicas ou enzimáticas, sem a necessidade de uso de animais (RESENDE, 2016). Além disso, são mais estáveis, possuem baixa imunogenicidade, menor custo de produção, são termodinamicamente favoráveis na formação de estruturas secundárias e terciárias e apresentam maior permeabilidade celular devido ao seu pequeno tamanho (KOLM, 2020).

O processo de seleção dos aptâmeros é realizado pelo método SELEX. Devido a sua conformação flexível, os aptâmeros podem interagir com diversos compostos, incluindo moléculas de baixa afinidade por DNA e RNA, como compostos orgânicos e inorgânicos, peptídeos, proteínas, carboidratos, antibióticos e células inteiras. Quando a técnica SELEX é aplicada à seleção de aptâmeros contra células inteiras, ela é denominada *cell*-SELEX, sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de diagnósticos, terapias-alvo e biossensores (KOLM, 2020).

O *Cell*-SELEX utiliza células-alvo inteiras como plataforma de seleção, dispensando o conhecimento prévio do epítipo ou do alvo molecular específico como está exemplificado na figura 1 (KOLM, 2020). Essa abordagem permite a seleção de aptâmeros capazes de reconhecer estruturas complexas e conformacionais presentes na superfície de células bacterianas, podendo ser utilizados na identificação de biomarcadores e no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas (KOLM, 2020).

Figura 1 – Representação do processo de seleção de aptâmeros por *Cell*-SELEX.



Legenda: O processo envolve incubar uma biblioteca de ssDNA com células-alvo, seguida de etapas de lavagem, recuperação dos oligonucleotídeos ligados, amplificação por PCR, regeneração da fita simples, e repetição do ciclo por múltiplas rodadas. Ao final, as sequências mais enriquecidas são identificadas por sequenciamento de nova geração (NGS).

Fonte: KOLM, 2020.

Uma abordagem alternativa ao método SELEX convencional, tem sido utilizada para otimizar a seleção de aptâmeros com alta afinidade e especificidade. O ultrassom é inserido estrategicamente no protocolo com o objetivo de remover aptâmeros ligados por interações fracas ou inespecíficas, elevando a precisão do processo seletivo (LAI; HONG, 2014). As ondas ultrassônicas atuam como uma etapa adicional de lavagem rigorosa, favorecendo a dissociação das moléculas não específicas e assegurando a retenção apenas das sequências com maior afinidade. Além disso, a combinação dessas tecnologias reduz significativamente o número de ciclos de seleção necessários, acelerando o processo e aprimorando a qualidade dos aptâmeros gerados (LAI; HONG, 2014).

Essa metodologia destaca-se por sua robustez, especificidade e reprodutibilidade, representando um avanço significativo no campo da seleção de aptâmeros. Os resultados obtidos evidenciam o grande potencial dessa tecnologia no desenvolvimento de biossensores e estratégias terapêuticas frente ao desafio crescente da resistência bacteriana a antibióticos (KOLM, 2020).

A combinação da metodologia *Cell*-SELEX com aplicações de PCR, ultrassom, NGS e bioinformática possibilita a otimização do SELEX, a seleção e identificação eficaz de aptâmeros de DNA específicos contra células bacterianas resistentes (KOLM 2020). Esses aptâmeros têm potencial para serem empregados no desenvolvimento de biossensores para um teste de diagnóstico rápido, específico e eficaz de infecções bacterianas (RESENDE, 2016; KOLM 2020). Essa abordagem pode gerar impactos positivos na melhoria do diagnóstico precoce e do tratamento direcionado dessas doenças, mitigando os danos causados à sociedade pela crescente resistência bacteriana aos antibióticos (KOLM, 2020). A técnica de aptâmeros selecionados por *Cell*-SELEX apresenta como vantagem não apenas a especificidade na detecção da infecção como também a rapidez para o diagnóstico, facilitando o tratamento eficaz e direcionado (KOLM, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Selecionar aptâmeros com elevado potencial biotecnológico, devido à sua alta especificidade e afinidade por bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos.

2.2 Objetivo específico

Selecionar aptâmeros com elevada afinidade e especificidade contra *Acinetobacter baumannii* 19606 ATCC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase NTUH-K2044, *Escherichia coli* MCR e *Pseudomonas aeruginosa* O1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas e isolados utilizados:

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foi utilizada a cepa *Acinetobacter baumannii* 19606, que apresenta quatro produtos proteicos associados a genes de resistência. O primeiro produto proteico é a β -lactamase classe C de espectro estendido ADC-158, uma enzima com base de serina capaz de hidrolisar penicilinas, inibidores de β -lactamases tradicionais e cefalosporinas até a terceira geração. O segundo e terceiro produtos proteicos pertencem à família das β -lactamases do tipo OXA-51 e OXA-98, que são enzimas de classe D, capazes de inativar todos os β -lactâmicos. Por fim, o quarto produto proteico é a di-hidropteroato sintase resistente à sulfonamida (KYRIAKIDIS, 2021).

A cepa de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* NTUH-K2044 é amplamente reconhecida como uma linhagem hipervirulenta, frequentemente associada a infecções invasivas, como abscessos hepáticos, bacteremia e meningites, principalmente em pacientes imunocompetentes (WU, 2009). O genoma completo da NTUH-K2044 foi sequenciado por Wu (2009), permitindo a caracterização detalhada de seus determinantes genéticos e sua utilidade como cepa de referência em estudos de virulência.

A cepa PaO1, que é uma das linhagens de referência mais amplamente utilizadas em estudos, sendo considerada um modelo padrão para pesquisas relacionadas à fisiologia, virulência e resistência antimicrobiana. Seu genoma foi o primeiro da espécie a ser completamente sequenciado nos anos 2000, servindo como base para inúmeras análises comparativas e funcionais (LANGENDONK; NEILL; FOTHERGILL, 2021).

Além disso foram utilizados isolados clínicos de E. Coli MCR e MRSA do hospital universitário da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 Preparo dos reagentes:

Foi preparado o tampão de lavagem para a remoção dos aptâmeros de baixa afinidade, utilizando Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 1x contendo 0,02% de Tween-20, seguida de esterilização. Para facilitar a interação molecular entre os oligonucleotídeos e as cepas selecionadas, utilizou-se um tampão de ligação composto por PBS 1x e 0,05% de Tween-20. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, retirou-se uma alíquota de 5 mL, à qual foram adicionados 0,1% de DNA de esperma de salmão e 0,05g de Albumina de Soro Bovino (BSA).

A biblioteca de ssDNA de aptâmeros, na concentração de 100pmol, foi incubada em termociclador a 95°C por 5 minutos, seguida de resfriamento até atingir a temperatura ambiente.

As bibliotecas utilizadas foram denominadas 341_20N-F e 341_40N-F, compostas, respectivamente, pelas seguintes sequências:

341_20N-F: CCTACGGGRSGCAGCAG**N₍₂₀₎ATTAGATACCCTGGTAGTCC

341_40N-F: CCTACGGGRSGCAGCAGN₍₄₀₎**ATTAGATACCCTGGTAGTCC

em que N representa nucleotídeos aleatórios incorporados entre regiões fixas flangeadoras.

Os cultivos bacterianos foram realizados em meio BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por aproximadamente 15 horas, sob agitação constante de 500 RPM em shaker orbital. Após a incubação, a densidade óptica da cultura foi ajustada para DO₆₀₀ = 0,6 nm no espectrofotômetro.

Para a separação celular, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugado a 14.000 RPM, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* bacteriano recuperado e lavado duas vezes com 500µL de tampão de lavagem, sob as mesmas condições de centrifugação. Em seguida, o *pellet* resultante da última lavagem foi ressuspenso em tampão de ligação e incubado com a biblioteca de aptâmeros.

Na metodologia com alvos moleculares externos as células bacterianas, cada um dos quatro microtubos foi incubado com 10µL da biblioteca e 490µL do tampão de ligação, mantidos em posição horizontal dentro do shaker orbital para aumentar a superfície de contato, sob agitação de 300 RPM por 20 minutos em cada ciclo de subtração. A metodologia endógena seguiu os mesmos parâmetros, com a diferença de, conter 20µL da biblioteca e 480 µL do tampão de ligação em cada microtubo e a temperatura de incubação foi de 37°C em estufa.

3.3 Subtração dos aptâmeros:

Para realizar a retirada de aptâmeros de baixa afinidade, foi utilizado o isolado de MRSA, com o objetivo de eliminar na primeira etapa os aptâmeros com afinidade a bactérias Gram-positivas. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de ligação e com a biblioteca previamente preparada. Os microtubos foram incubados sob agitação constante de 350 RPM por 20 minutos para permitir a interação dos aptâmeros com afinidade para bactérias Gram-positivas.

Em seguida, os microtubos da primeira etapa foram centrifugados a 6.000 RPM por 10 minutos a 25°C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante recuperado. Dessa forma, os aptâmeros com afinidade pela MRSA, utilizada na primeira etapa de subtração, foram eliminados ao longo do processo, restando apenas aqueles de baixa afinidade para Gram-positivas.

Esse procedimento foi repetido nas etapas de subtração com as demais cepas Gram-negativas, garantindo a seleção progressiva daqueles com maior afinidade com as bactérias de interesse final, como mostra a figura 2.

Figura 2 - Etapas de subtração e seleção de aptâmeros.



Legenda: Cada etapa de subtração teve duração de 20 minutos de incubação. A primeira foi realizada com a cepa Gram-positiva, seguida por etapas sucessivas com cepas Gram-negativas. Em cada uma delas, o sobrenadante do tubo anterior — contendo os aptâmeros com baixa afinidade para a cepa incubada — era recuperado e utilizado na etapa seguinte. A etapa de seleção também contou com 20 minutos de incubação, utilizando o sobrenadante resultante de todas as subtrações. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, contendo os aptâmeros com maior afinidade, foi recuperado.

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

3.4 Seleção de aptâmeros:

Na etapa de seleção os microtubos seguiram o mesmo processo de incubação. No entanto, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, uma vez que nele estavam contidos os aptâmeros de baixa afinidade e os de interesse, possivelmente, estavam ligados à superfície celular (no caso do SELEX exógeno) ou internalizados nas células (no caso do SELEX endógeno).

Dessa forma, o *pellet* foi recuperado e ressuspenso em 100µL de água livre de DNA. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 minutos no ultrassom. Imediatamente após esse período, os microtubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 1 minuto a 4°C para remover os aptâmeros de baixa afinidade. O sobrenadante foi descartado por conter os oligonucleotídeos de baixa afinidade e o *pellet* foi ressuspenso em 100µL de água ultrapura e armazenado no freezer para posterior utilização.

3.5 Lise celular e quantificação das amostras:

Os microtubos resultantes da etapa anterior foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e, em seguida, resfriados imediatamente a 4°C em gelo triturado por 5 minutos para lisar as células bacterianas. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas em 14.000 RPM a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado enquanto o *pellet* foi descartado.

Para remover compostos indesejados, as amostras foram submetidas à precipitação com 250µL de etanol 100% gelado e incubadas a 4°C *overnight*. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas 15.000 RPM a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem completa, 30µL de água ultrapura foram adicionados a cada microtubo.

Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1%, contendo o corante de DNA GelRed, e submetidas à eletroforese por 45 minutos para visualização do material genético no transiluminador de luz ultravioleta e análise aproximada do padrão de peso molecular, com base na localização das bandas no gel em relação ao marcador, conforme os tamanhos esperados para os aptâmeros selecionados na metodologia SELEX.

Utilizou-se 10µL da amostra e 10µL de tampão de carregamento 6xload. Como referência, foi utilizado o padrão de peso molecular de 100pb com a concentração de 100 ng/µL. Após 45 minutos de eletroforese, as bandas de interesse foram formadas, visualizadas, recortadas e submetidas à extração do material genético utilizando um kit de extração. Ademais, a quantidade de DNA recuperado foi quantificada por espectrofotometria em NanoDrop™.

3.6 Amplificação dos ligantes:

Para amplificar os aptâmeros, foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A reação foi realizada com:

- 10µL de mix com *GoTaq* Polimerase;
- 7µL de água ausente de nuclease;
- 2µL de uma alíquota com os primers Forward e Reverse (100 pmol/µL);
- 1µL da amostra para aquelas que apresentaram concentração $\geq 20\text{ng}/\mu\text{L}$ no método espectrofotométrico, e
- 2µL para as amostras com concentração $< 20\text{ ng}/\mu\text{L}$

Os primers 341F e 806R foram utilizados, porque se ligam às extremidades dos aptâmeros, que possuem uma sequência genética idêntica a uma região do DNA ribossomal 16S amplamente conhecida. Essa estratégia, aplicada na síntese da biblioteca, auxilia na identificação e no sequenciamento dos aptâmeros.

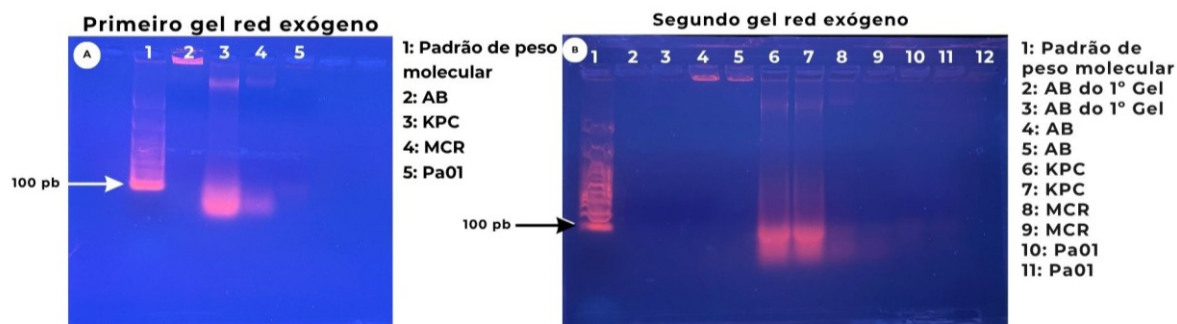
Após a reação da PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com reagente GelRed, seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente. Esse procedimento permitiu avaliar a eficácia da amplificação e separar as amostras de possíveis contaminantes, como resíduos de primers e DNA bacteriano residual. As amostras extraídas do gel foram analisadas novamente no espectrômetro NanoDrop™ para quantificação.

Por fim, as amostras foram secas no SpeedVac, preparadas e encaminhadas para sequenciamento de nova geração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia SELEX foi realizada duas vezes com foco em aptâmeros com afinidade contra alvos moleculares externos as células bacterianas como mostra a figura 3, e uma vez com foco interno representado pela figura 4.

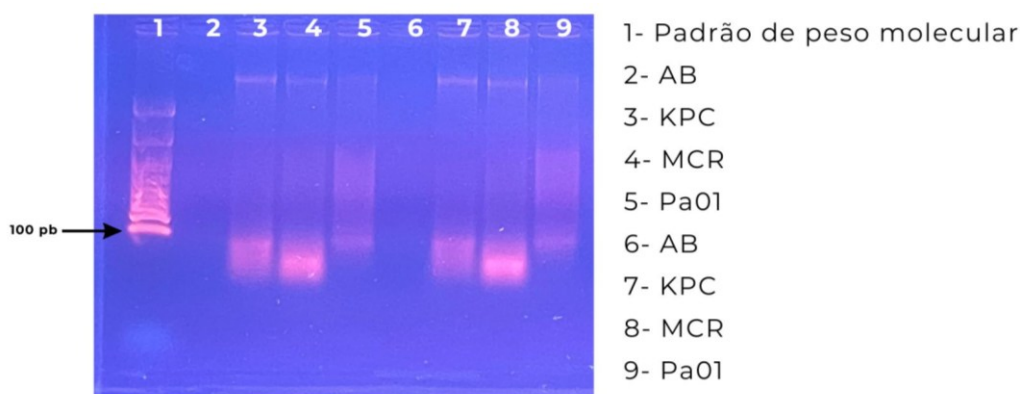
Figura 3 – Géis de eletroforese com a metodologia de aptâmeros exógenos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Vale ressaltar que na técnica de SELEX endógeno as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose corado com corante de DNA GelRed em duplicata.

Figura 4 – Gel de eletroforese com amostras do SELEX endógeno.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

A amostra de *Acinetobacter baumannii* (AB) analisada no primeiro gel apresentou luminescência no segundo poço, porém sem formação clara de bandas, o que sugeriu possível interferência de proteínas ou fragmentos de DNA bacteriano na migração dos oligonucleotídeos e para investigar essa hipótese, a amostra passou por uma nova etapa de purificação. No segundo gel, os poços 2 e 3 contêm essa amostra purificada, entretanto, não houve formação de bandas, indicando ausência de aptâmeros (JIN, 2015). Ao analisar os poços 4-5 do gel B e o gel com as amostras da metodologia endógena nota-se que o mesmo padrão se repetiu. Esses resultados são compatíveis com a hipótese de que DNA bacteriano residual pode ser confundido com aptâmeros em análises espectrofotométricas ou por fluorescência não específica, evidenciando a importância da confirmação por eletroforese e espectrofotometria seguida de sequenciamento para validar a presença de aptâmeros

funcionais (KOHLBERGER, 2021). A ausência de bandas na amostra de AB pode indicar uma falha no reconhecimento de epítomos específicos pela biblioteca de aptâmeros, o que sugere a necessidade de um maior número de ciclos de SELEX ou de uma modificação na biblioteca inicial (ZHAO, 2020).

Os resultados *Klebsiella pneumoniae* nos poços 3 (Gel A) e 6-7 (Gel B) apresentaram bandas intensas, mas com padrão de arraste. Esse arraste pode ser atribuído tanto à presença de RNA residual quanto à estrutura secundária complexa dos próprios aptâmeros. Esses dados indicam uma boa seleção estrutural dos aptâmeros, embora também apontem para a necessidade de etapas de purificação mais rigorosas, como o uso de DNase-free e RNase para evitar contaminação cruzada (KOHLBERGER, 2021; ZHU, 2023). Ao comparar as metodologias nota-se que as amostras de KPC dos géis A e B apresentaram a luminescência mais intensa entre as demais amostras. Por outro lado, o gel com as amostras do SELEX endógeno resultou em bandas mais fracas e com leve arraste, o que pode indicar degradação dos aptâmeros por nucleases das células bacterianas. Esse fenômeno é compatível com o ambiente intracelular hostil, onde nucleases podem rapidamente degradar aptâmeros não modificados. Aptâmeros endógenos geralmente demandam estabilização química, como modificações 2'-fluoro ou 2'-O-metil, para resistirem à degradação (SONG, 2020).

Os resultados de MCR representadas nos poços 4 (Gel A) e 8-9 (Gel B), apresentaram bandas mais fracas no SELEX com alvos moleculares externos as células bacterianas do que no interno, como mostra a figura 9. O que pode inicialmente sugerir baixa eficiência na metodologia, no entanto, estudos mostram que ciclos de seleção mais rigorosos podem reduzir a quantidade de aptâmeros, mas resultar em maior especificidade e afinidade com o alvo. A redução do pool de aptâmeros é esperada quando há forte pressão de seleção, o que pode explicar a baixa intensidade observada (KOHLBERGER, 2021).

A cepa de PAO1 também apresentaram resultados divergentes como está representado pelos poços 5 (Gel A), 10-11 (Gel B) e pelo poço 9 referente a figura 9. Nos géis A e B, as bandas foram fracas e ligeiramente deslocadas, padrão compatível com aptâmeros de menor tamanho, como os de 20N utilizados na biblioteca inicial (KOHLBERGER, 2021). Enquanto as amostras de PAO1 apresentaram bandas mais fortes no SELEX endógeno e também com leve deslocamento para cima. A consistência no padrão de deslocamento pode sugerir uma característica intrínseca da interação dos aptâmeros com componentes específicos da PAO1, o que merece posterior investigação estrutural (ZHAO, 2020). Em seguida, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando um NanoDrop™ como mostra o gráfico 1:

Gráfico 1 – Gráfico sobre a quantificação das amostras antes da PCR.



Legenda: Quantificação dos aptâmeros obtidos após os ciclos de seleção por SELEX. Os valores de concentração (ng/μL) foram determinados por espectrofotometria. As colunas em azul escuro representam os resultados do 1º SELEX exógeno, as em azul claro referem-se ao 2º SELEX exógeno, e as colunas amarelas correspondem ao SELEX endógeno. As amostras estão identificadas de acordo com as cepas bacterianas utilizadas: *Acinetobacter baumannii* (AB), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC (KPC), *Escherichia coli* portadora do gene mcr-1 (MCR) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1).

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Devido à ausência de formação de bandas no gel de eletroforese, as amostras de AB foram quantificadas diretamente do produto da metodologia SELEX, enquanto as demais foram extraídas do gel. Ao analisar o gráfico 1, observa-se que a concentração de componentes na amostra de AB do primeiro SELEX (105ng/μL) é quase o dobro da segunda maior concentração observada (KPC 61ng/μL). No entanto, como não houve visualização em gel para essa amostra, apenas a espectrofotometria não diferencia os componentes presentes, esse resultado pode incluir DNA plasmidial, DNA cromossômico bacteriano, os próprios aptâmeros e demais componentes da amostra (KOHLBERGER, 2021; JIN, 2015).

Ademais, o segundo SELEX com alvos moleculares externos as células bacterianas não apresentaram resultados esperados na espectrofotometria para amostra de AB, o que pode indicar baixa concentração de componentes. Por outro lado, a metodologia com alvos moleculares internos apresentou concentração igual a 12 ng/μL para a mesma cepa. O contraste entre as metodologias exógena e endógena é esperado, devido à presença de nucleases nas células bacterianas, que podem degradar os aptâmeros durante o processo (ZHAO, 2020).

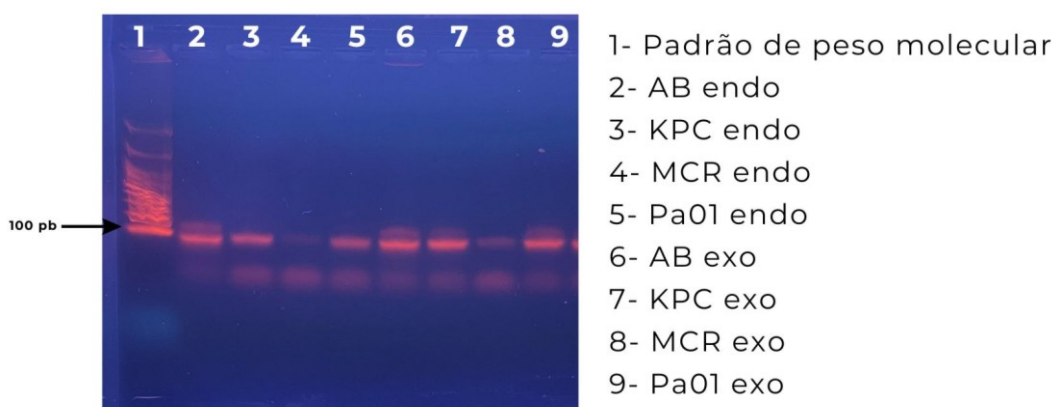
A amostra de KPC do primeiro SELEX exógeno apresentou a concentração de 61 ng/ μ L, mas no segundo SELEX essa concentração caiu drasticamente para 12 ng/ μ L e na metodologia endógena não apresentou uma concentração elevada. O resultado espectrofotométrico contrasta com a análise em gel de agarose, porque as amostras de KPC apresentaram formação de bandas fortes.

Em relação ao isolado de E. Coli, não apresentou a quantidade esperada de DNA porque a amostra testada para o segundo SELEX exógeno apresentou concentração igual a 10ng/ μ L enquanto os resultados representados nas etapas de eletroforese apresentaram formação de bandas em todas as aplicações das metodologias e na endógena a banda formada pela MCR foi a mais robusta e intensa quando comparada com as demais do mesmo método.

PAO1 obteve a formação de bandas mais fracas em ambas as metodologias, mas foi a única a apresentar resultados quantitativos significativos nas análises espectrofotométricas, sendo 19ng/ μ L e 10ng/ μ L respectivamente no SELEX exógeno, e 114ng/ μ L no SELEX endógeno.

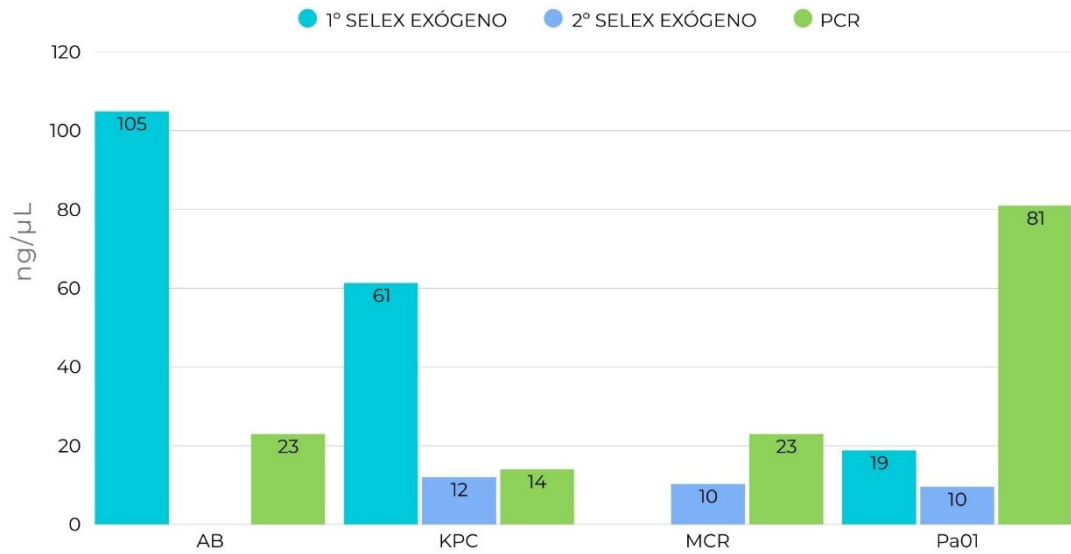
Para aumentar a quantidade de aptâmeros disponíveis, as amostras foram submetidas à PCR. Após a amplificação, os produtos de amostras iguais dos SELEX exógenos foram misturados e novamente analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com reagente GelRed, como mostra a figura 5, e quantificados em NanoDrop™ cujo resultados estão representados nos gráficos 2 e 3.

Figura 5 – Gel de eletroforese após a reação de PCR.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

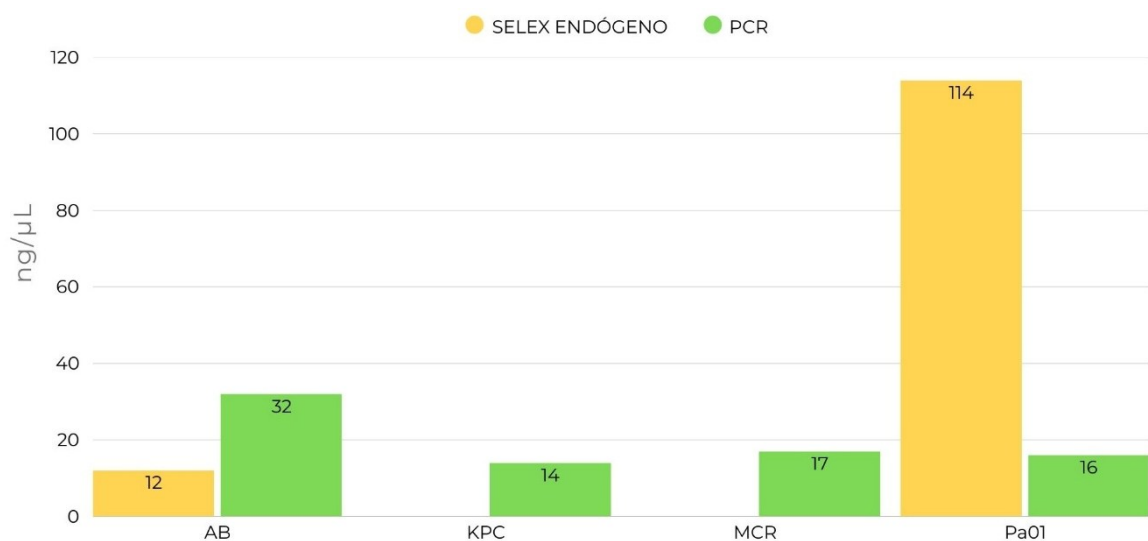
Gráfico 2 – Comparação das análises quantitativas de amostras exógenas.



Legenda: Quantificação das amostras obtidas pela metodologia do SELEX exógeno após a reação da PCR. Os valores de concentração (ng/μL) foram determinados por espectrofotometria no NanoDrop™. As colunas em azul escuro representam os resultados do 1º SELEX exógeno, as em azul claro referem-se ao 2º SELEX exógeno, e as colunas em verde a união das amostras iguais após a reação da PCR. As amostras estão identificadas de acordo com as cepas bacterianas utilizadas: *Acinetobacter baumannii* (AB), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *Escherichia coli* portadora do gene mcr-1 (MCR) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1).

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Gráfico 3 - Comparação das análises quantitativas de amostras endógenas.



Legenda: Quantificação das amostras obtidas pela metodologia do SELEX exógeno após a reação da PCR. Os valores de concentração (ng/μL) foram determinados por espectrofotometria de NanoDrop™. As colunas

em amarelo representam os resultados do SELEX endógeno e as colunas em verde as amostras após a reação da PCR. As amostras estão identificadas de acordo com as cepas bacterianas utilizadas: *Acinetobacter baumannii* (AB), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *Escherichia coli* portadora do gene *mcr-1* (MCR) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1).

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Diante das análises quantitativas e qualitativas das amostras após a reação de amplificação do DNA por PCR é possível notar que, todas as amostras apresentaram formação de bandas no gel de eletroforese e todas apresentaram valores satisfatórios nos resultados obtidos no NanoDrop™.

As amostras de AB apresentaram formação de bandas pela primeira vez, o que indica a presença de aptâmeros nos produtos dos SELEX realizados. Por isso, estima-se que antes da PCR a quantidade de material genético era muito baixa e não foi aparente nas análises de gel feitas anteriormente. Amostra submetida a metodologia de SELEX exógeno apresentou concentração de 23ng/μL, aproximadamente um quarto da quantidade estimada antes da reação de amplificação. Essa diferença pode ter ocorrido por causa da presença de outros compostos presentes na amostra, visto que as amostras de AB nas primeiras etapas foram quantificadas diretamente do produto do SELEX. Após a amplificação as bandas de AB mantiveram o padrão entre os SELEX exógeno e endógeno.

A amostra de KPC exógena formou uma banda levemente mais intensa que a endógena. Na análise dos gráficos 2 e 3 os valores foram iguais, resultando em 14ng/μL. Como é possível notar nos gráficos, a KPC apresentou o menor valor quantitativo após a Reação em Cadeia da Polimerase, em direção oposta ao resultado obtido anteriormente (1º SELEX: 61ng/μL). O que pode indicar uma degradação do material genético após a extração do gel de eletroforese.

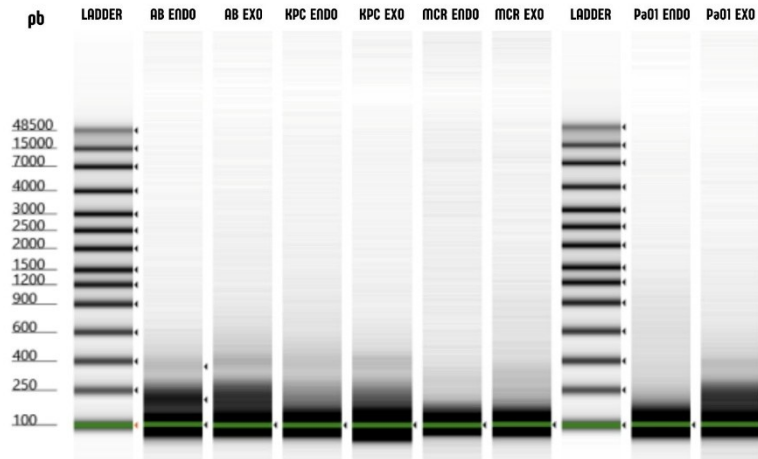
Em seguida, a MCR exógena apresentou uma banda mais forte que a endógena, o que contradiz os resultados dos géis anteriores que indicava o contrário. Contudo, nas análises espectrofotométricas após a PCR, a MCR apresentou valores significativos, sendo o segundo maior valor na metodologia endógena (17ng/μL) e exógena junto com a AB (23ng/μL).

A amostra de PAO1 exógena apresentou formação de banda com maior fluorescência do que a banda que representa amostra de PAO1 endógena. Todos os géis feitos com amostras de PAO1 antes da PCR não apresentaram formação de bandas ou apresentaram formação muito fraca. A análise quantitativa da amostra endógena antes (114ng/μL) e após a PCR (16ng/μL) é a mais discrepante de todas, o que resulta na diferença de 98ng/μL.

Após as análises quantitativas e qualitativas, os produtos da metodologia SELEX

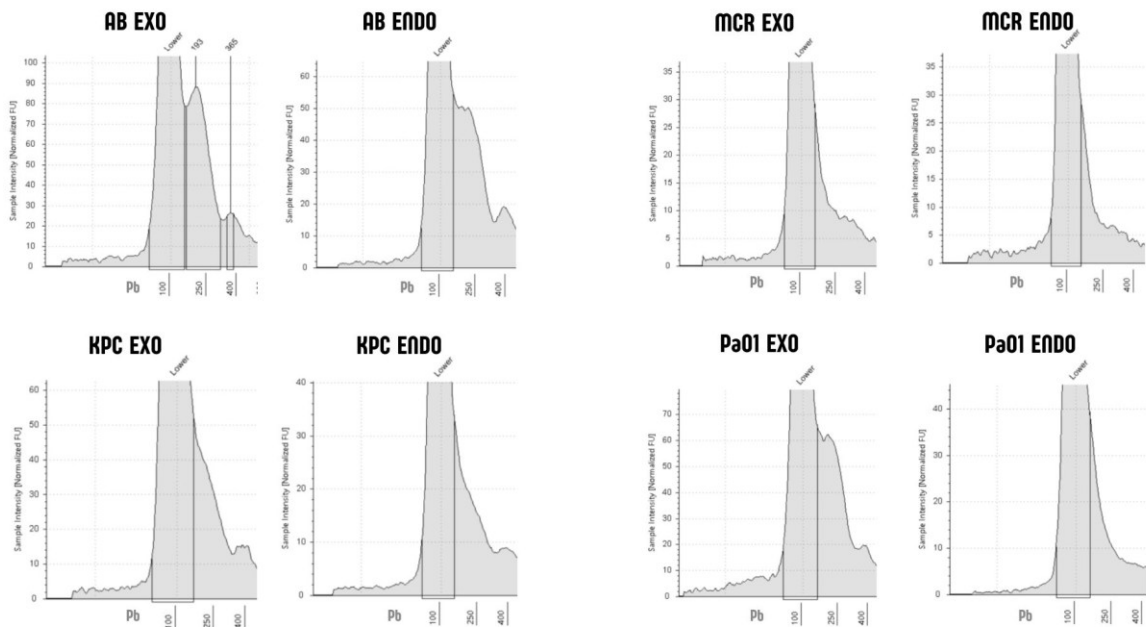
foram preparados e enviados para o NGS. Os resultados do controle de qualidade estão representados pela figura 6 e 7.

Figura 6 – Quantificação fluorimétrica Qubit.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025

Figura 7 – Resultados quantitativos do controle de qualidade das amostras



Legenda: Os gráficos relacionam a intensidade de luz emitida com a quantidade de pares de base.

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Segundo os dados apresentados pela quantificação fluorométrica Qubit, todos os produtos obtidos possuem intensidade elevada em 100 pares de base (pb), que é a região com

a maior intensidade esperada devido ao tamanho da biblioteca utilizada que possui região variável de 20N e 40N e 20pb em cada extremidade da biblioteca. O segundo pico presente nos gráficos ocorre por causa dos primers utilizados que contém a sequência correspondente a uma região genética que codifica o ribossomo 16S das bactérias.

Diante de todos os resultados obtidos, reafirma-se o potencial dos aptâmeros como ferramentas inovadoras para o diagnóstico e controle de infecções bacterianas resistentes. Sua elevada especificidade, estabilidade estrutural, baixo custo de produção e capacidade de modificação química os tornam uma alternativa viável e promissora aos anticorpos convencionais (RESENDE, 2016). Diferentemente dos anticorpos, os aptâmeros não requerem o uso de animais para sua produção, apresentam menor imunogenicidade e maior facilidade de armazenamento, o que os torna ideais para aplicação em ambientes clínicos e laboratoriais com infraestrutura limitada (KEEFE; PAI; ELLINGTON, 2010).

Esses ligantes podem ser aplicados em biossensores, sistemas de liberação controlada, plataformas de imagem e, potencialmente, em terapias antimicrobianas direcionadas. Estudos demonstram que a técnica SELEX é eficaz na geração de aptâmeros com aplicabilidade em reconhecimento celular, o que amplia sua relevância para contextos clínicos complexos, como infecções bacterianas (ZHAO, 2020). Nesse cenário, os aptâmeros obtidos neste estudo podem servir como base para futuras estratégias de diagnóstico rápido e terapias alternativas voltadas ao enfrentamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes.

5 CONCLUSÃO

A pesquisa desenvolvida teve como objetivo a seleção de aptâmeros elevada afinidade e especificidade por cepas bacterianas resistentes à antibióticos por meio de diferentes metodologias SELEX. As etapas de subtração e seleção de aptâmeros somadas a purificação, eletroforese em gel de agarose e análise por espectrofotometria permitiram avaliar qualitativa e quantitativamente a presença e a concentração de aptâmeros nas amostras obtidas. Os resultados apresentaram variações significativas nos valores antes e após a PCR. Contudo, a estabilidade dos valores após a reação indica o sucesso da amplificação apenas das regiões alvo.

A cepa *Acinetobacter baumannii* (AB) demonstrou maior complexidade, com ausência de bandas nos géis iniciais e quantificações elevadas, possivelmente em decorrência da presença de DNA bacteriano ou outros compostos interferentes. Entretanto, após a amplificação por PCR e o resultado apresentado pelo controle de qualidade, observou-se uma

elevada intensidade no comprimento de 100pb, indicando que aptâmeros estavam presentes e em elevada concentração.

A amplificação do material genético por PCR foi fundamental para a confirmação da presença de aptâmeros nas amostras, reforçando a necessidade da utilização de métodos complementares para validação dos resultados. As divergências observadas entre as análises qualitativas e quantitativas destacam a importância da avaliação criteriosa dos dados gerados ao longo do processo de seleção.

Conclui-se que a metodologia SELEX, mesmo diante de variações e desafios experimentais, demonstrou ser uma ferramenta viável para a seleção de oligonucleotídeos específicos contra bactérias resistentes à antibióticos. Os resultados obtidos contribuem para o avanço de pesquisas inovadoras voltadas à detecção das cepas testadas que foram estrategicamente escolhidas devido aos seus elevados danos à saúde pública global.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Relatório de metas e atividades*. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/pnpciras-e-pan-servicos-de-saude/BALANODEMETASEATIVIDADESPANGGTESFINAL15122023.pdf> . Acesso em: 25 abr. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Plano Nacional para prevenção e controle de Resistência aos antimicrobianos em serviço de saúde*. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-publica-plano-nacional-para-prevencao-e-controle-da-resistencia-microbiana>>. Acesso em: 25 abr. 2024.

ANS alerta sobre o controle das infecções hospitalares. Disponível em: <https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/noticias/qualidade-da-saude/ans-alerta-sobre-o-controle-das-infeccoes-hospitalares> . Acesso em: 25 abr. 2024.

ATCC® 19606™ | *Acinetobacter baumannii* | ATCC Genome Portal. Disponível em: <https://genomes.atcc.org/genomes/1577c3a70f334038?tab=annotations-tab> . Acesso em: 6 mar. 2025.

DING, L. et al. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase variants: the new threat to global public health*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 36, n. 4, 8 nov. 2023. <https://doi.org/10.1128/cmr.00008-23>

DINKEL, A. *Resistência à colistina mediada pelo gene mcr-1: o esgotamento dos recursos antimicrobianos*. Unisagrado.edu.br, 2020. <https://repositorio.unisagrado.edu.br/jspui/handle/handle/2518>

- FIOCRUZ. *Sepse: a maior causa de morte nas UTIs*. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/sepse-maior-causa-de-morte-nas-utis> . Acesso em: 21 abr. 2024.
- GRACE, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 1023523, 13 out. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023523>
- JIN, C. et al. *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Molecular Imaging*. *Journal of Molecular Evolution*, v. 81, n. 5-6, p. 162–171, 19 nov. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9716-6>
- KEEFE, A.; PAI, S.; ELLINGTON, A. Aptamers as Therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 7, p. 537–550, jul. 2010. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>
- KOHLBERGER, M.; GADERMAIER, G. SELEX: *Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 3 set. 2021. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>
- KOLM, C. et al. *DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing*. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77221-9>
- KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii Antibiotic Resistance Mechanisms*. *Pathogens*, v. 10, n. 3, p. 373, 19 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- LAI, J.-C.; HONG, C.-Y. Magnetic-Assisted Rapid Aptamer Selection (MARAS) for Generating High-Affinity DNA Aptamer Using Rotating Magnetic Fields. *ACS Combinatorial Science*, v. 16, n. 7, p. 321–327, 21 maio 2014. <https://doi.org/10.1021/co5000272>
- LANGENDONK, R. F.; NEILL, D. R.; FOTHERGILL, J. L. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 16 abr. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.665759>
- MANCINI, F.; GATTI, M.; D'ANDREA, M. M.; AMODIO, E.; VITALE, F.; GIAMMANCO, A. Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*, v. 11, n. 6, p. 1–23, 2022. DOI: [10.3390/antibiotics11060795](https://doi.org/10.3390/antibiotics11060795).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *ANS alerta sobre o controle das infecções hospitalares*. Disponível em: <https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/noticias/qualidade-da-saude/ans-alerta-sobre-o-controle-das-infeccoes-hospitalares> . Acesso em: 21 abr. 2024.
- RESENDE, R. *Biotecnologia aplicada à saúde*. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2016. eBooks Assinatura. (E-book), il. ISBN 9788521209683. Disponível em: <https://mb.ufu.br/9788521209683> . Acesso em: 28 abr. 2025.
- SANTOS, C. *Caracterização fenotípica e molecular de isolados de Salmonella spp. e Escherichia coli Patogênica Extraintestinal resistentes às polimixinas*. [s.l: s.n.]. Disponível

em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/05/1428773/dissertacaocarlavversaofinal2404-carla-adriana-santosfeito.pdf> .

SAÚDE, M. *ANS alerta sobre o controle das infecções hospitalares*. Disponível em: <https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/noticias/qualidade-da-saude/ans-alerta-sobre-o-controle-das-infeccoes-hospitalares> . Acesso em: 7 mar. 2024.

SONG, M. et al. *SELEX optimization of a G-quadruplex DNA aptamer binding to marine toxin gonyautoxin 1/4*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 18, p. 3425–3433, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31062016/>. Acesso em: 18 abr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.041>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702> . Acesso em: 9 dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “*WHO Updates List of Drug-Resistant Bacteria Most Threatening to Human Health*.”. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health> . Acesso em: 9 dez. 2023.

WU, K.-M. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 14, p. 4492–4501, 2009. DOI: 10.1128/JB.00315-09. <https://doi.org/10.1128/JB.00315-09>

ZHAO, J. et al. *Production of aptamers by Cell-SELEX and their applications in cancer biomarker identification*. *Discovery Medicine*, v. 29, n. 157, p. 33–40, 2020. Disponível em: <https://www.discoverymedicine.com/Jiayao-Zhao/2020/06/aptamers-by-cell-selex-and-applications-in-cancer-biomarker-identification/> . Acesso em: 18 abr. 2025.

ZHU, C. et al. *Recent progress of SELEX methods for screening nucleic acid aptamers*. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 157, p. 116–130, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124998>