

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Imunologia/Genética e Biotecnologia

Michele Cristine Ribeiro de Freitas

Parâmetros fisiológicos e moleculares da resposta de *Bacteroides fragilis* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos e avaliação de aspectos da interação bactéria-hospedeiro após infecção experimental.

Juiz de Fora
2010

2010	PGCBIO	Michele Cristine Ribeiro de Freitas	ICB/UFJF
-------------	---------------	--	-----------------

Michele Cristine Ribeiro de Freitas

Parâmetros fisiológicos e moleculares da resposta de *Bacteroides fragilis* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos e avaliação de aspectos da interação bactéria-hospedeiro após infecção experimental.

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Co-orientadores:

Profa. Dra. Vânia Lúcia Silva

Profa. Dra. Cíntia Marques Coelho

Juiz de Fora
2010

DESENVOLVIMENTO

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

COLABORAÇÃO

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Jacy Gameiro
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Denise Carmona Cara
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

APOIO

FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Freitas, Michele Cristine Ribeiro de.

Parâmetros fisiológicos e moleculares da resposta de *Bacteroides fragilis* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos e avaliação de aspectos da interação bactéria-hospedeiro após infecção experimental/ Michele Cristine Ribeiro de Freitas. – 2010.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Bacteriologia. 2. *Bacteroides fragilis*. I. Título.

CDU 576.8

Michele Cristine Ribeiro de Freitas

Parâmetros fisiológicos e moleculares da resposta de *Bacteroides fragilis* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos e avaliação de aspectos da interação bactéria-hospedeiro após infecção experimental.

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração Imunologia.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Jacy Gameiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

Juiz de Fora, MG
2010

Dedico este trabalho ao meu esposo Leandro e aos meus anjinhos, Geovanna e Isabella. Peço desculpas pelas vezes que me ausentei para que esta missão fosse cumprida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo amparo nas horas difíceis e por me mostrar o caminho nas horas incertas.

Agradeço ao meu orientador Cláudio e coorientadoras Vânia e Cíntia pelo empenho, compreensão, dedicação, paciência, amizade e carinho. Agradeço por me mostrar o caminho da ciência e principalmente por serem exemplos profissionais.

Agradeço a minha família pela compreensão e carinho, e principalmente pelo incentivo dado.

Agradeço aos amigos sempre presentes pelo apoio, incentivo e conselhos.

Agradeço aos amigos e companheiros de laboratório Mariana, Felipe, Danielle, Thiago, Juliana, Natália, Job, Rafaela, Letícia pela constante ajuda no preparo de géis, meios de cultura, anaerobiose e claro pela amizade e convívio, enfim por tudo!

Agradeço aos técnicos de Laboratório Leandro, Angélica e Thiaguinho pelo apoio. Às professoras Cláudia, Carol e Gisele pelo apoio constante.

Agradeço a todos do Laboratório de Imunologia Professora Ana Paula, Professor Henrique, Professora Jacy, Sandra, Caio, Alessa, Alice e Michele pela ajuda nos experimentos, pelos equipamentos, afinal por tudo!

A todos da Universidade Federal de Minas Gerais por me receberem tão bem e pela oportunidade de aprendizado e presteza, à Profa. Dra. Denise Carmona Cara pela colaboração na histopatologia.

Agradeço a EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agropecuária Gado de Leite pelo apoio técnico.

A todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

RESUMO

A espécie *Bacteroides fragilis* é um anaeróbio Gram negativo membro da microbiota indígena do trato gastrointestinal, e é comumente isolado de infecções clínicas. À medida que as drogas antimicrobianas são introduzidas no ambiente, os microrganismos respondem, tornando-se resistentes, podendo gerar alterações na fisiologia celular, e que podem interferir na relação bactéria-hospedeiro. Nosso objetivo foi investigar alterações em *B. fragilis* após exposição a concentrações subinibitórias de ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam (AMS), clindamicina (CLI) e cloranfenicol (CLO); e investigar aspectos da relação droga-bactéria-hospedeiro, após desafio experimental em camundongos. Foram obtidas 4 linhagens bacterianas: BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. Alterações na morfologia, padrões de crescimento, habilidades bioquímicas e fisiológicas, perfis de expressão protéica e semelhança genética foram avaliadas comparativamente entre as linhagens obtidas e a linhagem Bf parental ATCC 25285. Infecção experimental foi realizada em camundongos convencionais, desafiados intraperitonealmente. Histologia de baço e fígado, além de dosagem das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- γ no intestino, foram realizadas. Ampicilina e ampicilina/sulbactam induziram alterações morfológicas significativas nas células bacterianas na primeira exposição. Foi verificada diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos em todas as linhagens selecionadas. Além disso, a exposição aos antimicrobianos foi capaz de induzir alterações nos padrões bioquímico-fisiológicos bacterianos, se comparado com a amostra parental. Em relação à capacidade de formação de biofilme, observou-se alteração em todas as linhagens, quando comparadas à parental, sendo que as linhagens selecionadas pela exposição aos antimicrobianos tiveram capacidade de aderência diminuída. A identidade genética das linhagens bacterianas obtidas foi confirmada e não foram detectados fragmentos de DNA polimórfico. Variações nos perfis de citocinas foram verificadas nos animais desafiados com a linhagem BfAMS. Alterações histopatológicas também foram observadas no baço e fígado dos animais desafiados com as linhagens de *B. fragilis* selecionadas por exposição aos antimicrobianos. Nossos resultados permitem sugerir fenômenos relacionados à regulação da expressão gênica como uma resposta momentânea ou evolutiva dos microrganismos. Estes resultados podem ainda sugerir que essas drogas tem diferentes interações com a célula bacteriana, que podem ser prejudiciais para a interação bactéria-hospedeiro. Assim, nossos resultados chamam a atenção para o risco de terapia antimicrobiana inadequada, mesmo com baixas concentrações de fármacos, que poderiam alterar os níveis de expressão gênica de uma bactéria e modular sua patogenicidade.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, resistência antimicrobiana, alterações morfológicas, patogenicidade

ABSTRACT

Bacteroides fragilis is an anaerobic Gram negative rod member of resident gut microbiota, isolated from clinical infections due in part to its potent virulence factors. As antimicrobial drugs are introduced into the environment, microorganisms respond by becoming resistant and may cause changes in cell physiology. These changes can interfere with the bacterium-host relationship. The aim of this study was to investigate changes in *B. fragilis* after exposure to ampicillin (AMP), ampicillin/sulbactam (AMS), clindamycin (CLI) and chloramphenicol (CLO); and to investigate changes in host-bacteria relationships after experimental challenge in mice. Four bacterial strains were obtained: BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. Morphological changes, growth patterns, biochemical and physiological abilities, protein expression profile and genetic relationships were comparatively evaluated among the drug-selected strains and Bf parent ATCC 25285. Experimental infection was performed intraperitoneally in conventional mice. Liver and spleen histology, besides cytokines determinations were performed in the intestines. Ampicillin and ampicillin/sulbactam induced the highest significant morphological alterations in the bacterial cells after the initial drug exposure. Decreased sensitivity to all antimicrobials was observed for all drug-selected bacteria strains. Furthermore, drug-exposure was able to induce changes in biochemical pathways and bacterial physiology, if compared with the Bf parent strain. Regarding the ability of biofilm formation, alterations in adherence properties were observed for all drug-selected bacteria, being this characteristic down regulated. The genetic identities were confirmed for the selected strains and no DNA polymorphisms were detected. The cytokine patterns in the intestines from mice challenged with drug-selected bacteria were highly altered, mainly considering the BfAMS strain, as well as the histological aspect concerning the liver and the spleen excised from the experimentally challenged animals. Our results may suggest phenomena related to the gene expression regulation, as a microbial momentary or evolutionary response to the selective pressure of the antimicrobial drugs. These results may also suggest that these drugs have different interactions with the bacterial cell which can be harmful to the host-bacteria relationships. In this way, the data ask for attention regarding the risks of inappropriate chemotherapy, even with low concentrations of the antimicrobial drugs, which might the bacteria genetic expression levels and modulate their pathogenicity

Keywords: *Bacteroides fragilis*, antimicrobial resistance, morphological, pathogenicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de referência para interpretação dos testes de avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para *Bacteroides fragilis*, segundo o CLSI, 2007..... 37

Tabela 2 – Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos da amostra *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, segundo o CLSI (2007) e determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos 49

Tabela 3. Reavaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens de *B. fragilis* selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos, cultivadas na presença ou não das drogas 50

Anexo 1A. Avaliação das características bioquímicas e fisiológicas das linhagens de *B. fragilis* parental e selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas (BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO) cultivadas na presença e na ausência das drogas 102

Anexo 1B. Avaliação das características bioquímicas e fisiológicas (fermentação de carboidratos) das linhagens de *B. fragilis* parental e selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas (BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO) cultivadas na presença e na ausência das drogas..... 103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da área média das células de *Bacteroides fragilis* visualizadas após coloração de Gram, durante exposição a CSI ou não de diferentes antimicrobianos (10 passagens na presença das drogas e 10 passagens na ausência das drogas)..... 52

Figura 2. Aspecto das células de *Bacteroides fragilis* parental e selecionadas pela exposição a CSI de drogas antimicrobianas visualizadas após coloração pelo método de Gram. A – primeira passagem na droga; B – décima passagem na droga; C – décima passagem na ausência de drogas antimicrobianas. Aumento de 1000X..... 53

Figura 3. Representação gráfica do tipo *dot plot* da avaliação por citometria de fluxo das células de *Bacteroides fragilis* após a 1ª e a 10ª passagem das culturas na presença das CSI dos diferentes antimicrobianos. R1 - região de concentração das células de morfologia típica; R2 - região de concentração das células de morfologia alterada em relação ao controle Bf parental. FSC – eixo relacionado à alteração de morfologia; SSC – eixo relacionado à complexidade celular..... 54

Figura 4 Representação gráfica da curva de crescimento das linhagens de *Bacteroides fragilis* selecionadas pela exposição a CSI de diferentes antimicrobianos..... 55

Figura 5 Fenograma de similaridade UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) de resultante da comparação dos perfis bioquímicos e fisiológicos obtidos para as diferentes linhagens bacterianas de *B. fragilis* selecionadas pela exposição a CSI de antimicrobianos cultivadas na presença e na ausência das drogas, utilizando o coeficiente de Dice com *bootstrap* de 1000 réplicas..... 57

Figura 6 Representação gráfica da habilidade bacteriana de formação de biofilme comparativamente entre a linhagem *Bacteroides fragilis* parental e as linhagens derivadas selecionadas pela exposição à CSI de drogas antimicrobianas. * e a indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)..... 58

Figura 7. Análise do perfil de proteínas solúveis das linhagens de *Bacteroides fragilis* em SDS-PAGE, 8%. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga. As setas pretas indicam a presença de proteínas ausentes na linhagem parental 59

Figura 8. Análise do perfil de proteínas solúveis das linhagens de *Bacteroides fragilis* em SDS-PAGE, 15%. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga. As setas pretas indicam a presença de proteínas ausentes na linhagem parental e as setas brancas indicam a presença de proteínas ausentes nas linhagens selecionadas pela exposição aos antimicrobianos..... 60

Figura 9. Identificação molecular das linhagens de *Bacteroides fragilis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga 61

Figura 10. Genotipagem das linhagens de *Bacteroides fragilis* com diferentes iniciadores aleatórios, por AP-PCR. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga 62

Figura 11. Representação gráfica da análise histopatológica do baço dos camundongos desafiados com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 - lesão moderada e 3 – lesão intensa. A: avaliação de polpa branca; B: avaliação de polpa vermelha 64

Figura 12. Representação gráfica da análise de parâmetros histológicos do fígado (A a D) dos camundongos desafiados com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 - lesão moderada e 3 – lesão intensa 65

Figura 13. Representação gráfica dos valores médios das dosagens de citocinas no sobrenadante dos intestinos dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO após 7 ou 14 dias de infecção experimental. A: IL-6; B: IL-10; C: IL-17; D: IFN- γ ; E: TNF- α . *, a e b indicam diferenças estatisticamente significativas($p < 0,05$) 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - “deoxyribonucleic acid” - Ácido Desoxirribonucléico

RNA – “ribonucleic acid” - Ácido ribonucléico

GALT – “gut-associated lymphoid tissue” - tecido linfóide associado à mucosa do trato gastrintestinal

PRRs - “Pattern-recognition receptors” - receptores de reconhecimento padrão TLRs

– “Toll-like receptors” - receptores toll-like

BHIa – “Brain Heart Infusion agar” – Agar infusão de cérebro e coração

BHIc – “Brain Heart Infusion Broth” – Caldo infusão de cérebro e coração

CIM - concentração inibitória mínima

BRUc - Brucela caldo

CLSI – “*Clinical Laboratory Standards Institute*” - Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial

UPGMA- “Unweighted Pair Group Method” - Método de grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas

TNF α – “ tumor necrosis factor α “ – Fator α de necrose tumoral

CAT - cloranfenicol acetiltransferase

APCs – “antigen-presenting cell” - células apresentadoras de antígenos

LPS – lipopolissacarídeo

IL-6 - Interleucina-6

IFN- γ - Interferon- γ

IL-10 - Interleucina-10

IL-17 - Interleucina-17

ZPS – “Zwitterionic polysaccharides” polissacarídeo zwitteriônico

SDS - “sodium dodecyl sulfate” - dodecil sulfato de sódio

PBPs – “Penicillin-binding proteins” - proteínas ligadoras de penicilina

CSI - concentrações subinibitórias

SDS-PAGE – “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”

PCR – “Polymerase chain reaction”- reação em cadeia da polimerase

AP-PCR – “arbitrarily primed polymerase chain reaction” – reação em cadeia da polimerase com iniciadores aleatórios

CBR - Centro de Biologia da Reprodução

PMSF: “phenil methyl sulphonyl fluoride” - fenil metil sulfonil fluoridro

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid” - ácido etilenodiamino tetra-acético

PBS – “Phosphate buffered saline” – Salina tamponada com fosfato

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” – Ensaio Imunoenzimático

SUMÁRIO

1. Introdução e justificativa	18
2. Revisão de Literatura	20
2.1. Microbiota Intestinal Residente	20
2.2. Generalidades sobre o Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	21
2.2.1. Aspectos taxonômicos.....	21
2.2.2. Ecologia e fisiologia.....	22
2.2.3. Patogênese e virulência	24
2.2.4 Antimicrobianos e <i>Bacteroides fragilis</i>	26
2.3. Aspectos da interação microbiota intestinal e resposta imunológica.....	27
2.4. Interações antimicrobiano-bactéria-hospedeiro.....	30
3. Objetivos.....	33
3.1 Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. Material e métodos	35
4.1. Amostras bacterianas.....	35
4.2. Cultivo das linhagens bacterianas.....	35
4.3. Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	36
4.4. Obtenção das linhagens em concentrações subinibitórias das drogas.....	37
4.5. Avaliação das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas	37
4.5.1. Avaliação da morfologia bacteriana	38
4.5.2. Obtenção de curvas de crescimento das linhagens bacterianas.....	38
4.5.3. Avaliação de características bioquímicas e fisiológicas	39
4.5.4. Construção de fenograma.....	40
4.5.5. Avaliação da interferência das drogas antimicrobianas na formação de biofilme bacteriano experimental.....	41
4.6. Avaliação das características moleculares das linhagens bacterianas	42
4.6.1. Identificação de expressão diferencial de proteínas.....	42
4.6.2. Identificação molecular das linhagens bacterianas obtidas.....	42
4.6.3. Genotipagem bacteriana	43

4.7. Avaliação de alterações na interação bactéria-hospedeiro associadas às drogas antimicrobianas	44
4.7.1. Desenho experimental e infecção experimental em camundongos	44
4.7.2. Avaliação histopatológica do baço e fígado dos camundongos	45
4.7.3. Avaliação da produção de citocinas no intestino dos camundongos.....	46
4.8. Análise estatística	48
5. Resultados	49
5.1. Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação das concentrações subinibitórias das drogas	49
5.2. Avaliação do efeito das drogas na morfologia celular e em características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas obtidas.....	51
5.3. Avaliação dos padrões de expressão protéica	58
5.4. Avaliação dos padrões genéticos das linhagens bacterianas	60
5.5. Avaliação das alterações na interação bactéria-hospedeiro.	62
6. Discussão.....	69
6.1. Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação das concentrações subinibitórias das drogas	69
6.2. Avaliação do efeito das drogas na morfologia celular e em características bioquímicas, fisiológicas e moleculares das linhagens bacterianas obtidas	72
6.3. Avaliação das alterações na interação bactéria-hospedeiro	78
6.4. Considerações Finais.....	83
7. Conclusões.....	84
8. Referências Bibliográficas.....	86
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trato gastrintestinal, assim como a maior parte do corpo dos animais, é colonizado por organismos que compõem a microbiota residente, usualmente considerados inócuos. Entretanto, a incidência de infecções produzidas por estes microrganismos vem aumentando nos últimos anos. As bactérias anaeróbias compõem um grupo ecologicamente significativo da microbiota indígena de muitos mamíferos, e sua notável habilidade e versatilidade metabólica lhes conferem condições privilegiadas para atuação na manutenção da saúde dos hospedeiros, entretanto, podem atuar como agressões oportunistas. Na saúde, a microbiota residente tem um papel fundamental na barreira contra a instalação de microrganismos patogênicos, e pode participar de processos biológicos, como a degradação de substratos e disponibilização de nutrientes e energia para os hospedeiros. Além disso, esses microrganismos tem grande importância no desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico dos indivíduos. No desequilíbrio, os microrganismos residentes podem se proliferar excessivamente ou serem introduzidos em áreas não colonizadas no corpo. Assim, a grande maioria das doenças infecciosas por anaeróbios é causada por esses microrganismos indígenas anfibióticos, sendo, portanto, de origem endógena. Entre os isolados de espécimes clínicos, o grupo *Bacteroides fragilis* se destaca. Quanto à etiologia, os processos infecciosos no qual estão envolvidos são predominantemente polimicrobianos, nos quais os anaeróbios obrigatórios e os anaeróbios facultativos desempenham importante papel. Embora a microbiota intestinal seja de certa maneira estável, os microrganismos estão sujeitos a perturbação pelo uso de antimicrobianos para o tratamento de doenças, profilaxia ou mesmo pelo uso indevido. Além da perturbação no equilíbrio de níveis populacionais, estas bactérias indígenas podem adquirir resistência, transmitindo-a para linhagens patogênicas dificultando o tratamento de certas infecções. Neste sentido, um aspecto importante da biologia dos microrganismos anaeróbios é a crescente resistência a drogas observada no grupo *Bacteroides fragilis* e em outros grupos microbianos, com algumas conseqüências já sugeridas e estabelecidas para a relação bactéria-hospedeiro.

À medida que as drogas antimicrobianas são introduzidas no ambiente, os microrganismos respondem, tornando-se resistentes, sobretudo mediante o uso indiscriminado. Os mecanismos de resistência adquiridos resultam de alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações no padrão genético ou regulação da expressão de algumas habilidades já presentes no seu genoma. Várias evidências mostram que as drogas antimicrobianas podem realmente interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos.

Alterações morfológicas e nos padrões de virulência microbianos foram descritos após exposição a diferentes concentrações de antimicrobianos. Em relação à morfologia alterada, geralmente a primeira observação impactante, a filamentação celular tem sido implicada como fator de sobrevivência a mudanças ambientais, como a exposição a antimicrobianos, ou mesmo a mecanismos de escape a resposta do hospedeiro.

Assim, ecossistemas impactados pela ação de drogas antimicrobianas ou seus resíduos podem refletir, de maneira significativa, na biologia dos anaeróbios obrigatórios que compõem a microbiota residente de seres humanos e de outros animais, com implicações diretas na relação bactéria-hospedeiro, como uma resposta momentânea ou evolutiva dos microrganismos. A habilidade das bactérias relacionadas a alterações morfológicas e fisiológicas bem como a diminuição da susceptibilidade aos antimicrobianos afeta não só a ecologia microbiana, mas também o tratamento das doenças infecciosas.

Do exposto, com o estudo da resposta de bactérias do gênero *Bacteroides* a drogas de interesse clínico-microbiológico, pretende-se contribuir para o conhecimento da biologia desses microrganismos após contato com os antimicrobianos, para o conhecimento do impacto do fenômeno na virulência microbiana, além do desenvolvimento de estratégias terapêuticas que poderão assim minimizar as consequências ecológicas da antibioticoterapia, e estimular o uso racional de drogas antimicrobianas, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota Intestinal Residente

As superfícies internas e externas do corpo dos seres humanos são colonizadas por microrganismos que compõe a microbiota residente. O primeiro contato entre os microrganismos e o hospedeiro ocorre, geralmente, no nascimento, com a microbiota vaginal ou do ambiente externo dependendo do tipo de parto, se normal ou cesário (REID, 2004).

Estes microrganismos são encontrados com regularidade numa determinada área, em uma determinada condição fisiológica, com diversificada habilidade metabólica, que inclui a sensibilidade ao oxigênio e outros fatores que permitem sua colonização em sítios específicos. No entanto, quando ocorre algum desequilíbrio ou perturbação que comprometam as defesas naturais do hospedeiro, infecções graves podem acontecer, caracterizando assim o caráter anfibiótico da microbiota residente (ROSEBURY, 1962; HENTGES, 1993).

O intestino é um sítio primário de colonização e diretamente ligado ao desenvolvimento do sistema imune. As bactérias intestinais são importantes no desenvolvimento dos tecidos linfóides associados ao trato gastrintestinal (SHARMA et al., 2010).

A microbiota intestinal residente é composta por microrganismos aeróbios obrigatórios, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios, sendo observada predominância de microrganismos Gram-negativos. Estes microrganismos representam uma barreira à invasão e proliferação de microrganismos patogênicos exógenos e oportunistas, através da ocupação dos sítios de adesão, produção de bacteriocinas e metabólitos e a manutenção de baixo potencial de óxido-redução. Em meio às espécies de anaeróbios obrigatórios, destacam-se as do grupo *Bacteroides fragilis*, sendo aproximadamente 25% do total do anaeróbios no TGI humano. Entretanto, são também encontrados espécies de *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* e *Clostridium* (HOOPER et al., 1998).

As bactérias anaeróbias representam um grupo ecologicamente significativo da microbiota residente dos seres humanos e outros animais, principalmente por

apresentar uma excelente versatilidade metabólica, utilizando vários tipos de nutrientes como fonte de energia, permitindo assim a sua sobrevivência e coexistência. No trato gastrointestinal, estes microrganismos chegam a atingir, especialmente no cólon, a proporção de mil anaeróbios para cada aeróbio (FINEGOLD, 1977, FINEGOLD, 1990).

Entre estes microrganismos, espécies do grupo *Bacteroides fragilis* são importantes constituintes da microbiota residente intestinal de seres humanos e outros animais, além de colonizar outros locais do corpo, como por exemplo, a superfície de mucosas.

As espécies mais frequentemente isoladas da microbiota endógena humana são *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* e *B. distasonis*. Entretanto, a espécie *B. fragilis* e *B. eggerthii* são menos encontradas. Contudo, a espécie *B. fragilis* contribui com 63% em infecções clínicas de todo grupo isolado (LIU et al., 2003).

2.2 Generalidades sobre o Grupo *Bacteroides fragilis*

2.2.1 Aspectos taxonômicos

Estas bactérias pertencem à família *Bacteroidaceae* a qual engloba 7 gêneros, que incluem *Bacteroides*, *Acetofilamentum*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Anaerorhabdus*, *Anaerophaga*, *Megamonas* (GARRITY, BELL E LILBURN, 2004). São bastonetes Gram negativos, anaeróbios obrigatórios, móveis ou imóveis, metabolizadores de carboidratos, peptonas e outros intermediários metabólicos, em alguns casos com a produção de ácido (SALYERS, 1984). Em 1994, na 9ª edição do Manual Bergey de Determinação Bacteriológica, Holt et al. descreveram 47 espécies dentro do gênero *Bacteroides*. Entretanto, estudos moleculares com avaliação da região do DNA bacteriano codificador para a região do RNA ribossomal 16S têm permitido a descrição de novas espécies e reclassificação de espécies do gênero, além da criação de novos gêneros. Foi proposto que o gênero *Bacteroides* deve ser limitado a espécies altamente

fermentativas, que fenotipicamente assemelham-se a espécie *B. fragilis*. Apesar disso, a notação “grupo *B. fragilis*” ainda tem sido utilizada (SONG et al., 2004).

A espécie *B. fragilis* foi descrita como *Bacillus fragilis* em 1898 por Veillon e Zuber, e em 1919 foi transferida para o gênero *Bacteroides* por Castellani e Chalmers. Em 1974, havia uma subclassificação para a espécie *Bacteroides* em várias subespécies, até que, posteriormente, com o uso de tecnologias moleculares, foi verificado que eram espécies distintas, e estas foram reclassificadas em espécies do gênero *Bacteroides* (CATO e JOHNSON, 1976).

O grupo *B. fragilis* era constituído inicialmente pelas espécies *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. vulgatus* e *B. uniformis*, sendo posteriormente adicionadas as espécies *B. eggerthii*, *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris*. O grupo *B. fragilis* está constantemente sofrendo mudanças, seja com a inclusão ou exclusão de espécies do gênero (LIU et al., 2003). Recentemente, foram estudadas as regiões do DNA 16S da espécie *B. goldsteinii*, juntamente com *B. distasonis* e *B. merdae*, e assim, com base nos resultados apresentados, foi proposto um novo gênero, o *Parabacteroides*, para o agrupamento dessas espécies (SAKAMOTO e BENNO, 2006).

2.2.2 Ecologia e fisiologia

Linhagens bacterianas representantes de espécies do grupo *B. fragilis* podem ser transmitidas de mãe para filho durante o parto vaginal e, assim, tornar-se parte da microbiota humana nas primeiras fases de vida. As bactérias mantêm uma relação complexa e geralmente benéfica com o hospedeiro, quando retida no intestino (REID, 2004; WEXLER, 2007).

Este grupo microbiano desempenha um importante papel no ecossistema intestinal, principalmente no cólon, sendo responsável por aproximadamente 30% de todos os microrganismos isolados de espécimes fecais. Os maiores níveis populacionais entre as espécies do grupo são observados, no cólon, e compreendem representantes das espécies *B. vulgatus*, *B. distasonis* e *B. thetaiotaomicron*. Outras espécies, tais como *B. fragilis*, *B. ovatus* e *B. uniformis* são menos numerosos, mas estão presentes em altas concentrações. Todas as

espécies do grupo são classicamente consideradas patógenos oportunistas, embora as espécies *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* e *B. ovatus* tem recebido destaque pelo seu freqüente envolvimento na etiologia de diversos processos infecciosos, incluindo a formação de abscessos da cavidade abdominal, pulmonares e do sistema nervoso central, além de septicemia (SALYERS, 1984).

Por outro lado, a espécie *B. fragilis* representa apenas 0,5% da microbiota anaeróbica residente no cólon humano, mas é o representante do grupo mais freqüentemente isolado de processos clínicos infecciosos endógenos mono ou polimicrobianos com envolvimento de bactérias anaeróbias, especialmente na cavidade abdominal (KALKA– MOLL et al., 2001; MAZMANIAN e KASPER, 2006).

Embora o ambiente intestinal contenha uma ampla diversidade de nutrientes, os requerimentos nutricionais do grupo *B. fragilis* são modestos, pois crescem em meio contendo carboidratos, hemina, amônia, vitamina B12, sais inorgânicos e agentes redutores. Estes microrganismos apresentam alta capacidade de utilizar os nutrientes, como por exemplo, os polissacarídeos vegetais que não são digeridos pelo hospedeiro (WEXLER, 2007). Seu metabolismo é quimioheterotrófico e sacarolítico, onde seus principais produtos de fermentação são o acetato, succinato, propionato e lactato.

Nos sítios de infecção, *B. fragilis* pode utilizar glicoproteínas e glicolípideos da superfície celular como fonte de nutrientes, além de açúcares simples, tais como galactose e manose, e compostos mais complexos (SALYERS, 1984; WEXLER, 2007).

Uma característica fundamental das espécies do grupo *B. fragilis* é a aerotolerância, que é fundamental para que ocorra a colonização em alguns sítios mais oxigenados do corpo humano. Apesar de não crescerem em atmosfera de oxigênio, podem tolerar a sua presença por algumas horas, devido à presença de algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase, que lhes conferem assim, resistência às espécies reativas do oxigênio (ROCHA et al., 1996). Tem sido sugerido que uma pré-colonização de determinados sítios anatômicos por anaeróbios facultativos é essencial para a redução da concentração de oxigênio e do potencial de óxido-redução, e subsequente colonização pelos anaeróbios obrigatórios, permitindo assim a sobrevivência destes microrganismos, uma vez que possuem uma enorme versatilidade metabólica (SALYERS, 1984). Além disso, a literatura sugere a capacidade de representantes da espécie *B. fragilis* em consumir

oxigênio quando presente em concentrações nanomolares e, até mesmo, se beneficiar deste gás nestas concentrações (BAUGHN e MALAMY, 2004).

2.2.3 Patogênese e virulência da espécie *B. fragilis*

Assim como as outras espécies do grupo *Bacteroides*, *B. fragilis* é um bastonete Gram negativo que integra a microbiota indígena do trato gastrintestinal humano. Apresentam inúmeros fatores de virulência, os quais contribuem consideravelmente para que esses microrganismos estejam envolvidos em infecções mono e polimicrobianas (PETERSON et al., 1999).

O sucesso de colonização é altamente dependente da forma como a bactéria interage com o ambiente no seu hospedeiro. Quando ocorre o escape do microrganismo do intestino, geralmente como resultado de doenças induzidas por perturbações da mucosa intestinal ou cirurgia, alterações patológicas significativas podem ocorrer, incluindo formação de abscesso em vários locais, por exemplo, a cavidade abdominal, o cérebro, fígado, pelve e nos pulmões, ou invasão da corrente sanguínea (WEXLER, 2007; PUMBWE et al., 2007b).

A virulência destas bactérias está relacionada ao polissacarídeo capsular, ao lipopolissacarídeo, à produção de enzimas hidrolíticas e exotoxinas (TABAQCHALI e WILKS, 1992; OBISO, et al., 1995. ROKOSZ e MEISEL-MIKOLAJCZYK, 1995).

Além da alta capacidade de modificar antígenos variáveis de superfície para evadir da resposta imune do hospedeiro (WEXLER, 2007), acredita-se que os *Bacteroides* possam interferir no ataque do sistema imunológico do hospedeiro pela produção da cápsula, que reduz a habilidade fagocitária dos polimorfonucleares, e também pela produção de um fator ainda não completamente caracterizado, o qual pode degradar proteínas do complemento e inibir tanto a quimiotaxia como a opsonização (ROTSTEIN, et al., 1986).

Estudos tem sugerido, ainda, mecanismos de modulação da atividade de macrófagos, seja pela redução da produção de óxido nítrico e formação de poros na superfície dos macrófagos observando-se a extrusão do conteúdo citoplasmático, ou

pela indução de morte por processo semelhante ao da necrose, ainda não totalmente esclarecido (VIEIRA et al., 2005, VIEIRA et al., 2009).

Segundo relatos da literatura, os ácidos graxos de cadeia curta também podem ser importantes fatores de virulência que afetam os mecanismos de defesa do hospedeiro. Estes ácidos podem inibir a proliferação de linfócitos T e induzir apoptose em macrófagos, por diferentes estímulos (KYNER, ZABOS E CHRISTMAN, 1976; EFTIMIADI et al., 1991).

O alto potencial de colonização e consequente patogenicidade de *B. fragilis* está também relacionada à alta tolerância a bile. Acredita-se que esta tolerância à bile esteja relacionada com a co-agregação destas bactérias e sua aderência às paredes intestinais para a formação do biofilme. Fisiologicamente, as fímbrias e aglutininas de *B. fragilis* funcionam, como em outras bactérias, como adesinas, permitindo-lhes o estabelecimento nos tecidos do hospedeiro. A adesão das bactérias às células da superfície intestinal é essencial tanto para permanência no local como microbiota residente assim como para sua persistência. Vários estudos *in vivo* demonstraram que 99,9% das espécies bacterianas, incluindo *B. fragilis*, podem naturalmente colonizar superfícies formando biofilmes. Acredita-se que a presença de sais biliares interfira com os padrões de expressão bacteriano favorecendo sua aderência (PUMBWE et al., 2007b; PUMBWE, SKILBECK e WEXLER, 2008).

Para estes microrganismos, outros fatores de virulência incluem, ainda, as proteínas de membrana externa, enzimas hidrolíticas como lípases e peptidases, e a produção de exotoxinas, sendo a fragilisina relacionada a diarreia aguda em crianças com mais de um ano (PATHELA et al., 2005).

Apesar dos vários estudos relacionados à virulência e a patogenicidade de *B. fragilis*, o conhecimento da epidemiologia de infecções causadas por estes microrganismos é limitado. Muitos estudos tem se concentrado no desenvolvimento de métodos sorológicos e moleculares para a identificação inter e intra-específica para diferenciação entre microrganismos do grupo, uma vez que as outras espécies do gênero podem estar envolvidas em quadros clínicos (TABAQCHALI e WILKS, 1992).

.2.4 Antimicrobianos e *Bacteroides fragilis*

Os antibióticos são compostos de baixo peso molecular que matam ou inibem o crescimento bacteriano. A maioria deles é produzida por microrganismos, e outros são sintéticos ou parcialmente modificados em laboratório. Para que os antibióticos possam ser utilizados nas doenças infecciosas, eles devem satisfazer alguns critérios básicos: ter um espectro de ação satisfatória, ser direcionado a alvos peculiares de bactérias, o que minimiza a toxicidade para o hospedeiro; ser capaz de atingir o sítio do organismo onde a infecção esteja ocorrendo e não induzir resistência bacteriana (SALYERS e WHITT, 1994; BOHNEN, 1998).

Um aspecto importante da biologia dos microrganismos anaeróbios, não diretamente ligados à produção de doenças de natureza infecciosa, mas ligado à sua persistência, é a crescente resistência a drogas observada neste e em outros grupos microbianos, com algumas conseqüências já estabelecidas para a relação bactéria-hospedeiro (LORIAN e GEMMEL, 1994; DINIZ et al., 2000a; DINIZ et al., 2003). À medida que as drogas antimicrobianas são introduzidas no ambiente, os microrganismos respondem, tornando-se resistentes. Em regra, os mecanismos de resistência adquiridos resultam de alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações no padrão genético normal ou regulação da expressão de algumas habilidades já presentes no seu genoma. Várias evidências mostram que as drogas antimicrobianas podem realmente interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos (VAN DEN BROEK, 1989).

Para o tratamento em infecções causadas por *B. fragilis* são frequentemente prescritos β -lactâmicos (com ou sem inibidores de β -lactamases) carbapenêmicos, clindamicina e metronidazol. Fluoroquinolonas são também utilizadas em combinação com clindamicina e metronidazol (CANIGIA et al., 2007). Os antimicrobianos têm reduzido a mortalidade, mas não a persistência de doenças infecciosas. Com o uso abusivo e às vezes indiscriminado, as drogas antimicrobianas induzem ao aparecimento e acúmulo de linhagens bacterianas resistentes. Isto se deve aos novos mecanismos de adaptação bacteriana e transmissão dessa resistência para as novas gerações (BOHNEN, 1998; MINDLIN et al., 2006).

Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é geralmente espécie ou gênero-específica, e a adquirida está presente em apenas certas linhagens da espécie ou gênero, fato relacionado com a mutação em gene bacteriano ou por aquisição de nova informação genética, através de mecanismos de recombinação, como conjugação, transformação ou transdução (CUCHURAL e TALLY, 1986; LEVY, 1998).

O aparecimento e disseminação de linhagens microbianas isoladas de espécimes clínicos resistentes aos antimicrobianos avançam muito rapidamente. As espécies de *Bacteroides* são potencialmente resistentes a uma grande diversidade de drogas e a resistência a um determinado antimicrobiano pode variar muito entre as localizações geográficas (SNYDMAN et al., 2007). Assim, confirma-se a necessidade de estudos prospectivos regionais sobre os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos, bem como estudos voltados para o entendimento dos fenômenos ecológicos relacionados a esta crescente resistência bacteriana nos diversos ecossistemas (ASM, 2000).

2.3 Aspectos da interação microbiota intestinal e resposta imunológica

O intestino é o sítio primário de colonização e importante para o desenvolvimento do sistema imune. As bactérias intestinais são fundamentais no desenvolvimento dos tecidos linfóides associados ao trato gastrointestinal. Estudos têm mostrado que animais *Germ-free* mostram grandes defeitos no desenvolvimento do tecido linfóide associado à mucosa do trato gastrointestinal (GALT) e na produção de anticorpos, além de placas de Peyer diminuídas e lâmina fina com menos células, quando comparados com animais em ambiente convencional (SHARMA, YOUNG e NEU, 2010).

O epitélio intestinal tem um papel importante no não desencadeamento de uma resposta inflamatória a milhões de bactérias normalmente presentes no intestino. A resposta aos antígenos da microbiota intestinal é a tolerância que pode ocorrer através da supressão ativa, anergia ou apoptose de células antígeno reativas (MACDONALD, 1995).

Células epiteliais intestinais e as bactérias residentes têm sofrido inúmeras adaptações para facilitar o reconhecimento dos microrganismos, a ativação das células epiteliais e simultaneamente limitar a resposta imune inata. Este equilíbrio homeostático da resposta das células epiteliais é essencial para preservar a relação simbiótica entre os mamíferos e sua microbiota residente. Há evidências emergentes que a microbiota modula uma série de processos que resultam em maturação, diferenciação e proliferação da mucosa intestinal, tanto em nível celular quanto molecular. Através de uma cadeia de eventos moleculares, a microbiota fornece uma unidade importante para a maturação do sistema imune (ARTIS, 2008).

Bactérias da espécie *B. fragilis* produzem um polissacarídeo zwitteriônico (ZPS) que interage com linfócitos T CD4 e atua na regulação sistêmica da produção de citocinas, que são defectivas na ausência da colonização bacteriana, influenciando o sistema imunológico a prevenir respostas imunológicas deletérias ao hospedeiro. Assim, em contraste com os fatores de virulência de bactérias patogênicas, que induzem a doença, o ZPS de bactérias simbióticas surgiu como membro de uma família de moléculas microbianas que participam da manutenção da saúde, muitas vezes conhecidas como fatores de simbiose. Bactérias residentes têm sido implicadas como mediadoras cruciais de várias funções fisiológicas, metabólicas e imunológicas dos hospedeiros mamíferos (MAZMANIAN et al., 2005).

As células epiteliais intestinais além de fornecer uma barreira física constituem a primeira linha de defesa inata contra bactérias patogênicas e residentes, e podem influenciar a função de células apresentadoras de antígenos e linfócitos no microambiente intestinal. Em estudos *in vitro*, a secreção de citocinas tecido-específicas pelas células epiteliais intestinais limita a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas e macrófagos presentes nas placas de Peyer, lâmina própria do tecido e nos linfonodos mesentéricos, mantendo a homeostase imunológica. Além disso, o lúmen intestinal em contato frequente com a microbiota intestinal conta com a participação de estruturas linfóides especializadas, além das placas de Peyer, como os folículos linfóides isolados ou associados à lâmina própria por todo o comprimento do trato intestinal. Os sítios imunológicos contribuem para a manutenção do equilíbrio da imunidade e tolerância na superfície mucosa (BAUMGART e DIGNASS, 2002).

As células epiteliais são capazes de reconhecer os microrganismos presentes na mucosa intestinal por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que

incluem os receptores toll-like (TLRs). Esses PRRs reconhecem os fatores de bactérias, tais como LPS, lipoproteínas, flagelina e uma série de outros componentes específicos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a discriminação pelas células epiteliais intestinais entre as bactérias residentes e patogênicas, incluindo a distribuição seletiva de receptores TLRs. No entanto, o reconhecimento de bactérias, pelas células intestinais epiteliais ocorre, e é essencial para a homeostase intestinal normal (ARTIS, 2008).

Defeitos na barreira epitelial podem permitir que o GALT seja exposto a uma variedade de antígenos nocivos do lúmen intestinal, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) e interferon gama (IFN- γ), e gerar a inflamação da mucosa causando doença (SHIH e TARGAN, 2008).

As citocinas são proteínas secretadas pelas diferentes células da imunidade inata e adaptativa, suas principais funções medeiam e regulam as reações imunes e inflamatórias, e fornecem comunicação entre leucócitos e outras populações de células (KANNOURAKIS E ABBAS, 1994). O TNF- α é considerado principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas, tendo como importante papel a ativação de neutrófilos e monócitos para os locais infectados. Outra citocina de fase inflamatória ligada à resposta imune inata é a IL-6 sintetizada por fagócitos mononucleares e células do endotélio vascular, em resposta aos microrganismos. É uma citocina pleiotrópica comumente produzida a nível local no tecido e liberada na circulação em quase todas as situações de perturbação homeostática, incluindo endotoxemia, trauma e infecções agudas. Esta citocina possui diferentes funções. Na imunidade inata está diretamente relacionada à produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Já na imunidade adaptativa está ligada ao crescimento de linfócitos B que se diferenciaram em produtores de anticorpos (HEINRICH, CASTELL e ANDUS, 1990).

Estudos têm demonstrado que um dos principais agentes responsáveis pela formação de abscessos são os polissacarídeos. A formação de abscessos envolve uma resposta imune complexa com recrutamento de neutrófilos e indução de várias citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-10. Entretanto, a fonte e o papel destas citocinas ainda não estão definidos, embora alguns estudos evidenciem que a produção de TNF- α por macrófagos tem um importante papel na formação de abscessos (GIBSON et al., 1998).

A principal função biológica da IL-10 parece ser imunossupressora e anti-inflamatória. Entretanto, a estimulação de células apresentadoras de antígenos (APCs) com lipopolissacarídeo induz a liberação de IL-10, que é reforçada pela presença de células danificadas, exercendo um papel pró-inflamatório (MOCELLIN, et al., 2003).

2.4 Interações antimicrobiano-bactéria-hospedeiro

A problemática da resistência a drogas antimicrobianas vem ganhando espaço nas instituições de pesquisa, em uma abordagem contemporânea, que começou a ser discutida a partir da década de 40 (LORIAN e GEMMELL, 1994). Nesta perspectiva, já integrada ao estudo da biologia microbiana e sua relação com o hospedeiro, observa-se a necessidade de se conhecer as alterações ecológicas dirigidas por estes agentes em populações de microrganismos. Esta preocupação se evidencia à medida que as drogas são introduzidas no ambiente, seja por uso abusivo ou imperícia profissional, na medicina humana e veterinária, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (ASM, 2000; WITTE, 2000; O'BRIEN, 2002; LIVERMORE, 2003).

De maneira geral, há vários anos muitos autores vêm observando que bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas expostas a baixas concentrações de penicilina e outros antimicrobianos apresentavam alterações morfológicas, resultando em células alongadas e filamentosas. Além disso, outros aspectos também foram observados, como mudanças ultraestruturais e alterações na capacidade de adesão (SILVESTRO et al., 2006).

Alterações morfológicas tem sido descritas desde 1948, quando Tulasne e Vendrely relataram a observação de formas aberrantes de *Staphylococcus aureus* na presença de penicilina. Desde então vários estudos tem abordado e questionado a variação não só morfológica, mas alterações moleculares, fisiológicas e no perfil de virulência frente a várias condições de estresse.(LORIAN e GEMMEL ,1991; DINIZ et al., 2000b; CHEN et al., 2005; SILVESTRO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Lorian e Atkinson (1978) também relataram alterações em células de *S. aureus* expostas a diferentes concentrações de penicilina. Estudos têm relatado a

formação de filamentos em células de *E. coli* expostas a ampicilina e mezlocilina, e o alongamento dos bacilos e formação de células filamentosas em *Pseudomonas aeruginosa* após exposição à azlocilina e cefsulodina (LORIAN e GEMMEL, 1991).

Fang et al., (2002) analisaram os efeitos da cefoxitina sobre a morfologia celular na espécie *B. thetaiotaomicron*, e verificaram a filamentação dessas espécies quando as culturas foram tratadas com cefoxitina em concentrações subinibitórias. Além da filamentação foram observadas também a presença de vesículas superficiais e posterior lise. Ainda segundo esses autores, os padrões de crescimento e as alterações morfológicas induzidas pela cefoxitina em *B. thetaiotaomicron* estariam associados com as propriedades das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Em outro estudo, foi utilizada a clindamicina em concentrações subinibitórias, onde foi detectado um alongamento celular. Além disso, vesículas extracelulares e áreas limpas dentro do citoplasma foram observadas, sugerindo degradação citoplasmática (SILVESTRO et al., 2006).

Após exposição ao metronidazol, foram observadas alterações morfológicas em linhagens de *Bacteroides* resistentes à droga, e estes microrganismos tornaram-se mais virulentos em experimentos *in vivo*, sugerindo que a terapia a longo prazo e altas concentrações de metronidazol poderiam interferir com a patogenicidade microbiana, resultando em mudanças nas interações bactéria-hospedeiro (DINIZ et al., 2000a).

Estudos têm demonstrado, ainda, que a formação de filamentos de *Burkholderia pseudomallei* poderia ser revertida quando o agente de pressão era retirado. Além disso, constatou-se que as bactérias filamentosas eram menos virulentas, por apresentarem motilidade e lise de monócitos diminuída quando comparadas às filamentosas. Segundo os autores, isso seria uma questão problemática não só por causa do desenvolvimento de resistência ao antibiótico, mas também porque poderia levar a uma redução temporária da virulência e um aumento potencial da gravidade da doença na antibioticoterapia inapropriada (CHEN et al., 2005).

Segundo proposições na literatura, as filamentações em células bacterianas expostas a diferentes agentes antimicrobianos podem acontecer quando ocorre o crescimento celular na ausência de divisão celular. Existem várias condições que resultam em filamentação bacteriana e, muitas vezes, estão relacionadas à sobrevivência dos microrganismos em condições de estresse, as quais incluem

evasão da resposta do hospedeiro, fuga de predadores protistas, terapias antimicrobianas e exposição de células anaeróbias obrigatórias a ambientes mais oxigenados, onde variações metabólicas ou mesmo danos ao DNA celular podem ocorrer (SILVA et al., 2007; JUSTICE, et al., 2008).

Já foi demonstrado, também, que diferentes agentes antimicrobianos podem favorecer a adesão e a produção de enzimas e exotoxinas em diferentes grupos microbianos, cocos ou bastonetes, Gram-positivo ou Gram negativo. Assim, drogas β -lactâmicas podem estimular a interação entre *S. aureus* e a fibronectina do hospedeiro, favorecendo sua adesão (PROCTOR et al., 1983); a clindamicina pode exercer influência positiva na adesão de *Streptococcus pyogenes* a células epiteliais, em cultura (BEACHEY, EISENSTEIN E OFEK, 1982); o ácido nalidíxico pode estimular a adesão de células de *E. coli* a linhagens de células intestinais *in vitro* (VOSBECK, 1982); beta-lactâmicos, vancomicina e gentamicina podem estimular a produção de hemolisinas por *S. pneumoniae* (LORIAN, WALUSCHKA e KIM, 1982) e *S. aureus*, que também pode produzir penicilinases após exposição à eritromicina, à clindamicina e à pristinomicina (LORIAN, 1971; MICHEL, STESSMAN e STESSMAN, 1980; STESSMAN e MICHEL 1983). Células de *E. coli* e *Vibrio cholerae*, expostas a diferentes concentrações de tetraciclina e lincomicina, produziram altos níveis de enterotoxinas, e células de *Clostridium difficile* produziram altos níveis de toxinas após tratamento com clindamicina e lincomicina (LEVNER, WEINER e RUBIN, 1977; YOH et al., 1983; SCHLEIVERT e KELLY, 1984; GEMMELL, 1988). Em *B. fragilis*, foi demonstrado que penicilina em diferentes concentrações é capaz de interferir na atividade de neuroaminidases (FERREIRA et al., 1989).

3.1 Objetivos gerais

Pesquisar alterações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares em linhagens de *Bacteroides fragilis* selecionadas após exposição a concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas, bem como suas implicações para relação bactéria-hospedeiro, pela pesquisa de aspectos imunológicos e histológicos de camundongos convencionais após infecção experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos da linhagem de referência *B. fragilis* ATCC 25285 (parental) a ampicilina, ampicilina sulbactam, clindamicina e cloranfenicol e determinar sua concentração subinibitória;
- Obter linhagens bacterianas derivadas da amostra parental após cultivos sucessivos na presença dos antimicrobianos avaliados e reavaliar o seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- Avaliar o efeito das drogas na morfologia celular em características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas obtidas após cultivos sucessivos na presença ou na ausência dos antimicrobianos;
- Avaliar os padrões de expressão protéica das linhagens selecionadas após cultivos sucessivos na presença ou na ausência dos antimicrobianos em comparação à linhagem parental
- Genotipar e avaliar, comparativamente, os padrões genéticos das linhagens de *B. fragilis* derivadas selecionadas após cultivos sucessivos na presença ou na ausência dos antimicrobianos, em comparação com a amostra parental;

- Avaliar alterações na interação bactéria-hospedeiro por parâmetros imunológicos, como dosagem de citocinas inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-17) e análise histológica de órgãos de camundongos convencionais, após infecção experimental intraperitoneal com as linhagens de *B. fragilis* derivadas selecionadas após cultivos sucessivos na presença ou na ausência dos antimicrobianos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras bacterianas

Foram utilizadas neste estudo linhagens bacterianas de bastonetes Gram negativos da espécie *Bacteroides fragilis*, designadas como: parental (*B. fragilis* ATCC 25285), BfAMP (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µg/mL de ampicilina), BfAMS (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µg/mL de ampicilina), BfCLO (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µg/mL de Cloranfenicol), BfCLI (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µg/mL de Clindamicina).

A amostra parental *B. fragilis* ATCC 25285 pertence à coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, e foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Cultivo das linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas foram rotineiramente cultivadas em *Brain Heart Infusion* ágar (BHIa) ou caldo (BHIC) suplementado com L-cisteína, extrato de levedura, hemina e menadiona. Para a realização dos experimentos referentes à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e para a seleção das linhagens em concentração subinibitória, foi utilizado o Caldo Brucela (BRUC). Os microrganismos, anaeróbios estritos, foram cultivados em condições de anaerobiose mecânica, utilizando-se o método físico da jarra com atmosfera controlada (N₂ 90% e CO₂ 10%), a 37 °C, em estufa bacteriológica.

4.3. Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

A determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi feita pelo método de diluição em caldo segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007), documento M11-A7 para anaeróbios (Tabela 1). Concentrações crescentes (de 0,06µg/mL a 1024,00 µg/mL) das drogas foram obtidas em tubos contendo 5,0 mL de BRUc suplementado com hemina, menadiona e L-cisteína, a partir de soluções estoque dos antimicrobianos ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol e metronidazol. Após o crescimento em placa de BHIa, as colônias foram diluídas em salina na escala 1.0 Mcfarland, e inócuos de 100µL das amostras foram adicionados ao tubo contendo o meio e a droga (em duplicata), sequencialmente, em ordem crescente de concentração. Tubos controle, sem adição da droga, também foram inoculados.

A leitura dos resultados foi feita após 24-48 horas de incubação, determinando-se a CIM da droga para cada isolado. O crescimento foi verificado pela observação da turvação do meio de cultura e a CIM foi determinada como a menor concentração para a qual não foi observado crescimento microbiano. As soluções estoque das drogas foram obtidas através de pesagem do pó em balança analítica e posterior diluição em água destilada ou outro solvente conforme instrução do fabricante. As soluções estoque foram esterilizadas em filtro com membrana 0,22 µm (Milipore) e foram mantidas em geladeira a 4°C, durante o período dos experimentos, respeitando-se o seu prazo de validade. As drogas utilizadas justificam-se pela sua relevância clínico-microbiológica: clindamicina (Sigma-Aldrich), ampicilina (Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda.,Brasil), ampicilina-sulbactam (Cellofarm, Brasil) e cloranfenicol (Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda.,Brasil) e metronidazol (Metroniflex Baxter, USA).

Tabela 1 – Valores de referência para interpretação dos testes de avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para *Bacteroides fragilis* (CLSI, 2007).

Droga antimicrobiana	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
	Sensibilidade	Resistência Intermediária	Resistência
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
Clindamicina	≤ 2	4	≥ 8
Metronidazol	≤ 8	16	≥ 32
Ampicilina	≤ 0.5	1	≥ 2
Ampicilina/sulbactam	$\leq 4/8$	16/8	$\geq 32/16$

4.4. Obtenção das linhagens em concentrações subinibitórias das drogas

Após a avaliação inicial do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos da linhagem parental, as culturas referentes às últimas concentrações antes da inibitória (concentração subinibitória) para cada droga avaliada em concentração máxima de $2\mu\text{g/ml}$ das drogas, foram subcultivadas por 10 passagens em meio de cultura BRUc contendo esta mesma concentração de antimicrobiano, em intervalos de 24 horas. A cada subcultivo foram realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram e teste respiratório das culturas, para avaliação da pureza das culturas.

As linhagens bacterianas resultantes do processo de seleção foram nomeadas como BfAMP, BfAMS, BfCLO e BfCLI. Linhagens selecionadas por passagens em metronidazol não foram obtidas. Após a seleção das linhagens adaptadas, foram obtidas novas linhagens pelo subcultivo bacteriano por mais 10 passagens em meio de cultura BRUc sem os antimicrobianos. A cada subcultivo, foram realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram e teste respiratório das culturas, para avaliação da pureza das culturas.

Para o teste respiratório, alíquotas das culturas foram inoculadas em meio BHIa em duplicata, e as placas foram incubadas em condições de aerobiose (em estufa bacteriológica) e em condições de anaerobiose mecânica, em jarra com atmosfera controlada.

4.5. Avaliação das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas

4.5.1. Avaliação da morfologia bacteriana

A morfologia celular microbiana foi avaliada pela coloração de Gram, durante os 10 subcultivos na presença e os 10 subcultivos na ausência dos antimicrobianos. Além disso, durante todos os momentos avaliados, a morfologia da amostra parental também foi avaliada.

Após a coloração pelo método de Gram, os esfregaços, em aumento de 1000X, foram fotografados pela utilização de câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Em seguida, a morfologia celular foi avaliada com auxílio do *software Image tool*, para o cálculo da área média das células bacterianas, em micrômetros quadrados (μ^2). Foram medidas em média 30 células por campo microscópico, após focalização dos esfregaços bacterianos corados pelo método de Gram.

Além disso, a morfologia e complexidade das células foram avaliadas, também por citometria de fluxo no primeiro e no décimo subcultivo na presença dos antimicrobianos. Suspensões das células bacterianas foram obtidas em solução salina (NaCl 0,85%) após cultivo em BRUc, correspondentes à 0,5 da escala McFarland. As suspensões (700 μ L) foram avaliadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) utilizando-se os parâmetros FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) para avaliação da percentagem de células alteradas e alteração na complexidade celular, de acordo com já sugerido por Andrade (2010).

4.5.2 Obtenção de curvas de crescimento das linhagens bacterianas

Para comparar o padrão de crescimento da linhagem parental e das linhagens selecionadas pelo crescimento nas concentrações subinibitórias dos antimicrobianos foram realizadas curvas de crescimento bacteriano.

Pré-inóculos das culturas de 24 horas em BRUc de todas as linhagens bacterianas foram diluídos em 500 mL do caldo, em densidade ótica de 0,01, a 680nm (SANTOS, 2007b). Para avaliação do padrão de crescimento das linhagens

BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO, foi utilizado BRUc acrescido das concentrações subinibitórias dos diferentes antimicrobianos.

O crescimento foi avaliado por 30 horas, em anaerobiose, a 37°C, em intervalos de 01 hora nas primeiras 04 horas, em intervalos de 02 horas de 04 a 12 horas, em intervalos de 04 horas de 12 a 24 horas e em intervalo de 06 horas até 30 horas de acompanhamento das culturas. Alíquotas de 3 mL foram retiradas a intervalo e então feita a leitura da densidade ótica de cada uma das amostras, utilizando-se espectrofotômetro. A curva de crescimento obtida foi plotada em função do aumento da densidade ótica das culturas e do tempo de incubação. O tempo médio de geração das amostras foi determinado considerando-se o intervalo de tempo necessário para incremento de duas vezes o valor da densidade ótica da cultura durante o crescimento exponencial.

4.5.3 Avaliação de características bioquímicas e fisiológicas

As características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO foram avaliadas após cultivo na presença dos antimicrobianos e após 10 passagens na ausência das drogas. Além disso, as características bioquímicas e fisiológicas foram avaliadas também para a linhagem parental *B. fragilis* ATCC 25285.

Foram realizados 32 testes para avaliação das seguintes habilidades bacterianas: motilidade; produção de beta-lactamases, catalase e acetoina; hidrólise da beta-galactosidase e da esculina; tolerância para ceftrimide; desaminação da fenilalanina; produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S); utilização de malonato, citrato e acetamida; pesquisa das enzimas arginina dehidrolase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, urease e triptofanase (indol); além da habilidade de fermentação dos carboidratos adonitol, arabinose, celobiose, glicose, inositol, maltose, manitol, rafinose, rhamnose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose, xilano e xilose.

O teste de motilidade foi realizado pela avaliação do crescimento bacteriano em meio sulfeto-indol-motilidade - SIM e o teste da catalase foi realizado em lâmina

de vidro, onde esfregaços microbianos foram cobertos com solução de peróxido de hidrogênio a 10%, e então observado a formação de bolhas de gás para reação positiva.

Para avaliação da produção de enzimas do tipo beta-lactamase, foi utilizado o disco de Cefinase (BD–BBL, Maryland, USA), o qual é impregnado com nitrocefina, uma cefalosporina cromógena. Quando a bactéria testada produz a enzima em quantidades significativas, o disco de cor amarela se torna vermelho na área em que a linhagem foi colocada. O disco foi então umedecido com água esterilizada e com o auxílio de uma alça descartável as colônias crescidas em placas de BHIa por 48 horas foram colocadas no disco, e observadas se houve mudança de cor, por até trinta minutos, o qual foi considerado como reação positiva. Como linhagens controle, foram utilizadas linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* – ATCC29213 como controle positivo e *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 como controle negativo.

Os outros testes foram realizados utilizando-se kits que compõe os sistemas comerciais Bactray I, Bactray II e Bactray III (LB Laborclin, Paraná, Brasil). Os sistemas consistem de painéis com os substratos desidratados, e os inóculos bacterianos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. Os painéis foram incubados em anaerobiose, a 37°C, com uma leitura visual realizada com 24 horas de crescimento e outra realizada com 48 horas de crescimento.

4.5.4 Construção de fenograma

Para avaliação global das eventuais alterações fenotípicas nas diferentes linhagens bacterianas derivadas da Bf parental após exposição e cultivo ou não na presença das drogas antimicrobianas, foi obtido um fenograma pela utilização do *software Genes* (CRUZ, 2006; CRUZ, 2008).

Foi construída uma matriz binária pela atribuição dos parâmetros 1 para a os testes cujos resultados foram positivos e 0 para a os testes cujos resultados foram negativos. A partir dessa matriz foi construída uma matriz de similaridade, onde o índice de Jaccard foi adotado para estimar a similaridade fenética entre as linhagens estudadas.

Para o agrupamento dos dados da matriz foi utilizado o método *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA), com análise de *bootstrap* de 1000x.

4.5.5 Avaliação da interferência das drogas antimicrobianas na formação de biofilme bacteriano experimental

A verificação da interferência dos antimicrobianos na formação de biofilme pelas amostras em estudo foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Andrade (2010).

A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em BRUc de todas as linhagens bacterianas, 400 µL de cultura foram utilizados para uma diluição em 4 mL de meio que, depois de homogeneizado, foi aplicado em poços de placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (200 µL). A linhagem parental foi cultivada sem antimicrobiano enquanto que as linhagens BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO foram cultivadas na presença e ausência das drogas antimicrobianas, nas concentrações subinibitórias.

As placas foram então tampadas e incubadas em anaerobiose por 24 horas, a 37°C. Após o período de crescimento, foi retirado o caldo de cultivo com o auxílio de uma pipeta esterilizada e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Foram adicionados 300 µL de metanol e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, retirou-se o metanol e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente por 5 minutos para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de cristal violeta (0,1%) as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas.

O corante incorporado foi extraído pela adição de 300 µL de uma solução de etanol/acetona (8:2) o sistema foi deixado em repouso por 15 minutos tampado. Após este período, foi feita a leitura do corante solubilizado em leitor de Elisa a 590nm. Estes experimentos foram realizados em duplicata, em duas réplicas, para obtenção de valores médios, que foram plotados como corante solubilizado a partir das células bacterianas aderidas aos poços das placas utilizadas.

4.6 Avaliação das características moleculares das linhagens bacterianas

4.6.1 Identificação de expressão diferencial de proteínas

Uma cultura pré-inóculo de 20 mL foi obtida em BRU da 9ª para a 10ª passagem microbiana na presença e na ausência das concentrações subinibitórias dos antimicrobianos. Este pré-inóculo foi transferido, após 24 horas de crescimento em anaerobiose, a 37°C, para 250 mL de BRU nas mesmas condições acima, para extração de proteínas.

Massas celulares foram obtidas por centrifugação das culturas a 4000 rpm, durante 15 minutos. A massa celular foi congelada a -20°C e as proteínas solúveis extraídas pela utilização do kit *Qproteome Bacterial Protein Preparation* (Promega Corporation, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os extratos obtidos foram precipitados em ácido tricloroacético 1:1 em banho de gelo por 20 minutos, seguido de centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm, a 4°C. O material precipitado foi lavado com 1mL de etanol gelado (-20°C) e as massas protéicas foram secas por evaporação do resíduo de álcool e suspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE 2X (250mM Tris pH 6,8, glicerol 20% v/v, 0,002% p/v azul de bromofenol, 4% p/v SDS, 10% v/v β-mercaptoetanol).

Os extratos protéicos brutos foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE a 8 e 15%, segundo Laemmli, 1970. A corrida eletroforética foi feita sob corrente constante de 80 v, em tampão Tris-Glicina. As proteínas foram visualizadas no gel após coloração por azul de commassie R250.

4.6.2 Identificação molecular das linhagens bacterianas obtidas

Para identificação e reavaliação da identidade das linhagens de *B. fragilis* obtidas pela exposição às drogas antimicrobianas, foi utilizada a técnica da reação

em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a identificação da espécie *B. fragilis*, de acordo com metodologia proposta por Liu et al. (2003) já estabelecida em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2010).

Para a obtenção de DNA bacteriano de alto grau de pureza, as amostras bacterianas foram cultivadas em BRUc, por 24 horas, 37°C em anaerobiose e 1mL das culturas foi utilizado para extração de DNA total, usando-se kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Na reação de PCR, foram utilizados os iniciadores específicos Bfra-R 5'-GCTAATCCCCCAATCATAC-3' e 1392-A 5'GTACACACCCCGT-3' (IDT Integrated DNA Technologies). As reações foram feitas em volumes de 25µL, contendo 3 µL de DNA molde (10ng), 12,5 µL de *Gotaq Green Master Mix 2X* (Promega Corporation, Madison WI, USA), 1,25 µL dos iniciadores e 7 µL de água ultrapura. As condições de amplificação para reação foram de 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (Bioer Genepro).

Os amplicons esperados (420pb) foram observados em gel de agarose 1,5% juntamente com o padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Amresco) em TBE 0,5X. As imagens dos géis foram analisadas sob transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio.

4.6.3 Genotipagem bacteriana

A técnica da reação em cadeia da polimerase usando-se iniciadores aleatórios (AP-PCR) foi utilizada para genotipagem bacteriana dos microrganismos selecionados pela exposição aos antimicrobianos na 10ª passagem na presença e na ausência das concentrações subinibitórias dos antimicrobianos.

Para a obtenção de DNA bacteriano de alto grau de pureza, as amostras bacterianas foram cultivadas em BRUc, por 24 horas, 37°C em anaerobiose e 1mL

das culturas foi utilizado para extração de DNA total, usando-se kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliação da qualidade do DNA extraído foi realizada eletroforese em de agarose a 0,8%, com aplicação de 10 µL da amostra, e foi feita a quantificação do DNA total por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington – DE, USA). Para as reações de genotipagem, 10ng do DNA bacteriano foi utilizado.

Os iniciadores aleatórios utilizados foram OPA 16 5'-AGCCAGCGAA – 3'e OPA 18 5' – AGGTGACCGT – 3' (IDT Integrated DNA Technologies), segundo padronização já estabelecida na literatura (ERIBE E OLSEN, 2000). As reações foram feitas em volumes de 26µL, contendo 3 µL de DNA molde (10ng), 12,5 µL de *Gotaq Green Master Mix 2X* (Promega Corporation, Madison WI, USA), 1,25 µL dos iniciadores e 9,25 µL de água ultrapura. As condições de amplificação para reação foram de 1 minuto de desnaturação inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos de: 94°C por 5 segundos, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 1 segundo. As reações foram realizadas em termociclador (Bioer Genepro).

Os amplicons obtidos em cada reação foram separados em gel de poliacrilamida a 6%, em TBE 1X. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio. Após documentação, os perfis de amplificação gênica foram comparados entre a amostra parental e as linhagens BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO, crescidas na presença e na ausência de antimicrobianos.

4.7 Avaliação de alterações na interação bactéria-hospedeiro associadas às drogas antimicrobianas

4.7.1 Desenho experimental e infecção experimental em camundongos

Trinta fêmeas de camundongos Balb/c com 75 dias de idade, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF foram distribuídas em seis grupos experimentais. Antes do início do experimento, os animais receberam tratamento com Praziquantel (*Cestox*,

Merck,. BRASIL), em dose única de 75mg/kg/*camundongo* via oral e Ivermectina (IVOMEC, Merial Saúde Animal LTDA, BRASIL) diluída em água e colocada no bebedouro na proporção de 0,4ml da droga para 500ml de água durante sete dias (Klement et al., 1996). Esta etapa do trabalho contou com a colaboração da Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, do Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB/UFJF (12/2003-CEA).

No grupo I, controle (n=2), os animais receberam o veículo da suspensão bacteriana (BH1c); no grupo II (n=4), os animais receberam uma suspensão contendo a amostra bacteriana *B. fragilis*; O restante dos animais foi dividido em mais 4 grupos (n=6), que foram inoculados com suspensões contendo as linhagens BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO, cultivadas na presença das diferentes drogas antimicrobianas.

Todos os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com 200µL de suspensão bacteriana relativa a uma cultura de 24 horas (aproximadamente 10⁸ células/mL). Os camundongos foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, onde foram alojados em gaiolas plásticas em estantes ventiladas à temperatura ambiente, recebendo água filtrada e ração *ad libitum* por até 14 dias. Todo o experimento foi conduzido de acordo com Andrade (2002).

Cinquenta por cento dos animais de cada grupo foram sacrificados e necropsiados no 7^o e no 14^o dia pós-infecção (pi). Órgãos como o fígado e o baço dos animais foram excisados e fixados em formalina (solução de formol a 10%) para análise histopatológica. Além disso, foram coletados isoladamente, para análise de citocinas pró-inflamatórias, o intestino e os linfonodos mesentéricos desses animais.

4.7.2 Avaliação histopatológica do baço e fígado dos camundongos

O baço e o fígado dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as amostras bacterianas e aqueles do grupo controle obtidos no 7^o e no 14^o dias pi e fixados em formalina foram desidratados em soluções alcoólicas de diferentes concentrações e incluídos em blocos de parafina. Cortes de aproximadamente 4 µm foram obtidos em micrótomo (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemanha). para

montagem de lâminas de microscopia, que foram então coradas com hematoxilina-eosina, para posterior análise microscópica.

As lâminas obtidas foram codificadas e enviadas ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências biológicas da UFMG, e as análises histopatológicas foram realizadas sem a identificação da origem dos tecidos. As análises foram realizadas pela Profa. Dra. Denise Carmona Cara, seguida da emissão de laudo hitopatológico. Para fins de análise de dados foi criado um código para qualificar ausência de lesões, lesões discretas, moderadas e intensas nos cortes histológicos avaliados. Os parâmetros avaliados foram: (i) no fígado - degeneração hepática, comprometimento da arquitetura do tecido, necrose e dilatação dos sinusoides; (ii) no baço – hipertrofia e hiperplasia das polpas branca e vermelha.

4.7.3 Avaliação da produção de citocinas no intestino dos camundongos

Após a excisão dos intestinos dos animais no 7^o e no 14^o dias pi, os órgãos foram separadamente macerados com solução de extração (0,4 de NaCl, 10mM de NaPO₄, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM de cloreto benzetônio, 10 mM de EDTA, 20 pM de aprotina, 0,05% de PBS tween 20), até a completa diluição dos tecidos. O macerado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram separados para as dosagens de TNF-, IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-17.

A determinação das citocinas presentes nos sobrenadantes resultantes da maceração dos intestinos dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as amostras bacterianas parental ou selecionadas após exposição e cultivos nas concentrações subinibitórias dos antimicrobianos, foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se Kits comerciais para dosagem IL-6, IL-10, TNF-, IFN- γ (BD Opteia TM, Sandiego – Ca, USA) e para IL-17 (eBioscience, San Diego – CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para dosagem das citocinas TNF-, IFN- γ , IL-6 e IL-10, placas de 96 poços (Maxishorp) foram sensibilizadas com 100 L de anticorpo de captura (anti-citocina específico) em uma diluição de 1:250 e incubadas a 4°C. Após 24 horas, a placa foi

lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS/tween-20, 10x). Os poços foram bloqueados com o diluente, incubados a temperatura ambiente por 1 hora, e logo após, lavados 5 vezes com o mesmo tampão. Foram então adicionados 100 L/poço da amostra diluída 2 vezes e feita a curva de calibração, a placa foi incubada por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes, foi adicionado o anticorpo de detecção 100 L/poço (1:250), o sistema incubado a temperatura ambiente por 1 hora e posteriormente lavado por mais 10 vezes. Em seguida adicionou-se 100 L do substrato/poço, e as placas foram incubadas por 30 minutos no escuro, finalizando com 50 L da solução de parada/poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. A quantidade da citocina foi calculada a partir da curva-padrão, obtida por diferentes concentrações da citocina recombinante.

Para dosagem da citocina IL-17, placas de 96 poços (Maxishorp) foram sensibilizadas com 100 L de anticorpo de captura (anti-citocina específico) em uma diluição de 1:250 e incubadas a 4°C. Após 24 horas, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS/tween-20, 10x). Os poços foram bloqueados com o diluente, incubados a temperatura ambiente por 1 hora, e logo após, lavados 5 vezes com o mesmo tampão. Foram então adicionados 100 L/poço da amostra diluída 2 vezes e feita a curva de calibração, a placa foi incubada por 16 horas a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes, foi adicionado o anticorpo de detecção 100 L /poço (1:250), o sistema incubado a temperatura ambiente por 1 hora e posteriormente lavado por mais 5 vezes. Em seguida adicionou-se 100 L de avidina-HRP diluído em 1X de diluente, o sistema foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e as placas foram novamente lavadas por 7 vezes. Só neste momento, foi adicionado 100 µL do substrato/poço, e as placas foram incubadas por 15 minutos no escuro, finalizando com 50 L da solução de parada/poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. A quantidade da citocina foi calculada a partir da curva-padrão, obtida por diferentes concentrações da citocina recombinante.

4.8. Análise estatística

Quando necessário, os dados obtidos foram avaliados quanto à sua significância estatística com o auxílio do *software GraphPad Prism 5*. Foram utilizados os testes de análise de variância (*One-way Anova*) para a comparação de médias, o teste *t* pareado para comparação entre médias e o teste de *Tukey* para comparação múltipla. Foram considerados significativos valores $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação das concentrações subinibitórias das drogas

Considerando-se os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos determinados para a amostra parental *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, foi considerada a última concentração abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), como concentração subinibitória (CSI) das drogas ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol. Apesar de os resultados obtidos de CIM para a amostra parental estarem de acordo com o esperado, considerando-se como referência o manual M11-A7 do CLSI (2007), foi definido especificamente para ampicilina CSI = 2µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos da amostra *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, segundo o CLSI (2007) e determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos.

Antimicrobianos	CIM (µg/mL)	CSI (µg/mL)
Ampicilina	32	2
Ampicilina/sulbactam	2	1
Clindamicina	2	1
Cloranfenicol	4	2
Metronidazol	0,25	-

Após a seleção das linhagens em cultivos sucessivos na presença e na ausência dos antimicrobianos nas CSI determinadas, a reavaliação do perfil de susceptibilidade mostrou sensibilidade diminuída de todas as linhagens bacterianas obtidas, em relação à linhagem de *B. fragilis* parental para os mesmos antimicrobianos (Tabela 3).

Tabela 3. Reavaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens de *B. fragilis* selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos, cultivadas na presença ou não das drogas.

Linhagem	AMP	AMS	CLO	CLI	MTZ
Bf parental	32	2	4	2	0,25
BfAMP *	64	4	16	16	2
BfAMP	64	4	16	8	2
BfAMS *	32	32	4	2	1
BfAMS	32	16	4	2	1
BfCLO *	64	4	16	2	2
BfCLO	64	4	8	2	2
BfCLI *	64	4	4	16	4
BfCLI	64	4	4	4	4

* Linhagens cultivadas na presença dos respectivos antimicrobianos nas concentrações subinibitórias mínimas. AMP – ampicilina, AMS – ampicilina/sulbactam, CLO – cloranfenicol, CLI – clindamicina, MTZ - metronidazol

De maneira geral, para a linhagem BfAMS, quando cultivada na presença do antimicrobiano, observou-se alteração de 4 vezes na sua CIM para ampicilina/sulbactam e alteração de 2 vezes na CIM para o metronidazol. Não foi observada alteração significativa (> 1 vez o valor de CIM) para os outros antimicrobianos como ampicilina, clindamicina e cloranfenicol. É notório que a mesma amostra cultivada sem o antimicrobiano teve alteração de 3 vezes o valor da CIM para a associação ampicilina/sulbactam.

Por outro lado, embora a linhagem BfAMP tenha apresentado alteração do perfil de susceptibilidade à clindamicina quando cultivada na presença e na ausência da ampicilina (alteração de 3 e 2 vezes o valor da CIM, respectivamente), observou-se variação discreta (1 ou 2 vezes o valor de CIM) para o perfil de susceptibilidade à ampicilina/sulbactam e ao cloranfenicol. Para o metronidazol, observou-se variação de 3 vezes no valor da CIM.

Considerando-se a linhagem BfCLO, não foi observada alteração nos valores de CIM para clindamicina e alteração discreta nos valores de CIM (2 vezes) foi detectada para ampicilina e a associação ampicilina/sulbactam. Para o cloranfenicol foi observado alteração de 2 e 3 vezes nos valores de CIM quando a linhagem foi cultivada na presença ou na ausência do antimicrobiano. Como observado para

linhagem BfAMP, a linhagem BfCLO apresentou variação na CIM para o metronidazol de 3 vezes.

Embora o padrão de alteração na CIM da linhagem BfCLI cultivada na presença e na ausência de clindamicina tenha sido semelhante ao já observado para as drogas ampicilina, ampicilina/sulbactam (aumento de 2 vezes), não foi observado alteração no valor de CIM para o cloranfenicol. Alterações mais significativas foram observadas em relação à clindamicina, variação de 3 e 2 vezes no valor de CIM quando BfCLI foi cultivada ou não na presença do antimicrobiano e alteração de 4 vezes o valor de CIM para o metronidazol.

5.2 Avaliação do efeito das drogas na morfologia celular e em características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas obtidas

Alteração morfológica nas células bacterianas foram observadas nas linhagens BfAMP e BfAMS. As alterações foram mais evidentes no primeiro cultivo das bactérias BfAMS na presença dos antimicrobianos, no qual as células se mostraram filamentosas e eventualmente com formação de bulbos centrais, com alteração da largura e o citoplasma mais densamente corado.

Após a primeira passagem as alterações na morfologia celular voltaram gradativamente à forma original em relação à amostra parental. No entanto, as alterações foram mais discretas, bem como a volta do aspecto celular normal foi evidenciado com mais rapidez na linhagem BfAMP. Para as linhagens mostras BfAMS, a área média das células aumentou aproximadamente 7 vezes nos primeiros cultivos na presença do antimicrobiano, enquanto que a área média das células BfAMP aumentou na razão de apenas 2 vezes nos primeiros cultivos na presença da ampicilina.

As linhagens expostas a clindamicina e cloranfenicol mostraram pouca ou nenhuma filamentação, como observado especialmente com as células BfCLO (Figuras 1 e 2). Além disso, as análises de citometria de fluxo confirmaram os dados relacionados à alteração na morfologia celular, sobretudo no primeiro cultivo das bactérias na presença das CSI dos antimicrobianos.

Foram detectadas tanto alterações na morfologia, quanto na complexidade celular, sobretudo na linhagens BfAMS que apresentou cerca de 22% das células presentes na suspensão do primeiro cultivo alteradas em forma e complexidade. Embora as análises mostrem pouca alteração nas outras linhagens (BfAMP – aproximadamente 6%, BfCLO – aproximadamente 4%, e BfCLI – aproximadamente 2% de células alteradas em forma e complexidade), estas alterações não foram significativas, sobretudo no décimo cultivo na presença dos antimicrobianos. Ainda que pouco significativo, observou-se, ainda, que as alterações celulares relacionadas às linhagens BfAMP e BfAMS foram associadas, principalmente ao parametro complexidade celular (Figura 3).

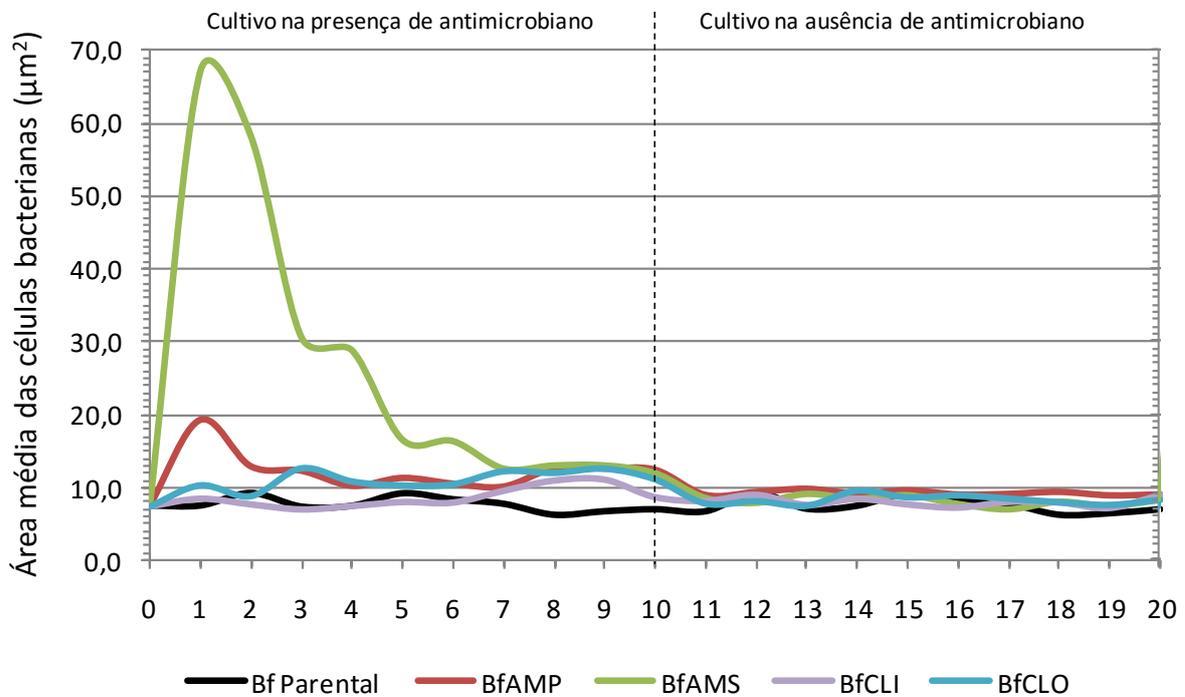


Figura 1. Representação gráfica da área média das células de *Bacteroides fragilis* visualizadas após coloração de Gram, durante exposição a CSI ou não de diferentes antimicrobianos (10 passagens na presença das drogas e 10 passagens na ausência das drogas).

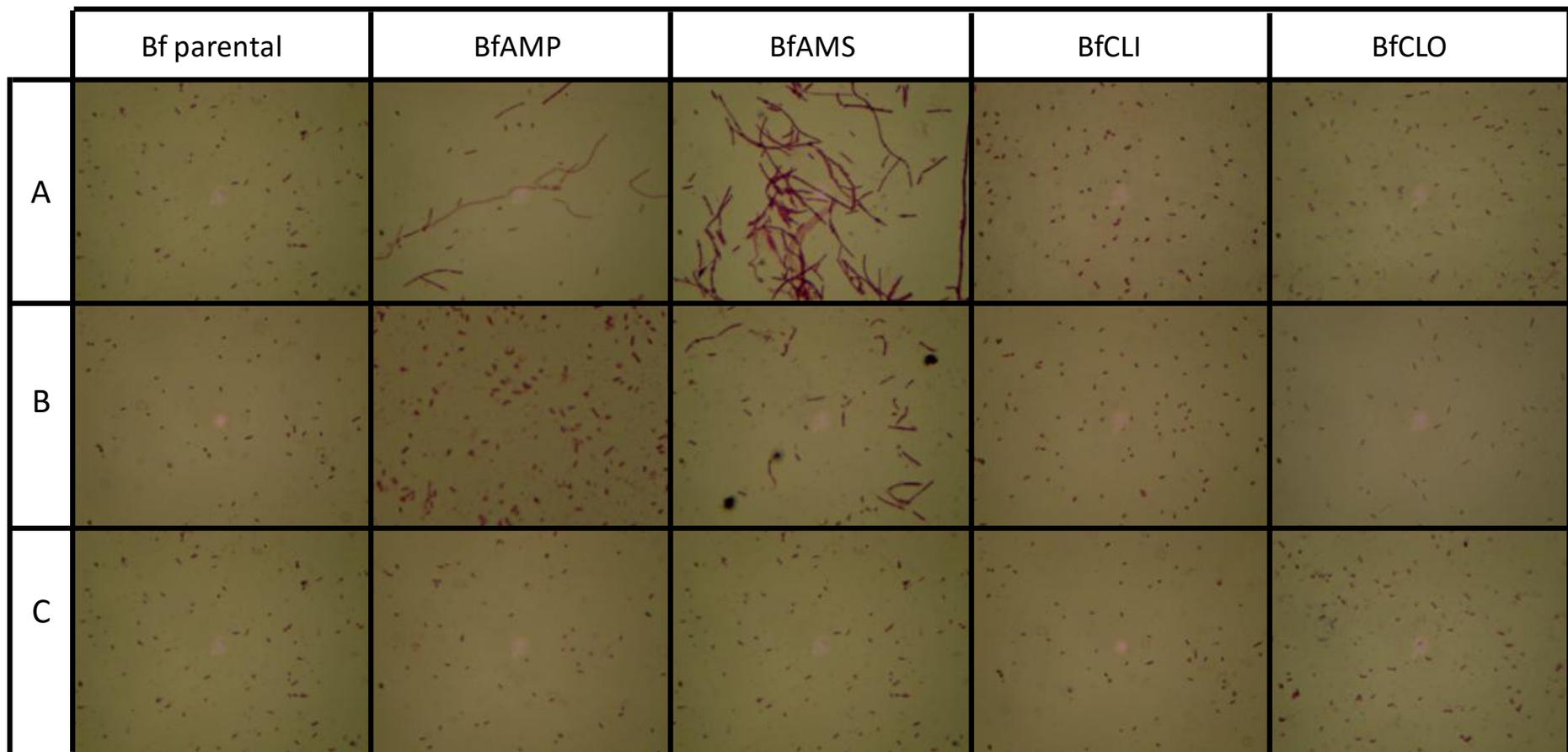


Figura 2. Aspecto das células de *Bacteroides fragilis* parental e selecionadas pela exposição a CSI de drogas antimicrobianas visualizadas após coloração pelo método de Gram. A – primeira passagem na droga; B – décima passagem na droga; C – décima passagem na ausência de drogas antimicrobianas. Aumento de 1000X.

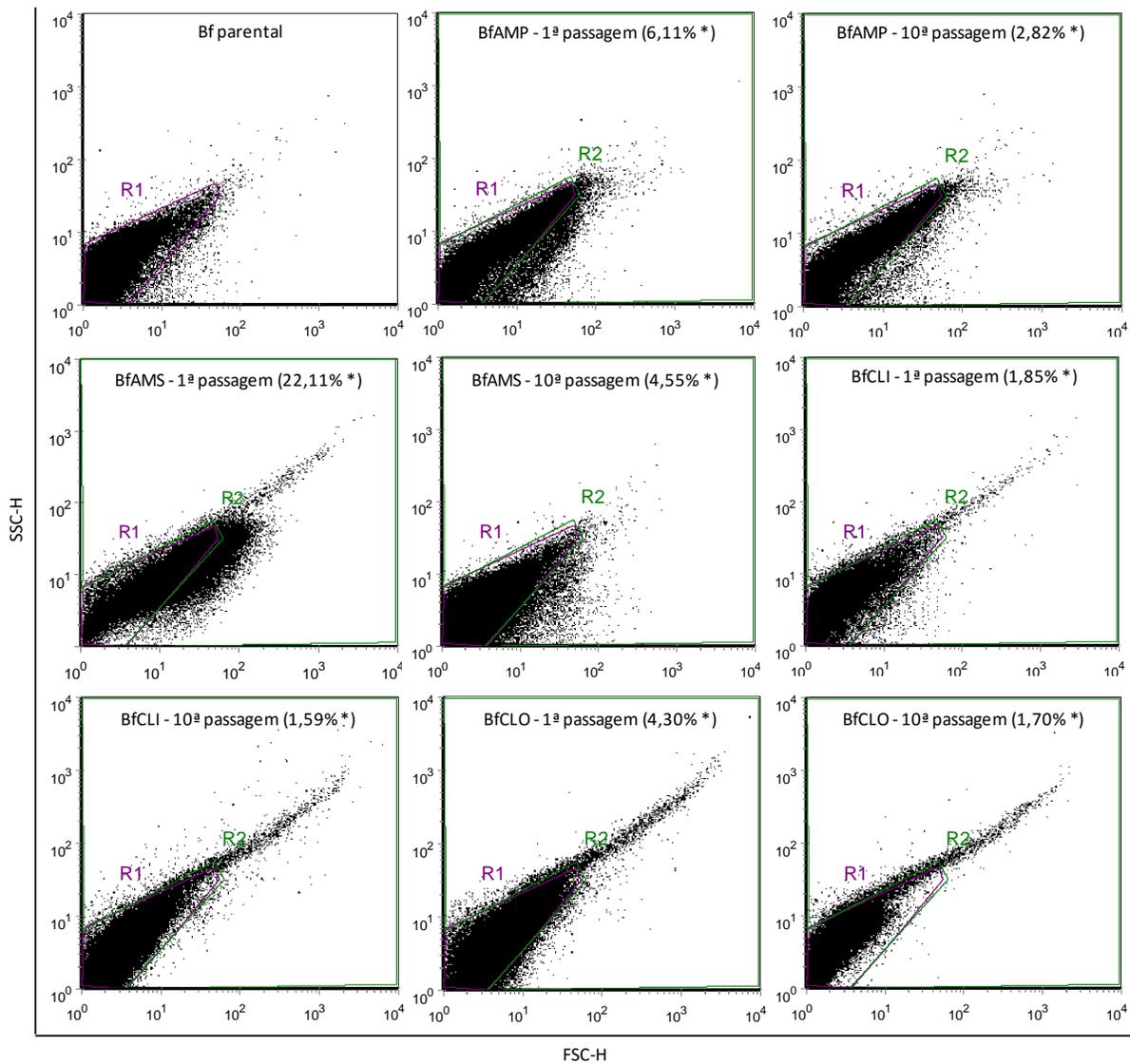


Figura 3. Representação gráfica do tipo *dot plot* da avaliação por citometria de fluxo das células de *Bacteroides fragilis* após a 1ª e a 10ª passagem das culturas na presença das CSI dos diferentes antimicrobianos. R1 - região de concentração das células de morfologia típica; R2 - região de concentração das células de morfologia alterada em relação ao controle Bf parental. FSC – eixo relacionado à alteração de morfologia; SSC – eixo relacionado à complexidade celular.

Considerando-se os padrões de crescimento das linhagens bacterianas selecionadas pela exposição à CSI dos antimicrobianos, observou-se que as linhagens BfCLI e BfCLO exibiram padrões de crescimento mais próximos ao da linhagem Bf parental. Não foram detectadas alterações significativas nos níveis populacionais totais e no tempo de geração bacteriano (TG), sendo determinado TG de 2 horas para a

linhagem parental, 2,3 horas para a linhagem BfCLI e 2,8 horas para a linhagem BfCLO. Por outro lado, o padrão de crescimento das linhagens BfAMP e BfAMS mostraram-se bastante alterados. Embora os níveis populacionais totais tenham sido semelhantes para a linhagem BfAMP se comparados às outras amostras bacterianas em estudo, seu TG foi de aproximadamente 3,5 horas durante o crescimento exponencial. O mesmo não foi observado para a linhagem BfAMS, cujo TG foi o mais discrepante entre os microrganismos estudados, aproximadamente 4 horas, e os níveis populacionais totais na cultura foram aproximadamente 50% menores do que o observado para as outras linhagens bacterianas, parental e selecionadas em CSI dos antimicrobianos (Figura 4).

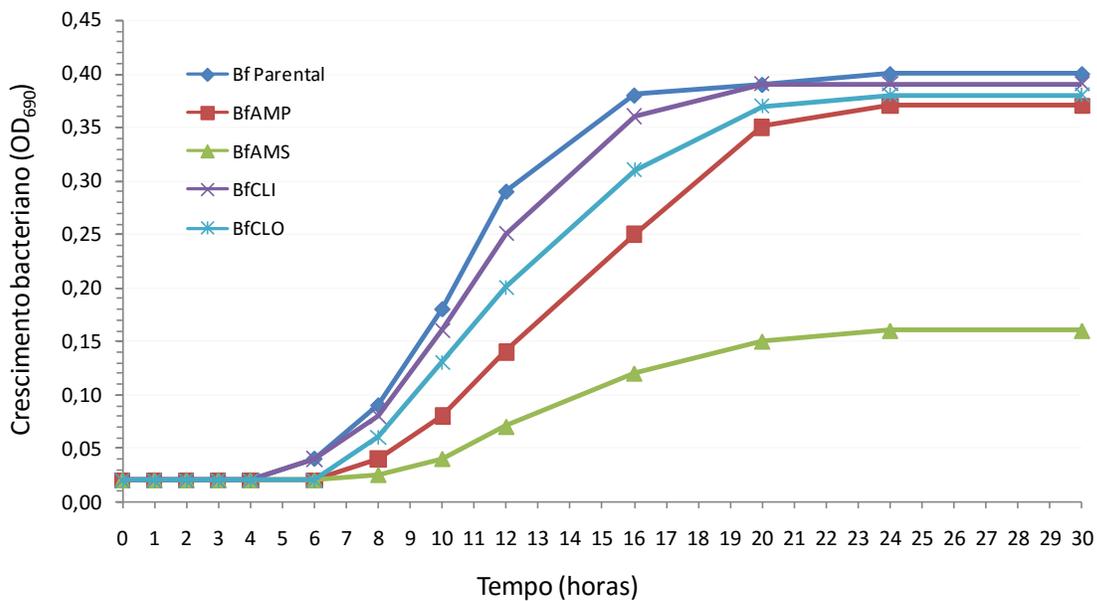


Figura 4. Representação gráfica da curva de crescimento das linhagens de *Bacteroides fragilis* selecionadas pela exposição a CSI de diferentes antimicrobianos.

A avaliação das características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO após cultivo na presença dos antimicrobianos e após 10 passagens na ausência das drogas mostrou que a exposição aos antimicrobianos foi capaz de induzir alterações nos padrões bioquímicos e fisiológicos bacterianos, se comparado com a amostra Bf parental (Anexo 2). Estes achados indicam que o fenótipo das linhagens adaptadas aos antimicrobianos pode não se manifestar da mesma forma no metabolismo bacteriano. Considerando-se a diversidade de habilidades avaliadas nos 28 testes para detecção da produção de enzimas, tolerância e assimilação de substratos, foi construída uma matriz de similaridade e os dados organizados em um fenograma de similaridade.

Os dados representados no fenograma mostram que as linhagens BfCLO cultivadas na presença ou na ausência das drogas antimicrobianas apresentaram comportamento bioquímico e fisiológico mais semelhante à amostra Bf parental, se comparado às outras linhagens. Apesar das linhagens BfAMP e BfCLI apresentarem comportamento semelhante, o seu cultivo na presença dos antimicrobianos favoreceu um fenótipo mais próximo ao da amostra parental em relação às mesmas bactérias cultivadas na ausência das drogas. Além disso, os dados permitem sugerir que as linhagens BfAMS cultivadas tanto na presença quanto na ausência dos antimicrobianos apresentaram comportamento bioquímico e fisiológico singular.

De acordo com o fenograma, o comportamento das bactérias selecionadas pela exposição à associação ampicilina/sulbactam se aproxima mais da linhagem de *B. fragilis* parental quando cultivada na ausência de drogas, em relação às mesmas bactérias cultivadas na presença de CSI da associação antimicrobiana (Figura 5).

Em relação à capacidade de formação de biofilmes pelas diferentes linhagens bacterianas (BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO), observou-se que esta habilidade também mostrou-se altamente alterada pela exposição bacteriana a CSI dos diferentes antimicrobianos.

BfAMP foi a única população com capacidade de formação de biofilme significativo quando cultivada na presença de CSI de antimicrobiano, embora o biofilme formado tenha sido significativamente menor do que o formado pela amostra Bf parental. Para as linhagens BfAMS e BfCLO, observou-se uma capacidade de

formação de biofilme significativamente maior pelas bactérias cultivadas na ausência dos antimicrobianos o que sugere uma interferência negativa dos antimicrobianos nesta habilidade bacteriana. Por outro lado, observou-se que a amostra BfCLI crescida ou não na presença do antimicrobiano mostrou capacidade altamente diminuída na formação de biofilme, se comparada à amostra parental, o que sugere estabilidade nesta característica nestas amostras de *B. fragilis*, se comparada à habilidade de formação de biofilme da amostra Bf parental (Figura 6).

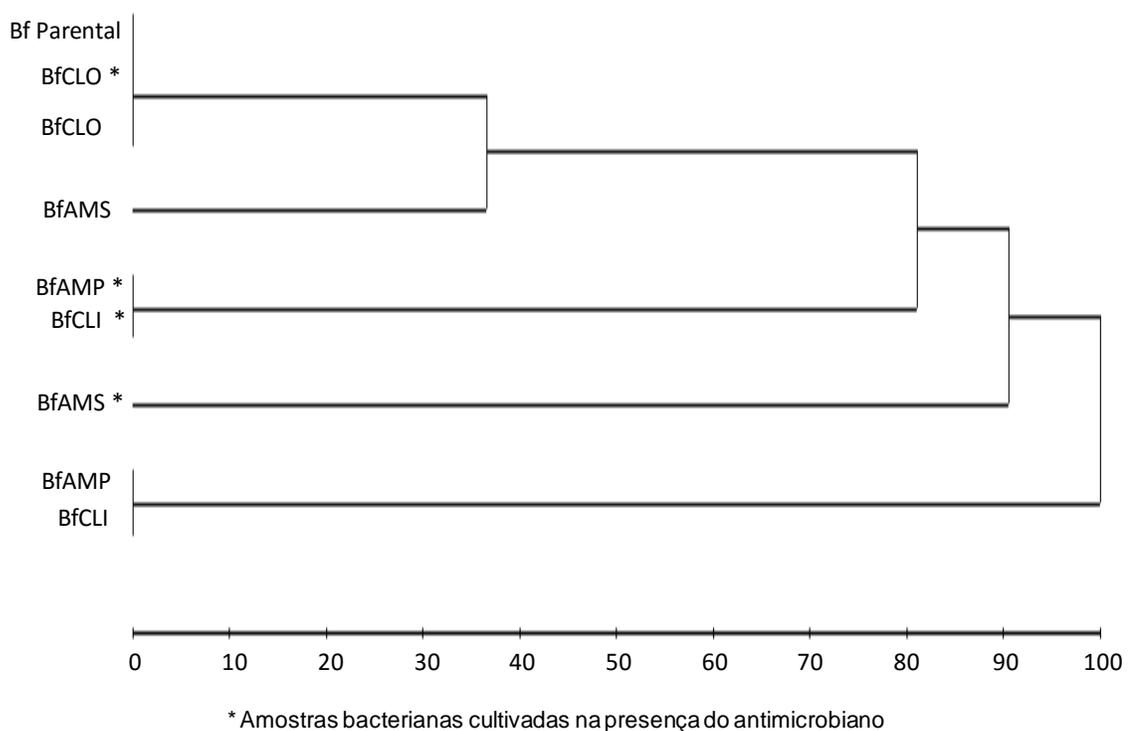


Figura 5. Fenograma de similaridade UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) de resultante da comparação dos perfis bioquímicos e fisiológicos obtidos para as diferentes linhagens bacterianas de *B. fragilis* selecionadas pela exposição a CSI de antimicrobianos cultivadas na presença e na ausência das drogas, utilizando o coeficiente de Dice com *bootstrap* de 1000 réplicas.

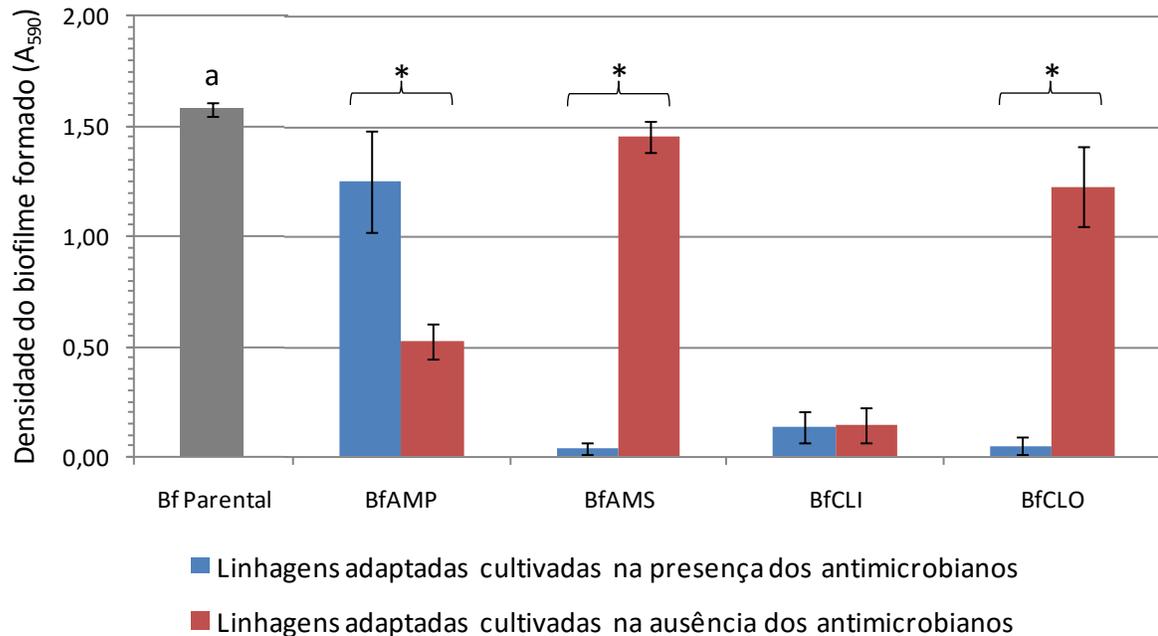


Figura 6. Representação gráfica da habilidade bacteriana de formação de biofilme comparativamente entre a linhagem *Bacteroides fragilis* parental e as linhagens derivadas selecionadas pela exposição à CSI de drogas antimicrobianas. * e a indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.3 Avaliação dos padrões de expressão protéica

Os perfis de expressão de proteínas totais solúveis foi comparado para as diferentes amostras de *B. fragilis* selecionadas pela exposição a CSI de antimicrobianos por SDS-PAGE. Como observado nas figuras 5 e 6, várias diferenças nos padrões de bandeamento protéico foram detectadas em relação às diferentes linhagens e a linhagem Bf parental. Os experimentos foram reproduzidos pelo menos 3 vezes e os resultados observados são típicos. Foram verificadas bandas protéicas para linhagem parental ausentes nas linhagens BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO, bem como bandas diferencialmente evidenciadas nas amostras selecionadas na presença do

antimicrobiano e ausentes na amostra parental. Para melhor visualização dos perfis de expressão protéica foram utilizados géis de 8% (Figura 7) e de 15% de poliacrilamida (Figura 8).

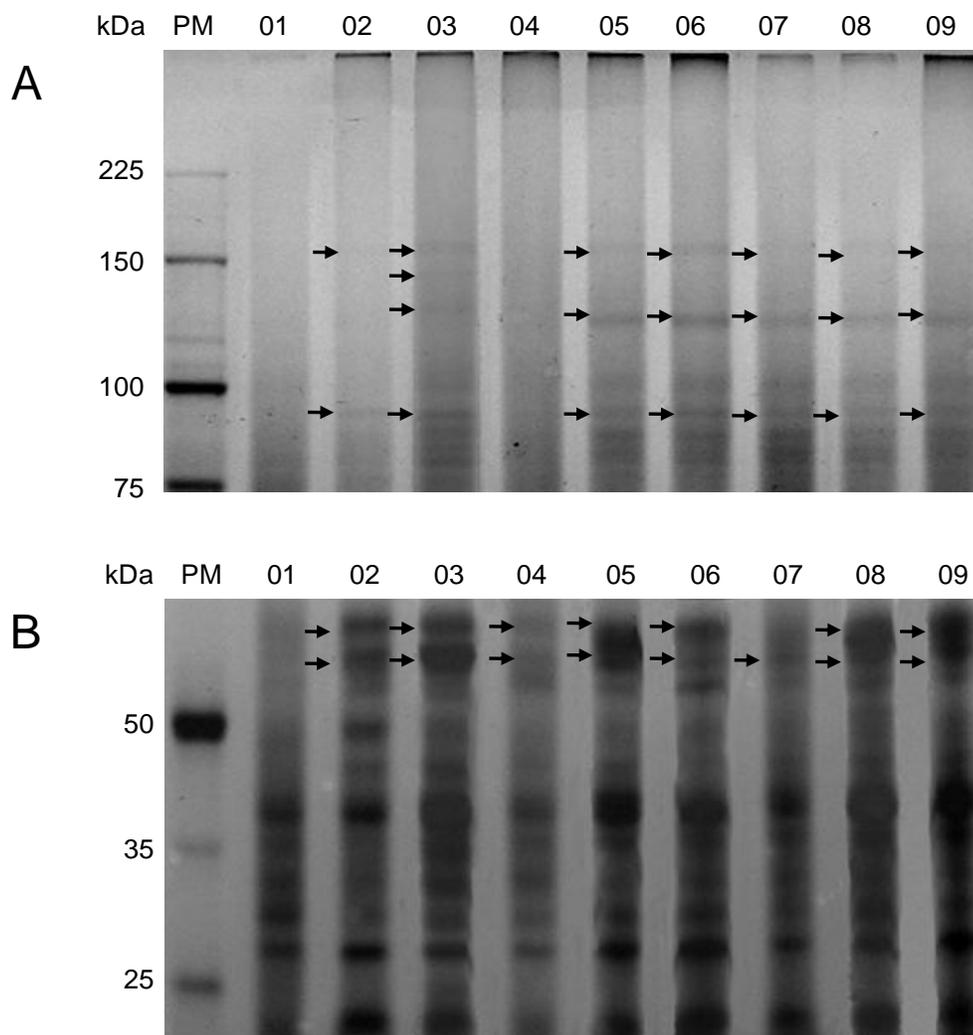


Figura 7. Análise do perfil de proteínas solúveis das linhagens de *Bacteroides fragilis* em SDS-PAGE, 8%. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga. As setas pretas indicam a presença de proteínas ausentes na linhagem parental.

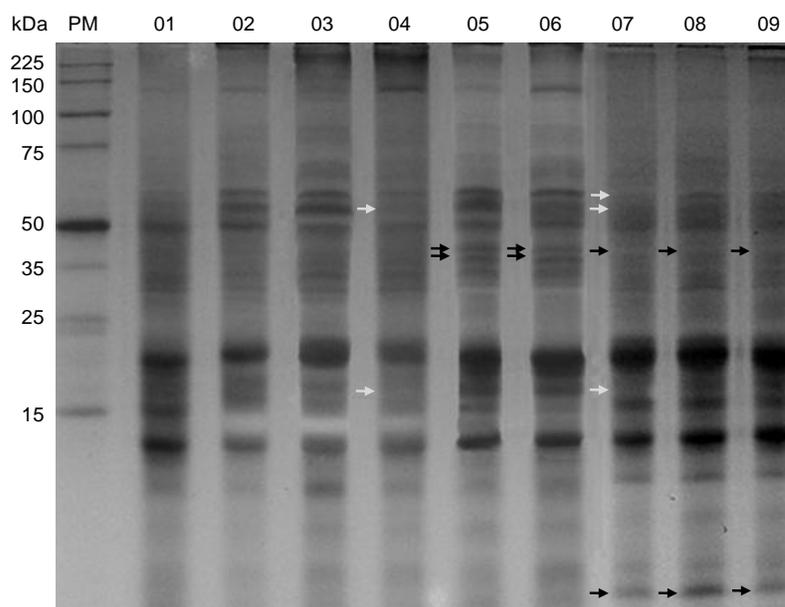


Figura 8. Análise do perfil de proteínas solúveis das linhagens de *Bacteroides fragilis* em SDS-PAGE, 15%. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga. As setas pretas indicam a presença de proteínas ausentes na linhagem parental e as setas brancas indicam a presença de proteínas ausentes nas linhagens selecionadas pela exposição aos antimicrobianos.

5.4 Avaliação dos padrões genéticos das linhagens bacterianas

A amplificação de segmentos dos genes localizados na região variável espaçadora intergênica entre o RNAr 16S e 23S de *B. fragilis* permitiu a confirmação específica das 4 linhagens bacterianas BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO selecionadas pelo cultivo na presença e na ausência dos antimicrobianos (Figura 9).

Além disso, de acordo com a técnica de genotipagem realizada neste estudo (AP-PCR), não foram observadas bandas de DNA polimórficos, o que sugere semelhança genética entre as linhagens obtidas, sem a evidência da ocorrência de mutações ou reorganizações gênicas durante o processo de seleção bacteriana pela exposição a CSI dos diferentes antimicrobianos (Figura 10).

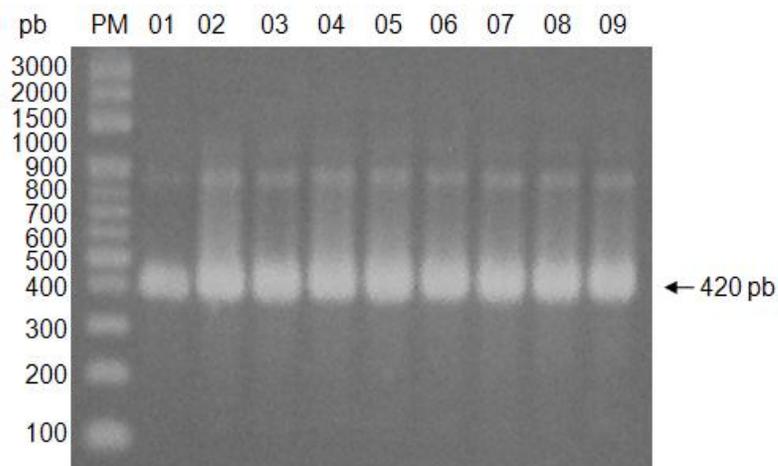


Figura 9. Identificação molecular das linhagens de *Bacteroides fragilis* por PCR utilizando os iniciadores específicos. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga.

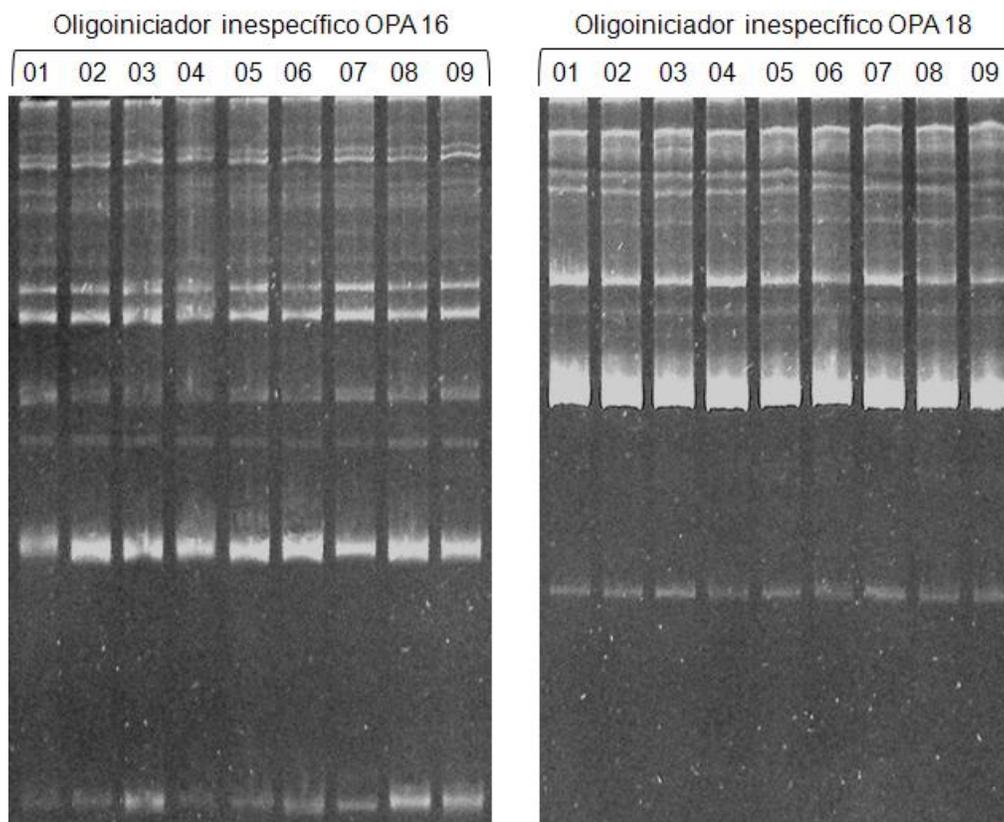


Figura 10. Genotipagem das linhagens de *Bacteroides fragilis* com diferentes iniciadores aleatórios, por AP-PCR. Canaletas: PM - padrão de peso molecular; 01 - Bf parental; 02, 04, 06 e 08 – BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO; 03, 05, 07 e 09 - BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO na ausência de droga.

5.5 Avaliação das alterações na interação bactéria-hospedeiro

A análise histopatológica do baço dos camundongos desafiados com as diferentes linhagens bacterianas selecionadas pela exposição a CSI dos antimicrobianos mostrou que o órgão esteve alterado em todos os grupos no 7º dia pi (pós-infecção). Nos cortes histológicos foram observadas lesões moderadas relacionada a áreas de hiperplasia folicular linfóide com centro germinativo sugestivo de grande atividade imunológica, além de hipertrofia da polpa vermelha. Por outro lado, nos cortes histológicos referentes aos órgãos avaliados após o 14º dia pi, não foram evidenciadas alterações significativas nos baços retirados dos camundongos do grupo controle.

Para os outros grupos, o comprometimento do órgão se manteve, sendo detectadas lesões moderadas relacionada a áreas de hiperplasia folicular linfóide com centro germinativo sugestivo de grande atividade imunológica além de hipertrofia da polpa vermelha, exceto para o grupo desafiado com a linhagem BfCLI, cuja lesão neste momento, se mostrou discreta (Figuras 11).

De maneira geral, a análise histopatológica do fígado dos camundongos desafiados com as diferentes linhagens bacterianas mostrou que 7 dias pi, a infecção gerou um quadro de degeneração hepática, com discreta desestruturação da arquitetura do órgão nos grupos controle e Bf parental. Além disso, lesão aparente não foi observada para o grupo BfAMP.

Entretanto, já neste período de infecção, as alterações foram mais pronunciadas nos animais desafiados com as linhagens selecionadas pela exposição a CSI das drogas. Para estes animais, lesões moderadas foram observadas para o grupo BfCLI e

lesões intensas foram observadas para os grupos BfAMS e BfCLO. Os lóbulos hepáticos foram identificáveis, porém, com dilatação dos capilares sinusóides, que pode estar relacionada com congestão vascular. Ainda, nos grupos onde a lesão foi intensa, observou-se pequeno foco inflamatório e necrose, mas sem quadro hemorrágico.

Aos 14 dias pi, foi observada manutenção do grau de lesão hepática pela avaliação histológica do fígado dos animais desafiados com as linhagens selecionadas pela exposição à CSI das drogas, com exceção do fenômeno observado para o grupo dos animais desafiados com BfAMP. Para estes animais, somente 14 dias pi foi observada lesão discreta relacionada aos parâmetros: degeneração hepática, comprometimento da arquitetura do fígado e dilatação dos sinusóides. Já para os animais do grupo controle e Bf parental, não foram observadas lesões aparentes neste período (Figura 12)

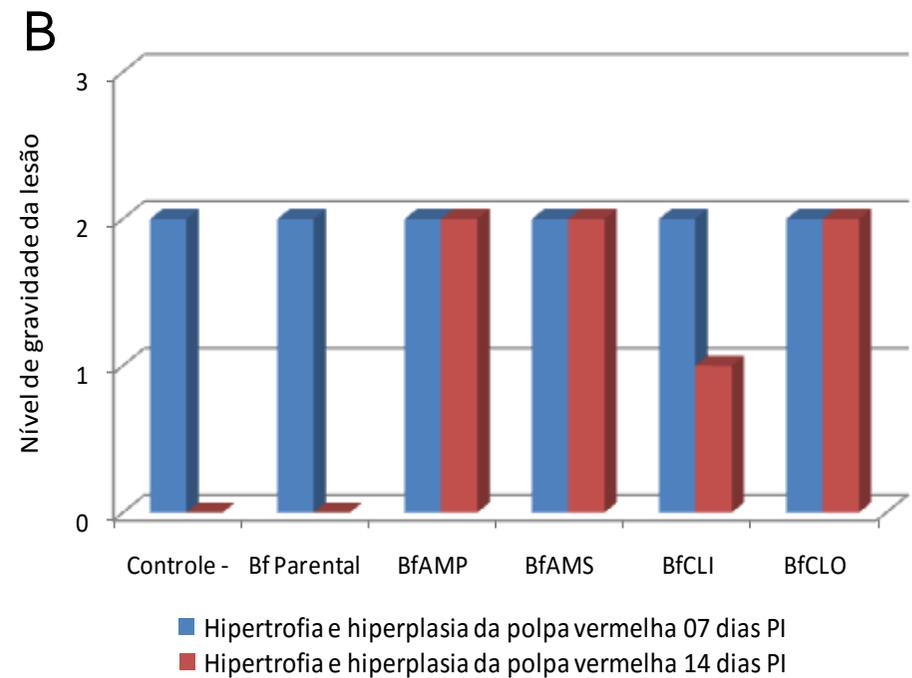
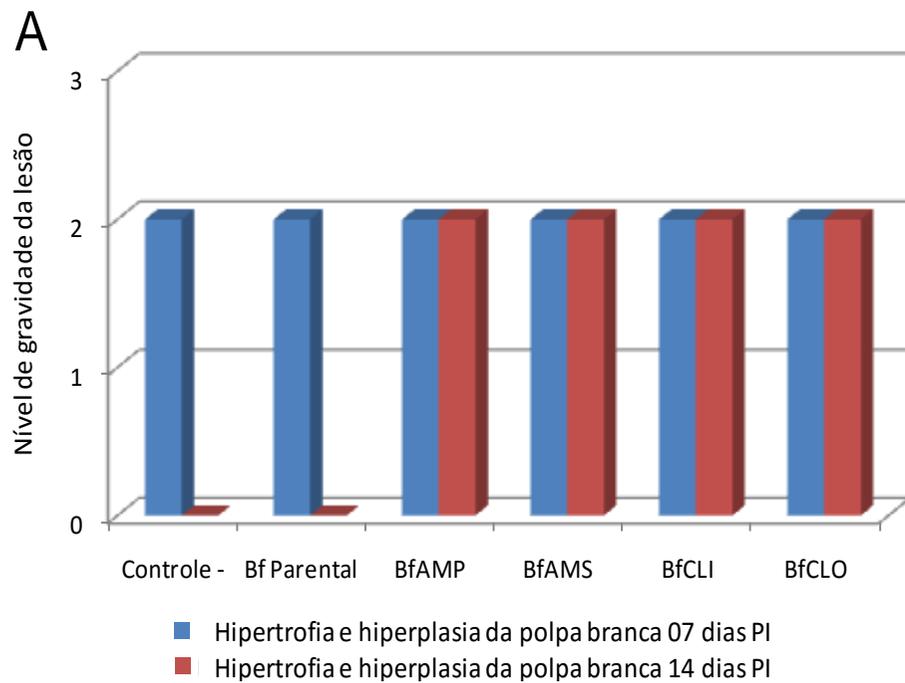


Figura 11. Representação gráfica da análise histopatológica do baço dos camundongos desafiados com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 - lesão moderada e 3 – lesão intensa. A: avaliação de polpa branca; B: avaliação de polpa vermelha.

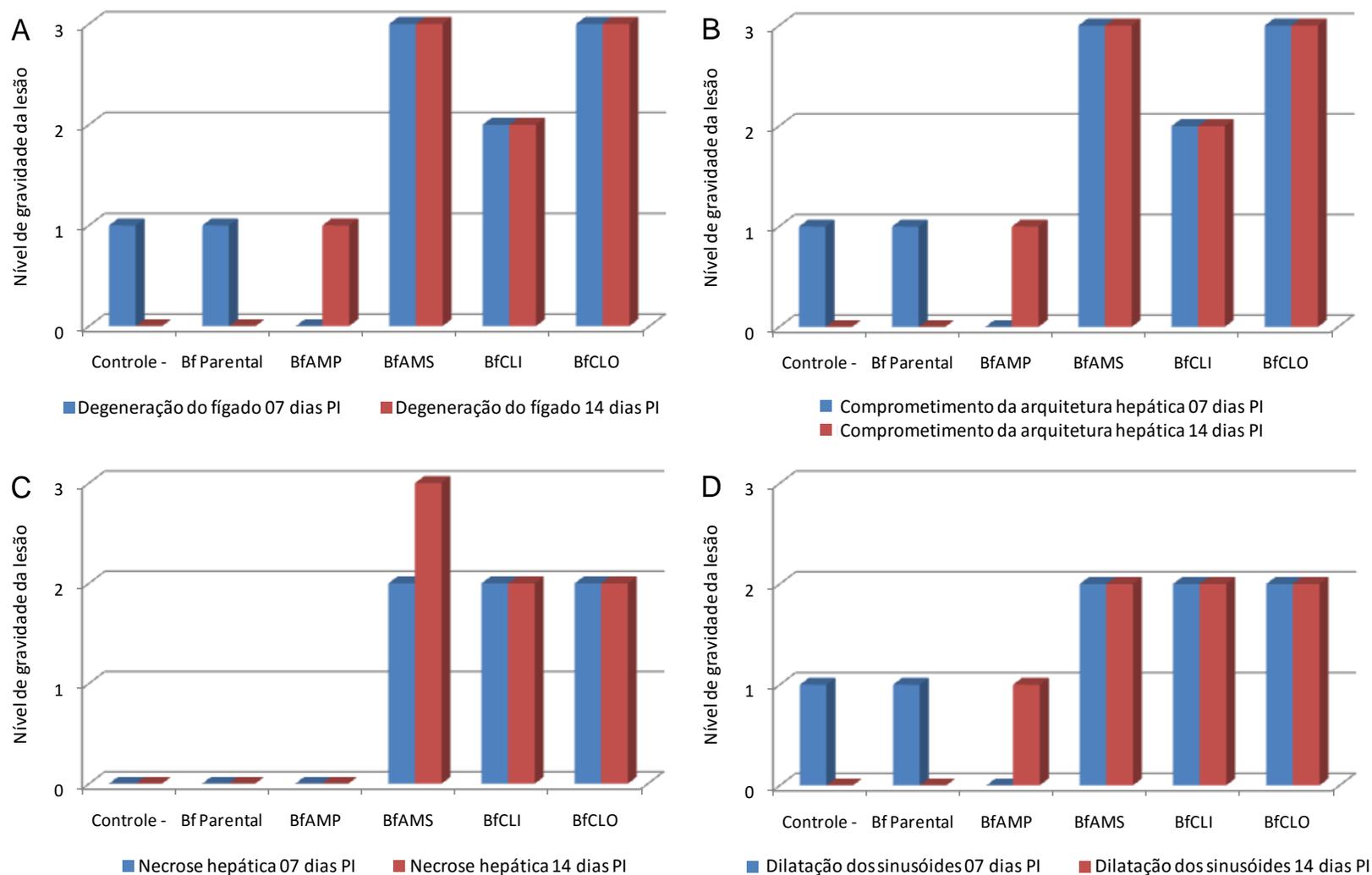


Figura 12. Representação gráfica da análise de parâmetros histológicos do fígado (A a D) dos camundongos desafiados com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 - lesão moderada e 3 – lesão intensa.

Em relação à análise do perfil de citocinas quantificadas no sobrenadante de macerado dos intestinos dos camundongos desafiados com as diferentes linhagens bacterianas selecionadas pela exposição a CSI dos antimicrobianos, observou-se grande variação nos níveis destas substâncias (Figura 13).

Considerando-se a dosagem de IFN- γ , foi detectado um aumento significativo desta citocina no sobrenadante do homogeneizado de intestino dos camundongos infectados com a linhagem BfAMS, sobretudo no 7^o dia pi. Para os outros grupos de animais, incluindo aqueles desafiados com a linhagem Bf parental, não houve alteração significativa nos níveis de IFN- γ , embora tenha sido observado uma diminuição significativa desta citocina no intestino dos animais desafiados com as linhagens BfAMS e BfCLO do 7^o para o 14^o dia pi.

Os níveis de IL-6 mostraram-se significativamente aumentados no 7^o dia pi no grupo de camundongos desafiados com as linhagens Bf parental e BfCLI em relação ao 14^o dia pi. Embora, os níveis de IL-6 no 7^o dia pi nos camundongos desafiados com Bf parental seja aparentemente superior àqueles medidos nos outros grupos experimentais, a análise estatística mostra que apenas o grupo de animais desafiados com a linhagem BfAMP apresenta níveis estatisticamente inferiores desta citocina. Por outro lado, no 14^o dia pi observa-se um aumento moderado de IL-6 no intestino dos animais do grupo BfCLI e BfCLO, enquanto que aumento significativo foi observado no grupo BfAMP e BfAMS, quando comparados aos animais desafiados com a linhagem Bf parental.

Para IL-17, assim como para IL-6, houve uma diminuição significativa nos níveis da citocina do 7^o para o 14^o dia pi no intestino dos animais desafiados com as linhagens Bf parental e BfCLI, quando comparados aos dados obtidos para os outros grupos. No 14^o dia pi, apesar dos níveis de IL-17 serem aparentemente maiores em todos os grupos em comparação ao controle desafiado com Bf parental, estes valores não foram estatisticamente significativos. Entretanto, considerando-se apenas o grupo dos animais desafiados com a linhagem BfAMS, observa-se aumento significativo nos níveis de IL-17 entre o 7^o e o 14^o dia pi. De maneira geral, neste ponto da infecção, ou seja, no 14^o pi observa-se uma manutenção do processo inflamatório nos grupos experimentais com exceção do grupo controle que mostrou decréscimo notório nos níveis de IL-6 e IL-17.

Quanto à IL-10, o grupo de animais desafiados com BfAMS mostrou níveis elevados da citocina no 7º dia pi em relação aos outros grupos incluindo o controle desafiado com Bf parental. Entretanto, no 14º dia pi a produção diminuiu significativamente nos grupos Bf parental, BfAMP e BfAMS, enquanto que para BfCLO e BfCLI os níveis foram discretamente mais baixos tanto no 7º quanto no 14º dia pi. Esta diminuição, embora desigual entre os diferentes grupos de camundongos, indica manutenção do processo inflamatório no intestino destes animais, sobretudo naqueles desafiados com as linhagens BfAMP e BfAMS.

Considerando-se a produção de TNF- α e sua dosagem nos intestinos dos animais desafiados com as diferentes linhagens de *B. fragilis*, foram observadas diferenças pouco significativas entre os grupos, embora houvesse diminuição significativa nos grupos desafiados com as linhagens Bf parental e BfAMS do 7º para o 14º dia pi e além disso, uma tendência de aumento nos níveis da citocina no grupo desafiado com a linhagem BfCLI do 7º para o 14º dia pi. De maneira geral, entre os grupos, houve diminuição significativa nos níveis de TNF- α detectados nos intestinos dos animais desafiados com a amostra Bf parental e a linhagem BfCLI, no 7º dia pi. Já no 14º dia pi não foram observadas alterações significativas, apesar dos níveis discretamente maiores da citocina observados para os grupos de animais desafiados com as linhagens bacterianas selecionadas pela exposição a CSI de antimicrobianos, em relação ao grupo desafiado com a linhagem Bf parental.

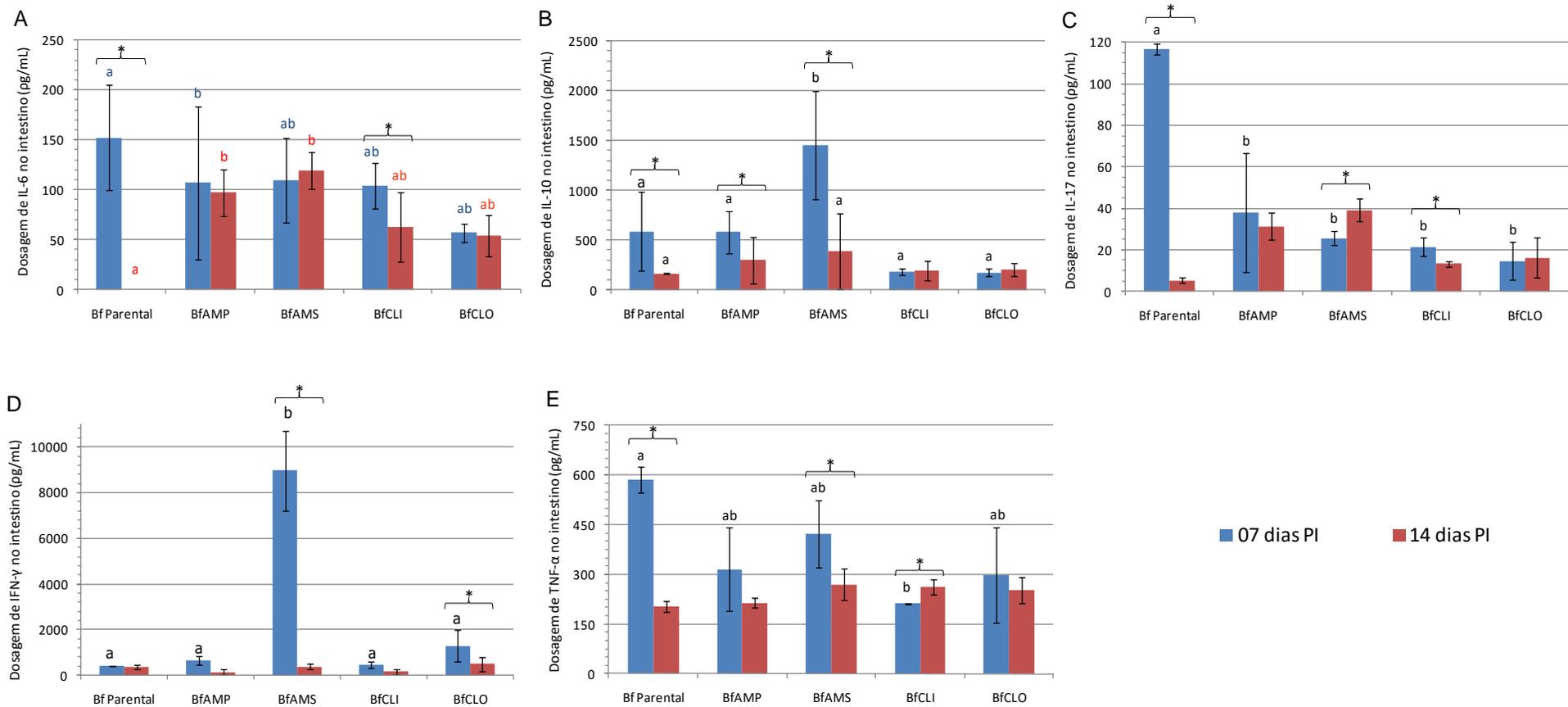


Figura 13. Representação gráfica dos valores médios das dosagens de citocinas no sobrenadante dos intestinos dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as linhagens de Bf parental, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO após 7 ou 14 dias de infecção experimental. A: IL-6; B: IL-10; C: IL-17; D: IFN- γ ; E: TNF- α . *, **a** e **b** indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação das concentrações subinibitórias das drogas

Espécies bacterianas do chamado grupo *Bacteroides fragilis* são componentes importantes da microbiota intestinal residente, e estão presentes em associação aos seres humanos e outros animais desde as primeiras fases da vida. A espécie *B. fragilis*, típica do grupo, é o bastonete Gram-negativo anaeróbio estrito mais frequentemente isolado de infecções clínicas (WEXLER, 2007).

Neste estudo, foi determinado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos ampicilina, à associação ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol e metronidazol para a linhagem de referência *B. fragilis* ATCC 25285, considerada linhagem Bf parental. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) das drogas estão de acordo com os valores esperados, segundo o CLSI (2007) no seu documento M11-A7, que orienta os testes de susceptibilidade para bactérias anaeróbias. Assim, foram consideradas como concentrações subinibitórias (CSI) as concentrações de drogas abaixo das CIM. Entretanto, em relação à ampicilina, se considerado que o valor de CIM foi de 32µg/mL, a CSI seria 16µg/mL. Neste caso, foi utilizada a concentração de 2µg/mL como CSI para que a sua adição nos experimentos não fosse tão discrepante em relação aos outros antimicrobianos. Na reavaliação do perfil de susceptibilidade das linhagens após seleção por exposição às CSI das drogas e o cultivo na presença ou ausência dos antimicrobianos, observou-se alteração nas CIMs para a maioria das drogas testadas. De acordo com o manual disponível (CLSI, 2007) deverá ser considerada significativa, alteração de 2 vezes ou mais a CIM de um determinado antimicrobiano, sendo que alterações menores, embora sugiram uma avaliação qualitativa, estão dentro do erro padrão do experimento.

Peterson et al. (1999) mostraram que após a exposição de 24 h de *B. fragilis* ATCC 23745 para esparfloxacina a análise da CIM aumentou de quatro a oito vezes

para cinco fluoroquinolonas, após passagens em meio livre de antimicrobiano a resistência permaneceu estável. Entretanto nenhuma alteração foi notada para outras drogas como cloranfenicol, clindamicina, metronidazol e cefoxitina. Pumbwe et al. (2006) demonstraram que após a seleção de mutantes de *Bacteroides* multirresistentes pela exposição ao detergente dodecil sulfato de sódio, e drogas antimicrobianas, as alterações nos perfis de susceptibilidade a estas e outras substâncias poderia estar relacionada a superexpressão de genes de bomba de efluxo.

Além disso, outros autores também observaram o fenômeno de alteração do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos associados à exposição de outros microrganismos, como *Burkholderia*, *Bacteroides* e *E. coli* a antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, metronidazol e quinolonas. Em todos os casos, mesmo após cultivo das linhagens selecionadas na ausência dos antimicrobianos, os fenótipos de diminuição de sensibilidade ou resistência permaneceram inalterados (CHEN et al., 2005; GEORGE e LEVY, 1983; HAUßLER et al., 1999; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2004; SANTOS et al., 2005; ANDRADE, 2010).

Assim, sugere-se que, no nosso estudo, tal como relatado pelos outros autores, a seleção microbiana pela exposição bacteriana às CSI das drogas tenha sido suficiente para modulação de habilidades microbianas e eliminação das subpopulações mais susceptíveis. Entretanto, a volta parcial do fenótipo de maior sensibilidade das linhagens, ainda que qualitativo (associado a alteração < 2 vezes a CIM), observado para as linhagens BfAMP e BfCLI à clindamicina, BfAMS à associação ampicilina/sulbactam e BfALO ao cloranfenicol, sugere que estas alterações sejam dependentes da pressão seletiva constante dos antimicrobianos.

Clinicamente, as espécies de *Bacteroides* têm revelado uma crescente resistência a muitos antibióticos, incluindo os beta-lactâmicos, lincosamidas como a clindamicina, metronidazol, cloranfenicol e fluoroquinolonas, dentre outros. Estas espécies têm apresentado vários mecanismos de resistência, como escape da ação das drogas, sendo a produção da enzima β -lactamase um dos principais. Outros mecanismos podem estar presentes, como a prevenção da interação entre o antibiótico e os seus alvos e alteração de rotas metabólicas. Além disso, no caso de bactérias Gram negativas onde há presença de uma membrana externa rica em poros que facilitam o

trânsito de antibióticos, podem ocorrer mudanças nestes poros e conseqüente impermeabilização das células ou efluxo ativo (DINIZ et al., 2004; SPÍŽEK e ŘEZANKA, 2004; PUMBWE et al., 2006; PUMBWE, GLASS e WEXLER, 2006; SANTOS et al., 2007a; WEXLER, 2007; SANTOS et al., 2010).

Assim, os dados obtidos neste estudo, especialmente a observação da diminuição da sensibilidade cruzada ente ampicilina, clindamicina e cloranfenicol, pode sugerir, como já relatado e descrito por outros autores, a indução de mecanismos de resistência comuns, como bombas de efluxo, considerando-se que estes antimicrobianos possuem mecanismos de ação diferentes na célula bacteriana. Essa observação pode ser sustentada uma vez que as linhagens BfCLI e BfCLO não mostraram sensibilidade diminuída ao cloranfenicol e clindamicina, respectivamente.

Os agentes β -lactâmicos agem na estrutura da parede celular bacteriana, o peptidoglicano. Estes se ligam a enzimas reguladoras chamadas de proteínas ligadoras de penicilina (PBP – *penicillin-binding proteins*) inibindo a formação das ligações cruzadas entre as cadeias de peptidoglicano. Isto, por sua vez, ativa as autolisinas que degradam a parede celular, o que resulta na morte da célula bacteriana. A produção de β -lactamases pelos microrganismos tem sido descrita como um dos principais fatores de resistência aos β -lactâmicos, e são comumente codificadas pelo gene *cepA* em isolados clínicos de *B. fragilis*, ou raramente por *cfxA*, que também contribui para o alto nível de resistência. Várias outras β -lactamases têm sido também descritas entre os *Bacteroides* spp. As metalo β -lactamases descritas são codificadas pelo gene *cifA*, sugerido como o fator de contribuição para a resistência aos carbapenêmicos (PAULA et al., 2004). Entre os agentes β -lactâmicos, os mais ativos (ou seja, aqueles para os quais a resistência varia de 2% a 5%) são as combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase, como ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulanato e piperacilina/tazobactam (HECHT, 2004).

A clindamicina apresenta uma boa atividade contra o grupo *B. fragilis*. Infelizmente, o número de linhagens resistentes à clindamicina tem aumentado desde a década de 90 (TANAKA-BANDO et al. 1995). Os mecanismos de resistência propostos incluem a metilação de uma ou duas adeninas do RNA ribossômico, levando a uma diminuição da afinidade da droga para o seu alvo ou efluxo ativo. Entre

Bacteroides spp., os genes mais frequentemente identificados são *ermF*, *ermG* e *ermB* (LOFMARK et al.,2006; PUMBWE et al., 2006)

O cloranfenicol age através da inibição da peptidiltransferase ribossômica em bactérias e, conseqüentemente, impede a síntese protéica. A resistência ao cloranfenicol foi encontrada em várias espécies de bactérias. Em alguns casos, a resistência pode ser devido à relativa impermeabilidade ao antimicrobiano, sistemas de efluxo, inativação por fosfotransferases e a mutação do alvo ribossomal. Entretanto, acredita-se que o principal mecanismo de resistência seja a inativação do antibiótico por acetilação enzimática, pela enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) que foi originalmente observada em isolados de *E. coli* e bactérias entéricas relacionadas. Estudos posteriores mostraram que espécies de *B. fragilis* podem expressar cloranfenicol acetiltransferase. O gene *cat*, já identificado em *Bacteroides*, é o responsável pela codificação das enzimas CAT (BRITZ e WILKINSON, 1978, BURNHAM et al.,2000).

6.2 Avaliação do efeito das drogas na morfologia celular e em características bioquímicas, fisiológicas e moleculares das linhagens bacterianas obtidas

Atualmente, questões relacionadas ao fenômeno da resistência bacteriana, como reflexo direto das alterações induzidas pelos antimicrobianos nas células bacterianas, envolvem variações nos padrões morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Neste estudo a análise dos padrões morfológicos, bioquímicos e fisiológicos das linhagens selecionadas em concentrações subinibitórias das drogas antimicrobianas mostrou alterações evidentes, como filamentação celular, formação de bulbos ao longo dos filamentos e alterações nos padrões bioquímicos e fisiológicos com destaque para os padrões de fermentação de carboidratos. De maneira geral, as alterações fisiológicas, entretanto, foram observadas com maior intensidade nas linhagens bacterianas expostas às CSI de ampicilina e ampicilina/sulbactam.

Formas alongadas de *B. fragilis* foram observadas quando expostas à clindamicina por Silvestro et al. (2006). Entretanto em nosso estudo não foram observadas filentações significativas em resposta a este antimicrobiano, bem como ao cloranfenicol. Outros autores também evidenciaram formas aberrantes de linhagens bacterianas incluindo *Bacteroides* spp. e outros gêneros, tanto de Gram negativos quanto de Gram positivos, quando em contato com outras drogas antimicrobianas. De maneira geral, as alterações incluem a filentação celular e podem ser reversíveis quando os microrganismos são cultivados na ausência de drogas e estão relacionadas, muitas vezes a alteração nos padrões de degradação e reciclagem de proteínas, mudanças nas características bioquímicas e fisiológicas dos microrganismos e inibição de enzimas autolíticas que atuam no início da separação celular, causando o alongamento (KLEIN e LUGINBUHL, 1977; LORIAN e GEMEL, 1994; GUSS e BAWDON, 1984; CAVALCANTI et al., 1991; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2003; FONSECA et al., 2004; SANTOS et al., 2007).

De maneira mais específica, considerando-se drogas β -lactâmicas, vários relatos tem sido documentados. Klein e Luginbuhl, em 1977 relataram que células de *Haemophilus influenza* exibiram formas filamentosas quando expostas à concentrações inibitórias de ampicilina; Moosdeen, Williams e Yamabe (1988), além de Santos et al. 2007, mais recentemente, relatam a filentação de *E. coli* expostas a diferentes concentrações de β -lactâmicos associados ou não a inibidores de β -lactamases. Ainda, sugeriu-se que o sulbactam sozinho estaria associado, também à filentação destas bactérias, além de associado à filentação e formação de bulbos ao longo do filamento em *Proteus mirabilis*. Fonseca et al. (2004) documentaram formas filamentosas em *Pseudomonas aeruginosa* quando expostas a piperacilina-sulbactam. Jacques et al. (1991) mostraram que linhagens de *Pasteurella multocida* quando expostas a concentrações subinibitórias de penicilina apresentaram alterações morfológicas e de crescimento. Por outro lado, linhagens de *Bordetella bronchiseptica* não apresentaram mudanças significativas quando submetidas à pressão seletiva pela mesma droga. Os autores sugerem que o fenômeno depende não só do tipo da droga utilizada, mas também do microrganismo, e principalmente da interação droga-microrganismo. Fang et al. (2002) relacionaram as mudanças morfológicas encontradas

em *Bacteroides thetaiotaomicron* expostas a cefoxitina e relacionaram estas alterações às PBPs. As PBPs são os alvos da ligação dos agentes β -lactâmicos e são essenciais para o crescimento das bactérias. A inativação de PBP-3 tem como resultado, na bactéria, o crescimento com longos filamentos não septados.

Assim, do exposto, sugere-se, neste trabalho, que as alterações mais expressivas observadas nas linhagens BfAMP e BfAMS, após as primeiras passagens em ampicilina e, sobretudo à associação ampicilina/sulbactam, poderiam estar relacionadas ao efeito sinérgico entre ampicilina e sulbactam, uma vez que, no último caso, houve maior filamentação e formação de bulbos.

Chen et al. (2005) também relataram a reversão das alterações morfológicas de *Burkholderia pseudomallei* após exposição a níveis subinibitórios de ceftazidima, ofloxacina, ou trimetoprim. De acordo com os autores, células filamentosas voltaram a forma normal. Além disso, foi verificada também alterações nos padrões fisiológicos das bactérias quando estavam em contato com os antimicrobianos. As implicações clínicas de bactérias com morfologia alterada são evidentes e devem ser esclarecidas nos laboratórios de microbiologia. Os microbiologistas clínicos devem estar cientes do potencial aparecimento de bacilos ou cocos filamentosos em amostras clínicas para evitar confusão com os fungos e outros organismos naturalmente filamentosos, especialmente da avaliação de espécimes clínicos provenientes de pacientes sob antibioticoterapia ou com histórico do uso destes medicamentos recente. Os profissionais de saúde, por sua vez devem considerar a possibilidade de que formas filamentosas podem indicar que concentrações sub-terapêuticas de antibióticos estão sendo atingidas no local da infecção (WOJNICZ et al., 2007).

Diversos estudos *in vivo* mostram que mais de 99% das espécies bacterianas conhecidas, incluindo *B. fragilis*, podem naturalmente colonizar superfícies, formando biofilmes. Um biofilme pode ser definido uma comunidade bacteriana de uma ou mais espécies agregadas por uma matriz polimérica aderentes a superfícies vivas ou inanimadas (WEINACHT et al., 2004; PUMBWE et al., 2007b).

A aderência bacteriana às superfícies permite que estes organismos sejam resistentes aos mecanismos de dispersão mecânica associado a superfícies como aqueles relacionados ao trato gastrointestinal durante a colonização das superfícies

mucosas (WILSON, 2002). Embora a adesão seja essencial para a manutenção da microbiota e seu hospedeiro, a formação de um biofilme é o primeiro estágio de uma doença infecciosa, relacionado à adesão bacteriana e que inclui infecções associadas a dispositivos protéticos, endocardites, doenças orofaciais, respiratórias e do trato gastrointestinal e geniturinário, dentre outras (WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010). Os mecanismos exatos pelos quais células bacterianas podem aderir às camadas de células epiteliais ou às secreções como as camadas de mucina são, ainda, desconhecidos, embora diferentes tipos de interações pili/fímbria e adesão mediada por adesinas estejam frequentemente envolvidos (DONLAN, 2001; WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010).

No nosso estudo, observou-se que as diferentes linhagens bacterianas selecionadas pela exposição à CSI de drogas antimicrobianas apresentaram diferentes padrões de formação de biofilme, se comparado à linhagem Bf parental. Como um todo, observa-se que as diferentes drogas antimicrobianas foram capazes de interferir de maneira peculiar nos padrões de aderência bacteriana à superfície. A linhagem BfAMP foi a única população com capacidade de formação de biofilme significativo quando cultivada na presença de CSI de antimicrobiano, embora menos denso que aquele formado pela linhagem parental. Para as linhagens BfAMS e BfCLO, observou-se uma capacidade de formação de biofilme significativamente maior pelas bactérias cultivadas na ausência dos antimicrobianos, o que sugere uma interferência negativa dos antimicrobianos nesta habilidade bacteriana. Por outro lado, observou-se que a linhagem BfCLI crescida ou não na presença do antimicrobiano mostrou capacidade altamente diminuída na formação de biofilme, sugerindo uma interferência negativa e estável do antimicrobiano nesta habilidade.

Vários estudos mostram que diferentes substâncias químicas, desde sais biliares encontrados no trato gastrointestinal, quanto substâncias antimicrobianas, peptídeos naturais, desinfetantes e ainda substâncias antissépticas podem modular a expressão de biofilmes bacterianos. Assim, percebe-se que a literatura é diversa e, em muitos casos, observa-se esforço direcionado ao entendimento da dinâmica entre as condições ambientais adversas e os padrões de colonização microbiana, que pode ter reflexo não só na sua biologia, mas também nas suas relações com seus hospedeiros

(DONLAN, 2001; WILSON, 2002; WEINACHT et al., 2004; MACFARLANE, WOODMANSEY e MACFARLANE, 2005; VIEIRA et al., 2005b; WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010; OLIVEIRA et al., 2010; FOGAÇA et al., 2010; HELLMARK et al., 2010; ODUWOLE et al., 2010; LOVETRI e MADHYASTHA, 2010).

É de se considerar que a exposição de organismos unicelulares de ciclo de vida curto a condições ambientais de estresse pode, muitas vezes, resultar em alterações no comportamento fisiológico, com reflexos nos resultados dos testes convencionais de avaliação bioquímica e fisiológica. Este fato pode ser observado pelo fenograma obtido que mostra o distanciamento fenotípico das diferentes linhagens bacterianas em relação à amostra Bf parental, tal como observado por outros autores (SANTOS et al., 2007a; DINIZ et al., 2004; SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Comparando-se os perfis de expressão protéica das amostras parental e selecionadas pela exposição à CSI dos antimicrobianos, cultivadas ou não na presença das drogas, podemos reforçar a evidencia da interferência destes antimicrobianos na biologia destes anaeróbios. Foram observadas bandas protéicas de diferentes pesos moleculares expressas ou não nos extratos brutos das linhagens BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO, se comparado à amostra Bf parental.

Diferenças dessa magnitude podem não resultar da acumulação de mutações e sim parte de um amplo programa de controle genético que altera a fisiologia celular para proteção contra os danos produzidos pelos antimicrobianos. Estas alterações globais, enquanto não completamente elucidadas, embora proteínas relacionadas à estrutura e metabolismo já tenham sido identificadas em *Bacteroides* e outras espécies microbianas, podem ter outros efeitos significativos nos organismos, como aqueles relacionados à alterações nos padrões de virulência microbianos como já documentado (ROCHA et al. 1996; ROCHA E SMITH 1997; DINIZ et al., 2004; SANTOS et al., 2010; FLETCHER et al. 2001).

De maneira geral, estas alterações nos perfis protéicos podem também estar relacionadas a alterações fisiológicas que podem ter resultado nos perfis bioquímicos e fisiológicos alterados observados neste estudo. Entretanto, estas alterações nos perfis de expressão protéica devem ser mais investigadas nestes microrganismos pela

utilização de metodologia mais sensível, como a eletroforese bidimensional, tal como preconizado e sugerido pela literatura já citada.

A técnica de AP-PCR tem sido extensivamente utilizada na bacteriologia de anaeróbios, dentre outras áreas da ciência, para estudos relacionados à clonalidade e detecção de polimorfismos no genoma celular relacionada aos estudos epidemiológicos para avaliação de semelhança entre organismos relacionados taxonomicamente (GEORGE et al., 1997; CAMARENA et al. 1995; SONG 2005; SANTOS, 2007).

Neste estudo, a combinação de dois oligonucleotídeos iniciadores inespecíficos e aleatórios permitiu a verificação de grande proximidade clonal entre as diferentes linhagens bacterianas avaliadas nas diferentes condições de cultivo, se comparada à linhagem Bf parental. As observações relacionadas aos experimentos de genotipagem podem ser confirmadas pela re-identificação molecular das linhagens bacterianas, pela utilização de iniciadores específicos para amplificação de segmentos dos genes localizados na região variável espaçadora intergênica entre o RNAr 16S e 23S de *B. fragilis*, de acordo com metodologia proposta por Liu et al. (2003) já estabelecida em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2010).

Considerando-se a literatura disponível, a sensibilidade desta técnica pode estar relacionada a sutis alterações no DNA de várias espécies de seres vivos, incluindo as bactérias. A detecção destas alterações pode contribuir para o entendimento da resposta bacteriana frente à pressão exercida pelas drogas antimicrobianas, como o surgimento de linhagens resistentes e alterações decorrentes deste fenômeno (WELSH e MCCLELLAND, 1990). Assim, de acordo com Eribe e Oslen (2000), os oligonucleotídeos iniciadores OPA 16 e OPA 18 seriam suficientes para avaliação clonal de populações de *B. fragilis*. De maneira geral, nossos resultados permitem sugerir que as alterações observadas podem estar relacionadas com eventos associados à regulação de expressão gênica nestas bactérias, como observados nos testes de avaliação bioquímica e fisiológica.

Estudos têm demonstrado que embora possa haver alterações tanto morfológicas, fisiológicas e nos padrões de virulência bacterianos após exposição a antimicrobianos, ou a algum tipo de estresse ambiental, polimorfismos no DNA não são necessariamente detectados (FANG et al., 2002; SILVA et al., 2006). Por outro lado,

Santos et al. (2007b) detectou variações nos padrões de bandas gerados por AP-PCR após a exposição de *Prevotella intermedia* ao oxigênio molecular, e este fato não pôde ser considerado apenas uma resposta fenotípica adaptativa.

De maneira global, a observação das alterações nas características bioquímicas e fisiológicas das diferentes linhagens bacterianas, os perfis das curvas de crescimento indicando alteração nos tempos de geração bacteriano e níveis populacionais totais, além das alterações nos padrões de formação de biofilme, sugere-se que a seleção pela exposição à CSI dos antimicrobianos tenha reflexo nos padrões fenotípicos bacterianos. Estas alterações, e ainda outras não observadas neste estudo, podem se refletir em propriedades fisiológicas dos microrganismos, como antigenicidade celular, estrutura de parede, adesividade, metabolismo e susceptibilidade a defesas imunológicas do hospedeiro. Como consequência ecológica, este fenômeno poderia influir na patogenicidade destes microrganismos, comprovando que qualquer agente que possa alterar os padrões genéticos de uma população microbiana pode alterar sua virulência inicial.

6.3. Avaliação das alterações na interação bactéria-hospedeiro

Neste estudo, no qual espécies do grupo *B. fragilis* foram selecionadas por exposição a baixas concentrações de drogas antimicrobianas, foram observadas alterações na biologia destas bactérias, com reflexo no seu potencial agressor, tal como observado por outros autores (FERREIRA et al., 1989; LORIAN & GEMMELL, 1994; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2004, SANTOS et al., 2007b).

As interações patógeno-hospedeiro podem ou não resultar em dano ao hospedeiro. É aceito que citotoxicidade ou dano aos tecidos do hospedeiro seja componente da virulência microbiana (CASADEVALL E PIROFSKI, 1999). Neste estudo, para avaliação da alteração na virulência microbiana devido à exposição às diferentes drogas, o dano tecidual e a modulação imunológica avaliada pela expressão

de citocinas nos camundongos, foram utilizados como parâmetros de morbidade. A morbidade é um evento marcador de doença infecciosa mais prevalente do que a mortalidade (LEDERBERG, 1999). Assim, foi observado que todas as linhagens selecionadas pela exposição a CSIs de antimicrobianos foram capazes de induzir alterações qualitativas e quantitativas de diferentes intensidades no hospedeiro, como já relatado anteriormente para uma amostra de espécies de *Bacteroides* resistentes ou selecionadas após exposição a CSI de metronidazol, ertapenem e piperacilina/tazobactam (DINIZ *et al.*, 2000; DINIZ *et al.* 2003, SANTOS *et al.*, 2007b).

Embora as espécies de *Bacteroides* sejam da microbiota residente, estes microrganismos estão frequentemente associados a infecções de alta morbidade e mortalidade. No grupo, vários fatores de virulência têm sido descritos, além dos componentes relacionados à interferência direta com o sistema imunológico, como a produção de fatores de invasão como proteases e outras enzimas hidrolíticas; fatores de proteção, como a produção de catalases, peroxidases, superóxido-dismutase; fatores de modulação da população microbiana como as bacteriocinas; além de estruturas de aderência para colonização de superfícies (PETERSON,1996; DONLAN, 2001; WEXLER, 2007; WOLCOTT *et al.*, 2010; DICKSCHAT, 2010).

A partir do momento da exposição aos antígenos o sistema imune produz resposta, linfócitos T e B ativados atuam com a produção de anticorpos específicos e outros mecanismos, especialmente na ativação de macrófagos e a ativação de células citotóxicas. Esta resposta pode lesar células normais através da ativação do sistema complemento, ou mesmo da própria atividade citotóxica dos linfócitos CD8 e células natural killer. Assim, é evidente que os agentes agressores muitas vezes induzem lesão mediada pela resposta imunitária que evocam e não por seus efeitos diretos sobre os tecidos (CASADEVALL E PIROFSKI, 1999).

A reação inflamatória pode, então, ser responsável por lesões em órgão distantes da infecção, por exemplo, através da formação de imunocomplexos formados com antígenos bacterianos que podem circular e se depositar em diversos tecidos, provocando lesões. Constituindo assim respostas sistêmicas no organismo (SHMAGEL E CHERESHNEV, 2009). O conjunto de repostas sistêmicas é conhecido como reação de fase aguda e se caracteriza por uma mudança no padrão de síntese de proteínas no fígado e conseqüentes mudanças na resposta imunológica. Neste processo, os principais mediadores são as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidos no próprio tecido lesado. Ainda, os hepatócitos aumentam os níveis de expressão de algumas proteínas, como proteína C reativa, transferrina, fibrinogênios e componentes do complemento (MCCLAIN,1997).

Em nosso estudo, considerando-se o desequilíbrio de expressão de citocinas encontrado no intestino dos camundongos desafiados com as linhagens de *B. fragilis* selecionadas pela exposição às CSIs das diferentes drogas antimicrobianas, observa-se claramente uma resposta inflamatória em todos os grupos analisados. Verificou-se alteração nos padrões de citocinas no intestino de camundongos infectados pela linhagem BfAMS, com a produção exacerbada de IFN- γ no sétimo dia após a infecção (pi). Esta citocina desempenha um papel central e complexo na resistência dos mamíferos aos patógenos, como a estimulação da atividade bactericida dos fagócitos, a estimulação através da apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade classe I e classe II (MHC), na interação leucócito-endotélio e os efeitos sobre a proliferação celular. Além disso, a alta produção de IFN- γ é indicativa de lesão tecidual local, pois como citocina inflamatória está relacionada ao estímulo de células na produção de outras citocinas e melhoria na atividade citotóxica mediada pelas células do sistema imunológico (WANG, WANG e LIU, 1999).

Ainda que os níveis de TNF- α praticamente não diferiram entre os grupos, visto que é uma citocina inflamatória primária, justificando o decréscimo da citocina no décimo quarto dia pi no grupo Bf parental e BfAMS, está relacionada com a migração de células e estímulo à produção de outras citocinas como as IL-1, IL-6 e IL-8. Além disso, TNF- α também atua como estímulo à ativação de linfócitos T, no nosso modelo experimental pode ter contribuído significativamente para o processo inflamatório. Esta

citocina atua de modo endócrino, causando reações sistêmicas e estimulando principalmente, as atividades de ordem hepática e produção de citocinas como a IL-6 (PRABHA, et al., 2003; BENVENISTE E BENNO, 1995).

Os níveis de IL-6 e IL-17 foram significativamente elevados quando comparamos o grupo controle com os demais grupos tratados com as demais linhagens no sétimo dia de infecção, entretanto estes níveis decresceram no décimo quarto dia no grupo controle, enquanto que para os grupos infectados com BfAMP e BfAMS estes níveis se mantiveram, como possível manutenção do processo inflamatório, a IL-6 também é uma citocina inflamatória que está diretamente relacionada à produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (HEINRICH, CASTELL e ANDUS, 1990). Este fato sugere relação com as alterações encontradas na análise histopatológica do fígado uma vez que este órgão é responsável pela produção de proteína C reativa e componentes do sistema complemento, que embora não foram mensuradas estão diretamente relacionadas as infecções de fase aguda e sistêmica. Além disso, sua produção é extremamente estimulada pela IL-6 e este aumento pode eventualmente estar relacionado à lesão no órgão caracterizando uma inflamação sistêmica, principalmente pelo grupo desafiado com a linhagem BfAMS que apresentou os maiores níveis de IL-6 e altos graus de lesão no órgão.

Ainda, considerando-se a associação destas citocinas às lesões hepáticas observadas, é aceito que a ativação de linfócitos T pode estar relacionada a ativação de células de Kupffer, podendo provocar necrose hepática, através da perturbação da microcirculação, devido à destruição das células endoteliais e deposição de fibrina nos sinusóides hepáticos (MIMURA et al.2004). Estudos tem relacionado o aumento dos níveis de IL-6 a contribuição tanto para os sintomas locais quanto para os sistêmicos da artrite reumatóide, relacionando a IL-6 como um forte indutor da resposta de fase aguda, que pode resultar em febre, amiloidose secundária, anemia, e elevações em proteínas de fase aguda, como proteína C-reativa (CRONSTEIN,2007, FONSECA et al., 2009).

Os níveis iniciais de IL-10 mostraram-se elevados principalmente no grupo de animais desafiados com BfAMS. Esta observação pode ser associada com uma tentativa de controle da infecção. Sabe-se que a IL-10 é uma molécula que possui

várias características, tais como moduladora da resposta imune, que influencia profundamente o desenvolvimento e as formas de resposta Th1 e Th2 e reduz a sensibilidade das células aos efeitos do TNF- α (GIBSON, TZIANABOS e ONDERDONK,1996). A presença de IL-10 pode representar ainda uma resposta celular que influencia a diminuição dos níveis de TNF- α , uma vez que esta tem sido descrita como um mecanismo de autoregulação. Alguns estudos têm demonstrado níveis altos de IL-10 para antígenos de *B. fragilis*, principalmente polissacarídeos capsulares, sugerindo, o evento, como um mecanismo chave pelo qual *B. fragilis* pode suprimir o sistema imunológico para o estabelecimento do foco de infecção (GIBSON, TZIANABOS e ONDERDONK,1996).

A hiperplasia de polpa branca esplênica observada nos animais desafiados com as linhagens bacterianas selecionadas pela exposição a CSIs dos antimicrobianos pode sugerir que o aumento na quantidade de células da polpa branca esteja relacionado à proliferação de linfócitos. Acredita-se que essa observação possa estar relacionada ao processo inflamatório evidenciado pela produção de citocinas. Além disso, os grupos desafiados com as linhagens selecionadas na CSI mantiveram estes níveis de hiperplasia e hipertrofia evidenciando a continuidade do processo inflamatório.

Os níveis de citocinas encontrados nos diferentes grupos de camundongos desafiados com as diferentes linhagens de *B. fragilis*, e os graus de lesões observados, apontam para um real aumento da virulência bacteriana quando comparados a linhagem parental. Vários estudos tem demonstrado, ainda, mudanças nos perfis de virulência de bactérias expostas aos antimicrobianos. Kobayashi et al. (2002) avaliaram o efeito do tratamento com claritromicina, eritromicina e azitromicina em *P. aeruginosa* inoculadas em camundongos e observaram níveis maiores de TNF- α e óxido nítrico no lavado do fluido broncoalveolar. Além disso, esses mesmos autores observaram de 80 a 100% de morte nos grupos de animais desafiados com as linhagens bacterianas selecionadas por exposição a antimicrobianos. Diniz et al. (2000 e 2003) também verificaram que linhagens de *Bacteroides* resistentes ao metronidazol ou selecionadas em CSI foram mais virulentas após o contato com a droga, pela observação de parâmetros histopatológicos de baço, fígado e intestino. Chen et al. (2005) relataram aumento na produção de TNF- α e IL-1 em linhagem de *Burkholderia* quando expostas a

ceftazidima, ofloxacina e trimetoprim. Neste estudo foram observados altos níveis de inflamação e os autores sugerem relação das alterações na estrutura bacteriana e a modulação da virulência microbiana após exposição aos antimicrobianos.

6.4 Considerações finais

Do exposto, observa-se, de maneira evidente, que as concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol foram capazes de interferir com o comportamento bioquímico e fisiológico de *B. fragilis*. Estas alterações, de fato, podem ter reflexo no potencial agressor bacteriano, pela observação dos parâmetros imunológicos e histopatológicos, após infecção experimental em camundongos convencionais.

Dessa maneira, percebe-se cada vez mais a extensão das implicações do uso indiscriminado e abusivo das drogas antimicrobianas, uma vez que a resposta bacteriana a estes agentes é a base do sucesso terapêutico, e a antibioticoterapia inadequada pode se refletir diretamente na interação bactéria hospedeiro.

Assim considera-se de extrema importância a continuidade e o aprofundamento desta linha de pesquisa em desenvolvimento no laboratório pela chance de se contribuir para elucidação de questões, principalmente aquelas relacionadas à genética da resistência bacteriana e mecanismos de regulação, cujas implicações nas características morfológicas, fisiológicas e expressão de virulência dos microrganismos são, hoje, inquestionáveis, mas pouco consideradas na prática clínica e requer um suporte mais objetivo da pesquisa básica.

7 CONCLUSÕES

Concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol podem modular habilidades microbianas; e interferem na susceptibilidade de *B. fragilis* a outros antimicrobianos;

Os β -lactâmicos em concentrações subinibitórias podem induzir maior filamentação nas células de *B. fragilis*, com maior expressão nas primeiras exposições à droga, mas estas alterações não são permanentes;

Clindamicina e cloranfenicol parecem não induzir alterações morfológicas significativas em células de *B. fragilis* expostas às concentrações subinibitórias;

Os resultados obtidos com linhagens bacterianas expostas a concentrações subinibitórias de ampicilina e ampicilina/sulbactam mostram que essas drogas interferem no tempo de geração de *B. fragilis*, enquanto que a exposição a clindamicina e cloranfenicol parece não resultar em alteração significativa dos padrões de crescimento;

Parâmetros bioquímicos e fisiológicos como assimilação de substratos e expressão de proteínas, enzimas e adesinas associadas à formação de biofilme, sofrem interferência de drogas antimicrobianas, como expressão da resposta adaptativa de *B. fragilis*;

O fato de não terem sido detectados, pela técnica empregada, polimorfismos gênicos nas linhagens selecionadas pela exposição aos antibióticos, sugere que a resposta de *B. fragilis* à ampicilina, à associação ampicilina/sulbactam, à clindamicina e ao cloranfenicol esteja relacionada com a regulação da expressão gênica;

A exposição de *B. fragilis* às drogas ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol altera os padrões de virulência da bactéria, com maior intensidade de interferência dos dois primeiros

Medida de parâmetros imunológicos no intestino, e histológicos, do baço e fígado dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as linhagens de *B. fragilis* selecionadas após exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos sugere resposta sistêmica à infecção.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Society for Microbiology.** 2000. Antimicrobial resistance: an ecological perspective. Report from the American Academy of Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- American Society for Microbiology.** 2009. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. Report from the American Academy of Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. 2002. **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro.
- ANDRADE, J. P. 2010. Efeito de concentração subinibitória de piperacilina-tazobactam na morfologia e fisiologia de *Escherichia coli*. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil. 127f.
- ARTIS, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews Immunology**, **8** :411 – 420.
- BAUGHN, A. D.; MALAMY, M. H. 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. **Nature**. 427 : 441-444.
- BAUMGART D.C., DIGNASS, A. U. 2002. *Intestinal barrier function.* **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**; **5**: 685-694.
- BEACHEY, E. H.; EISENSTEIN; B. I. OFEK, I. 1982. Prevention of the adhesion of bacteria to mucosal surfaces influence of antimicrobial agents, In H. Eickenberg, H. Halm, and W. Opferkuch (ed.), **Influence of antibiotics on the host-parasite relationship.** Springer Verlag KG, Munich. 171-182.
- BENVENISTE, E. Y.; BENOS, D. J. 1995. TNF- α - and IFN- γ -mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. **Faseb Journal**, **9**: 1577-1581

BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. 1994. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology**. 9nd ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, 5-18

BOHNEN, J. M. A. 1998. Antibiotic therapy for abdominal infection. **World Journal Surgery**, **22**: 152-157.

BRITZ M. L.; WILKINSON R.G. 1978. Chloramphenicol acetyltransferase of *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **14**: 105-11.

BURNHAM, T. H.; SNITKER, J. A. ;E. K. KASTRUP. 2000. Facts and Comparisons. St. Louis, MO, **Drug Facts and Comparisons**. 1278-1279.

CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; DASÍ,M.; MORENO, A. F.; GARCÍA, R.; LEDESMA, E.; LLORCA, J.; HERNÁNDEZ, J. 1995. DNA amplification fingerprinting for subtyping *Neisseria gonorrhoeae* strains. **Sexually Transmitted Disease**, **22**: 128-135

CANIGIA, L. F.; CASTELLO L.; DI MARTINO A.; GRECO G.; LEGARIA M. C.; LITTERIO M.; PREDARI S. C.; ROLLET R.; ROSSETTI A.; CARLONI G.; SARCHI M. I.; BIANCHINI H. 2007. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group isolates from Buenos Aires, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología** **39**: 156-160.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI L.A. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**. **67(8)**: 3703–13.

CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. 1919. **Manual of Tropical Medicine**. 3nd. Ed. New York: Willians Wood e Co., 959-960

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. 1976. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* and *B. vulgatus*: designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber)

Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **26**: 230–237.

CAVALCANTI, S. M. B.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, M. C. S.; FILHO, F. C.S. 1991. Effect of metronidazole on surface properties of *Bacteroides fragilis*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, **28**: 819-826.

CHEN, K.; WEN G. W. SUN, CHUA K. L.; GAN Y. 2005. Modified Virulence of Antibiotic-Induced *Burkholderia pseudomallei* Filaments. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **49**: 1002–1009

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A7. 7th ed. Wayne, PA: **CLSI**.

COOMBES B. K.; JOHNSON D. L.; MAHONY J. B. 2002. Strategic targeting of essential host-pathogen interactions in chlamydial disease **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, **2** (3):201-16.

CRONSTEIN B. N. 2007. Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. **Bulletin of the NYU hospital for joint diseases**. 65: 1:S11-5.

CRUZ, C. D. 2006. Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes. 1. ed. Viçosa: Editora UFV: 1. 285 p.

CRUZ, C. D. 2008. Programa Genes - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 278 p.

CUCHURAL, G. J., THALY, F. P. 1986. *Bacteroides fragilis*: current susceptibilities, mechanisms of drug resistance, and principles of antimicrobial therapy. **Drug Intelligence & Clinical Pharmacy**, **20**: 567-573.

DICKSCHAT J. S. 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. **Natural Product Reports**, **27**: 343-69.

DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R. ; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. 2000a. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistance *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrobial Agents chemotherapy**, **44**: 2419-2423.

- DINIZ, C. G.; SANTOS, S G ; PESTANA, A. C. N. R. ; FARIAS, L M ; CARVALHO, M A R . 2000b. Chromosomal breakage in *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment. **Anaerobe**, **6**: 149-153.
- DINIZ, C. G.; ARANTES, R. M.; CARA, D. C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS L.M. 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes and Infection**, **5**: 19-26.
- DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; ROCHA, E. R.; SMITH, C. J. 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, **54**:100-108.
- DONLAN, R.M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, **Clinical Infection Disease**, **33**: 1387–1392.
- EFTIMIADI, C. ; STASHENKO, P.; TONETTI, M.; MANGIANTE, P. E.; MASSARA, R.; ZUPO, S.; FERRARINI, M. 1991. Divergent effect of the anaerobic bacteria by product butyric acido in the immune response suppression of T-lymphocyte proliferation and stimulation of interleukin-1 beta production. **Oral Microbiology and Immunology**,**6**: 17-23.
- ERIBE, E. R.; OLSEN, I. 2000. Strain differentiation in *Bacteroides fragilis* by RAPD and Dendron computer-assisted gel analysis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, **108**:676–684.
- FANG, H.; EDLUND, C.; HEDBERG, M.; NORD, C.E. 2002. New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group. **International Journal of Antimicrobial Agents**,**19**:361-370.
- FERREIRA, M. C.; DOMINGUES R. M. C. P. ; UZEDA, M. de. 1989. Influence of metronidazole, chloramphenicol, clindamycin and penicillin G on growth and neoraminidase activity of *Bacteroides fragilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **24**:157-164
- FERREIRA, D. P.; SILVA, V. L.; GUIMARÃES, D. A.; COELHO, C. M.; ZAULI, D.A.G. ; FARIAS, L. M. ; CARVALHO, M.A.R. ; DINIZ, C. G. 2010. Distribution, detection of enterotoxigenic strains and antimicrobial drug susceptibility patterns of *Bacteroides*

fragilis group in diarrheic and non-diarrheic feces from Brazilian infants.. **Brazilian Journal of Microbiology (In Press), 41**: 01-09.

FINEGOLD, S.M. 1977. Anaerobic Bacteria in Human Disease. **Academic Press, Inc.** N.Y., 534

FINEGOLD, S. M. 1990 .Anaerobes problems and controversies in bacteriology, infections and susceptibility testing. **Reviews of Infectious Diseases,12**: 223-230.

FLETCHER,J.M.; NAIR, S.P.; WARD, J.M.; HENDERSON, B.; WILSON, M. 2001. Analysis of the effect of changing environmental conditions on the expression patterns of exported surface-associated proteins of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbial Pathogenesis,30**:359–368.

FOGAÇA, A.C.;ZAINI, P.A.; WULFF, N.A.; DA SILVA, P.I.; FÁZIO, M.A.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; DA SILVA; A. M. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters, 306** :152-159

FONSECA, A.P EXTREMINA C.; FONSECA A. F.; SOUSA J. C. 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology, 53**: 903-910

FONSECA, J.E.; SANTOS, M.J.; CANHÃO, L.; CHOY, H. E.2009. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmunity Reviews, 8**: 538-542

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition**. Release 5.0. Springer-Verlag, New York.: 1-399.

GEMMEL, C. G. 1988. The prevalence of in vitro measurements of opsonophagocytosis to the study of antibiotic-PMN-bacterium interaction in vivo. **Drugs Under Experimental and Clinical Research, 14**: 735-740

GEORGE, A.M.; LEVY, S.B. 1983. Amplifiable resistance to tetracycline chloranphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. **Journal of Bacteriology,155**: 531-540.

GEORGE, M. L. C.; BUSTAMAM, M.; CRUZ, W. T.; LEACH, J. E.; NELSON, R. J. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. **Phytopathology**, 87:302-309.

GIBSON, F.C.; TZIANABOS, A.O.; ONDERDONK, A.B. 1996. The capsular polysaccharide complex of *Bacteroides fragilis* induces cytokine production from human and murine phagocytic cells. **Infection and Immunity**, 64: 1065-1069.

GIBSON, F.C.; D. L. KASPER ; ONDERDONK, A.B.; TZIANABOS, A.O. 1998. Cellular Mechanism of Intraabdominal Abscess Formation by *Bacteroides fragilis*. **Journal of Immunology**, 160: 5000-5006.

GUSS S.P.; BAWDON R.E.1984. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of cephalosporins on *Bacteroides* species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 13: 633–635.

HÄUBLER, S.; ROHDE,M.; VON NEUHOFF , N.; NIMTZ , M.; STEINMETZ, I. 2003. Structural and Functional Cellular Changes Induced by *Burkholderia pseudomallei* Rhamnolipid **Infection and Immunity**, 71: 2970–2975.

HECHT, D.W. 2004. Prevalence of Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: Worrisome Developments. **Clinical Infectious Diseases**, 39:92–7.

HEIMDAHL, A.; VON KONOW, L.; SATOH, T.; NORD, C. E. 1985. Clinical appearance of oro-facial infection of odontogenic origin in relation to microbiological findings. **Journal of Clinical Microbiology**, 22: 299-302.

HEINRICH P. C.; CASTELL, J. V.;ANDUS T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, 265: 621-636

HELLMARK B, UNEMO M, NILSDOTTER-AUGUSTINSSON A, SÖDERQUIST B. 2010. In vitro antimicrobial synergy testing of coagulase-negative staphylococci isolated from prosthetic joint infections using Etest and with a focus on rifampicin and linezolid. **Eur Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**, 29:591-5.

HENTGES, D.J. The anaerobic microflora of the human body. **Clinical Infectious Diseases**, 16, : S175-80, 1993.

HOOPER L. V., BRY L., FALK P. G., GORDON J. I. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **BioEssays**, **20**: 336 – 343

JACQUES, M.; EBRUN A.; FOIRY B.; DARGIS M.; ALOUIN F. 1991. Effects of antibiotics on the growth and morphology of *Pasteurella multocida*. **Journal of General Microbiology**, **137**:2663-2668.

JUSTICE, S.S; HUNSTAD, D.A.; CEGELSKI, L.; HULTGREN, S.J. 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. **Nature Reviews Microbiology**, **6**: 162-168.

KALKA – MOLL, W.M.; WANG, Y.; COMSTOCK, L.E.; GONZALEZ, S.E.; TZIANABOS, A.O. KASPER, D.L. 2001. Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single *Bacteroides fragilis* strain. **Infection and Immunity**, **69**: 2339-2644.

KANNOURAKIS, G.; ABBAS, A. 1994. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Langerhans Cell Histiocytosis. **British Journal of Câncer**, **70**: S37-S40.

KLEIN R. D.; LUGINBUHL, G. H. 1977 Ampicillin-Induced Morphological Alterations of *Haemophilus influenzae* Type b. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **11**: 559-562

KOBAYASHI, T.; TATEDA, K.; MATSUMOTO, T.; MIYAZAKI, S.; WATANABE, A.; NUKIWA, T.; YAMAGUCHI, K..J. 2002. Macrolide-treated *Pseudomonas aeruginosa* induces paradoxical host responses in the lungs of mice and a high mortality rate. **Antimicrobial Chemotherapy**. **50**:59-66.

KYNER, D.; ZABOS, P.; CHRISTMAN, J.; ACS, G. 1976. Effect of sodium butyrate on lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, **144**: 1674-1678.

LEDERBERG J .1999. J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. **Genetics**, **153**:1–3 .

LEVNER, M. H. ; WEINER, F.F.; RUBIN, A. 1977. Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. **Infection and Immunity**, **15**: 132-137.

LEVY, S.B. 1998. THE CHALLENGE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE. **Scientific American**, **278**: 32-39.

- LIU, C.; SONG, Y.; MCTEAGUE, M.; VU, A.W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S.M. 2003. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group - and species-specific primers. **FEMS Microbiological Letters**, **222** : 9-16.
- LIVERMORE, D. M. 2003. Overstretching the mutant prevention concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**, 732.
- LÖFMARK S. ; JERNBERG C.; JANSSON J. K.; EDLUND C. 2006. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. **58**: 1160-1167.
- LORIAN, V. 1971. Effect of antibiotics on staphylococcal hemolysin production. **Applied Microbiology**, **22**:106.
- LORIAN V.; ATKINSON, B. 1978. Effect of serum on gram-positive cocci grown in the presence of penicillin. **Journal Infection Disease**,**6**: 865-871.
- LORIAN, V.; WALUSCHKA, A.; KIM, Y.1982. Abnormal morphology of bacteria in the sputa of patients treated with antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**. **16**: 382–386.
- LORIAN, V.; GEMMELL, C. 1994. Effect of low antibiotic concentrations on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefences. In **Antibiotics and Laboratory Medicine**, 3rd edn, pp. 493–555. Edited by V. Lorian. Baltimore: Williams & Wilkins.
- LOVETRI, K.; MADHYASTHA, S. 2010. Antimicrobial and antibiofilm activity of quorum sensing peptides and Peptide analogues against oral biofilm bacteria. **Methods Molecular Biology**, **618**: 383-92.
- MACFARLANE S, WOODMANSEY EJ, MACFARLANE GT. 2005. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. **Applied Environment Microbiology**,**71** :7483-92.

MAZMANIAN S.; LIU C.; TZIANABOS A.; KASPER D. 2005. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, **122**:107-118.

MAZMANIAN, S.; KASPER, D. 2006. The love–hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**, **6**: 849-858

MCCLAIN C. J.; SHEDLOFSKY S.; BARVE S.; HILL D. B. 1997 Cytokines and alcoholic Liver disease. **Alcohol Health & Research World**,**21**: 317-320.

MICHEL J, STESSMAN P, STESSMAN J. 1980 Effects of subminimal inhibitory concentrations of Erythromycin, Clindamycin, and Pristinamycin on the penicillinase production of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. **17**:13-5.

MIMURA, S.; MOCHIDA, S.; INAO, M.; MATSUI, A.; NAGOSHI, S.; YOSHIMOTO, T.; 2004. Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice. **Journal of Gastroenterology**, **39**:867–872

MINDLIN S.Z.; PETROVA M.A.; BASS I.A.; GORLENKO Z.M. 2006. Origin, evolution, and migration of drug resistance genes. **Genetika**, **42**: 1495-511.

MOCELLIN, S.; PANELLI M. C.; WANG E.; NAGORSEN D.; MARINCOLA F. M. 2003. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, **24**: 36-43.

MOOSDEEN, F.; WILLIAMS, J. D.; YAMABE, S. 1988. Antibacterial Characteristics of YTR 830, a Sulfone 3-Lactamase Inhibitor, Compared with Those of Clavulanic Acid and Sulbactam. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, **32**: 925-927 .

NAKANO, V.; GOMES, D. A.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. AND ÁVILA-CAMPOS, M. J. 2006. Evaluation of the pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Subtypes in Gnotobiotic Mice. **Current Microbiology**,**53**:113-117.

OBISO, R.J.; ÇYERLY, D. M.; VAN TASSEL.; WILKINS, T. D. 1995. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo. **Infection and Immunity**,**63**: 3820-3826.

O'BRIEN, T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infection Disease**, **34**: S78-S84.

ODUWOLE, K.O.; GLYNN, A. A.; MOLONY, D. C.; MURRAY, D.; ROWE, S.; HOLLAND, L.M.; MCCORMACK, D.J.; O'GARA, J.P. 2010. Anti-biofilm activity of sub-inhibitory povidone-iodine concentrations against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Orthopaedic Research**.

OLIVEIRA, M.; SANTOS, V.; FERNANDES, A.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. **Poultry Science**, **89**:1065-9.

PATHELA, P.; HASAN, K.Z.; ROY, E.; ALAM, K.; HUQ, F.; SIDDIQUE, A.K.; SACK, R.B. 2005. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* – Associated Diarrhea in Children 0–2 Years of Age in Rural Bangladesh. **The Journal of Infectious Disease**, **191**:1245-1252.

PAULA, G. R.; FALCÃO, L. S.; ANTUNES, E. M.; AVELAR, K. E. S.; REIS, F. N. A.; MALUHY, M. A.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. 2004. Determinants of resistance in *Bacteroides fragilis* strains according to recent Brazilian profiles of antimicrobial susceptibility. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **24** : 53–8.

PETERSON, J. W. 1996. Bacterial Pathogenesis. **Medical Microbiology**, **4ed**.

PETERSON, M. L., HOVDE, L. B., WRIGHT, D. H., HOANG, A. D., RADDATZ, J. K., BOYSEN, P. J., ROTSCHAFFER, J. C. 1999. Fluoroquinolone Resistance in *Bacteroides fragilis* following Sparfloxacin Exposure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **43**: 2251-2255.

PRABHA, C.; JALAPATHY, K. V.; MATSA, R. P.; DAS, S. D. 2003. Role of TNF- α in host immune response in tuberculous pleuritis. **Current science**, **85** :639-641.

PROCTOR, R. A.; HAMILL, R.J.; MOSHER, D.F.; TEXTOR, J.A.; OLBRANTZ, P.J. 1983. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on *Staphylococcus aureus* interactions with fibronectin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, **12**: 85-95.

PUMBWE, L.; UEDA, O.; YOSHIMURA, F.; CHANG, A.; SMITH, R.L.; WEXLER, H.M. 2006. *Bacteroides fragilis* BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **58**: 37-46.

PUMBWE, L.; GLASS, D.; WEXLER, H.M. 2006. Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **50**: 3150-3.

PUMBWE, L.; A. CHANG, H. M. Wexler. 2007a. The RND-family transport system BmeRABC-5 is a metronidazole efflux pump in *Bacteroides fragilis*. **Microbial Drug Resistance**, **13**:96–101.

PUMBWE, L.; SKILBECK C. A.; NAKANO V.; AVILA-CAMPOS M. J.; PIAZZA, R. M.F.; WEXLER, H. M. 2007b. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. **Microbial Pathogenesis**, **43** : 78–87.

PUMBWE, L.; SKILBECK C. A.; WEXLER H. M. 2008. Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. **Microbial Ecology**, **56**: 412 - 419.

REID, G. 2004. When microbe meets human. **Clinical Infection Disease**, **39**:827–830.

ROCHA, E. R.; SELBY, T.; COLEMAN, J. P.; SMITH, C.J. 1996. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, **178**: 6895-6903.

ROCHA, E. R.; SMITH, C. J. 1997. Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. **Journal of Bacteriology**, **179**: 7033–7039.

ROKOSZ, A.; MEISEL-MIKOLAJCZYK, F.1995. Selected properties of *Bacteroides fragilis* enterotoxigenic strains. **Medycyna doświadczalna i mikrobiologia**, **47**:183-188.

ROSEBURY, T. 1962. Microorganisms Indigenous to Man. **Mcgraw-Hill**, New York

ROTSTEIN, O.D.; PRUETT, T. L.; SORENSON, J. J.; FIEGEL, V.D.; NELSON, R. D.; SIMMONS, R. L. A. 1986. *Bacteroides* by-product inhibits human polymorphonuclear leukocyte function, **Archives of Surgery**, **121**: 81-88.

SAKAMOTO, M.; BENNO Y. 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *ParaBacteroides distasonis* gen.nov, comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *ParaBacteroides merdae* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**,56:1599-1605.

SALYERS, A. A. 1984. Bacteroides of the human lower intestinal tract. **Annual Reviews of Microbiology**, 38 : 293-313.

SALYERS, A. A.; WHITT, D.D. 1994. Bacterial Patogenesis: A Molecular Approach. Washington D.C. **ASM Press**, 418.

SANTOS, K. V. 2005. Estudo da atividade antimicrobiana in vitro de ertapenem e piperacilina-tazobactam sobre bactérias do grupo Bacteróides fragilis e Escherichia coli. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil. 114f.

SANTOS S.G.; DINIZ C.G.; SILVA V.L.; SOUZA N.C.; LIMA F.L., BOMFIM M.R.Q.; CARVALHO M.A.R.; FARIAS, L.M. 2007a.The influence of molecular oxygen exposure on the biology of *Prevotella intermedia*, with emphasis on its antibiotic susceptibility. **Journal of Applied Microbiology** 103: 882–891.

SANTOS, K. V. D. ; NICOLI, J. R. ; MARTINS, W. A. ; COUTINHO, S. C. ; APOLONIO, A. C. M. ; DINIZ, C. G. ; CARVALHO, M. A. R. D. ; FARIAS, L. D. M. 2007b. Comparative activity of ertapenem and piperacillin tazobactam in a murine systemic infection model with *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, 56:1576-1579.

SANTOS, K. V. D ; DINIZ, C. G.; CASTRO, L. V.D ; ANDRADE, H. M. D ; GIUSTA, M. S.; PIRES, S. D F.; SANTOS, A. V. ; APOLÔNIO, A. C. M. ; CARVALHO, M. A. R. D; FARIAS, L. M. d. 2010. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. **Research in Microbiology (Paris)** (In Press)

SCHLIEVERT, P. M.; J. A. KELLY. 1984. Clindamycin-induced suppression of toxic-shock syndrome–associated exotoxin production. **Journal Infection Disease**. 149:471.

SHARMA R.; YOUNG, C.; NEU, J. 2010. Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **2010**:1-15.

SHIH, D. Q.; TARGAN, S. R. 2008. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal Gastroenterology**, **21**: 390-400.

SHMAGEL, K. V.; CHERESHNEV, V. A. 2009. Molecular Bases of Immune Complex Pathology. **Biochemistry (Moscow)** **74**: 469 - 479.

SILVA, V.L.; DINIZ C.G; SANTOS S.G.; GOMES R.M.F.; NICOLI J.R., MAGALHA P.P. MENDES E.N., CARVALHO M.A.R.; FARIAS, L.M. 2007. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **Journal of Applied Microbiology** **103** :20–26.

SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. ; SANTOS, S G ; CARVALHO, M A R ; FARIAS, L M . 2009. Use of 2-D electrophoresis and ESI Mass Spectrometry techniques to characterize *Fusobacterium nucleatum* proteins up-regulated after oxidative stress. **Anaerobe**, **Aug**: 1-18.

SILVESTRO E.M., NAKANO V., ARANA-CHAVEZ V. E., MARQUES M.V., AVILA-CAMPOS M. J. 2006. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiology Letters**, **257**:189 – 194.

SNYDMAN, D. R., N. V. JACOBUS, L. A. MCDERMOTT, R. RUTHAZER, Y. GOLAN, E. J. GOLDSTEIN, S. M. FINEGOLD, L. J. HARRELL, D. W. HECHT, S. G. JENKINS, C. PIERSON, R. VENEZIA, V. YU, J. RIHS, S. L. GORBACH. 2007. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **51**:1649-1655

SONG, Y. L., LIU, C. X., MCTEAGUE, M., FINEGOLD, S. M. 2004. "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin **Journal Clinical Microbiology**, **42**: 5565-5570.

SONG, Y. 2005. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. **Anaerobe** **11**:79-91

SPIŽEK, J.; ŘEZANKA, T. 2004. Lincomycin, clindamycin and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **64**: 455–464.

STESSMAN, J; MICHEL, J. 1983. Effects of subminimal inhibitory concentrations of aminoglycosides on the penicillinase production of *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, **29**:116-20.

TABAQCHALI, S.; WILKS, M. 1992. Epidemiological aspects of infections by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **11**:1049-1057.

TANAKA-BANDO, K.; KATO, N.; WATANABE K.; UENO, K. 1995. Antibiotic susceptibility profiles of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in Japan from 1990 to 1992. **Clinical Infection Disease**, **20**:S352–S355.

TULASNE K.; VENDRELY R. 1948. Cytology Of Staphylococci Before And After Treatment With Penicillin. **Nature**, **161**: 316-317.

VAN DEN BROEK, P. J. 1989. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. **Reviews of Infection Disease**, **11**: 213-245.

VIEIRA J.M.; VALLIM D. C. ; FERREIRA E.O.; SEABRA S.H.; VOMMARO R.C.; AVELAR K.E.; DE SOUZA W.; FERREIRA M.C.; DOMINGUES R.M. 2005. *Bacteroides fragilis* interferes with iNOS activity and leads to pore formation in macrophage surface. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **326** : 607-13.

VIEIRA, C.D.; FARIAS, L.D.E. M.; DINIZ, C.G.; ALVAREZ-LEITE M.E.; CAMARGO, E.R.; CARVALHO, M. A. 2005. New methods in the evaluation of chemical disinfectants used in health care services. **American Journal of Infection Control**, **33**: 162-9.

VIEIRA, J .M. B. D.; SEABRA, S.H.; VALLIM D.C. ; AMÉRICO, M.A.; FRACALLANZA ,S.E.L; VOMMARO, R.C. R.; DOMINGUES, M.C.P. 2009. *Bacteroides fragilis* induce necrosis on mice peritoneal macrophages: *In vitro* and *in vivo* assays. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **387** : 627–632 .

VOLLAARD, E. J.; H. A. CLASENER. 1994. Colonization resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **38**: 409-14.

VOSBECK ,K.; METT, H.; HUBER, U.; BOHN, J.; PETIGNAT, M. 1982. Effects of low concentrations of antibiotics on *Escherichia coli* adhesion. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **21**: 864-869.

WANG J.; WANG X. ; LIU P. 1999. Detection of serum TNF α , IFN- γ ,IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**, **5** :38-40.

WEINACHT, K.G.; ROCHE, H. C.; KRINOS, M.; COYNE, M.J.; PARKHILL, J. 2004 Comstock, Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*, **Molecular Microbiology**, **53** :1319–1330.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**:7213-7218.

WEXLER, H. M. 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, 593–621.

WILSON, M. 2002. Bacterial adhesion to host tissues: mechanisms and consequences. In: **Advances in Molecular and Cellular Microbiology**. Wilson M. (Editor). Cambridge University Press, Cambridge.

WITTE, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **14**: 321-325.

WOJNICZ D.; KAK M.; ADAMSKI R.; JANKOWSKI S. 2007. Influence of Subinhibitory Concentrations of Amikacin and Ciprofloxacin on Morphology and Adherence Ability of Uropathogenic Strains. **Folia Microbiologica**, **52**: 429–436.

WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M.E.; WOLCOTT, B.M.; GOGOKHIA L.; COSTERTON J.W.; DOWD, S. E. 2010. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **Journal of Wound Care**,**19**:45-6, 48-50, 52-3.

YOH, M.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T.; TAKEDA Y.; MIWATANI, T. 1983. Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, **42**.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1A. Avaliação das características bioquímicas e fisiológicas das linhagens de *B. fragilis* parental e selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas (BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO) cultivadas na presença e na ausência das drogas.

Linhagens bacterianas	Testes bioquímicos e fisiológicos																
	MOT	CEF	CAT	TVP	ONG	ESC	CET	TPD	H2S	MAL	CIT	ACE	ADH	LDC	ODC	URE	IND
Bf parental	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfAMP *	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfAMP	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfAMS *	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfAMS	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfCLI *	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfCLI	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfCLO *	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BfCLO	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* Linhagens bacterianas cultivadas na presença das drogas antimicrobianas.

Teste de motilidade (MOT); produção de beta-lactamases (CEF), catalase (CAT) e acetoína (TVP); hidrólise da beta-galactosidase (ONG) e da esculina (ESC); tolerância para ceftriaxona (CET); desaminação da fenilalanina (TPD); produção de sulfeto de hidrogênio (H2S); utilização de malonato (MAL), citrato (CIT) e acetamida (ACE); pesquisa das enzimas arginina dehidrolase (ADH), lisina descarboxilase (LDC), ornitina descarboxilase (ODC), uréase (URE) e triptofanase – indol (IND).

Anexo 1B. Avaliação das características bioquímicas e fisiológicas (fermentação de carboidratos) das linhagens de *B. fragilis* parental e selecionadas pela exposição a concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas (BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO) cultivadas na presença e na ausência das drogas.

Linhagens bacterianas	Avaliação da habilidade de fermentação de carboidratos														
	ADO	ARA	CEL	GLI	INO	MAN	MAO	RAF	RHA	SAC	SAL	SOR	TRE	XIA	XIL
Bf parental	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
BfAMP *	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
BfAMP	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
BfAMS *	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
BfAMS	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
BfCLI *	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
BfCLI	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
BfCLO *	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
BfCLO	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

* Linhagens bacterianas cultivadas na presença das drogas antimicrobianas.

Testes de fermentação dos carboidratos adonitol (ADO), arabinose (ARA), celobiose (CEL), glicose (GLI), inositol (INO), manitol (MAN), maltose (MAO), rafinose (RAF), rhamnose (RHA), sacarose (SAC), salicina (SAL), sorbitol (SOR), trealose (TRE), xilano (XIA) e xilose (XIL).