

*Organizadores:*

SUELI FUMIE YAMADA-OGATTA

GERSON NAKAZATO

MÁRCIA CRISTINA FURLANETO

MARCO ANTONIO NOGUEIRA

# TÓPICOS ESPECIAIS EM MICROBIOLOGIA



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

**TÓPICOS ESPECIAIS EM**  
**MICROBIOLOGIA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**

**Centro de Ciências Biológicas**

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

# **TÓPICOS ESPECIAIS EM MICROBIOLOGIA**

Sueli Fumie Yamada-Ogatta  
Gerson Nakazato  
Márcia Cristina Furlaneto  
Marco Antonio Nogueira  
(Organizadores)

Londrina PR  
2015

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão

*Reitora*

Prof. Dr. Ludoviko Carnasciali dos Santos

*Vice-Reitor*

## Capa

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey

## Fotos da capa:

Superiores, da esquerda para a direita:

*Trypanosoma cruzi*, MEV (Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura), Rotavírus, MET (Prof. Dr. Carlos Nozawa), Nódulo de soja com bactérias fixadoras de nitrogênio (Mariangela Hungria)

Inferiores, da esquerda para a direita

*Cryptococcus gatti*, MEV (Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares), *Xanthomonas axonopodis*, MEV (Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior), *Candida parapsilosis*, MEV (Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto, UEL)

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

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

T674 Tópicos especiais em microbiologia [livro eletrônico] / Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Gerson Nakazato, Márcia Cristina Furlaneto, Marco Antonio Nogueira (organizadores) ; [capa: Alexandre Tadachi Morey]. – Londrina : UEL/ Departamento de Microbiologia, 2015.

1 Livro digital.

Vários autores.

Inclui bibliografia.

Disponível em:

<http://www.uel.br/ccb/microbiologia/pages/livros.php>

ISBN 978-85-7846-359-5

1. Microbiologia. 2. Microbiologia – Formação de conceitos. 3. Microbiologia – Estudo e ensino. I. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie. II. Nakazato, Gerson. III. Furlaneto, Márcia Cristina. IV. Nogueira, Marco Antonio. V. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

CDU 579

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte deste livro poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa dos organizadores e autores.

1ª edição brasileira – 2015

ISBN 978-85-7846-359-5

Depósito Legal na Biblioteca Nacional

2015

## **Homenagem**

O Departamento de Microbiologia e o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina ao produzirem este compêndio científico não poderiam deixar de render o profundo reconhecimento à Profa. Shiduca Itow-Jankevicius. Mentora do estabelecimento do próprio Departamento de Microbiologia, foi da Profa. Shiduca também, a iniciativa de implementar e de participar intensamente na consolidação do curso de mestrado em Microbiologia, hoje, como Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Todos estes conspícuos feitos vicejaram, graças ao seu incansável espírito de luta, atitude sempre positiva e, acima de tudo, pelo seu pensamento altruísta. Sempre atenta e fervorosa na formação profissional e do engrandecimento científico individual e, conseqüentemente, do grupo de docente-pesquisadores. À Profa. Shiduca, as nossas homenagens e os nossos agradecimentos pela incessante dedicação e pelo exemplar legado.

Carlos M. Nozawa

# Sumário

Página

## Capítulo 1

Taxonomia Bacteriana – Aspectos Atuais e Perspectivas.....7  
Fernando Gomes Barcellos, Jakeline Renata Marçon Delamuta, Mariangela Hungria, Pâmela Menna, Jesiane Stefânia da Silva Batista e Renan Augusto Ribeiro

## Capítulo 2

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Fatores de Virulência e Modulação do Sistema Imune.....29  
Eiko Nakagawa Itano, Luciene Airy Nagashima, Berenice Tomoko Tatibana, Fernanda Akemi Nakanishi Ito e Kátia Key Oshiro

## Capítulo 3

*Escherichia coli* Diarreiogênica em Animais.....45  
Juan Josue Puño Sarmiento, Luis Eduardo de Souza Gazal, Leonardo Pinto Medeiros, Jacinta Sanchez Pelayo, Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Gerson Nakazato e Sérgio Paulo Dejato da Rocha

## Capítulo 4

Fatores de Virulência em *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal.....58  
Eliandro Reis Tavares, Paula Signolfi Cyoia, Sara Scandorieiro, Vanessa Lumi Koga, Gerson Nakazato e Renata Katsuko Takayama Kobayashi

## Capítulo 5

*Enterococcus* sp. em Alimentos: Paradigmas.....71  
Luciana Furlaneto Maia, Mayara Baptistucci Ogaki, Cláudia Carneiro Brandalize, Katia Real Rocha e Márcia Cristina Furlaneto

## Capítulo 6

Resistência a Carbapenêmicos em Enterobactérias.....91  
Eliana Carolina Vespero, Ana Carolina Polano Vivian, Ana Paula Streling de Oliveira e Halha Ostrensky Saridakis

## Capítulo 7

Resistência em *Staphylococcus aureus*.....108  
Giovana Carolina Bodnar, Caio Ferreira de Oliveira, Márcia Regina Echtes Perugini, Renata Katsuko Takayama Kobayashi e Gerson Nakazato

## Capítulo 8

Relação Mútua entre *Candida albicans* e Imunidade.....120  
Ionice Felipe, Luis Carlos Jabur Gaziri, Ivete Conchon Costa, Tacito Graminha Campos, Wagner Loyola

## Capítulo 9

*Switching* Fenotípico em *Candida* spp.....131  
Márcia Cristina Furlaneto, Alane Tatiana Pereira Moralez, Emanuele Julio Galvão de França, Luciana Furlaneto-Maia

## Capítulo 10

*Phytomonas* spp.: Modelo para Estudo de Processos Biológicos da Família Trypanosomatidae?.....148

Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Viviane Krominski Graça-de Souza, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, Cesar Armando Contreras Lancheros, Priscila Mazzochi Hiraiwa, Alexandre Haruo Inoue, Mariana Serpeloni, Igor Alexandre Campos Damiani, Angelica Martins Batista, Rosiane Valeriano da Silva, Alexandre Tadachi Morey, Phileo Pingue Filho e Lucy Megumi Yamauchi

### **Capítulo 11**

Rotavirus.....166

Flávio Lauretti, Nayara Lopes, Ligia Carla Faccin-Galhardi, Rosa Elisa Carvalho Linhares e Carlos Nozawa

### **Capítulo 12**

Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da Busca à Identificação.....180

Admilton Gonçalves de Oliveira, Ane Stefano Simionato, Miguel Octavio Pérez Navarro e Galdino Andrade

### **Capítulo 13**

Antivirais Naturais.....200

Mariana Caldas Minari Oliveira, Carlos Nozawa e Rosa Elisa Carvalho Linhares

### **Capítulo 14**

Nanopartículas Metálicas com Atividade Antimicrobiana.....213

Viviane Ferreira Cardozo, Erick Kenji Nishio, Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Luciano Aparecido Panagio e Gerson Nakazato

### **Capítulo 15**

Plantas Medicinais: A Busca de Novos Fármacos no Tratamento de Doenças

Causadas por Protozoários Tripanossomatídeos.....224

Celso Vataru Nakamura, Adriana Oliveira dos Santos, Erika Izumi, Raíssa Bocchi Pedroso, Rodrigo Hinojosa Valdez, Tânia Ueda-Nakamura e Benedito Prado Dias Filho

### **Capítulo 16**

Introdução, Estabelecimento e Adaptação de Bradirrizóbios Simbiontes da Soja em Solos Brasileiros.....243

Mariangela Hungria, Fernando Gomes Barcellos, Iêda Carvalho Mendes, Ligia Maria de Oliveira Chueire, Renan Augusto Ribeiro, Jesiane Stefânia da Silva Batista, Pâmela Menna, Jakeline Renata Marçon Delamuta

### **Capítulo 17**

Microrganismos e Processos Microbianos como Bioindicadores de Qualidade Ambiental.....262

Marco Antonio Nogueira, Marina Yumi Horta Miyauchi, Daniel Bini e Galdino Andrade

## **Apresentação**

Embora a vida na Terra tenha origem microbiana há cerca de 3,6 bilhões de anos, o homem passou a se dar conta da presença de microrganismos há pouco mais de 300 anos, com as primeiras observações de Antoni van Leeuwenhoek no final do século XVII. Desde então, da simples observação de estruturas celulares até a era “ômica” de hoje, muito se evoluiu. Entretanto, ainda há muito a que se descobrir e entender sobre esses organismos, tanto aqueles causadores de enfermidades, quanto os que desenvolvem algum papel no ambiente, com grande potencial de aplicação biotecnológica.

Este livro reúne, nos dezessete capítulos, esforços de docentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, seus discentes e colaboradores, decorrentes de suas linhas de pesquisa. Nesses capítulos são abordados assuntos referentes aos mais variados campos de estudo da microbiologia, desde a microbiologia básica até a microbiologia aplicada à saúde humana e animal, à agricultura e ao meio ambiente. A experiência relatada em cada capítulo contribuirá para a formação do conhecimento em Microbiologia de estudantes de graduação e pós-graduação, com uma leitura que envolve desde conceitos básicos até o que há de mais atual em cada área abordada, constituindo uma vasta fonte de consulta.

# Capítulo 1

## Taxonomia Bacteriana – Aspectos Atuais e Perspectivas

---

Fernando Gomes Barcellos <sup>1</sup>

Jakeline Renata Marçon Delamuta <sup>2,3</sup>

Mariangela Hungria <sup>2</sup>

Pâmela Menna <sup>2</sup>

Jesiane Stefânia da Silva Batista <sup>2,3</sup>

Renan Augusto Ribeiro <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral/CCB/UEL, Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, PR.

<sup>2</sup> Embrapa Soja, Cx. P. 231, 86001-970, Londrina, PR.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia/CCB/UEL

---

### 1. Introdução

O termo taxonomia é, geralmente, considerado como sinônimo de sistemática ou biosistemática e é, tradicionalmente, dividido em três partes: classificação, nomenclatura e identificação <sup>29, 65</sup>. A classificação é definida como o arranjo ordenado dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade. A nomenclatura são as denominações das unidades definidas na classificação (Tabela 1). A identificação é o processo de determinação se um organismo pertence a uma das unidades definidas pela classificação e nomenclatura <sup>65</sup>.

Alguns pesquisadores definem a taxonomia como a teoria e prática da classificação dos organismos e consideram a sistemática como sendo mais ampla, incluindo componentes evolutivos e filogenéticos <sup>57</sup>.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana e é definida como um grupo de linhagens, incluindo a linhagem tipo, que compartilham 70% ou mais de similaridade na hibridação DNA – DNA e 5° C ou menos de  $\Delta T_m$  <sup>35, 62, 63, 65, 68</sup>. As características fenotípicas e quimiotaxonômicas devem estar de acordo com esta definição <sup>63</sup>.

O símbolo  $T_m$  indica a temperatura média de desnaturação de uma fita dupla de DNA, e  $\Delta T_m$  é a diferença em graus Celsius na  $T_m$  entre uma dupla fita homóloga de DNA, de um mesmo isolado bacteriano, e uma dupla fita heteróloga de DNA proveniente de dois isolados bacterianos distintos <sup>65</sup>.

A linhagem tipo de uma espécie (em inglês “type strain”) serve como “portador” do nome da espécie e como espécime de referência <sup>7, 62</sup>. Um exemplo é a espécie *Bradyrhizobium japonicum* cuja linhagem tipo é a USDA 6<sup>T</sup>, onde a letra “T” em sobrescrito indica “type strain” (Figura 1).

A taxonomia polifásica tem sido a estratégia utilizada atualmente na taxonomia bacteriana e consiste na integração de diferentes tipos de dados e informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (Tabela 2) <sup>19, 42, 55, 57, 65</sup>.

Um grande número de características fenotípicas e genotípicas tem sido utilizado na taxonomia polifásica em procariotos (Tabela 2), mas é necessário entender em que nível taxonômico as metodologias utilizadas fornecem informações e ter consciência da complexidade técnica, isto é, a quantidade de tempo e trabalho necessária. O Quadro 1 relaciona algumas das diferentes metodologias utilizadas, atualmente, na taxonomia bacteriana e suas respectivas resoluções taxonômicas.

Vandamme et al. <sup>65</sup> classificaram os métodos atualmente utilizados na taxonomia polifásica bacteriana em métodos genotípicos e fenotípicos e alguns deles estão descritos na Tabela 2 e no Quadro 1.

**Tabela 1.** Nomenclatura utilizada na taxonomia bacteriana conforme a categoria taxonômica – Como exemplo temos a bactéria causadora de um tipo de pneumonia (a legionelose) em seres humanos, a *Legionella pneumophila* <sup>7</sup>.

<b>Categoria Taxonômica</b>	<b>Exemplo</b>
Domínio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordem	<i>Legionellales</i>
Família	<i>Legionellaceae</i>
Gênero	<i>Legionella</i>
Espécie	<i>Legionella pneumophila</i>
Subespécie	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>

**Tabela 2.** Informações genotípicas e fenotípicas que podem ser utilizadas na taxonomia polifásica bacteriana (adaptado de Vandamme <sup>65</sup>; Gillis <sup>19</sup>).

<b><i>Informações Genotípicas</i></b>	<b><i>Informações Fenotípicas</i></b>
<b>DNA Total</b>	<b>Proteínas</b>
% molar de G+C	Perfis eletroforéticos de proteínas celulares ou de proteínas do envelope celular (1D ou 2D)
Perfis de restrição (RFLP, RFLP - PFGE)	Perfis enzimáticos
Tamanho do genoma	(“Multilocus Enzyme Electrophoresis”)
Hibridizações DNA-DNA	<b>Marcadores Quimiotaxonômicos</b>
<b>Segmentos de DNA</b>	Ácidos graxos celulares
Perfil de DNA (“DNA fingerprinting”) com base em PCR	Ácidos micólicos
(ribotipagem, ARDRA, RAPD, AFLP)	Lipídios polares
Sondas de DNA	Quinonas
Sequenciamento de DNA	Poliaminas
	Compostos das paredes celulares
	Exopolissacarídeos
<b>RNA</b>	<b>Características Expressas</b>
Sequenciamento de bases	Morfologia
Perfil de RNAs de baixo peso molecular (LMW)	Fisiologia (Biolog, API)
	Enzimologia (APIZYM)
	Sorologia (monoclonal, policlonal)

RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição; PFGE “Pulsed Field Gel Electrophoresis”, eletroforese em campo pulsado; RFLP-PFGE, análise de polimorfismo de macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em campo pulsado; ARDRA “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”, análise de restrição de DNA ribossomal amplificado; RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA”, DNA polimórfico amplificado ao acaso; AFLP “Amplified Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados; LMW “low molecular weight”, baixo peso molecular; 1D, 2D, uma e duas dimensões, respectivamente.

## **2. Métodos Genotípicos**

Os métodos genotípicos são aqueles direcionados às moléculas de DNA e RNA. Esses métodos dominam, atualmente, os estudos taxonômicos, devido ao progresso tecnológico mas, principalmente devido à visão atual da classificação, a qual deve refletir as relações naturais, como aquelas codificadas pelo DNA <sup>35, 65</sup>. Os principais métodos genotípicos utilizados na taxonomia polifásica bacteriana estão descritos a seguir:

**Quadro 1.** Resolução taxonômica de algumas metodologias utilizadas atualmente na taxonomia bacteriana (adaptado de Vandamme <sup>65</sup>; Gillis <sup>19</sup>).

Metodologia	Família	Gênero	Espécie	Linhagem (cepa, estirpe)
Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)				
Análise de Fragmentos de Restrição de Baixa Frequência (LFRFA ou RFLP-PFGE)				
Ribotipagem				
Amplificação de DNA (AFLP, AP-PCR, rep-PCR, DAF, RAPD, ARDRA)				
Tipagem de bacteriocinas e fagos				
Técnicas de sorologia (monoclonal, policlonal)				
Zimogramas (polimorfismo de multilocus enzimático)				
Perfis de eletroforese de proteínas celulares totais				
Hibridizações DNA-DNA				
% de G+C				
Amplificação das regiões espaçadoras entre os genes RNAt (tDNA-PCR)				
Marcadores quimiotaxonômicos (poliaminas, quinonas)				
Perfil de ácidos graxos celulares (FAME - "fatty acid methyl esters")				
Estrutura da parede celular				
Fenótipo (clássico, API, Biolog)				
Sequenciamento de RNAr				
Sondas de DNA				
Sequenciamento de DNA				

#### a) Determinação da razão de bases do DNA (% em moles de G + C)

A determinação da porcentagem molar de guanina e citosina é um método genotípico clássico e é considerado parte da descrição padrão de uma taxa <sup>42, 65, 68</sup>. Em geral, dentro de uma espécie bem definida, a variação observada não é maior do que 3% e não mais que 10% dentro de um gênero bem definido. Nas bactérias, em geral, varia de 24 a 76% <sup>42, 65</sup>.

#### b) Hibridação DNA-DNA (HDD)

A hibridação DNA – DNA e o decréscimo na estabilidade termal dos DNAs híbridos são utilizados para delinear espécies <sup>42, 65, 68</sup>. O valor de hibridação de DNA

(em % de pareamento) é um parâmetro indireto da similaridade de sequências nucleotídicas entre dois genomas inteiros. Foi estabelecido que a estabilidade térmica decresce de 1 a 2,2% para cada 1% de não pareamento. Atualmente, não é possível converter os valores de hibridação DNA-DNA em percentagem de similaridade de sequências de todo o genoma <sup>65</sup>. Como descrito anteriormente, foi definido pelo comitê internacional *ad hoc* em sistemática bacteriana (“Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics”) que uma espécie deve, em geral, incluir linhagens que apresentem valores em torno de 70% ou superior nos valores de hibridação DNA-DNA <sup>42, 62, 68</sup>.

Apesar de ser considerado o método padrão para a descrição de espécies procarióticas a nível genômico, a HDD tem sido criticada nos últimos anos e considerada até inapropriada para se delimitar os taxa procarióticos, tendo como principais desvantagens a complexidade e o tempo de realização da técnica, não permitindo, assim, uma rápida identificação dos microrganismos. Além disso, a impossibilidade de se construir um banco de dados cumulativo com os resultados gerados pela técnica tem-se tornado um grande problema nessa era dominada pela bioinformática <sup>27, 47, 51, 76</sup>.

### **c) Estudos filogenéticos com base no gene ribossomal 16S**

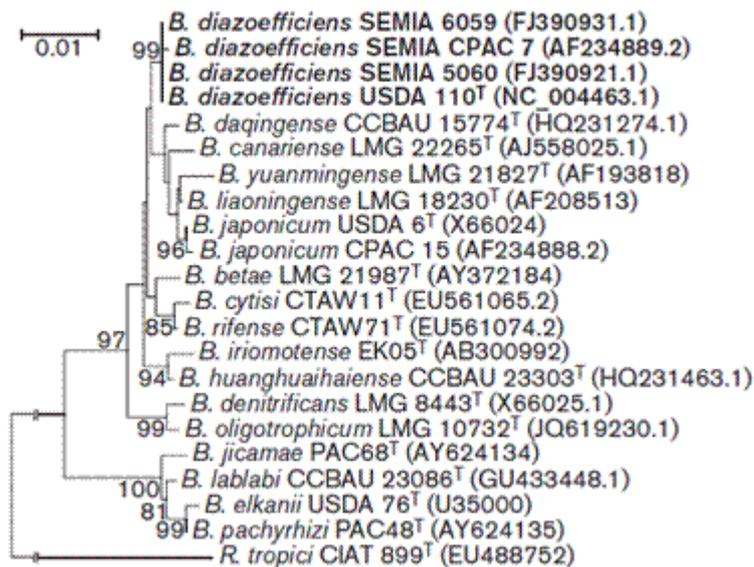
Segundo Ludwig e Klenk <sup>36</sup>, o desenvolvimento de uma sistemática que refletisse as relações naturais entre os microrganismos foi sempre o objetivo fundamental dos taxonomistas. No entanto, a determinação das relações entre os microrganismos só foi possível com o desenvolvimento dos métodos moleculares (análises de macromoléculas) os quais puderam ser aplicados na identificação e classificação bacteriana. As determinações do conteúdo de G+C, e os métodos quimiotaxonômicos, tais como a composição da parede celular e de lipídios foram, em muitos casos, mais eficientes do que os métodos clássicos baseados em características morfológicas e fisiológicas. Estas ferramentas fornecem informação que pode ser usada para diferenciar taxa, mas não possibilitam uma análise das relações genéticas e filogenéticas entre os organismos <sup>36</sup>. Zuckerkandl e Pauling <sup>78</sup> propuseram o uso de estruturas primárias de macromoléculas para deduzir a história filogenética dos organismos. Com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento molecular as ideias de Zuckerkandl e Pauling tornaram-se aplicáveis <sup>36</sup>. Em 1977, o grupo do pesquisador Carl Woese demonstrou a utilidade da molécula de RNAr da subunidade menor como um marcador filogenético universal <sup>16</sup>. Os estudos de Carl Woese sugeriram uma relação natural entre os

microrganismos, na qual uma nova sistemática procariótica poderia estar baseada e propuseram, com base na filogenia do gene ribossomal 16S (procariontes) e do gene ribossomal 18S (eucariontes), os domínios Archea, Bacteria e Eucarya <sup>73</sup>. Os organismos procariontes estariam incluídos nos domínios Archea e Bacteria, e os organismos eucariontes no domínio Eucarya.

De acordo com Stackebrandt <sup>58</sup>, os genes ribossomais (DNAr) são considerados, hoje, os cronômetros moleculares mais úteis para a determinação das relações filogenéticas entre os organismos e os motivos pelos quais o gene ribossomal 16S (ou 18S) é o marcador mais amplamente utilizado nos estudos de filogenia são os seguintes:

- 1) A função dos ribossomos não mudou nos últimos 3,8 bilhões de anos;
- 2) Os genes ribossomais estão presentes em todos os organismos vivos;
- 3) O tamanho [1540 nucleotídeos – gene ribossomal 16S; 1676 - 1724 nucleotídeos – gene ribossomal 18S, em fungos <sup>51</sup>] faz com que seja fácil de analisar;
- 4) A estrutura primária é uma sequência contendo regiões alternadas apresentando distintos graus de conservação: - regiões invariáveis; - regiões mais ou menos conservadas e - regiões altamente variáveis;
- 5) Não tem sido observada a ocorrência da transferência horizontal de genes ribossomais entre organismos.

As relações filogenéticas são calculadas com base nas similaridades de pareamento, quanto maior a similaridade das sequências, maior a relação filogenética entre os organismos. As relações filogenéticas podem ser visualizadas graficamente com o uso de algoritmos e as distâncias filogenéticas formam a base das árvores filogenéticas ou dendrogramas. Um exemplo de construção de árvore filogenética com base no gene ribossomal 16S é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Árvore filogenética construída com base nas sequências do gene ribossomal 16S das espécies do gênero *Bradyrhizobium*<sup>11</sup>.

#### **d) Métodos de caracterização baseados nos polimorfismos de DNA (tipagem molecular)**

Os métodos baseados nos polimorfismos de DNA são aqueles que possibilitam a detecção de variações nas sequências dos nucleotídeos no genoma entre organismos relacionados, entre espécies ou dentro de uma mesma espécie. Os principais métodos utilizados atualmente para a tipagem molecular de parte ou da totalidade do genoma (genotipagem) podem ser divididos em<sup>35, 65</sup>:

a) Análise do polimorfismo de fragmentos de restrição do DNA genômico total (RFLP-PFGE).

b) Métodos de tipagem baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase).

A Tabela 3 apresenta uma lista de alguns dos métodos de tipagem molecular utilizados atualmente em bactérias.

A metodologia de RFLP-PFGE (análise do polimorfismo de macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em campo pulsado) é considerada atualmente a mais discriminatória para a tipagem molecular bacteriana. Devido à alta reprodutibilidade, é também utilizada como metodologia padrão “gold standard” na tipagem epidemiológica de patógenos bacterianos<sup>45, 46, 65</sup>. Comparativamente com outros métodos de tipagem molecular, a metodologia de RFLP-PFGE é considerada laboriosa, cara e recomendada para a caracterização de somente um número reduzido de isolados<sup>46</sup>.

**Tabela 3.** Métodos de tipagem molecular utilizados em bactérias.

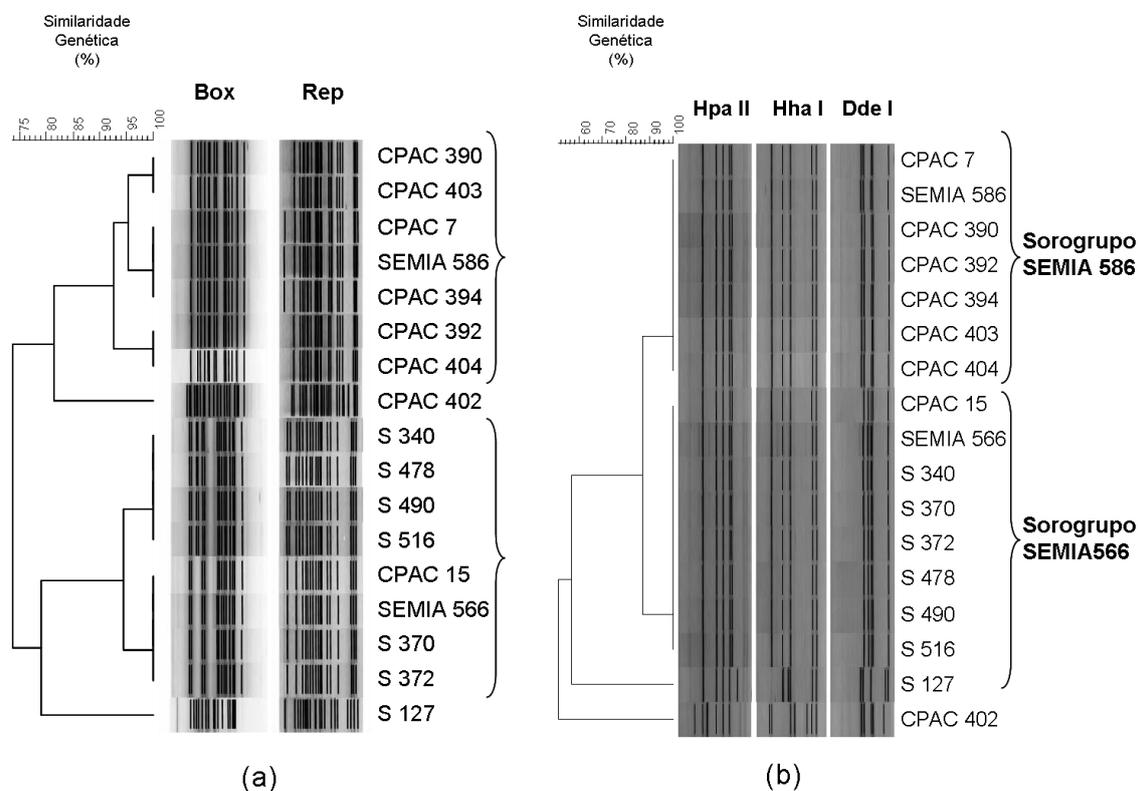
<b>Metodologia</b>	<b>Alvo de caracterização</b>	<b>Referências</b>
RFLP-PFGE <sup>a</sup>	Genoma total	Bouton et al. <sup>6</sup> ; Ludwig <sup>35</sup> ; Tindall et al. <sup>62</sup>
rep-PCR (BOX, REP e ERIC)	Genoma total	Tindall et al. <sup>62</sup> ; Versalovic et al. <sup>67</sup> ;
AFLP <sup>a</sup>	Genoma total	Ludwig <sup>35</sup> ; Savelkoul et al. <sup>54</sup> ; Tindall et al. <sup>62</sup>
RAPD <sup>a</sup> / AP-PCR / DAF	Genoma total	Ludwig <sup>35</sup> ; Tindall et al. <sup>62</sup> ; Welsh, Mcclelland <sup>70</sup> (RAPD) – Welsh, Mcclelland <sup>69</sup> (AP-PCR) – Berthier et al. <sup>5</sup> (DAF)
MLST	Genes alvo (genes “housekeeping”)	Enright, Spratt <sup>13</sup> ; Ludwig <sup>35</sup>
MLVA com base em PCR	Repetições em “Tandem” no DNA genômico (VNTRs)	Vergnaud, Pourcel <sup>66</sup>
ARDRA <sup>a</sup>	Genes ribossomais	Heyndrickx et al. <sup>22</sup>
ITS-PCR-FLP	Sequências espaçadoras entre os genes RNAt	Welsh, Mcclelland <sup>71</sup>
IGS-PCR-FLP	Sequências espaçadoras entre os genes ribossomais	Gürtler, Stanisich <sup>21</sup>
T-RFLP	Genes ribossomais	Liu et al. <sup>34</sup>
SSCP	Genes ribossomais	Widjoatmodjo et al. <sup>72</sup>
T/DGGE	Genes ribossomais	Muyzer <sup>43</sup>

<sup>a</sup> Nome da metodologia – ver na Tabela 2. rep-PCR “repetitive extragenic palindromic – polymerase chain reaction”; AP-PCR “Arbitrarily primed PCR”; DAF “DNA Amplification Fingerprinting”; MLST “Multilocus Sequence Typing”; MLVA “Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis”; ITS-PCR-FLP “Internal Transcribed Spacer – Polymerase Chain Reaction – Fragment Length Polymorphism”; IGS-PCR-FLP “Intergenic Spacer – PCR-FLP”; T-RFLP “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”; SSCP “PCR-based Single-Stranded Confirmation polymorphism”; T/DGGE - DGGE “Denaturing Gradient Electrophoresis”, TGGE “Temperature Gradient Gel Electrophoresis”.

A maioria das metodologias listadas na Tabela 3 tem sido utilizada extensivamente na última década para a caracterização de microrganismos patogênicos (procariontes ou eucariontes), tipagem epidemiológica, na classificação e sub-tipagem de linhagens de interesse na indústria alimentícia e na biotecnologia, além da grande contribuição na taxonomia polifásica e na elucidação da diversidade microbiana em diferentes ambientes <sup>46</sup>. Um exemplo de análise polifásica com linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* utilizando os métodos de tipagem molecular rep-PCR (BOX e REP) e PCR-RFLP do gene ribossomal 16S é apresentado na Figura 2.

A escolha do método de tipagem molecular para uma determinada aplicação depende de vários fatores, tais como: poder de discriminação, reprodutibilidade, facilidade de execução, tempo de processamento para obtenção de dados,

interpretação dos dados (por exemplo, equipamento, análise computadorizada), padronização para uso intra e inter laboratório, custo e experiência <sup>46</sup>.



**Figura 2.** Análise polifásica de linhagens de *B. japonicum* utilizando os métodos de (a) rep-PCR (BOX e REP) e (b) PCR-RFLP do gene ribossomal 16S. Com base na análise pelo método de rep-PCR foi possível agrupar as linhagens em dois grupos, que também apresentam reação sorológica distinta (SEMIA 586 e SEMIA 566), sendo que duas linhagens (CPAC 402 e S 127) não foram agrupadas nestes grupos (similaridade  $\leq 80\%$ ). Na análise de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S (b) as linhagens CPAC 402 e S 127 apresentaram uma similaridade inferior a 60% com as demais linhagens de *B. japonicum*. As linhagens CPAC 402 e S 127 foram, posteriormente, caracterizadas pelo sequenciamento completo do gene ribossomal 16S e identificadas como sendo *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* e *Bradyrhizobium elkanii*, respectivamente, sendo que, anteriormente, haviam sido identificadas, por métodos fenotípicos, como sendo linhagens de *B. japonicum* (BARCELLOS et al. <sup>4</sup>).

### 3. Métodos Fenotípicos

Os métodos fenotípicos são os que não estão direcionados ao DNA ou RNA e incluem os métodos quimiotaxonômicos. O termo quimiotaxonomia se refere à aplicação de métodos analíticos para coletar informações de vários constituintes químicos da célula para a classificação bacteriana <sup>42, 55, 62, 65</sup>. As características

fenotípicas clássicas utilizadas na taxonomia bacteriana compreendem aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. A Tabela 4 relaciona as principais características fenotípicas utilizadas na taxonomia bacteriana. Os métodos fenotípicos são utilizados na identificação de bactérias e constituem a base para a descrição formal de uma taxa, desde espécie e subespécie até gênero e família <sup>42, 65</sup>. Devido o entendimento atual de que a classificação bacteriana deve estar de acordo com as relações filogenéticas entre as taxa, com base no gene ribossomal 16S, iniciou-se uma busca por marcadores morfológicos que refletissem as relações filogenéticas, e identificou-se que os marcadores quimiotaxonômicos preenchiam estes requisitos <sup>8, 42</sup>. Os marcadores quimiotaxonômicos já identificados, incluem: ácidos graxos celulares, ácidos micólicos, lipídios polares, quinonas respiratórias, poliaminas, açúcares celulares e composição de amino ácidos da parede, assim como diaminos ácidos da camada de mureína <sup>8, 62, 63</sup>. Estes marcadores, assim como outros marcadores fenotípicos, foram recomendados em análises polifásicas em nível de gênero e, também, em taxas superiores <sup>8, 42</sup>.

Um grande número de sistemas automatizados e semi-automatizados tem sido utilizado, principalmente em laboratórios clínicos, para a identificação de bactérias com base em características fenotípicas. Um exemplo é o BIOLOG (Biolog, Inc., Hayward, Calif. USA), o qual é um sistema de identificação bacteriano que se baseia na análise da habilidade de uma bactéria em oxidar 95 diferentes fontes de carbono <sup>40</sup>. No entanto, esses testes fenotípicos devem ser realizados sob condições bem padronizadas para obter resultados reproduzíveis <sup>65</sup>.

#### **4. Delineamento de uma Espécie**

Stackebrandt <sup>57</sup> descreveu um roteiro para o processo de classificação de isolados bacterianos, e recomenda que as análises iniciem com base no gene ribossomal 16S. Para isso é sugerida uma busca por similaridade com sequências de genes ribossomais 16S depositadas em banco de dados (como o NCBI “National Center for Biotechnology Information” - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e o RDP “Ribosomal Data Base” - <http://rdp.cme.msu.edu/>) ou o uso do programa ARB (<http://www.arb-home.de/>) <sup>62</sup>. As buscas realizadas no RDP e ARB irão fornecer as distâncias filogenéticas com o(s) isolado(s) mais relacionados. O prosseguimento das análises irá depender do número de espécies mais próximas filogeneticamente do isolado. Se o isolado estiver dentro de um grupo de isolados que compõe um gênero, a descrição do gênero deve ser um guia para a identificação das

propriedades-chave para colocar o isolado dentro deste gênero. Se as espécies de um gênero forem separadas por propriedades fenotípicas distintas, estas devem ser procuradas no isolado em questão e, se forem identificadas, o isolado será identificado. Caso contrário, são sugeridos estudos de reassociação DNA-DNA para se determinar se o isolado é o núcleo de uma nova espécie. Nos casos em que as similaridades nos estudos de reassociação DNA-DNA forem inferiores a 70%, deve-se realizar uma descrição minuciosa do isolado, fornecendo evidências para a inclusão no gênero e para as propriedades que distinguem a nova espécie das previamente estabelecidas <sup>57</sup>.

**Tabela 4.** Características fenotípicas utilizadas na taxonomia bacteriana (adaptado de Busse et al. <sup>8</sup>; Trüper e Schleifer <sup>63</sup>).

<b><i>Categoria</i></b>	<b><i>Exemplos</i></b>
Cultura	Morfologia da colônia Cor da colônia Corpo de frutificação Micélio
Morfologia	Formato celular Tamanho celular Mobilidade Tipo de flagelo Endósporo Materiais de reserva Coloração de Gram Coloração rápida com ácido “acid-fast stain”
Fisiologia	Amplitude de temperatura para o crescimento Amplitude de pH para o crescimento Tolerância à salinidade
Bioquímica	Utilização de fontes de carbono Oxidação de carboidratos Fermentação de carboidratos Perfil enzimático
Testes de inibição	Meio seletivo Antibióticos Corantes
Sorologia	Aglutinação Imunodifusão
Quimiotaxonomia	Ácidos graxos Lípidios polares Opanóides Ácidos micólicos Composição de lipopolisacarídeos Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de lipopolisacarídeos Diaminoácidos da parede celular Composição de aminoácidos da parede celular Açúcares totais da célula Pigmentos celulares Sistema de quinonas Conteúdo de poliaminas Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totais da célula

## 5. Técnicas atuais na Taxonomia Bacteriana

### a) Utilização da genômica na taxonomia bacteriana

Atualmente devido ao grande número de genomas bacterianos sequenciados e ao desenvolvimento de sofisticadas ferramentas de bioinformática, as quais permitem analisar e identificar semelhanças e diferenças entre genomas, novas estratégias têm sido desenvolvidas para uma descrição mais apurada das relações filogenéticas entre os microrganismos <sup>9, 12, 25, 30, 56</sup>. Estas estratégias podem permitir o desenvolvimento de um sistema de classificação natural que represente mais precisamente a história evolutiva <sup>9</sup>. Embora as sequências dos genes ribossomais 16S e a hibridação DNA-DNA continuem sendo consideradas como critérios moleculares para o delineamento de espécies, espera-se que muitas informações taxonômicas adicionais possam ser obtidas a partir de sequências genômicas completas <sup>9</sup>.

Devido às limitações da técnica de HDD para se delimitar as espécies bacterianas, vários métodos foram propostos para substituí-la. Dentre eles, o mais promissor é a técnica ANI (“Average Nucleotide Identity”), fundamentada na similaridade nucleotídica média que os genomas de duas estirpes compartilham<sup>27,28,48,51</sup>. Por comparar um grande número de genes conservados “in silico”, a similaridade média dos genomas representa uma medida robusta da distância genética e evolutiva entre eles. De acordo com Goris et al. <sup>20</sup>, genomas que mostram valores maiores que 95% de similaridade correspondem ao valor mínimo de 70% de HDD estabelecido para se definir uma espécie procariótica. Outra vantagem da técnica é que os genomas sequenciados podem ser depositados em bancos de dados públicos, tornando-os de fácil acesso.

Com um número cada vez maior de genomas sequenciados, também foi possível desenvolver uma ferramenta de bioinformática, conhecida como HDD digital, que permite a comparação de genomas “in silico” e que visa substituir a técnica manual de HDD. Os resultados são promissores, uma vez que os valores encontrados correspondem àqueles dados de HDD experimental, facilitando, assim, o trabalho dos taxonomistas na identificação da grande diversidade microbiana existente <sup>2, 11</sup>.

A partir de comparações entre genomas sequenciados de representantes de uma mesma espécie, concluiu-se que a sequência genômica de uma linhagem não representa a diversidade genética existente em uma espécie <sup>9</sup>. Assim, Lan e Reeves<sup>33</sup> sugeriram a definição de genoma da espécie “species genome”, incluindo todos os

genes existentes nas linhagens caracterizadas na espécie, de forma a ter uma ideia da variação existente na espécie. O genoma da espécie consiste de dois componentes: um “core” de genes – que são os genes presentes na maioria das linhagens representativas da espécie e os “genes auxiliares”<sup>9</sup>.

A partir das sequências genômicas completas já disponíveis foi possível verificar uma relação entre o modo de vida da bactéria e a proporção de genes “core” e “genes auxiliares”<sup>9</sup>. Assim, observou-se que bactérias parasitas intracelulares obrigatórias, como a *Chlamydomphila pneumoniae*, as quais estão intimamente adaptadas ao ambiente fisiológico estável de seus hospedeiros, tendem a conter poucos genes auxiliares. No entanto, bactérias de vida livre, como a *Escherichia coli*, possuem um conteúdo de genes flexíveis (genes auxiliares) muito grande, proporcionando uma maior adaptabilidade a diferentes condições ambientais<sup>9</sup>.

Pela comparação de genomas relacionados foi possível inferir possíveis eventos que levaram à grande diversidade em relação ao conteúdo e organização dos genomas<sup>9, 56</sup>. Assim, foi possível identificar eventos como rearranjos cromossomais, perda de genes, duplicações gênicas e a transferência horizontal de genes<sup>9</sup>.

A duplicação gênica é considerada um importante mecanismo antecedente à inovação gênica e, conseqüentemente, facilitando a adaptação a novos ambientes e a exploração de novos nichos ecológicos<sup>23</sup>. Análises recentes de genomas bacterianos têm demonstrado que a maioria dos genes duplicados em bactérias surgiu a partir de eventos de duplicação de genes “pequenos”<sup>18</sup>. Identificou-se que os genes parálogos compreendem mais de 44% da capacidade codificadora do genoma bacteriano, sendo denominado de “paranome”<sup>23</sup>. Jordan et al.<sup>24</sup> verificaram que as famílias de genes parálogos contribuíram significativamente para as diferenças fenotípicas observadas entre linhagens bacterianas. Análises dos genomas indicam que os genes envolvidos em processos de adaptação a ambientes em constante mudança são mantidos após a duplicação gênica, demonstrando a importância da duplicação gênica na evolução biológica<sup>9</sup>.

Análises comparativas de genomas procariontes têm identificado a presença de uma grande proporção do conteúdo gênico como tendo sido adquirida por eventos de transferência horizontal de genes (“horizontal gene transfer”- HGT)<sup>30, 44</sup>. A introdução de novos genes ou alelos pela HGT permite a adaptação a nichos específicos, a qual pode eventualmente levar à diversificação bacteriana e especiação<sup>44</sup>.

Os estudos atuais de genômica comparativa indicam que os genomas bacterianos não estão crescendo em tamanho, mas reorganizando ou redistribuindo ao invés de acumular sequências <sup>9</sup>. Conseqüentemente, a aquisição de genes por duplicação gênica e a HGT devem estar sendo contrabalanceadas pela perda de genes <sup>9</sup>. As deleções cromossômicas servem para eliminar genes não essenciais ou que não são funcionais <sup>41</sup>. Em alguns casos, a perda de genes proporcionou uma vantagem adaptativa. Um exemplo são as *Shigella* spp., as quais, provavelmente, evoluíram a partir da *Escherichia coli* para se tornarem patogênicas. Para isso, as *Shigella* spp. não somente adquiriram genes de virulência em um plasmídio, mas também houve deleção de um grande fragmento genômico, ocorrendo a perda de genes que eram prejudiciais ao modo de vida da bactéria patogênica, permitindo uma maior virulência <sup>39</sup>. A extrema redução do genoma tem sido observada em grupos bacterianos que possuem um estilo de vida intimamente associado a um hospedeiro, como por exemplo: micoplasmas, clamídias, espiroquetas, buchneras e rickettsias. Acredita-se que a redução do genoma seja a principal força por trás da evolução das bactérias parasitas intracelulares obrigatórias, conhecido como evolução por redução <sup>9</sup>.

Juntamente com os fenômenos que influenciam a variação no conteúdo gênico (duplicação gênica, HGT e perda de genes), o rearranjo genômico é uma força motora por trás da constante evolução da organização genômica. Com o aumento no número de genomas sequenciados, observou-se que o nível de conservação do genoma é maior entre organismos filogeneticamente intimamente relacionados <sup>9</sup>. Observou-se que a ordem dos genes em procariotos, mesmo em nível de operon (“open reading frame” – sequência de leitura aberta) é muito menos conservada do que a média de similaridade de sequências proteicas, indicando que a posição relativa dos genes não é essencial para a função gênica <sup>74</sup>. A conservação da ordem dos genes pode ser utilizada como uma medida filogenética para estudar as inter-relações entre espécies <sup>9, 31</sup>.

Com base em estudos sobre a organização dos genomas bacterianos, observou-se que o grau de flexibilidade do genoma é dependente do conteúdo de sequências repetidas e móveis, tais como os elementos de sequência de inserção (ISE), transposons conjugativos, plasmídios e bacteriófagos <sup>26</sup>. Cromossomos contendo uma alta densidade de repetições possuem altas taxas de rearranjos, as quais levam a uma perda acelerada da ordem dos genes <sup>9, 50</sup>. Os estudos de rearranjos cromossômicos têm demonstrado a influência destes na evolução do

genoma e, também, a função exercida pela replicação no direcionamento da evolução do genoma <sup>61</sup>.

Diferentes metodologias foram desenvolvidas, recentemente, para inferir as relações taxonômicas com base na sequência completa de genomas. Um número representativo das metodologias utilizadas é apresentado na Tabela 5, as quais são classificadas de acordo com o tipo de análise a que se aplicam <sup>9</sup>.

**Tabela 5.** Metodologias utilizadas para inferir as relações taxonômicas entre procariontes com base em sequências genômicas totais <sup>9</sup>.

<b>Metodologia</b>	<b>Tipo de análise que realiza</b>
Conteúdo gênico	Identificação de genes ortólogos entre genomas
Ordem gênica	Comparações na conservação da ordem dos genes entre genomas
Análise comparativa de sequências de macromoléculas conservadas	Construção de árvores filogenéticas com base no alinhamento concatenado de genes conservados
Distância filogenética com base no BLAST genômico “Genome Blast Distance Phylogeny” (GBDP)	Construção de árvores filogenéticas com base em comparações de similaridade das sequências nucleotídicas totais entre genomas
Análises de presença e ausência de genes	Análise da presença e ausência de genes que codificam para famílias de proteínas. As características das proteínas estudadas são: dobras “folds”, inserções ou deleções (“indels” ou “signature sequences”). Ex. Árvores filogenéticas construídas com base na presença/ausência de “folds” proteicos
Composição de nucleotídeos	Análise comparativa da composição de dinucleotídeos (dissimilaridade relativa de dinucleotídeos - $\delta^*$ ) entre genomas
Vias metabólicas “metabolic pathway reaction content”	Construção de árvores filogenéticas com base no conteúdo de enzimas e reações das vias metabólicas, reconstruídas a partir das informações das anotações dos genomas

### **b) Utilização da metodologia de “Multilocus Sequence Analysis” – MLSA**

Embora a filogenia bacteriana esteja baseada na análise do gene ribossomal 16S, recentemente vários estudos têm demonstrado que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrer transferência horizontal e recombinação genética, resultando em sequências mosaicas <sup>30, 38, 64</sup>. Essas observações implicam em que a análise filogenética bacteriana, com base exclusivamente no gene ribossomal 16S, pode nem sempre refletir corretamente a filogenia dos procariotos. Outra desvantagem do uso exclusivo do gene ribossomal 16S nos estudos de taxonomia, filogenia e evolução é que as espécies muito relacionadas nem sempre podem ser distinguidas, pelo fato de apresentarem um alto nível de conservação nas

sequências nucleotídicas do gene ribossomal 16S e, assim, não possibilitando a identificação das divergências evolutivas <sup>59</sup>.

Atualmente, tem sido proposta uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana, a qual consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci), que apresentem uma taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais. Desta forma, a análise conjunta de múltiplos genes poderia funcionar como um “tampão” contra efeitos de recombinação ou transferência horizontal (HGT) ocorridos em um único gene específico <sup>17</sup>.

Com base nessa estratégia foi desenvolvida e utilizada para muitos grupos bacterianos, principalmente em bactérias patogênicas, a metodologia de “Multilocus Sequence Typing” (MLST), um método para a caracterização genotípica de procariotos em nível infraespecífico <sup>17</sup>. O MLST consiste no sequenciamento e análise (similaridade alélica) conjunta (como uma única sequência concatenada) de, no mínimo, cinco (usualmente sete) genes “housekeeping” <sup>13, 59</sup>. Atualmente o MLST é mais utilizado na epidemiologia molecular na diferenciação de linhagens de uma mesma espécie <sup>17</sup>.

Com base na metodologia de MLST foi proposta a metodologia de “Multilocus Sequence Analysis” (MLSA), visando a sua utilização para a definição de espécies e elucidação de relações taxonômicas entre espécies <sup>17, 38, 55</sup>. Na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, sendo utilizados procedimentos de análise filogenética com base na sequência de nucleotídeos de genes (alelos) que estejam presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família). Esta metodologia tem permitido a discriminação em nível de espécie onde, inicialmente, os organismos são identificados em nível de gênero ou família com base no gene ribossomal 16S e, posteriormente, identificados em nível de espécie com base na metodologia de MLSA<sup>17</sup>.

De acordo com Zeigler <sup>77</sup>, os genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer a alguns critérios, como: a) estarem distribuídos no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb, b) estarem presentes no genoma em uma única cópia, c) terem extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento, d) contenham informações suficientes para as análises e, finalmente, e) que os dados obtidos com o uso destes genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridação DNA-DNA.

Muitos genes “housekeeping” já foram identificados e estão sendo empregados com sucesso para se inferir a taxonomia, a filogenia e a evolução dos procariotos <sup>3, 14, 37, 38, 76</sup>. A sequência concatenada desses genes também pode ser utilizada para se calcular o ANI; um valor de 96% de ANI é equivalente a 70% de HDD, revelando-se uma forma rápida para elucidar as relações genéticas e evolutivas de espécies intimamente relacionadas <sup>27, 76</sup>.

A metodologia de MLSA já foi aplicada em estudos taxonômicos de diferentes gêneros bacterianos, como *Bulkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* e *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Microvirga*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus* (antigamente conhecido por *Ralstonia*) e *Gluconacetobacter* <sup>1, 17, 38, 49, 60</sup>. Atualmente, a metodologia de MLSA, tem se mostrado como uma ferramenta decisiva na descrição de novas espécies bacterianas <sup>10, 11, 47</sup>.

### **c) Utilização da Espectrometria de Massa na identificação e classificação bacteriana**

Atualmente, técnicas as quais fazem uso da espectrometria de massa “mass spectrometry” (MS) estão sendo utilizadas em estudos de identificação e classificação bacteriana <sup>32, 52, 53</sup>. Estas metodologias são baseadas na detecção de proteínas e peptídeos ou na detecção de ácidos nucleicos <sup>32, 53</sup>.

A detecção de proteínas (perfis de proteínas) tem sido utilizada na identificação e/ou classificação bacteriana utilizando-se principalmente o espectrômetro de massa MALDI-TOF (“Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight”). Em muitos protocolos têm sido utilizado uma única colônia bacteriana, a qual é utilizada diretamente nas análises por espectrometria de massa <sup>32, 52, 53</sup>. O espectro de massa pode ser utilizado para a identificação bacteriana ao nível de gênero, espécie e, em alguns casos, subespécie<sup>53</sup>. Os espectros de massa obtidos são comparados com espectros de massa, experimentais ou teóricos) disponíveis em banco de dados específicos, incluindo espectros obtidos a partir de linhagens tipo (“type strains”) das espécies em estudo <sup>53</sup>. Os espectros proteicos obtidos são representados em sua maior parte por proteínas ribossomais, as quais representam uma grande proporção das proteínas sintetizadas pela célula bacteriana <sup>53</sup>. Os espectros de massa obtidos podem ser utilizados em análises de agrupamento “clustering analysis” e os

resultados obtidos aplicados aos estudos de classificação taxonômica de isolados bacterianos <sup>53</sup>.

O uso dos perfis proteicos de espectrometria de massa na identificação e classificação bacteriana tem sido realizado recentemente em diferentes estudos, os quais incluíram espécies de *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre outros <sup>15, 52, 53</sup>.

Diferentes metodologias foram recentemente desenvolvidas para a análise de sequências específicas de DNA ou RNA, envolvendo genes conservados evolutivamente (genes “housekeeping”), baseadas em espectrometria de massa. Estas metodologias têm sido também utilizadas na identificação e classificação bacteriana <sup>32, 53</sup>.

## 6. Considerações Finais

A possibilidade do desenvolvimento de uma classificação que poderá representar, de maneira mais precisa, a relação natural entre os organismos é o principal desafio atual dos taxonomistas, o que poderá ser proporcionado pelos estudos atuais de genômica bacteriana, os quais têm possibilitado um melhor entendimento dos mecanismos evolutivos. Além disso, a utilização e validação de novas metodologias moleculares, como o MLSA, e de metodologias com o uso de Espectrometria de Massa, em um número cada vez maior de gêneros bacterianos, têm permitido a identificação e classificação, de maneira mais precisa e rápida, de um maior número de isolados bacterianos.

## 7. Referências

1. ARDLEY J.K., PARKER M.A., DE MEYER S. E., TRENGOVE R.D., O'HARA G.W., REEVE W.G., YATES R.J., DILWORTH M.J., WILLEMS A., HOWIESON J.G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.2579-2588, 2012.
2. AUCH A.F., VON JAN M., KLENK, H.P., GÖKER M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**, v.2, p.117-134, 2010.
3. BALBOA S., ROMALDE J.L. Multilocus sequences analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease: description of *Vibrio tapetis* subsp. *britannicus* subs. nov. **Systematics and Applied Microbiology**, v.36, p.183-187, 2013.
4. BARCELLOS F.G., MENNA P., BATISTA J.S.S., HUNGRIA M. Evidence for horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.2635-2643, 2007.

5. BERTHIER F., BEUVIER E., DASEN A., GRAPPIN R. Origin and diversity of mesophilic *lactobacilli* in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. **International Dairy Journal**, v.11, p.293-305, 2001.
6. BOUTON Y., GUYOT P., BEUVIER E., TAILLIEZ P., GRAPPIN R. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative *lactobacilli* during Comté cheese ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.27-38, 2002.
7. BRENNER D.J., STALEY J.T., KRIEG N.R. Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2001, p.27-31.
8. BUSSE H.J., DENNER E.B.M., LUBITZ W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v.47, p.3-38, 1996.
9. COENYE T., GEVERS D., VAN DE PEER Y., VANDAMME P., SWINGS J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.147-167, 2005.
10. DALL'AGNOL R.F., RIBEIRO R.A., ORMEÑO-ORRILLO E., ROGEL M.A., DELAMUTA J.R.M., ANDRADE D.S., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p.4167-4173, 2013.
11. DELAMUTA J.R.M., RIBEIRO R.A., ORMEÑO-ORRILLO E., MELO I.S., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p.3342-3351, 2013.
12. DELSUC F., BRINKMANN H., PHILIPPE H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.361-375, 2005.
13. ENRIGHT M.C., SPRATT B.G. *Multilocus* sequence typing. **Trends in Microbiology**, v. 7, p.482-487, 1999.
14. ESTRADA-DE LOS SANTOS P., VINUESA P., MARTÍNEZ-AGUILAR L., HIRSCH A.M., CABALLERO-MELLADO J. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Current Microbiology**, v.67, p.51-61, 2013.
15. FERREIRA L., SÁNCHEZ-JUANES F., GARCÍA-FRAILE P., RIVAS R., MATEOS P. F., MARTÍNEZ-MOLINA E., GONZÁLEZ-BUITRAGO J. M., VELÁZQUEZ E. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. **PLOS ONE**, v.6, p.e20223.
16. FOX G.E., PECHMAN K.R., WOESE C.R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.27, p. 44-57, 1977.
17. GEVERS D., COHAN F.M., LAWRENCE J.G., SPRATT B.G., COENYE T., FEIL E.J., STACKEBRANDT E., VAN DE PEER Y., VANDAMME P., THOMPSON F.L., SWINGS J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.
18. GEVERS D., VANDEPOELE K., SIMILLION C., VAN DE PEER Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. **Trends in Microbiology**, v.12, p.148-155, 2004.
19. GILLIS M., VANDAMME P., DE VOS P., SWINGS J., KERSTERS K. Polyphasic Taxonomy. In: BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2001, p.43-48.
20. GORIS J., KONSTANTINIDIS K.T., KLAPPENBACH J.A. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.81-91, 2007.
21. GÜRTLER V., STANISICH V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p.3-16, 1996.
22. HEYNDRIKX M., VAUTERIN L., VANDAMME P., KERSTERS K., DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, v.26, p.247-259, 1996.
23. HOOPER S.D., BERG O.G. On the nature of gene innovation: duplication patterns in microbial genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, p.945-954, 2003.
24. JORDAN I.K., MAKAROVA K.S., SPOUGE J.L., WOLF Y.I., KOONIN E.V. Lineage-specific gene expansions in bacterial and archaeal genomes. **Genome Research**, v.11, p.555-565, 2001.
25. KLENK H.P., GÖKER M. En route to a genome-based classification of *Archaea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**. v.33, p.175-182, 2010.
26. KOLSTO A.B. Dynamic bacterial genome organization. **Molecular Microbiology**. v.24, p. 241-248, 1997.
27. KONSTANTINIDIS K.T., RAMETTE A., TIEDJE J.M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v.361, p.1929-1940, 2006.

28. KONSTANTINIDIS K.T., RAMETTE A., TIEDJE J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, p.7286-7293, 2006.
29. KONSTANTINIDIS K.T., TIEDJE J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.6258-6264, 2005.
30. KONSTANTINIDIS K.T., TIEDJE J.M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.504-509, 2007.
31. KORBEL J.O., SNEL B., HUYNEN M.A., BORK P. SHOT: a web server for the construction of genome phylogenies. **Trends in Genetics**, v.18, p.158-162, 2002.
32. KRÁSNÝ L., HÝNEK R., HOCHÉL I. Identification of bacteria using mass spectrometry techniques. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.353, p.67-79, 2013.
33. LAN R., REEVES P.R. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. **Trends in Microbiology**, v.8, p.396-401, 2000.
34. LIU W.T., MARSH T.L., CHENG H., FORNEY L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4516-4522, 1997.
35. LUDWIG W. Reprint of "Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification". **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.1-12, 2008.
36. LUDWIG W., KLENK H.P. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2001, p.49-65.
37. MARTENS M., DAWYNDT P., COOPMAN R., GILLIS M., DE VOS P., WILLEMS A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.58, p.200-214, 2008.
38. MARTENS M., DELAERE M., COOPMAN R., DE VOS P., GILLIS M., WILLEMS A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007.
39. MAURELLI A.T., FERNANDEZ R.E., BLOCH C.A., RODE C.K., FASANO, A. Black holes and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.95, 3943-3948, 1998.
40. MILLER J.M., RHODEN D.L. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology**. v.29, p.1143-1147, 1991.
41. MIRA A., OCHMAN H., MORAN N.A. Deletion bias and the evolution of bacterial genomes. **Trends in Genetics**. v.17, p.589-596, 2001.
42. MOORE, E.R.B., MIHAYLOVA, S.A., VANDAMME, P., KRICHEVSKY, M.I., DIJKSHOORN, L. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**. v.161, p.430-438, 2010.
43. MUYZER G. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.317-322, 1999.
44. OCHMAN H., LAWRENCE J.G., GROISMAN E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v.405, p.299-304, 2000.
45. OLIVE D.M., PAMELA B. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.
46. PUKAL R. DNA fingerprinting techniques applied to the identification, taxonomy and community analysis of prokaryotes. In: STAKCKEBRANDT E. **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. 1st. ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006. p.51-82.
47. RIBEIRO R.A., ROGEL M. A., LÓPEZ-LÓPEZ A., ORMEÑO-ORRILLO E., BARCELLOS, F.G., MARTÍNEZ J., THOMPSON F.L., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1179-1184, 2012.
48. RICHTER M., ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, p.19126-19131, 2009.
49. RIVAS R., GARCÍA-FRAILE P., VELÁZQUEZ E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v.2, p.51-69, 2009.
50. ROCHA E. P. DNA repeats lead to the accelerated loss of gene order in bacteria. **Trends in Genetics**. v.18, p.600-603, 2003.

51. ROSSELLÓ-MÓRA R. Towards a taxonomy of *Bacteria* and *Archaea* based on interactive and cumulative data repositories. **Environmental Microbiology**, v.14, p.318-334, 2012.
52. SÁNCHEZ-JUANES F., FERREIRA L., DE LA VEJA P.A., VALVERDE A., BARRIOS M.L., RIVAS R., MATEOS P.F., MARTINEZ-MOLINA E., GONZÁLEZ-BUITRAGO J.M., TRUJILLO M.E., VELÁZQUEZ E. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: Application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.565-571, 2013.
53. SAUER S., KLIEM M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.74-82, 2010.
54. SAVELKOUL P.H.M., AARTS H.J.M., DE HAAS J., DIJKSHOORN L., DUIM B., OTSEN M., RADEMAKER J.L.W., SCHOOLS L., LENSTRA J.A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p.3083-3091, 1999.
55. SCHLEIFER K.H. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**. v.32, p.533-542, 2009.
56. SNEL B., MARTIJN A.H., DUTILH B.E. Genome trees and the nature of genome evolution. **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.191-209, 2005.
57. STACKEBRANDT E. Defining taxonomic ranks. In: DWORKIN M. **The Prokaryotes**. 3.ed. Heidelberg, Berlin, New York: Springer, 2006. p.29-57.
58. STACKEBRANDT E. Phylogeny based on 16S rRNA/DNA. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2003. Disponível em: <<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/titles?filter=P>>. Acesso em: 11 dez. 2007.
59. STACKEBRANDT E., FREDERIKSEN W., GARRITY G.M., GRIMONT P.A.D., KÄMPFER P., MAIDEN M.C.J., NESME X., ROSSELLÓ-MORA R., SWINGS J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043-1047, 2002.
60. THOMPSON F.L., GEVERS D., THOMPSON C.C., DAWYNDT P., NASER S., HOSTE B., MUNN C.B., SWINGS J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of *multilocus* sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5107-5115, 2005.
61. TILLIER E.R.M., COLLINS R.A. Genome rearrangement by replication-directed translocation. **Nature Genetics**, v.26, p.195-197, 2000.
62. TINDALL B.J., ROSSELLÓ-MÓRA R., BUSSE H.J., LUDWIG W., KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.249-266, 2010.
63. TRÜPER H.G., SCHLEIFER K.H. Prokaryote characterization and identification. In: DWORKIN M. **The Prokaryotes**. 3.ed. Heidelberg, Berlin, New York: Springer, 2006. p.58-79.
64. VAN BERKUM P., TEREFWORK Z., PAULIN L., SUOMALAINEN S., LINDSTRÖM K., EARDLY B.D. Discordant phylogenies within the *rnm* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**. v.185, p.2988-2998, 2003.
65. VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERBSTERS K., SWINGS J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.
66. VERGNAUD G., POURCEL C. Multiple *locus* VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) analysis. In: STACKEBRANDT E. **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. 1.ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006. p.83-104.
67. VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., DE BRUIJN F. J., LUPSKI J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40, 1994.
68. WAYNE L.G., BRENNER D.J., COLWELL R.R., GRIMONT P.A.D., KANDLER, P., KRICHEVSKY M.I., MOORE L.H., MOORE W.E.C., MURRAY E., STACKEBRANDT E., STARR M.P., TRÜPER H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.37, p.463-464, 1987.
69. WELSH J.W., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
70. WELSH J.W., MCCLELLAND M. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pairwise combination of primers. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.5275-5279, 1991.
71. WELSH J.W., MCCLELLAND M. PCR-amplified length polymorphisms in tRNA intergenic spacers for categorizing *staphylococci*. **Molecular Microbiology**, v.6, p.1673-1680, 1992.
72. WIDJOJATMODJO M.N., FLUIT A., VERHOEF F. Rapid identification of bacteria by PCR-single stranded conformation polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.3002-3007, 1994.
73. WOESE C.R., KANDLER O., WHEELIS M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.87, p.4576-4579, 1990.

74. WOLF Y.I., ROGOZIN I.B., KONDRASHOV A.S., KOONIN E.V. Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. **Genome Research**, v.11, p.356-372, 2001.
75. WU Z., TSUMURA Y., BLOMQUIST G., WANG X.R. 18S gene variation among airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5389-5397, 2003.
76. ZHANG Y.M., TIAN C.F., SUI X.H., CHEN W.F., CHEN W.X. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of Rhizobia. **PLOS ONE**, v.7, p.e44936, 2012.
77. ZEIGLER D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1893-1900, 2003.
78. ZUCKERKANDL E., PAULING L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v.8, p.357-366, 1965.

## Capítulo 2

### ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Fatores de Virulência e Modulação do Sistema Imune**

---

Eiko Nakagawa Itano<sup>1,4</sup>

Luciene Airy Nagashima<sup>1,4</sup>

Berenice Tomoko Tatibana<sup>2</sup>

Fernanda Akemi Nakanishi Ito<sup>3</sup>

Kátia Key Oshiro<sup>1</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas

<sup>2</sup> Instituto Federal do Paraná - IFPR, Eixo Ambiente e Saúde/Saúde Bucal, Campus Londrina

<sup>3</sup> Centro de Ciências da Saúde-CCS, Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### **1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

O micro-organismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi descrito pela primeira vez em caso de actinomicose cervicofacial humana e denominado de *Bacterium actinomycetum comitans*, por Klinger (1912). Denominado de *Bacterium comitans* por Lieske (1921), e de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, por Topley & Wilson (1929). Em estudo de base filogenética foi reclassificado como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, dentro de um novo gênero, *Aggregatibacter*, que abrange as espécies anteriormente denominadas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, e *Haemophilus segnis*<sup>75</sup>.

Trata-se de um cocobacilo, Gram-negativo, não formador de esporos, imóvel, microaerófilo (5-10% CO<sub>2</sub>), fermentativo e produtor de catalase<sup>119</sup>. Apresenta desde formas cocoides até pequenos bastonetes encurvados, podendo aparecer individualmente, em pares ou pequenos agrupamentos<sup>41</sup>. Em isolamento primário, as colônias são translúcidas, com estruturas internas em forma de estrela e aderidas fortemente à superfície do meio solidificado<sup>92, 94</sup>. Essa bactéria é encontrada normalmente na cavidade bucal, sendo um dos principais micro-organismos envolvidos na periodontite<sup>18, 112</sup>.

*A. actinomycetemcomitans* podem ser classificados de acordo com a expressão de antígenos sorotipos-específicos. O sorotipo é determinado por antígenos relacionados ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície celular. Inicialmente foram descritos os sorotipos *a*, *b* e *c* <sup>120</sup>. Posteriormente, *d* e *e* <sup>86</sup> e *f* <sup>51</sup>. Há isolados que não correspondem aos seis sorotipos sendo proposto o sorotipo *g* <sup>100</sup>. O sorotipo *b* está associado com a periodontite agressiva e os sorotipos *a* e *c* estão associados a portadores saudáveis <sup>11</sup>, embora também tenham sido encontrados em pacientes com periodontite <sup>54</sup>. Diferenças genômicas entre as cepas de *A. actinomycetemcomitans* se dá por mutações no DNA bacteriano, havendo possibilidade de que um terço do total de genes do pangenoma possa sofrer mudança <sup>57</sup>.

De maneira geral, *A. actinomycetemcomitans* expressa fatores de virulência que promovem adesão ao tecido oral, suprime ou inativa a resposta imune do hospedeiro e induz a inflamação e destruição do tecido. A expressão de fimbrias e polissacarídeo são importantes para a formação de biofilmes densos <sup>28, 52</sup>.

A periodontite é definida tradicionalmente como uma doença oral que destrói o tecido periodontal, circunscrita em termos de danos, aos tecidos bucais de suporte dos elementos dentários. Por ser uma patologia inflamatória associada à bacteremia e dependente da susceptibilidade do hospedeiro em que ocorre uma quebra na homeostasia do sistema imune, os estudos tem procurado conhecer os mecanismos fisiopatológicos entre periodontite e outras doenças/alterações sistêmicas como doenças cardiovasculares, risco de alterações renais, complicações na gravidez, diabetes *mellitus* <sup>29, 73, 74, 105, 114, 118</sup>. Há vários estudos que mostram a associação de *A. actinomycetemcomitans* com doenças não-orais<sup>113, 116</sup>, tais como abscessos abdominais, cerebrais e faciais <sup>32, 84</sup>, infecção do trato urinário <sup>109</sup>, doenças cardiovasculares e endocardites <sup>8, 27, 73, 98</sup>, infecção pulmonar <sup>69</sup>, abscesso de glândula tireoide, osteomielites<sup>50</sup> e lesões pré-cancerosas<sup>88</sup>. Há evidências que sugerem que a remoção do processo inflamatório/infeccioso da periodontite, por meio do tratamento periodontal, estaria associada à diminuição de mediadores e marcadores inflamatórios determinantes na fisiopatologia de condições sistêmicas<sup>29,114</sup>.

Na doença periodontal, quando há formação de bolsas periodontais, o epitélio da bolsa é a única barreira entre o biofilme e o tecido conjuntivo. O epitélio fino freqüentemente ulcerado é facilmente rompido, permitindo o acesso das bactérias ao tecido conjuntivo e vasos sanguíneos <sup>31</sup>, podendo, portanto o periodonto

infectado agir como um foco para infecções extra-orais por disseminação desses micro-organismos a outras partes do corpo.

A doença periodontal, de forma geral, pode ser dividida em dois grandes grupos: periodontite agressiva localizada (PAL), anteriormente denominada periodontite juvenil localizada, e periodontite crônica (PC) anteriormente denominada periodontite do adulto. A PAL tem sido frequentemente associada a *A. actinomycetemcomitans*, que é o principal habitante das bolsas periodontais desses pacientes, enquanto que, na PC, o mesmo encontra-se associado a outros micro-organismos <sup>7, 10, 25, 78, 93, 119</sup>. Estas são denominações da classificação das Condições e Doenças Periodontais, consensuada em 1999, no Workshop Internacional, na qual as formas de periodontite foram reclassificadas em três tipos diferentes (crônica, agressiva e necrosante) e em manifestações periodontais de doenças sistêmicas <sup>4</sup>.

## **2. Resposta imune a *A. actinomycetemcomitans***

Padrões moleculares associados ao patógeno *A. actinomycetemcomitans* são reconhecidos por receptores semelhantes a Toll (TLR) 2 e TLR4. Sugere-se que o aumento na expressão de TLR2 por *A. actinomycetemcomitans* estaria envolvido na fagocitose e apoptose de monócitos via ativação de proteína quinase, ativada por mitógeno p38 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) <sup>53</sup>. Comparando animais nocautes para TLR2 ou TLR4 e animais selvagens, observou-se que esses receptores são essenciais para o controle da infecção, no entanto, a ausência de TLR2 levou à maior perda óssea, enquanto a ausência de TLR4 levou à menor perda. Os animais deficientes em TLR2 tiveram o influxo de neutrófilos e macrófagos para o periodonto mais tardio e diminuído, possivelmente devido à diminuição de citocinas como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$ , quimiocina CXC ligante 2 (CXCL2) e quimiocina CC ligante 5 (CCL5), além de diminuição de fagocitose e produção de óxido nítrico (NO) e aumento da apoptose de células fagocíticas, o que poderia explicar a falha no controle da infecção <sup>33</sup>. Animais deficientes em TLR4 também tiveram redução na produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e diminuição da migração de células inflamatórias. No entanto, essa menor reação inflamatória associada à diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase pode ter resultado em uma periodontite menos severa nesses animais <sup>63</sup>.

Além desses receptores, a indução por *A. actinomycetemcomitans* de dano aos tecidos e perda do osso alveolar também pode ser mediada por receptor 1 da proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica (NOD1) <sup>44</sup>.

Modelos experimentais em animais têm sido de grande utilidade para o estudo da doença periodontal. Em um modelo de infecção em ratos, após quatro semanas de infecção, houve resposta inflamatória com aumento de monócitos circulantes e de polimorfonucleares no epitélio juncional e gengival, além de aumento de células T CD8 e não de células T CD4 ou células T regulatórias nos linfonodos. Houve também produção de anticorpos e grande formação de osteoclastos. A infecção levou a perda de ligamento periodontal e aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , mas que foram reversíveis após tratamento antibacteriano <sup>22</sup>.

Em modelo murino, também foi mostrado na fase inicial da infecção, a ativação e aumento das células B e T CD4, aumento de imunoglobulina G (IgG) e de citocinas e moléculas como IL-12, TNF, IL-19, IL-21, CD70 e CD40L e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) 2, 3 e 10, por células B; e IL-10, IL-16, TNF, linfotóxina  $\beta$ , Fas ligante (FasL), receptor ativador de ligante de fator nuclear- $\kappa$ B (RANKL) e osteoprotegerina, por células T, levando posteriormente à reabsorção óssea. Na fase tardia, células T produziram TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , BMP11, e células B induziram IL-7, BMP11, FasL, além de BMP10. Adicionalmente ao fato de atuarem na reabsorção óssea, muitas dessas citocinas inflamatórias estão envolvidas em outras doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, artrite e diabetes <sup>62</sup>.

Na resposta de IgG ativada por *A. actinomycetemcomitans* inclui-se anticorpos que reagem tanto à bactéria quanto a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas. Esses anticorpos a LDL incluem anti-fosforilcolina (anti-FC) e anti- $\beta$ 2glicoproteína-1-dependente de anticardiolipina (anti-CL), relacionados com desordens associadas à aterosclerose e a complicações na gravidez. Indivíduos com periodontite frequentemente apresentam elevados níveis desses anticorpos. De forma semelhante, animais imunizados com *A. actinomycetemcomitans* induzem anti-CL. Esses anticorpos formam imunocomplexos que estimulam ainda mais as células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, que promovem resposta inflamatória duradoura de Th1, também estimulada por células matadoras naturais (NK) e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) <sup>106</sup>.

### **3. Fatores de *A. actinomycetemcomitans* que interferem no sistema imune do hospedeiro**

Dentre os mecanismos de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, estão muitos fatores capazes de suprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro e dentre os vários fatores de virulência pode-se destacar: leucotoxina (Ltx), LPS e toxina citoletal distensiva (Cdt).

### **3.1. Toxicidade sobre células fagocíticas: Leucotoxina**

Um dos fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* mais investigado é a Ltx, que é uma proteína hidrossolúvel termolábil com capacidade tóxica seletiva sobre monócitos, neutrófilos e macrófagos humanos, além de atuarem em linhagens celulares tais como Jurkat, MOLT-4, Daudi, Raji ou P3U1 <sup>72, 91, 110, 119</sup>.

A Ltx pode estar localizada na célula bacteriana ou sob forma solúvel no sobrenadante de cultivo <sup>48</sup>. Esta toxina pertence à família de proteínas RTX (*Repeats toxin*) e está localizada no *operon* composto por quatro genes *ltxC*, *ltxA*, *ltxB* e *ltxD* <sup>61</sup>. O gene *ltxA* codifica a toxina, enquanto os genes *ltxB*, *ltxC* e *ltxD* estão ligados com a ativação e transporte da toxina. Estruturalmente, LtxA apresenta um domínio de interação com a membrana da célula alvo localizado na região N-terminal, uma região central com 14 repetições de oito aminoácidos (sequência consenso LXGGXGND) e uma região C-terminal relacionada a translocação da toxina para a superfície celular bacteriana <sup>60</sup>.

A especificidade da LtxA está relacionada com um receptor específico das células-alvo, o antígeno associado à função leucocitária (LFA-1), o qual é exclusivamente expresso em leucócitos. Níveis de LFA-1 nas células estão correlacionados com a toxicidade da LtxA, sendo que LtxA atua preferencialmente em células do sistema imune que expressem a forma ativada de LFA-1. Esta forma ativada permite a ligação de LFA-1 à molécula de adesão intercelular (ICAM), resultando em migração das células ativadas para o local da infecção <sup>40, 49</sup>.

Observa-se com maior frequência *A. actinomycetemcomitans* produtores de Ltx em isolados clínicos de pacientes com doença periodontal, principalmente PAL, enquanto que acima de 80% dos isolados de indivíduos periodontalmente sadios não são produtores de LtxA ou são minimamente produtoras. Foram isoladas cepas de *A. actinomycetemcomitans* de pacientes com PC, sendo que 43% eram produtores de Ltx <sup>12, 120</sup>. Os ensaios com *A. actinomycetemcomitans* viáveis mostraram aumento de citotoxicidade com o aumento da relação célula alvo/bactérias. No entanto, isolados que possuíam baixa atividade leucotóxica quando em alta densidade bacteriana mostraram atividade equivalente ao da cepa leucotóxica em baixa concentração <sup>72</sup>.

O clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans* altamente produtor de LtxA, apresenta uma deleção de 530 pb na região promotora do operon da leucotoxina <sup>14</sup>, está associado à forma agressiva da doença e também à perda de inserção, especialmente em alguns grupos étnicos <sup>1,36</sup>. Essa incidência em grupos étnicos está mais relacionada a fatores do hospedeiro (da população estudada) do que fatores geográficos <sup>85</sup>.

Em modelo experimental de periodontite em ratos, utilizando linhagens, mutante (deleção do gene *ltxA*) e selvagem de *A. actinomycetemcomitans*, observou-se que a doença e perda óssea foi menor com a linhagem mutante em comparação com a linhagem que expressa a leucotoxina <sup>90</sup>.

Acredita-se que a LtxA tenha papel na evasão ao sistema imune. A seletividade da Ltx ao afetar leucócitos seria uma proteção contra a fagocitose, uma vez que ocorre infiltração de células polimorfonucleares após invasão da bactéria para destruí-la <sup>46,47</sup>. Sugere-se que LtxA aderindo à membrana da célula alvo por meio deste receptor ative vias de sinalização intracelular ainda indefinido com a ativação da caspase-1, a qual induz a ativação e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 <sup>45</sup>. Além disso, a LtxA também aumenta a expressão de ICAM-1 e molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) em células endoteliais, embora não se saiba por qual mecanismo, mostrando efeitos pró-inflamatórios adicionais dessa toxina <sup>23</sup>.

Foi observado aumento da concentração de IL-1 $\beta$  em exsudatos gengivais com periodontite e associação entre altos níveis dessa citocina com os de *A. actinomycetemcomitans*. Estudos sugerem que a bactéria pode usar IL-1 $\beta$  como um indicador do estado inflamatório do hospedeiro utilizando uma lipoproteína localizada na superfície da membrana externa <sup>79</sup>. Portanto, a LtxA pode induzir a produção e secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos, o que é mediado por ativação de caspase-1. A IL-1 $\beta$  está associada à reabsorção e perda óssea na periodontite. Estudos mostraram que macrófagos expostos a LtxA ativaram a reabsorção óssea enquanto a presença de anticorpos monoclonais anti- IL-1 $\beta$  inibia essa ativação, indicando que a reabsorção óssea causada pela LtxA é devido à liberação de IL-1 $\beta$  <sup>45,55, 56</sup>.

Ainda não está totalmente elucidado se o mecanismo de toxicidade da LtxA é o mesmo para todos os tipos celulares. Foi sugerido que a atividade citotóxica de LtxA possivelmente ocorra não pela simples formação de poros transmembrana, mas pela modificação da estrutura da bicamada lipídica, desestabilizando-a e assim causando seu rompimento <sup>15</sup>. Também foi proposta uma nova via de morte celular

em linhagem celular monocítica. Nesta células, LtxA se liga a LFA-1 ativada, é endocitada e transportada ao lisossoma, onde causa rompimento da membrana e vazamento do seu conteúdo, podendo assim induzir a morte celular direta ou induzir apoptose por meio de ativação das caspases <sup>24</sup>.

### **3.2. Endotoxina: lipopolissacarídeo**

O LPS faz parte da membrana externa de bactérias Gram-negativas e é composto por lipídeo A, cerne de oligossacarídeos e polissacarídeos do antígeno O, estes últimos são os que definem os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, os polissacarídeos do antígeno O de LPS são necessários para a secreção da LtxA em *A. actinomycetemcomitans* <sup>102</sup>.

Sabe-se que o LPS é capaz de induzir a resposta imune, o dano tecidual e a perda do osso alveolar. O LPS estimula a produção de várias citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. Essas citocinas estão relacionadas à osteoclastogênese, tanto por estimular diretamente a formação de osteoclastos, como faz TNF- $\alpha$ , ou por indiretamente promover RANKL, como é o caso de IL-1 e IL-6, fazendo, assim, que o LPS seja uma das causas da reabsorção óssea <sup>34</sup>.

Possivelmente relacionado à via PGE<sub>2</sub>-receptor específico acoplado à proteína G (EP4), LPS estimula a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que também contribui para a destruição óssea, uma vez que utilizando o inibidor de EP4 ocorre inibição de TNF- $\alpha$  e IL-6, além de inibição do aumento de osteoclasto por indução de LPS no osso alveolar <sup>77</sup>.

Um estudo realizado sobre o efeito do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) na produção de citocinas e na reabsorção óssea, em que macrófagos de camundongos *knockout* para IL-1Ra foram estimulados com LPS de *A. actinomycetemcomitans*, obteve-se como resultado, níveis aumentados de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 além de aumento na produção de PGE<sub>2</sub>, EP4 e na formação de osteoclasto<sup>68</sup>.

Foi mostrado que células epiteliais estimuladas com LPS de *A. actinomycetemcomitans* produzem IL-15. Utilizando este sobrenadante de cultivo dessas células epiteliais com LPS, com células T, estas são ativadas, produzindo IFN- $\gamma$  sendo essa ativação inibida quando se adiciona anticorpos anti-IL-15. Portanto, a IL-15 produzida pelas células epiteliais em resposta ao LPS deve estar envolvida na ativação de células T e produção de IFN- $\gamma$ , tendo então papel importante na resposta imune no tecido periodontal <sup>99</sup>.

Vários estudos mostram que o LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimula macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO). Também foram analisados os efeitos do tratamento com inibidor de NO ou com NO exógeno em animais estimulados com LPS e infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Com o inibidor, houve aumento dos níveis séricos de IgG2a e IFN- $\gamma$  e rápida cicatrização das lesões, sugerindo uma estimulação para uma resposta Th1 protetora, enquanto que com NO exógeno, ocorreu o inverso. Além disso, LPS de *A. actinomycetemcomitans* também estimula osteoblastos a produzirem NO, o que poderia estar relacionado à reabsorção óssea<sup>95-97</sup>.

O LPS possui propriedades aterogênicas, com formação de células espumosas e acúmulo de colesterol<sup>59</sup>, e estimula a formação de placas por macrófagos, pelo aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, o que poderia contribuir na aterosclerose, uma vez que *A. actinomycetemcomitans* está relacionado com doenças cardiovasculares<sup>42, 111</sup>.

### **3.3. Toxina genotóxica: toxina citoletal distensiva**

A toxina citoletal distensiva (Cdt) é produzida por bactérias Gram-negativas e causa distensão celular, parada do ciclo celular e/ou apoptose. Ela é composta de 3 subunidades: CdtA, CdtB e CdtC, e, apesar de CdtB ser considerada a subunidade ativa, CdtA e CdtC se ligam à célula alvo e são necessárias para atividade citotóxica<sup>58</sup>.

A Cdt produz efeitos em várias células, incluindo linfócitos e macrófagos e células epiteliais do periodonto<sup>21, 58, 76</sup>. Embora a presença de *A. actinomycetemcomitans* portador do gene *cdt* ocorra em baixa frequência na placa subgingival de pacientes com periodontite, a sua ocorrência está fortemente associado a periodontite agressiva<sup>103</sup>.

Esta toxina também apresenta a capacidade de induzir a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, mas não TNF- $\alpha$ , IL-12 ou fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) em células mononucleares periféricas<sup>3</sup>. Em macrófagos, além de inibir a fagocitose, a Cdt causa diminuição da produção de NO e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-12, comparado com *A. actinomycetemcomitans* não produtores da toxina<sup>6</sup>, podendo induzir apoptose tanto em células proliferativas e não-proliferativas, por mecanismos distintos<sup>83</sup>.

Quanto à resposta de anticorpos específicos a esta toxina, embora pacientes com periodontite agressiva tenham altos níveis de anticorpos a diversos antígenos de *A. actinomycetemcomitans*, não se observa diferença quando se compara os

níveis de anticorpos a Cdt de pacientes com PAL e controles <sup>117</sup>. Também não se observou diferença no título de IgG a CdtA e CdtB entre os grupos controle, com PAL e generalizada e PC, mas pacientes com periodontite agressiva generalizada reagiram com CdtC <sup>5</sup>.

#### **4. Aspectos epidemiológicos da doença periodontal e *A. actinomycetemcomitans***

Os estudos têm variado muito na doença periodontal. Protocolos de amostragem, métodos de detecção e análise microbiana com diferentes técnicas impedem comparações. Vários trabalhos de prevalência indicam uma diferença na distribuição global de *A. actinomycetemcomitans* entre os vários grupos populacionais, tanto na condição de saúde bem como no estado de doença periodontal <sup>13, 26, 37, 71, 84, 89, 104, 115</sup>.

Estudos no Brasil apontam para uma alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com PAL (80% dos 25 adolescentes analisados) <sup>107</sup>. Outro estudo encontrou resultados semelhantes, sendo que a prevalência foi de 72% em pacientes com PAL e de 41,6% em pacientes de PC <sup>19</sup>. Já no Chile encontrou-se uma baixa prevalência deste periodontopatógeno, com 29% na PAL e 35,2% na PC <sup>30, 66</sup>. Da mesma forma, no Japão, encontraram 20% na PAL e 17,5% na PC <sup>101</sup>. Assim, vários trabalhos apontam para uma alta prevalência <sup>20,80,81</sup> enquanto outros para uma baixa prevalência <sup>35,70</sup> nas diferentes patologias periodontais.

A importância desses achados corrobora a teoria da placa específica, juntamente com o conceito de que nem todas as cepas apresentam a mesma virulência, havendo também, o fator da carga bacteriana para instalação e progressão da doença. Além disso, apontam para a importância do monitoramento dos pacientes com periodontite, bem como a avaliação de risco de indivíduos susceptíveis principalmente no caso da PAL, onde nem todos os indivíduos são igualmente susceptíveis <sup>108</sup>. Parece haver uma correlação hereditária e genética para perda óssea, apesar de não haver a identificação de genes específicos responsáveis por ela <sup>16, 65, 67</sup>, embora análises raciais e de tendência familiar com a PAL sugerirem a transmissão de forma autossômica dominante <sup>108</sup>.

Nos Estados Unidos, em um levantamento nacional, a prevalência da PAL entre adolescentes de origem africana foi quinze vezes maior do que nos americanos caucasianos <sup>64</sup>. Parece haver uma relação entre o clone de *A.*

*actinomycetemcomitans*, JP2, e indivíduos de origem africana com a PAL<sup>36,82</sup>. Este clone virulento não foi detectado nos caucasianos europeus<sup>39, 43, 87</sup>. Isto embasa uma hipótese de que *A. actinomycetemcomitans* seria um patógeno oportunista na maior parte do mundo e, no caso dos adolescentes africanos, ou pelo menos naqueles portadores do clone JP2, seria um patógeno exógeno<sup>36</sup>.

A relação da ascendência africana do portador do clone JP2 levou à hipótese de que, inicialmente, possa ter surgido como um genótipo distinto na região mediterrânea da África e, posteriormente, se disseminou para a África Ocidental<sup>2,13,17,38,43</sup>. Outros tipos clonais de JP2 podem ser isolados a partir de indivíduos saudáveis, bem como de indivíduos com periodontopatia. Conforme mostrado em um estudo no Marrocos<sup>2</sup>, onde o clone JP2 é endêmico, a presença deste clone na placa dentária confere um risco aumentado para o desenvolvimento da PA<sup>17</sup>. Dados de portadores do clone JP2 com acompanhamento de dois anos evidenciaram um nível de estabilidade de colonização e uma relação a um risco relativo de PA maior para os indivíduos com colonização deste clone JP2 estável<sup>38</sup>. Padrões de infecção cruzada entre pais e filhos e colonização compartilhada de cepas clone JP2 entre irmãos foram demonstrados, o que pode indicar que a transmissão de *A. actinomycetemcomitans*, ocorre na vertical e pelo contato próximo de pessoa para pessoa<sup>9</sup>.

Sendo assim, *A. actinomycetemcomitans* caracteriza-se como um micro-organismo capaz de provocar alterações no hospedeiro, tanto em ambiente oral bem como extraoral; resultado do mecanismo de ação das toxinas e sua capacidade de aderir e penetrar nas células, facilitando a sua disseminação. Estas características conferem versatilidade à bactéria, dificultando o tratamento do portador.

## 5. Referências

1. ABERG C.H., KWAMIN F., CLAEISSON R., DAHLÉN G., JOHANSSON A., HAUBEK D. Progression of attachment loss is strongly associated with presence of the JP2 genotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: a prospective cohort study of a young adolescent population. **Journal of Clinical Periodontology**, v.41, p.232-241, 2014.
2. ABERG C.H., KWAMIN F., CLAEISSON R., JOHANSSON A., HAUBEK D. Presence of JP2 and Non-JP2 Genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. **Journal of Periodontology**, v.83, p.1520-1528, 2012.
3. AKIFUSA S., POOLE S., LEWTHWAITE J., HENDERSON B., NAIR S.P. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. **Infection and Immunity**, v.69, p.5925-5930, 2001.
4. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, p.53-54, 1999.

5. ANDO E.S., L. DE-GENNARO L.A., FAVERI M., FERES M., DIRIENZO J.M., MAYER M.P.A. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. **Journal of Periodontal Research**, v.45, p.471-480, 2010.
6. ANDO-SUGUIMOTO E.S., DA SILVA M.P., KAWAMOTO D., CHEN C., DIRIENZO J.M., MAYER M.P.A. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. **Cytokine**, v.66, p.46-53, 2014.
7. ARMITAGE G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and condition. **Annals of Periodontology**, v.4, p.1-6, 1999.
8. ASHRAFI R., MCKAY E., EBDEN L., JONES J., DAVIS G., BURGESS M. Endocarditis in a large district general hospital: A study of the microbiological spectrum between 2000 and 2011. **Experimental & Clinical Cardiology**, v.17, p.175-178, 2012.
9. ASIKAINEN S., CHEN C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology 2000**, v.20, p.65-81, 1999.
10. ASIKAINEN S., JOUSIMIES-SOMER H., KANERVO A., SUMMANEN P. Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and in matched controls. **Journal of Periodontology**, v.58, p.224-230, 1987.
11. ASIKAINEN S., LAI C.H., ALALUUSUA S., SLOTS J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. **Oral Microbiology and Immunology**, v.6, p.115-118, 1991.
12. BAEHNI P.C., TSAI C.C., McARTHUR W.P. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. **Archives of Oral Biology**, v.26, p.271-276, 1981.
13. BRÍGIDO J.A., DA SILVEIRA V.R., REGO R.O., NOGUEIRA N.A. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, 2013.
14. BROGAN J.M., LALLY E.T., POULSEN K., KILIAN M., DEMUTH D.R. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. **Infection and Immunity**, v.62, p.501-508, 1994.
15. BROWN A.C., BOESZE-BATTAGLIA K., DU Y., STEFANO F.P., KIEBA I.R., EPAND R.F., KAKALIS L., YEAGLE P.L., EPAND R.M., LALLY E.T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin cytotoxicity occurs through bilayer destabilization. **Cellular Microbiology**, v.14, p.869-881, 2012.
16. BROWN T.A., BYRES L., GARDNER M., VAN DYKE T.E. Subclass and molecular form of immunoglobulin A antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. **Infection and Immunity**, v.59, p.1126-1130, 1991.
17. CHEN C., WANG T., CHEN W. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. **Molecular Oral Microbiology**, v.25, p.207-214, 2010.
18. CHRISTERSSON L.A., ALBINI B., ZAMBON J.J., WISKEJÖ U.M., GENCO R.J. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light immunofluorescence and electromicroscopic studies. **Journal of Periodontology**, v.58, p.529-539, 1987.
19. CORTELLI J.R., CORTELLI S.C., JORDAN S., HARASZTHY V.I., ZAMBON J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.860-866, 2005.
20. DAHLEN G., WILDAR F., TEANPAISAN R., PAPANOU P.N., BAELUM V., FEJERSKOV O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. **Oral Microbiology and Immunology**, v.17, p.137-142, 2002.
21. DAMEK-POPRAWA M., HARIS M., VOLGINA A., KOROSTOFF J., DIRIENZO J.M. Cytolethal distending toxin damages the oral epithelium of gingival explants. **Journal of Dental Research**, v.90, p.874-879, 2011.
22. DE BRITO BEZERRA B., ANDRIANKAJA O., KANG J., PACIOS S., BAE H.J., LI Y., TSIAGBE V., SCHREINER H., FINE D.H., GRAVES D.T. *A. actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease promotes systemic and local responses in rat periodontium. **Journal of Clinical Periodontology**, v.39, p.333-341, 2012.
23. DIETMANN A., MILLONIG A., COMBES V., COURAUD P.O., KACHLANY S.C., GRAU G.E. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on endothelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v.61-62, p.43-50, 2013.
24. DIFRANCO K.M., GUPTA A., GALUSHA L.E., PEREZ J., NGUYEN T.V.K., FINEZA C.D., KACHLANY S.C. Leukotoxin (Leukothera®) targets active leukocyte function antigen-1 (LFA-1) protein and triggers a lysosomal mediated cell death pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.17618-17627, 2012.
25. ELLNER J.J., ROSENTHAL M.S., LERNER P.I., McHENRY M.C. Infective endocarditis caused by slow-growing fastidious gram-negative bacteria. **Medicine of Baltimore**, v.58, p.145-158, 1979.
26. ENNIBI O.K., BENRACHADI L., BOUZIANE A., HAUBEK D., POULSEN K. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.70, p.318-322, 2012.

27. FIGUERO E., SÁNCHEZ-BELTRÁN M., CUESTA-FRECHOSO S., TEJERINA J.M., DEL CASTRO J.A., GUTIÉRREZ J.M., HERRERA D., SANZ M. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by Nested polymerase chain reaction. **Journal of Periodontology**, v.82, p.1469-1477, 2011.
28. FINE D.H., FURGANG D., KAPLAN J.B., CHARLESWORTH J., FIGURSKI D.H. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. **Archives of Oral Biology**, v.44, p.1063-1076, 1999.
29. FURUTA M., EKUNI D., YAMAMOTO T., IRIE K., KOYAMA K., SANBE T., YAMANAKA R., MORITA M., KUROKI K., TOBE K. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.68, p.27-33, 2010.
30. GAJARDO M., SILVA N., GÓMEZ L., LEÓN R., PARRA B., CONTRERAS A., GAMONAL J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **Journal of Periodontology**, v.76, p.289-94, 2005.
31. GANDHIMADHI D., MYTHILI R. Periodontal infection as a risk factor for preterm low birth weight. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.14, p.14-120, 2010.
32. GARNER J.G. Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* at Auckland hospital. **New Zealand Medical Journal**, v.89, p.384-385, 1979.
33. GELANI V., FERNANDES A.P., GASPAROTO T.H., GARLET T.P., CESTARI T.M., LIMA, H.R., RAMOS JR. E.S., MALASPINA T.S.S., SANTOS C.F., GARLET G.P., DA SILVA J.S., CAMPANELLI A.P. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Periodontology**, v.80, p.2010-2019, 2009.
34. GRAVES D.T., LI J., COCHRAN D.L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v.90, p.143-153, 2011.
35. HAN N.M., XIAO X.R., ZHANG L.S., RI X.Q., ZHANG J.Z., TONG Y..H, YANG M.R., XIAO Z.R. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. **Journal of Periodontal Research**, v.26, p.409-414, 1991.
36. HAUBEK D., DIRIENZO J. M., TINOCO E.M.B. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.3037-3042, 1997.
37. HAUBEK D., ENNIBI O.K., POULSEN K., VAETH M., POULSEN S., KILIAN M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v.371, p.237-242, 2008.
38. HAUBEK D., ENNIBI O.K., VAETH M., POULSEN S., POULSEN K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Dental Research**, v.88, p.856-860, 2009.
39. HAUBEK D., POULSEN K., ASIKAINEN S., KILIAN M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.395-401, 1995.
40. HOGG N., SMITH A., MCDOWALL A., GILES K., STANLEY P., LASCHINGER M., HENDERSON R. How T cells use LFA-1 to attach and migrate. **Immunology Letters**, v.92, p.51-54, 2004.
41. HOLT S.C., TANNER A.C.R., SOCRANSKY S.S. Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **Infection and Immunity**, v.30, p.588-600, 1980.
42. ISODA T., TSUTSUMI T., YAMAZAKI K., NISHIHARA T. Measurement of plaque-forming macrophages activated by lipopolysaccharide in a micro-channel chip. **Journal of Periodontal Research**, v.44, p.609-615, 2009.
43. JENTSCH H., CACHOVAN G., GUENTSCH A., EICKHOLZ P., WOLFGANG P., EICK S. Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. **Clinical Oral Investigations**, v.16, p.1589-1597, 2012.
44. JIAO Y., HASEGAWA M., INOHARA N. Emerging roles of immunostimulatory oral bacteria in periodontitis development. **Trends in Microbiology**, v.22, p.157-133, 2014.
45. JOHANSSON A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. **Toxins**, v.3, p. 242-259, 2011.
46. JOHANSSON A., KALFAS S. Virulence mechanisms of leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. In: VIRDI M.S. (Ed.) **Oral Health Care - Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions**. doi: 10.5772/2520, 2012.
47. KACHLANY S.C., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. **Journal of Dental Research**, v.89, p.561-570, 2010.
48. KACHLANY S.C., FINE D.H., FIGURSKI D.H. Secretion of RTX leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity**, v.68, p.6094-6100, 2000.
49. KACHLANY S.C., SCHWARTZ A.B., BALASHOVA N.V., HIOE C.E., TUEN M., LE A., KAUR M., MEI Y., RAO J. Anti-leukemia activity of a bacterial toxin with natural specificity for LFA-1 on white blood cells. **Leukemia Research**, v.34, p.777-785, 2010.

50. KAPLAN A.H., WEBER D.J., ODDONE E.Z., PERFECT J.H. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. **Reviews of Infectious Diseases**, v.2, p.46-63, 1989.
51. KAPLAN J.B., PERRY M. B., MACLEAN L. L., FURGANG D., WILSON M. E., FINE D.H. Structural and genetic analysis of O-polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infection Immunology**, v.69, p.5375-5384, 2001.
52. KAPLAN J.B., VELLIYAGOUNDER K., RAGUNATH C., ROHDE H., MACK D., KNOBLOCK J.K., RAMASUBBU N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.8213-8220, 2004.
53. KATO S., NAKASHIMA K., NAGASAWA T., ABIKO Y., FURUICHI Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.46, p.164-170, 2013.
54. KAWAMOTO D., ANDO E.S., LONGO P.L., NUNES A.C., WIKSTRO M.M., MAYER M.P. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, p.493-501, 2009.
55. KELK P., CLAESSION R., CHEN C., SJÖSTEDT A., JOHANSSON A. IL-1 $\beta$  secretion induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. **International Journal of Medical Microbiology**, v.298, p.529-541, 2008.
56. KELK P., CLAESSION R., HANSTROM L., LERNER U.H., KALFAS S., JOHANSSON A. Abundant secretion of bioactive interleukin-1 by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Infection and Immunity**, v.73, p.453-458, 2005.
57. KITTIHOTIRAT W., BUMGARNER R.E., ASIKAINEN S., CHEN C. Identification of the pangenome and its components in 14 distinct *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains by comparative genomic analysis. **PLoS One**, v.6, e22420, 2011.
58. LAGERGÅRD T., KEITH J. Cytolethal distending toxin as virulence factor, protective antigen, and target for vaccine development. **Vaccine: Development and Therapy**, v.2, p.51-60, 2012.
59. LAKIO L., LEHTO M., TUOMAINEN A.M., JAUHAINEN M., MALLE E., ASIKAINEN S., PUSSINEN P.J. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Endotoxin Research**, v.12, p.57-64, 2006.
60. LALLY E.T., GOLUB E.E., KIEBA I.R., TAICHAMAN N.S., ROSENBLUM J., ROSENBLUM J.C., GIBSON C.W., DEMUTH D.R. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and composition to homologous toxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15451-15456, 1989.
61. LALLY E.T., KIEBA I.R., GOLUB E.E., LEAR J.D., TANAKA J.C. Structure/function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Journal of Periodontology**, v.67, p.298-308, 1996.
62. LI Y., MESSINA C., BENDAOU M., FINE D.H., SCHREINER H., TSIAGBE V.K. Adaptive immune response in osteoclastic bone resorption induced by orally administered *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in a rat model of periodontal disease. **Molecular Oral Microbiology**, v.25, p.275-292, 2010.
63. LIMA H.R., GELANI V., FERNANDES A.P., GASPAROTO T.H., TORRES S.A., SANTOS C.F., GARLET G.P., DA SILVA J.S., CAMPANELLI A.P. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. **Journal of Clinical Periodontology**, v.37, p.248-254, 2010.
64. LOE H., BROWN L. J. Early onset periodontitis in the United States of America. **Journal of Periodontology**, v. 62, p.608-616, 1991.
65. LOPEZ N.J. Clinical, laboratory, and immunological studies of a family with a high prevalence of generalized prepubertal and juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.63, p.457-468, 1992.
66. LOPEZ N.J., MELLADO J.C., LEIGHTON G.X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.23, p.101-105, 1996.
67. MARAZITA M.L., BURMEISTER J.A., GUNSOLLEY J.C., KOERTGE T.E., LAKE K., SCHENKEIN H.A. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.65, p.623-630, 1994.
68. MIZUTANI H., ISHIHARA Y., IZAWA A., FUJIHARA Y., KOBAYASHI S., GOTOU H., OKABE E., TAKEDA H., OZAWA Y., KAMIYA Y., KAMEI H., KIKUCHI T., YAMAMOTO G., MITANI A., NISHIHARA T., NOGUCHI T. Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* up regulates inflammatory cytokines, prostaglandin E2 synthesis and osteoclast formation in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. **Journal of Periodontal Research**, v.48, p.748-756, 2013.
69. MORRIS J.F., SEWELL D.L. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.18, p.450-452, 1994.

70. MULLALLY B. H., DACE B., SHELBURNE C. E., WOLFF L. F., COULTEN W. A. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology Research**, v.35, p.232-241, 2000.
71. MURAKAMI M., SUZUKI J.I, YAMAZAKI S., IKEZOE M., MATSUSHIMA R., ASHIGAKI N., AOYAMA N., KOBAYASHI N., WAKAYAMA K., AKAZAWA H., KOMURO I., IZUMI Y., ISOBE M. High incidence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in patients with cerebral infarction and diabetic renal failure: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v.13, p.557, 2013.
72. NAKAGAWA R.I., GUAZELI-AMIN V.L., HIDALGO M.M., ITANO E.N. Anticorpos antileucotoxina contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras de soro e saliva de pacientes com periodontite juvenil localizada. **Pesquisa Odontológica Brasileira** v.15, p.5-11, 2001.
73. NAKANO K., NEMOTO H., NOMURA R., INABA H., YOSHIOKA H., TANIGUCHI K., AMANO A., OOSHIMA T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, p.64-68, 2009.
74. NEGRATO C.A., TARZIA O., JOVANOVIĆ L., CHINELLATO L.E.M. Periodontal disease and diabetes mellitus. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, p.1-12, 2013.
75. NØRSKOV-LAURITSEN N., KILIAN M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb.nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2135-2146, 2006.
76. OHARA M., MIYAUCHI M., TSURUDA K., TAKATA T., SUGAI M. Topical application of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest in the rat gingival epithelium *in vivo*. **Journal of Periodontal Research**, v.46, p.389-395, 2011.
77. OKA H., MIYAUCHI M., FURUSHO H., NISHIHARA T., TAKATA T. Oral administration of prostaglandin E2-specific receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in rat periodontal tissue. **Journal of Periodontology**, v.83, p.506-513, 2012.
78. PAGE R.C, VANDESTEEN G.E., EBERSOLE J.L., WILLIAMS B.L., DIXON I.L., ALTMAN L.C. Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of a juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.56, p.602-609, 1985.
79. PAINO A., AHLSTRAND T., NUUTILA J., NAVICKAITE I., LAHTI M., TUOMINEN H., VÄLIMAA H., LAMMINMÄKI U., PÖLLÄNEN M.T., IHALIN R. Identification of a novel bacterial outer membrane interleukin-1 $\beta$ -binding protein from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **PLoS One**, v.8, p.e70509, 2013.
80. PAPAPANOU P.N., NEIDERUD A.M., PAPADIMITRIOU A., SANDROS J., DAHLEN G. Checkerboard assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. **Journal of Periodontology**, v.71, p.885-897, 2000.
81. PAPAPANOU P.N., TEANPAISAN R., OBIECHINA N.S., PITHPORNCHAIYAKUL W., PONGPAISAL S., PISUTHANAKAN S., BAE LUM,V., FEJERSKOV O., DAHLEN G.Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample en Southern Thailand. **European Journal of Oral Sciences**, v.110, p.345-352, 2002.
82. POULSEN K., KILIAN M. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.3037-3042, 1997.
83. RABIN S.D.P., FLITTON J.D., DEMUTH D.R. Induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. **Infection and Immunity**, v.77, p.3161-3169, 2009.
84. RAHAMAT-LANGENDOEN J.C., VAN VONDEREN M.G., ENGSTRÖM L.J., MANSON WL., VAN WINKELHOFF A.J., MOOI-KOKENBERG E.A. Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, p.702-706, 2011.
85. RYLEV M., KILIAN M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **Journal of Clinical Periodontology**, v.35, p.346-361, 2008.
86. SAARELA M., ASIKAINEN S., ALALUUSUA S., PYHALA L., LAI C.H., JOUSIMIES-SOMER H. Frequency and stability of mono-or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. **Oral Microbiology and Immunology**, v.7, p.277-279, 1992.
87. SAKELLARI D., KATSIKARI A., SLINI T., IOANNIDIS I., KONSTANTINIDIS A., ARSENAKIS M. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, p.108-114, 2011.
88. SALAZAR C.R., FRANCOIS F., LI Y., CORBY P., HAYS R., LEUNG C., BEDI S., SEGERS S., QUEIROZ E., SUN J., WANG B. , HO H., CRAIG R., CRUZ G.D., BLASER M.J., PEREZ-PEREZ G., HAYES R.B., DASANAYAKE A., PEI Z., CHEN Y. Association between oral health and gastric precancerous lesions. **Carcinogenesis**, v.33, p.399-403, 2012.
89. SALAZAR C.R., SUN J., LI Y., FRANCOIS F., CORBY P., PEREZ-PEREZ G., DASANAYAKE A., PEI Z., CHEN Y. Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions. **PLoS One**, v.8, p. e51604, 2013.

90. SCHREINER H., LI Y., CLINE J., TSIAGBE V.K., FINE D.H. A comparison of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) virulence traits in a rat model for periodontal disease. **PLoS One**, v.8, p. e69382, 2013.
91. SIMPSON D.L., BERTHOLD P., TAICHMAN N.S. Killing of human myelomonocytic leukemia and lymphocytic cell lines by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Infection and Immunity**, v.56, p.1162-1166, 1988.
92. SLOTS J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.606-609, 1982.
93. SLOTS J., LISTGARTEN M.J. *Bacterioides gingivalis*, *Bacterioides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.85-93, 1988.
94. SLOTS J., REYNOLDS H.S., GENCO R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infection and Immunity**, v.29, p.1013-1020, 1980.
95. SOSROSENO W., BIRD P.S., SEYMOUR G.J. Effect of exogenous nitric oxide on murine splenic immune response induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **Anaerobe**, v.15, p.95-98, 2009.
96. SOSROSENO W., BIRD P.S., SEYMOUR G.J. Nitric oxide production by a human osteoblast cell line (HOS cells) stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, p.50-55, 2009.
97. SOSROSENO W., MUSA M., RAVICHANDRAN M., FIKRI IBRAHIM M., BIRD P.S., SEYMOUR G.J. Effect of L-N6-(1-iminoethyl)-lysine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, on murine immune response induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **Journal of Periodontal Research**, v.42, p.124-130, 2007.
98. STRAKA M., KAZAR J., PIJAK M.R., GASPAROVIC J., WSOLOVA L., MONGIELLOVA V. The importance of the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in *sulcus gingivalis* of patients with cardiovascular diseases. **Medical Science Monitor**, v.17, p.CR646-CR649, 2011.
99. SUGA T., MITANI A., MOGI M., KIKUCHI T., FUJIMURA T., TAKEDA H., HISHIKAWA T., YAMAMOTO G., HAYASHI J.I., ISHIHARA Y., NOGUCHI T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulated epithelial cells produce interleukin-15 that regulates T cell activation. **Archives of Oral Biology**, v.58, p.1541-1548, 2013.
100. TAKADA K., SAITO M., TSUZUKIBASHI O., KAWASHIMA Y., ISHIDA S., HIRASAWA M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Molecular Oral Microbiology**, v.25, p.200-206, 2010.
101. TAKEUCHI Y., UMEDA M., ISHIZUKA M., HUANG Y., ISHIKAWA I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **Journal of Periodontology**, v.74, p.1460-1469, 2003.
102. TANG G., KAWAI T., KOMATSUZAWA H., MINTZ K.P. Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Molecular Oral Microbiology**, v.27, p.70-82, 2012.
103. TAN K.S., SONG K.P., ONG G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.37, p.268-272, 2002.
104. TAN L., WANG H., LI C., PAN Y. 16S rDNA-based metagenomic analysis of dental plaque and lung bacteria in patients with severe acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Periodontal Research**, 2014.
105. TELES R., WANG C.Y. Mechanisms involved in the association between periodontal diseases and cardiovascular disease. **Oral Disease**, v.17, p.450-461, 2011.
106. TEW J.G., EL SHIKH M.E., EL SAYED R.M., SCHENKEIN H.A. Dendritic cells, antibodies reactive with oxldl, and inflammation. **Journal of Dental Research**, v.91, p.8-16, 2012.
107. TINOCO E.M.B., BELDI M.I., LOUREIRO C.A. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **European Journal of Oral Sciences**, v.105, p.9-14, 1997.
108. TONETTI M.S., MOMBELLI A. Early-onset periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, p.39-53, 1999.
109. TOWNSEND T.R., GILLENWATER J.Y. Urinary tract infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of the American Medical Association**, v.21, p.558, 1969.
110. TSAI C.C., TAICHMAN S. Dynamics of infection by leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p.330-331, 1986.
111. TSUTSUMI T., NAKASHIMA K., ISODA T., YOKOTA M., NISHIHARA T. Involvement of adhesion molecule in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **Journal of Periodontal Research**, v.45, p.550-556, 2010.

112. VAN STEENBERGEN T.J., BOSCH-TIJHOF C.J., VAN WINKELHOFF A.J., GMÜR R., DE GRAAF J. Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2769-2774, 1994.
113. VAN WINKELHOFF A.J., SLOTS J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. **Periodontology** 2000, v.20, p.122-135, 1999.
114. VIDAL F., FIGUEREDO C.M., CORDOVIL I., FISCHER R.G. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. **Journal of Periodontology**, v.80, p.786-791, 2009.
115. VIEIRA E.M., RASLAN S.A., WAHASUGUI T.C., AVILA-CAMPOS M.J., MARVULLE V., GAETTI-JARDIM JÚNIOR E. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilian Indians from Umutina Reservation, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Applied Oral Science**, v.17, p.440-445, 2009.
116. WANG C.Y., WANG H.C., LI J.M., WANG J.Y., YANG K.C., HO Y.K., LIN P.Y., LEE L.N., YU C.J., YANG P.C., HSUEH P.R. Invasive Infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.43, p.491-497, 2010.
117. XYNOGALA I., VOLGINA A., DIRIENZO J.M., KOROSTOFF J. Evaluation of the humoral immune response to the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 in subjects with localized aggressive periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, p.116-123, 2009.
118. YE C., KATAGIRI S., MIYASAKA N., BHARTI P., KOBAYASHI H., TAKEUCHI Y., MOMOHARA Y., SEKIGUCHI M., TAKAMINE S., NAGASAWA T., IZUMI Y. The anti-phospholipid antibody-dependent and independent effects of periodontopathic bacteria on threatened preterm labor and preterm birth. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.1, p.65-72, 2013.
119. ZAMBON J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, p.1-20, 1985.
120. ZAMBON J.J., CHRISTERSSON L.A., SLOTS J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **Journal of Periodontology**, v.54, p.707-711, 1983.

## Capítulo 3

### *Escherichia coli* Diarreiogênica em Animais

---

Juan Josue Puño Sarmiento<sup>1,3</sup>

Luis Eduardo de Souza Gazal<sup>1,3</sup>

Leonardo Pinto Medeiros<sup>1,3</sup>

Jacinta Sanchez Pelayo<sup>2,3</sup>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,3</sup>

Gerson Nakazato<sup>1,3</sup>

Sérgio Paulo Dejato da Rocha<sup>2,3</sup>

Universidade Estadual de Londrina – UEL

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>2</sup> Laboratório de Bacteriologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### 1. Introdução

Os patógenos que causam diarreia possuem um modo de transmissão similar, a transmissão fecal-oral. Esta transmissão pode ocorrer de maneira direta, de pessoa para pessoa e/ou indireta, ou seja, as fezes humanas ou de animais contaminadas entram em contato com alimentos e/ou água, que por sua vez, quando não higienizados ou tratados corretamente, são ingeridos juntamente com os patógenos <sup>64</sup>.

#### 2. Agentes causadores da diarreia

Dentre os patógenos causadores, Rotavirus é responsável por em média 40% das admissões hospitalares por diarreia em crianças abaixo de cinco anos em todo mundo <sup>63</sup>. Em segundo lugar, *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) é responsável por 30 a 40% dos episódios de diarreia aguda nos países em desenvolvimento, atingindo principalmente crianças abaixo de cinco anos e idosos <sup>48</sup>. Além destes, outros agentes causadores incluem: *Norovirus*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas* sp. Infecções causadas por protozoários e helmintos ocorrem principalmente em áreas onde o saneamento ambiental é significativamente precário <sup>48</sup>.

Devido à importância epidemiológica de DEC como o principal agente bacteriano causador da diarreia, este micro-organismo será detalhado no presente capítulo, tendo como foco a patogenicidade, fatores de virulência e animais como reservatório.

### **3. *Escherichia coli* Diarreiogênica**

*E. coli* associada a infecção intestinal, tanto em crianças, adultos e outras espécies, é conhecida como DEC. As cepas de DEC são tradicionalmente divididas em seis patotipos ou categorias, baseado nos seus marcadores de virulência específicos, manifestações clínicas e a sua interação com células epiteliais cultivadas *in vitro* <sup>30</sup>. Esses patotipos são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Embora essa classificação continue sendo amplamente usada pela maioria dos autores, tem sido mostrado que algumas categorias incluem patotipos diferentes. Desta forma, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as linhagens de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC <sup>30</sup>.

Croxen e Finlay <sup>10</sup> consideram mais dois novos patotipos: *E. coli* aderente invasiva (AIEC), aparentemente associada a doença de Crohn, mas não causa diarreia e *E. coli* enteroagregativa produtora de Shiga-toxina (STEAE) <sup>9</sup>, responsável pelo surto de *E. coli* em 2011 na Alemanha <sup>23</sup>.

#### **3.1. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)**

Atualmente, EPEC é subdividido em EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC). Esta classificação é baseada na presença do plasmídio EAF (*EPEC adherence factor*) e expressão da fimbria BFP (*Bundle-forming pilus*) na tEPEC <sup>49</sup>. O principal mecanismo de patogenicidade de ambas as EPEC conduz a uma lesão no epitélio intestinal denominada “*Attaching and Effacing*” (A/E). Este mecanismo inicia-se com a adesão íntima da bactéria à membrana apical do enterócito, levando à destruição das microvilosidades intestinais e resultando na formação de estruturas semelhantes a pedestais. Este fenômeno ocorre pela polimerização da actina e proteínas do citoesqueleto da célula hospedeira <sup>61</sup>. Os genes necessários para o estabelecimento da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade de 35,5 kb conhecida como *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). A região LEE

compreende cinco *operons* principais (LEE1-5) e 41 genes que codificam um grupo de proteínas que se distribuem em seis categorias: reguladores transcricionais, proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT), translocadores, chaperonas moleculares, proteínas efetoras secundárias, incluindo Tir e adesina intimina<sup>14, 65</sup>.

No entanto, linhagens de tEPEC provocam um quadro diarreico agudo, atingem preferencialmente crianças de países em desenvolvimento e seu reservatório é principalmente o homem. Por outro lado, linhagens de aEPEC, são importantes agentes causadores de diarreia persistente em animais e adultos de países em desenvolvimento e desenvolvidos<sup>49</sup>.

Até agora os relatos tem mostrado que tEPEC são raramente encontrados em animais. EPEC é também associada à diarreia em animais jovens como cães, gatos, ovinos, caprinos e bezerros<sup>45</sup>.

### **3.1.1. Animais como reservatório de EPEC**

#### ***Bovinos***

O bovino é considerado um importante reservatório de EPEC, o desenvolvimento deste patotipo chega a contaminar os alimentos como leite e carne, o que seria um fator de risco para os humanos.

EPEC é uma importante causa de diarreia, sobretudo em bezerros. Estudos realizados no Brasil, Suíça, e Suécia<sup>3, 13, 60</sup> mostram que bovinos são considerados importantes reservatórios de aEPEC. *E. coli* com os sorogrupos O126, O127, O55, O158, O125 foram encontrados nos trabalhos acima mencionados. Por tanto, o controle sanitário dos animais desde a criação, o abate até a obtenção da carne é fundamental. Estas medidas impediriam o acesso de patógenos aos alimentos, evitando, o desencadeamento de enfermidades ao consumidor deste produto.

#### ***Ovinos***

Existem vários relatos mostrando a presença de EPEC em ovinos de diferentes fazendas. Frohlicher e colaboradores<sup>24</sup> isolaram 53 colônias de aEPEC de fazendas da Suíça, o que representava 55% dos isolados de *E. coli*. Foram relatados similares resultados na Espanha e Alemanha<sup>12, 33</sup>, indicando altas porcentagens deste patotipo nesta espécie animal. Os sorogrupos reportados até o momento são O2, O26, O35, O70, O103, O145 e O156 que foram encontrados em trabalhos feitos na Alemanha, Inglaterra, País de Gales, Espanha, Suíça e no Brasil<sup>1, 33, 50</sup>. Não existem relatos sobre o isolamento de tEPEC em ovinos. Baseado nos resultados

relatados até o ano 2013 pode assumir-se que ovinos são considerados reservatórios de aEPEC para humanos.

### **Suínos**

Estes animais podem ser considerados reservatórios para este patotipo devido à alta incidência de aEPEC em suas amostras fecais. Os sorotipos O2:H40, O2:H49, O108:H9 e O145:H28 foram os mais frequentes e relatados até o momento <sup>24, 33, 37</sup>. Além disso, na Suíça foram isoladas cepas de tEPEC O157:H45 de amostras fecais de suínos prontos para abate <sup>31</sup>. Assim, os suínos podem ser considerados reservatórios de EPEC causadores de infecção humana.

### **Cães**

EPEC é considerado como uma importante causa de diarreia em cães, particularmente em filhotes. Um dos primeiros isolados de EPEC foi detectado no intestino de um filhote de oito semanas de idade <sup>7</sup>. Este isolado não era invasiva e pertencia ao sorotipo O49:H10.

Existe uma correlação positiva entre EPEC e o quadro diarreico em cães, além de ter sido relatada a presença de cepas de aEPEC em animais sadios servindo como reservatório para infecções humanas <sup>54</sup>. A presença de EPEC em cães representa um perigo para a saúde pública.

### **Gatos**

Outro animal de companhia que é pouco estudado, mas que poderia servir como fonte de infecção para os humanos são os gatos. Puño-Sarmiento e colaboradores <sup>54</sup> avaliaram a presença de EPEC em amostras fecais de 50 gatos. Foram isoladas três colônias de aEPEC em gatos com e sem diarreia. Similares resultados foram relatados por Morato e colaboradores <sup>43</sup>. Esses resultados poderiam indicar que gatos possam atuar como reservatórios de aEPEC.

## **3.2. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

EAEC foi definido pela primeira vez em 1987 como um grupo de bactérias que causava diarreia, não produtor de toxinas e que apresentava um padrão de aderência diferente ao encontrado em tEPEC (aderência localizada-AL) em células HEp-2 e HeLa, formando agregados bacterianos na superfície celular e em regiões da lamínula livre de células, em arranjo semelhante a tijolos empilhados (aderência

agregativa-AA) <sup>11</sup>. Atualmente, a configuração em “tijolos empilhados ” é uma condição obrigatória para este patotipo, que é reconhecido como um grupo emergente causador de diarreia aguda e persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias e afeta, principalmente, crianças de países em desenvolvimento <sup>11</sup>, e possivelmente com capacidade de secretar uma ou mais enterotoxinas <sup>26</sup>.

Recentemente, no Brasil, EAEC foi identificada como o principal agente causador de diarreia em crianças menores de cinco anos de idade <sup>5</sup>. Nos Estados Unidos, EAEC também foi descrita como um patógeno comum em crianças com diarreia <sup>21</sup>.

EAEC é um grupo complexo pela sua patogenicidade, porque apesar de vários autores associarem estas cepas com a mucosa do cólon, outros mostraram que poderiam também colonizar o intestino delgado <sup>4</sup>. Além disso, EAEC é considerado também um grupo heterogêneo, em relação à grande quantidade dos sorotipos encontrados. No entanto, alguns sorotipos estão associados a este grupo como O44:H18, O111:H12, O125, O126:H7 e vários sorotipos não tipáveis <sup>11</sup>.

Sarantuya e colaboradores <sup>(58)</sup> propuseram uma nova classificação das amostras de EAEC, como típica tEAEC e atípica aEAEC, baseado na presença ou ausência do gene *aggR*, o qual está localizado em um plasmídeo e codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de EAEC <sup>26</sup>.

Em animais, existem poucos relatos da presença de EAEC como agente causal de infecção intestinal ou como reservatórios deste patotipo. Uber e colaboradores <sup>62</sup>, fizeram a primeira identificação e caracterização de quatro cepas de aEAEC isoladas de leitão e bezerros. Puño-Sarmiento e colaboradores <sup>54</sup> relataram a presença de tEAEC em cães e gatos, oito cepas isoladas de cães, cinco das quais apresentavam quadro diarreico e uma cepa isolada de gato sem diarreia.

### **3.3. *Escherichia coli* Produtora de Shiga-Toxina (STEC) e *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

STEC pertence a um importante grupo de patógenos de origem alimentar, encontrados comumente no intestino de gado saudável <sup>40</sup>. STEC caracteriza-se por produzir ao menos uma das citotoxinas, chamadas de Shiga-toxina 1 (Stx1) e Shiga-toxina 2 (Stx2), codificada em fagos que interagem com o cromossomo bacteriano. STEC pode produzir apenas uma das toxinas ou mesmo ambas <sup>16, 25</sup>. Alguns autores referem-se a STEC como VTEC (*Escherichia coli* produtora de

Verotoxina), nome derivado dos ensaios de citotoxicidade em células Vero, realizados por Konowalchuk e colaboradores <sup>32</sup>. Em humanos, STEC pode causar diarreias sanguinolenta, com quadros de HC, que podem evoluir para a HUS. Essas cepas de STEC são um subgrupo denominado como EHEC.

EHEC, especialmente do sorotipo O157:H7, foram reconhecidas mundialmente a partir da década de 80 como um dos mais importantes patógenos causadores de doenças humanas veiculadas por alimentos. Na década de 90, a infecção causada por essa bactéria foi relatada em mais de 30 países de seis continentes, e sua severidade foi mostrada em grandes surtos principalmente no Japão, Costa Rica, Estados Unidos e Escócia <sup>42</sup>.

A HUS é caracterizada pela tríade: trombocitopenia, anemia hemolítica e microangiopatia trombótica, que contribuem para lesão renal aguda, sendo necessário em muitos casos, a realização de diálise, e em casos mais graves pode progredir para insuficiência renal e morte <sup>41</sup>.

A família das toxinas Shiga, é composta por uma estrutura A-B de aproximadamente 70 kDa, conservada entre seus membros. Todas as Stx possuem uma estrutura denominada AB5 com uma subunidade A enzimaticamente ativa com massa molecular de aproximadamente 32 kDa em associação com cinco subunidades B com cerca de 7,7 kDa. A subunidade A pode ser clivada em dois peptídeos: A1 e A2, de 28 e 4 kDa, respectivamente, onde A1 apresenta atividade enzimática enquanto que A2 tem por função ligar a estrutura A ao pentâmero B. O pentâmero B liga a toxina ao receptor glicolipídico específico presente na superfície da célula eucariótica, sendo a globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e <sup>6, 53</sup>. Após a ligação, uma sequência de eventos ocorre: (I) a toxina sofre endocitose pela célula eucariótica, (II) é clivada em fragmento A1 ativo e fragmento A2 que será reduzido, (III) o fragmento A1 livre ativa RNA N-glicosidase e interage com a unidade 60S do ribossomo (IV), que remove um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA (V) impede a ligação do amino-acil-RNA transportador a esta subunidade, e por fim inibe a etapa de alongação da síntese proteica <sup>53</sup>. Em maio de 2009, no *International Symposium on Shiga-toxin (Verotoxin) Producing Escherichia coli Infections*, em Buenos Aires, foram estabelecidas nomenclaturas de acordo com o subtipo de Stx. Nessa nova nomenclatura incluem 3 tipos de Stx1 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) e 7 tipos de Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g) <sup>18</sup>.

Cepas de EHEC além de produzirem a Shiga-toxina, ainda apresentam uma característica importante que é a capacidade de causar a lesão *Attaching and*

*Effacing* (A/E) no epitélio intestinal, semelhante às cepas de EPEC. Essa lesão é causada pela proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, que pertence à região LEE do cromossomo bacteriano <sup>30</sup>. Dessa forma, enquanto o quadro de diarreia é caracterizado pela lesão (A/E) que EHEC provoca pela interação com o epitélio intestinal, o quadro de diarreia sanguinolenta e HUS ocorrem pela ação da Shiga toxina no endotélio microvascular do trato renal e gastrointestinal <sup>51</sup>.

Outros fatores de virulência estão envolvidos na colonização e patogenicidade das cepas de STEC. Entre esses fatores estão: a enterohemolisina (EHEC-*Ehly*), sugerida como marcador para detecção de EHEC, onde sua função pode estar associada com a lise de eritrócitos para obtenção de ferro pela célula bacteriana; além de serina-protease, catalase-peroxidase, adesinas, inibidor de linfócitos, um sistema de secreção do tipo II e outros, todos codificados por genes localizados em um plasmídeo (pO157) <sup>6, 57</sup>.

Cepas de STEC, principalmente *E. coli* O157:H7, são encontradas em muitos animais. Os bovinos são os principais reservatórios de STEC <sup>25</sup>, porém é possível encontrar cepas também em outros animais, como ovinos, caprinos <sup>34</sup>, cães e gatos, roedores, aves, peixes, anfíbios e alguns moluscos e insetos <sup>20</sup>. Cepas de *E. coli* O157:H7 podem ser altamente patogênica para suínos, porém raramente são isolados destes animais <sup>20</sup>. Martins e colaboradores <sup>39</sup> isolaram pela primeira vez uma *E. coli* O103:H2 de ovino. Este sorotipo só tinha sido reportado anteriormente como responsável por infecção humana na Europa, Japão e nos Estados Unidos <sup>39</sup>. Esta seria a sua primeira descrição de origem animal no Brasil, sugerindo que ovinos possam servir como reservatório de EHEC.

A persistência de *E. coli* O157:H7 em bovinos está associada a capacidade das bactérias em colonizar uma região ou local específico no trato gastrointestinal desses animais <sup>17</sup>. Naylor e colaboradores <sup>46</sup> relataram que *E. coli* O157:H7 apresenta tropismo para uma região terminal do reto dentro da junção reto-anal (RAJ) dos bovinos. Após ser ingerida a cepa de *E. coli* O157:H7 entra no rúmem, e antes de colonizar a região RAJ, precisa vencer as barreiras ácidas do estômago <sup>47</sup>. Devido a um sistema de resistência ácida (AR), as cepas de *E. coli* O157:H7 são capazes de sobreviver à acidez estomacal, o que implica sua baixa dose infectante (cerca de 10-100 UFC). Três sistemas de resistência ácida foram identificados em *E. coli*: AR 1 (oxidativo), AR 2 (glutamato-dependente) e AR 3 (arginina-dependente) <sup>(47)</sup>. O primeiro sistema é complexo e pouco entendido, enquanto AR 2 e AR 3, possuem ação similar; basicamente os sistemas convertem glutamato e arginina em GABA e

agmatina, respectivamente, o que libera prótons para fora da célula bacteriana, aumentando o pH interno, auxiliando na manutenção da homeostase do pH <sup>8, 47</sup>.

### **3.4. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

A disenteria bacilar é uma infecção aguda do intestino grosso humano, sendo endêmica na maioria dos países em desenvolvimento e ocorrendo em surtos em países desenvolvidos <sup>19</sup>. Cerca de 10% dos casos de disenteria bacilar são causados por EIEC, enquanto que a maioria dos casos é por diferentes espécies de *Shigella*<sup>27,35</sup>. Os sintomas clínicos provocados por EIEC incluem febre, dores abdominais, mal estar e diarreia aquosa, podendo ou não ter a presença de muco ou sangue <sup>52</sup>. A doença causada pela EIEC é caracterizada pela destruição do epitélio intestinal devido a uma resposta inflamatória induzida durante a invasão da mucosa pela bactéria. Os genes associados com a invasão de EIEC na célula estão agrupados em um plasmídeo de virulência de 230 kb <sup>52</sup>.

Ainda não foram relatados casos de EIEC em animais, como descrito por Puño-Sarmiento e colaboradores <sup>54</sup>, no qual foram pesquisados os seis patotipos clássicos de DEC em amostras de cães e gatos e foram relatados apenas EPEC e EAEC.

### **3.5 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC é a responsável por abortos em outros animais (bovinos, ovinos, suínos) com altos índices de morbidade e mortalidade. ETEC é uma das principais causas de diarreia aquosa na prole de algumas espécies de animais, como em bezerros recém-nascidos em amamentação e em porcos em amamentação e pós-desmamados. É a principal causa de enterocolibacilose, infligindo grandes danos a indústria agropecuária. Curiosamente, é muito raro ou praticamente não existe em outros animais rurais como coelhos, cavalos ou aves domésticas, para este fato não há ainda uma boa explicação, uma vez que esses animais possuem receptores que são sensíveis as enterotoxinas e adesinas de algumas ETEC <sup>44</sup>.

Em humanos ETEC é reconhecida como uma das mais frequentes (algumas vezes fatais) causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento, e é um dos mais importantes agentes da diarreia dos viajantes. Isso sugere que várias similaridades podem ser encontradas na patogenia das infecções por ETEC em animais e humanos. Essas similaridades servem como excelentes oportunidades para entender ETEC humanas utilizando modelos animais, embora necessite de uma especificidade por parte do hospedeiro em relação aos receptores <sup>29, 55</sup>.

A patogenicidade de ETEC consiste na produção de enterotoxinas codificadas em plasmídeos, como a toxina termo-lábil (LT), toxina termo-estável tipo a (STa) e tipo b (STb). As LTs são toxinas grandes e oligoméricas com similaridade estrutural com a toxina colérica expressa pelo *Vibrio cholerae* <sup>66</sup>. As STs são toxinas pequenas e monoméricas com múltiplos resíduos de cisteína. ST não é uma toxina única, mas sim uma família de toxinas que se subdivide em dois grupos: STa e STb, no qual se diferenciam pela sua sequência de aminoácidos <sup>(2)</sup>. As cepas de ETEC colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado e começam a produzir suas enterotoxinas. A resposta as enterotoxinas produzidas nos animais é similar à resposta a toxina colérica em humanos <sup>22</sup>. As enterotoxinas estimulam a sinalização pró-inflamatória e ativa as adenilato-ciclases na mucosa (principalmente nas criptas e vilosidades intestinais), levando a um aumento da produção de AMP-cíclico, causando um aumento na secreção de fluidos intestinais <sup>15, 28</sup>. Podendo resultar assim em um grau variado de diarreia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, acidose, hipercalemia, insuficiência circulatória e morte.

### **3.6 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)**

Dentre as DEC, DAEC é um grupo bem heterogêneo caracterizado pelo seu padrão de aderência difusa em células HEp-2 e HeLa. Esse padrão é mediado por proteínas codificadas por uma família de *operons* relacionados, os quais incluem adesinas fimbriais (Dr) e afimbriais (Afa), que quando juntos formam a adesina afa-dr, sendo responsável pelo padrão aderente difuso <sup>36</sup>.

DAEC podem ser subdivididas em duas subclasses <sup>59</sup>. A primeira subclasse compreende cepas que possuem as adesinas Afa/Dr, e estão comumente associadas em infecções do trato urinário e com outras várias infecções entéricas <sup>38</sup>. As adesinas Afa/Dr se ligam como fator de aceleração de decaimento (DAF) que está presente na borda escovada das células epiteliais intestinais e do trato urinário. Essa ligação promove um agrupamento de moléculas de DAF por baixo na bactéria aderente, acionando assim uma cascata de sinalização  $Ca^{2+}$  dependente, resultando em dano e alongamento das microvilosidades da borda escovada das células devido a danos a estruturas do citoesqueleto das células do hospedeiro <sup>10</sup>. A segunda subclasse de DAEC inclui cepas que expressam uma adesina envolvida na aderência difusa (AIDA-I), a qual esta intimamente relacionada com diarreia infantil. Essas cepas de DAEC geralmente possuem uma ou mais regiões homólogas do LEE que são encontradas em EPEC, podendo assim contribuir para patogenia dessas cepas de DAEC. Cepas dessa subclasse secretam padrões similares de

proteínas reguladas por parâmetros ambientais, como temperatura, pH e concentração de ferro <sup>10, 59</sup>.

Em humanos, são registrados casos adultos e crianças com e sem diarreia, sendo mais comum em crianças menores de 12 meses com diarreia <sup>38, 56</sup>. Até o presente momento não foram relatados casos de DAEC em animais.

### 3.7. *Escherichia coli* enteroagregativa produtora de Shiga toxina (STEAEC)

Em 2011, um grande surto de gastroenterite por *E. coli* foi registrado na Alemanha, com um total de 3.842 casos notificados, sendo 2.987 confirmados com 18 mortes. Este surto ocorreu em um período curto, iniciando em 8 de maio e concluído em 4 de julho, com seu ápice em 22 de maio. O surto foi causado por uma cepa de EAEC O104:H4 que adquiriu a capacidade de produzir Stx de EHEC <sup>9</sup>. A esta cepa foi dado o nome de *Escherichia coli* enteroagregativa produtora de Shiga toxina (STEAEC).

STEAEC apresenta fatores de virulência relacionados aos patótipos EAEC e EHEC. STEAEC coloniza as células da mucosa intestinal com o auxílio de uma fimbria AAF e uma proteína chamada dispersina, como em EAEC, além de expressar outras duas adesinas (Pic e Pet) cujas funções ainda são desconhecidas <sup>9</sup>. A cepa também tem a capacidade de expressar a toxina Stx, semelhante a EHEC, onde inibe a síntese proteica e pode induzir a apoptose celular. Não foram relatados, até o momento, casos de STEAEC em animais.

## 4. Referências Bibliográficas

1. AIDAR-UGRINOVICH L., BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J.E., LEOMIL L., DAHBI G., MORA A., ONUMA D.L., SILVEIRA W.D., PESTANA DE CASTRO A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.297-306, 2007.
2. AL-MAJALI A.M., KHALIFEH M.S. Distribution and characterization of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) receptor throughout the intestinal tract of newborn camels (*Camelus dromedaries*). **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1311-1314, 2010.
3. ANDRADE G.I., COURA F.M., SANTOS E.L., FERREIRA M.G., GALINARI G.C., FACURY FILHO E.J., DE CARVALHO A.U., LAGE A.P., HEINEMANN M.B. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.1783-1790, 2012.
4. ANDRADE J.A., FREYMULLER E., FAGUNDES-NETO U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an *in vitro* study utilizing the scanning electron microscopy. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.48, p.199-204, 2011.
5. ARAUJO J.M., TABARELLI G.F., ARANDA K.R., FABBRICOTTI S.H., FAGUNDES-NETO U., MENDES C.M., SCALETSKY I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3396-3399, 2007.
6. BERTÃO A.M.S., SARIDAKIS H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, p.81-92, 2007.

7. BROES A., DROLET R., JACQUES M., FAIRBROTHER J.M., JOHNSON W.M. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.280-282, 1988.
8. CASTANIE-CORNET M.P., PENFOUND T.A., SMITH D., ELLIOTT J.F., FOSTER J.W. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.3525-3535, 1999.
9. CLEMENTS A., YOUNG J.C., CONSTANTINOU N., FRANKEL G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v.3, p.71-87, 2012.
10. CROXEN M.A., FINLAY B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.26-38, 2010.
11. CHATTAWAY M.A., DALLMAN T., OKEKE I.N., WAIN J. Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again? **Journal of Infection in Developing Countries**, v.5, p.425-436, 2011.
12. DE LA FUENTE R., GARCIA S., ORDEN J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA J.A., DIEZ R., CID D. Prevalence and characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy sheep and goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.262-266, 2002.
13. DE VERDIER K., NYMAN A., GREKO C., BENGTTSSON B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.54, p.2, 2012.
14. DEAN P., MARESCA M., KENNY B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology** v.8, p.28-34, 2005.
15. DEVRIENDT B., STUYVEN E., VERDONCK F., GODDEERIS B.M., COX E. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v.34, p.1175-1182, 2010.
16. DOPFER D., GEUE L., SCHARES S., MINTEL B., HOFFMANN B., FISCHER E.A. Dynamics of shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and their virulence factors in cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, p.22-30, 2012.
17. ETCHEVERRIA A.I., PADOLA N.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v.4, p.366-372, 2013.
18. FARROKH C., JORDAN K., AUVRAY F., GLASS K., OPPEGAARD H., RAYNAUD S., THEVENOT D., CONDRON R., DE REU K., GOVARIS A., HEGGUM K., HEYNDRIKX M., HUMMERJOHANN J., LINDSAY D., MISZCZYCHA S., MOUSSIEGT S., VERSTRAETE K., CERF O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p.190-212, 2013.
19. FARUQUE S.M., KHAN R., KAMRUZZAMAN M., YAMASAKI S., AHMAD Q.S., AZIM T., NAIR G.B., TAKEDA Y., SACK D.A. 2002. Isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3908-3913, 2002.
20. FERENS W.A., HOVDE C.J. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, p.465-487, 2011.
21. FLORES J., OKHUYSEN P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.25, p.8-11, 2009.
22. FOSTER D.M., SMITH G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.25, p.13-36, 2009.
23. FRANK C., WERBER D., CRAMER J.P., ASKAR M., FABER M., AN DER HEIDEN M., BERNARD H., FRUTH A., PRAGER R., SPODE A., WADL M., ZOUFALY A., JORDAN S., KEMPER M.J., FOLLIN P., MULLER L., KING L.A., ROSNER B., BUCHHOLZ U., STARK K., KRAUSE G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v.365, p.1771-1780, 2011.
24. FROHLICHER E., KRAUSE G., ZWEIFEL C., BEUTIN L., STEPHAN R. 2008. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEPEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology**, v.8, p.144, 2008.
25. GYLES C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, p.E45-62, 2007.
26. HARRINGTON S.M., DUDLEY E.G., NATARO J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, p.12-18, 2006.
27. HSU B.M., WU S.F., HUANG S.W., TSENG Y.J., JI D.D., CHEN J.S., SHIH F.C. Differentiation and identification of *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. **Water Research**, v.44, p.949-955, 2010.
28. JOHNSON A.M., KAUSHIK R.S., HARDWIDGE P.R. Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.115-119, 2010.
29. JOHNSON T.J., NOLAN L.K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.73, p.750-77, 2009.

30. KAPER J.B., NATARO J.P., MOBLEY H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.
31. KAUFMANN M., ZWEIFEL C., BLANCO M., BLANCO J.E., BLANCO J., BEUTIN L., STEPHAN R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v.69, p.260-266, 2006.
32. KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I., STAVRIC S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.18, p.775-779, 1977.
33. KRAUSE G., ZIMMERMANN S., BEUTIN L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.87-95, 2005.
34. LA RAGIONE R.M., BEST A., WOODWARD M.J., WALES A.D. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. **FEMS Microbiology Review**, v.33, p.394-410, 2009.
35. LI Z., WANG L., SUN W., HOU X., YANG H., SUN L., XU S., SUN Q., ZHANG J., SONG H., LIN H. Identifying high-risk areas of bacillary dysentery and associated meteorological factors in Wuhan, China. **Scientific Report**, v.3, p.3239, 2013.
36. MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.152, p.2-12, 2013.
37. MALIK A., TOTH I., BEUTIN L., SCHMIDT H., TAMINIAU B., DOW M.A., MORABITO S., OSWALD E., MAINIL J., NAGY B. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae+* *Escherichia coli* from weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.82-93, 2006.
38. MANSAN-ALMEIDA R., PEREIRA A.L., GIUGLIANO L.G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiology**, v.13, p.22, 2013
39. MARTINS F.H., GUTH B.E., PIAZZA R.M., BLANCO J., PELAYO J.S. First description of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 strain isolated from sheep in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.126-128, 2014.
40. MARUCCI P.L., OLIVERA N.L., BRUGNONI L.I., SICA M.G., CUBITTO M.A. 2011. The occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bathing water of the Sierra de la Ventana region, Buenos Aires Province, Argentina. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.175, p.1-8, 2011.
41. MAYER C.L., LEIBOWITZ C.S., KUROSAWA S., STEARNS-KUROSAWA D.J. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. **Toxins (Basel)**, v.4, p.1261-1287, 2012.
42. MITTELSTAEDT S., DE CARVALHO V.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 - review. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, p.175-182, 2006.
43. MORATO E.P., LEOMIL L., BEUTIN L., KRAUSE G., MOURA R.A., PESTANA DE CASTRO A.F. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses and Public Health**, v.6, p.229-237, 2009.
44. NAGY B., FEKETE P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.443-454, 2005.
45. NAKAZATO G., GYLES C., ZIEBELL K., KELLER R., TRABULSI L.R., GOMES T.A., IRINO K., DA SILVEIRA W.D., PESTANA DE CASTRO A.F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v.101, p.269-277, 2004.
46. NAYLOR S.W., LOW J.C., BESSER T.E., MAHAJAN A., GUNN G.J., PEARCE M.C., MCKENDRICK I.J., SMITH D.G., GALLY D.L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. **Infection and Immunity**, v.71, p.1505-1512, 2003.
47. NGUYEN Y., SPERANDIO V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.2, p.90, 2012.
48. O'RYAN M., PRADO V., PICKERING L.K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v.16, p.125-136, 2005.
49. OCHOA T.J., CONTRERAS C.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.24, p.478-483, 2011.
50. ORDEN J.A., YUSTE M., CID D., PIACESI T., MARTINEZ S., RUIZ-SANTA-QUITERIA J.A., DE LA FUENTE R. Typing of the *eae* and *espB* genes of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from ruminants. **Veterinary Microbiology**, v.96, p.203-215, 2003.
51. PAGE A.V., LILES W.C. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. **The Medical Clinics of North America**, v.97, p.681-695, xi, 2013.
52. PARSOT C. *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.11-18, 2005.

53. PATON A.W., PATON J.C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.598-602, 1998.
54. PUÑO-SARMIENTO J., MEDEIROS L., CHICONI C., MARTINS F., PELAYO J., ROCHA S., BLANCO J., BLANCO M., ZANUTTO M., KOBAYASHI R., NAKAZATO G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.166, p.676-680, 2013.
55. RAJKHOWA S., HUSSAIN I., RAJKHOWA C. Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrhoeic faecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.455-458, 2009.
56. RIVEROS M., BARLETTA F., CABELLO M., DURAND D., MERCADO E.H., CONTRERAS C., RIVERA F.P., MOSQUITO S., LLUQUE A., OCHOA T.J. Adhesion patterns in diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from children with and without diarrhea. **Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica**, v.28, p.21-28, 2011.
57. ROBINSON A.L., MCKILLIP J.L. Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection, p. 1096-1105. In Méndez-Vilas A (ed.), **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v.2, 2010.
58. SARANTUYA J., NISHI J., WAKIMOTO N., ERDENE S., NATARO J.P., SHEIKH J., IWASHITA M., MANAGO K., TOKUDA K., YOSHINAGA M., MIYATA K., KAWANO Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.133-139, 2004.
59. SERVIN A.L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.18, p.264-292, 2005.
60. STEPHAN R., BOREL N., ZWEIFEL C., BLANCO M., BLANCO J.E. First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle. **BMC Microbiology**, v.4, p.10, 2004.
61. TRABULSI L.R., KELLER R., TARDELLI GOMES T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.508-513, 2002.
62. UBER A.P., TRABULSI L.R., IRINO K., BEUTIN L., GHILARDI A.C., GOMES T.A., LIBERATORE A.M., DE CASTRO A.F., ELIAS W.P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.256, p.251-257, 2006.
63. WHO<sup>a</sup>. 2008. Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001-2008. **Weekly epidemiological record** 83:421-428.
64. WHO<sup>b</sup> 2009, posting date. Diarrhoeal disease the world health.
65. YOUNIS R., BINGLE L.E., ROLLAUER S., MUNERA D., BUSBY S.J., JOHNSON S., DEANE J.E., LEA S.M., FRANKEL G., PALLEN M.J. SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal. **Journal of Bacteriology**, v.192, p.6093-6098, 2010.
66. ZHANG C., RAUSCH D., ZHANG W. Little heterogeneity among genes encoding heat-labile and heat-stable toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.6402-6405, 2009.

## Capítulo 4

### Fatores de Virulência em *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal

---

Eliandro Reis Tavares<sup>1,3</sup>

Paula Signolfi Cyoia<sup>1,2</sup>

Sara Scandorieiro<sup>1,2</sup>

Vanessa Lumi Koga<sup>1,2</sup>

Gerson Nakazato<sup>1,2</sup>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,2</sup>

Universidade Estadual de Londrina – UEL

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>2</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### 1. Introdução

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, que coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais homeotérmicos. *E. coli* e seus hospedeiros coexistem naturalmente com mútuos benefícios, raramente causando doenças<sup>30, 48</sup>. Porém, algumas linhagens podem adaptar-se a novos nichos, expressando ou adquirindo fatores específicos de sobrevivência. Estas adaptações podem contribuir para o desenvolvimento de doenças em indivíduos saudáveis, e nesses casos, os fatores específicos estão relacionados à virulência<sup>30</sup>.

Em geral, isolados de *E. coli* podem ser agrupados como: a) isolados intestinais comensais; b) isolados intestinais patogênicos e c) isolados patogênicos extraintestinais (ExPEC – *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*)<sup>42</sup>. Estes isolados podem ser reunidos em sete grupos filogeneticamente distintos: A, B1, B2, C, D, E e F<sup>13</sup>. ExPECs pertencem em sua maioria ao grupo B2 com algumas linhagens pertencentes ao grupo D. Os isolados intestinais comensais pertencem aos grupos A, B1, C e E<sup>5,13</sup>.

ExPECs podem ainda ser classificadas quanto ao sítio anatômico acometido, como exemplo: *E. coli* uropatogênica (UPEC – *uropathogenic E. coli*), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC – *Neonatal meningitis E. coli*), *E.*

*coli* associada a sepse (SEPEC – *Sepsis-associated E. coli*) e *E. coli* patogênica aviária (APEC – *avian pathogenic E. coli*)<sup>14, 30, 48</sup>. ExPECs exibem fatores de virulência responsáveis por permitir a colonização de diferentes superfícies anatômicas, evadir as defesas do hospedeiro, adquirir nutrientes essenciais, como o ferro, desencadear um processo invasivo no hospedeiro e estimular uma resposta inflamatória. Dentre os principais fatores de virulência estão: presença de diversas adesinas, cápsulas polissacarídicas, toxinas, sideróforos, proteases, dentre outros que conferem resistência às defesas do hospedeiro<sup>30</sup>.

UPEC é o principal agente etiológico de infecções do trato urinário (ITU) adquiridos na comunidade e também em ambientes hospitalares, responsável por alta morbidade e mortalidade em todo o mundo. A habilidade em causar ITU está associada à expressão de diversos fatores de virulência, como adesinas (fimbria P e tipo 1); toxinas tais como hemolisinas; sideróforos e antígenos capsulares. Estes fatores permitem que a bactéria seja capaz de se ligar e provocar danos às células e aos tecidos extraintestinais do hospedeiro, resistindo aos mecanismos de defesa nestes sítios, estimulando uma resposta inflamatória, e causando a doença<sup>6, 53</sup>.

Outro patotipo extraintestinal, o NMEC, é a causa mais comum de meningite por bactérias Gram-negativas em neonatos. Nesta patologia, a bactéria chega ao sistema nervoso central mais comumente pela via hematogênica, resultando em inflamação das meninges, razão pela qual a meningite está fortemente associada à sepse neonatal. Estas bactérias apresentam diversos fatores de virulência, sendo o antígeno capsular K1 o mais comum, presente em aproximadamente 80% de NMECs<sup>30</sup>.

SEPECs apresentam vários fatores de virulência em comum com UPEC e APEC. Apesar de ter tido um grande aumento de casos de sepse e bacteremia causados por *E. coli* nos últimos anos, ainda há poucos estudos relacionados à patogênese de SEPEC<sup>2, 14</sup>. ExPEC causadoras de infecções na corrente sanguínea pertencem à linhagens que apresentam uma grande variedade de fatores de virulência como adesinas, sistemas de captação de ferro, resistência sérica e toxinas<sup>2</sup>.

Uma pequena porcentagem de *E. coli* é patogênica para aves, conhecida como APEC, sendo um dos principais causadores de colibacilose, doença responsável por elevados prejuízos para a indústria aviária<sup>38</sup>. Dentre os principais fatores de virulência encontrados em APEC estão os relacionados ao sistema de captação de ferro (*iutA* e *iroN*), hemolisina (*hlyF*), resistência lítica

ao soro (*iss*) e proteases (*ompT*)<sup>28</sup>. Estudos têm mostrado que alguns isolados de APEC são muito próximos geneticamente de ExPEC humanas<sup>36, 54</sup>, sugerindo que as aves possam ser um veículo ou pelo menos reservatório, sendo considerada um agente zoonótico em potencial. Outros reservatórios têm sido descritos em estudos de epidemiologia molecular, incluindo o trato gastrointestinal humano além de vários reservatórios não-humanos como produtos cárneos de varejo, esgoto, animais domésticos e outras fontes ambientais<sup>4, 32, 36</sup>.

## 2. Ilhas de Patogenicidade e Plasmídios

De modo geral, cerca de 70% a 80% do genoma bacteriano (*core* genoma) é composto por uma quantidade homogênea de sequências de C+G, e em cada espécie esse arranjo é específico e típico, sendo responsável por compor aqueles genes relacionados com as informações celulares essenciais. O restante do genoma pode conter C+G diferente do *core*, podendo conter elementos genéticos móveis, como sequências de inserção, transposons, integrons, plasmídios e profagos, e ilhas genômicas (GEIs –*Genomic islands*) que quando codificam fatores de virulência podem ser chamadas de ilhas de patogenicidade ou PAI (*Pathogenicity Island*)<sup>16</sup>.

O termo “Ilha de Patogenicidade” foi proposto por Hacker e colaboradores<sup>20</sup> em 1990, e são definidas como regiões do DNA relativamente grandes, variando entre 10.000 e 200.000 pares de bases, que apresentam características próprias e considerável instabilidade, e codificam para os mais variados fatores de virulência<sup>55</sup>. A transferência horizontal de DNA por transposons, plasmídios, bacteriófagos ou PAIs, independente de gênero e espécie, é responsável pela intensa variabilidade genética entre os microrganismos, permitindo a aquisição ou perda de genes de virulência e conferindo elevada capacidade adaptativa dos mesmos à novos sítios anatômicos, ampliando o espectro de doenças<sup>6, 55</sup>.

PAIs são elementos genéticos móveis, flanqueados por pequenas sequências diretas repetidas localizadas adjacentes aos genes que codificam para o RNA transportador. Estas ainda contêm genes que codificam para integrases, transposases e sequências de origem de replicação, podendo ser mobilizados por conjugação<sup>16, 47, 49, 55</sup>.

Nas PAIs, de espécies patogênicas para humanos, podem ser encontrados ainda genes relacionados com fatores de aderência (adesinas e fimbrias), mecanismos de captação de elementos essenciais que são limitados no ambiente (sistemas de captação de ferro), além de diversas toxinas como as hemolisinas. Em UPEC já foram descritas oito diferentes PAIs associadas à virulência <sup>16, 47</sup>.

Assim como as PAIs, os plasmídios também são elementos genéticos móveis, capazes de atribuir uma variedade genética às bactérias, porém são elementos extracromossomais. Os plasmídios ColV e ColBM ocorrem com maior frequência em ExPEC quando comparados com isolados comensais. Estes plasmídios têm sido associados com uma variedade de características que predispõe ao estabelecimento de septicemia e infecções do trato urinário, incluindo resistência ao soro, aquisição de ferro em ambientes onde ele é escasso, crescimento em urina humana e em condições de pH ácido, e produção de colicinas <sup>27</sup>.

Recentemente foi descrita uma região plasmidial denominada *Conserved Virulence Plasmidic* (CVP), que apresenta oito operons ou genes, que codificam para sistemas sideróforos (genes *iro*, *iuc* e *sit*), proteína de membrana externa (gene *ompT*), colicina V (gene *cva*),  $\alpha$ -hemolisina (gene *hlyF*), sistema de secreção tipo I (gene *ets*) e gene relacionado a resistência sérica (gene *iss*) <sup>35</sup>.

Em ExPEC humana, a região CVP está presente em UPEC (10 a 20%) e NMEC (50 a 60%), sendo encontrada principalmente em patógenos pertencentes ao grupo filogenético B2. Em cepas de APEC, a presença da região CVP ocorre também nos grupos filogenéticos A e B1<sup>35</sup>.

### **3. Fatores de virulência**

#### **3.1. Adesinas**

A habilidade da bactéria em aderir e colonizar as células epiteliais do hospedeiro é um passo importante para o início de uma infecção. A adesão da bactéria é promovida por estruturas proteicas presentes na superfície bacteriana, que se ligam a receptores específicos, presentes nas células do hospedeiro. Estas estruturas, conhecidas como adesinas, podem se localizar em apêndices filamentosos denominados *pili* ou fimbrias, ou se caracterizarem

como moléculas monoméricas ou multiméricas ancoradas na parede celular bacteriana, chamadas de adesinas afimbriais <sup>8</sup>.

Existem diferentes tipos de fimbrias, algumas das mais conhecidas em ExPEC são: fimbria tipo 1 (*fim*), fimbria P (*pap*), fimbria S (*sfa*), fimbria F1C (*foc*), fimbria Dr (*dra*), adesinas afimbriais (*afa*) e Tsh (*temperature-sensitive haemagglutinin*) sendo as três primeiras, as mais estudadas <sup>3, 40</sup>.

As fimbrias tipo 1 são expressas pela maioria dos isolados de *E. coli*, além de outros membros da família Enterobacteriaceae. Elas são responsáveis por mediar a hemaglutinação manose-sensível em diferentes espécies de animais, já que seu receptor correspondente na célula hospedeira é uma manose. Esta adesina é codificada por um conjunto de nove genes localizados no operon *fim*, e sua expressão é controlada por um fenômeno conhecido como variação de fase. A presença de fimbrias tipo 1 está relacionada à ligação do patógeno ao epitélio da bexiga e da uretra, por estes conterem receptores manosilados, estando este fator de virulência muito associado a UPEC isoladas de cistite <sup>3, 50</sup>. Porém, é difícil determinar o real papel da fimbria tipo 1 na patogênese de ExPEC, uma vez que ela é expressa tanto em isolados comensais quanto patogênicos <sup>6</sup>.

As fimbrias P são expressas por UPEC frequentemente associadas à pielonefrite. Esta fimbria é codificada pelo operon *pap* que é composto por 11 genes. Estruturalmente é constituída por mais de mil cópias de subunidades de pilina (*PapA*) em uma conformação helicoidal e apresenta as proteínas PapE, PapF e PapG na porção distal. Esta última apresenta propriedades de ligar-se a digalactosídeos [ $\alpha$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Gal] dos receptores glicolipídicos do epitélio renal. Proteínas envolvidas na síntese e no papel funcional da fimbria P têm sido estudadas como alvo de novos compostos no combate à infecções por UPEC <sup>3, 31</sup>.

A fimbria S é predominantemente expressa em *E. coli* isoladas de meningites em neonatos; entretanto foi encontrada, também, em *E. coli* uropatogênica. A fimbria liga-se a receptores específicos presentes em glicoproteínas ( $\alpha$ -Sialyl-2,3-galactose), apresentando afinidade por receptores presentes na bexiga e nos rins de hospedeiros humanos, e aos componentes da matriz extracelular (fibronectina, laminina e sialoglicoproteínas) das células endoteliais microvasculares cerebrais. A fimbria S é codificada pelos operon *sfaI*, quando relacionado a infecções uropatogênicas, e *sfaII*, quando relacionado a meningites em recém nascidos <sup>10</sup>. Estudos mostraram que a

presença da fimbria S foi mais prevalente em isolados de *E. coli* provenientes do fluido cérebro espinal quando comparadas com linhagens provenientes de urina, sangue ou fezes <sup>56</sup>.

### 3.2. Captação de Ferro

O ferro é um cofator essencial para a multiplicação bacteriana; mais de 100 enzimas que atuam no metabolismo primário e secundário, dependem desse elemento para suas atividades <sup>37</sup>. Ferro é também um carreador de elétrons requerido em importantes processos biológicos como na produção de energia e transporte do oxigênio <sup>19</sup>. Este íon é principalmente encontrado complexado às proteínas heme, transferrinas, lactoferrinas e ferritinas, e em pequena quantidade no meio extracelular, o que limita a sua disposição durante um processo infeccioso<sup>37</sup>. Como resultado, a aquisição de ferro é uma necessidade crítica para patógenos que sobrevivem dentro de um hospedeiro. Sendo assim, bactérias infecciosas desenvolveram diversos mecanismos envolvidos na aquisição de ferro como a síntese de sideróforos, que apresentam maior afinidade ao ferro do que transferrinas e lactoferrinas.

Os sideróforos são moléculas pequenas sintetizadas no citoplasma e requerem um sistema de exportação extracelular específico <sup>43</sup>. De forma geral, os sideróforos são divididos em cinco classes: catecolatos, fenolatos, hidroximatos,  $\alpha$ -hidroxil-carboxilatos e sideróforos mistos. Essa classificação é baseada na natureza química do sítio de ligação ao ferro <sup>19</sup>. Quase todas as linhagens de *E. coli* produzem sideróforos do tipo catecolato chamado enterobactina, também conhecido como enteroquelina, sem importante papel na virulência. Além deste, elas, também, produzem sideróforos adicionais como salmoquelinas (catecolato), aerobactinas (tipo híbrido, citrato-hidroxamato) e yersiniabactina (fenolato); alguns isolados de ExPEC podem sintetizar até quatro diferentes tipos de sideróforos <sup>19, 43</sup>.

A salmoquelina, forma glicosilada da enterobactina, é codificada pelos genes *iroNBCDEN*, localizado no plasmídio ColV ou ColBM, embora também tenha sido encontrado em ilhas de patogenicidade. Foi primeiramente identificada por Hantke e colaboradores <sup>22</sup> em 2003, em *Salmonella enterica*; mas tem sido associada à virulência de UPEC, NMEC e APEC <sup>19</sup>. Uma vez conjugada ao ferro, ela é internalizada através do receptor Iron e utiliza o mesmo sistema de transporte ABC da enterobactina, FepCDG <sup>43</sup>.

Os genes que codificam a aerobactina podem estar localizados tanto em plasmídios (ColV ou ColBM) como no cromossomo bacteriano. O operon da aerobactina é composto por cinco genes *iucABCD* e *iutA*, dos quais quatro (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e o *iutA*, para o receptor de aerobactina. Este sideróforo frequentemente é encontrado em ExPECs isoladas de humanos com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%) e, também pode ser encontrada, em isolados de pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou em isolados fecais (41%), denotando a maior participação deste fator de virulência nas infecções extraintestinais, particularmente no trato urinário <sup>17</sup>. Comparado à enterobactina, concentrações bem inferiores de aerobactina são suficientes para estimular o crescimento bacteriano na ausência de ferro <sup>19</sup>.

A yersiniabactina, codificada pelo gene *fyuA*, foi originalmente descrita em *Yersinia* sp. e posteriormente identificada em PAIs presentes em *E. coli*. Este sideróforo está relacionado com o estabelecimento de infecções do trato urinário devido a eficiente captação de ferro <sup>18</sup>. Yersiniabactina possui ainda uma função importante na redução da formação de espécies reativas de oxigênio por leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, acentuando seu papel na virulência<sup>19</sup>.

A perda de tais sistemas de transporte de ferro resulta em expressiva diminuição na virulência, indicando o papel fundamental que desempenham em muitas doenças infecciosas bacterianas. Em ExPEC, tem sido mostrado o aumento na expressão de sistemas de transporte de sideróforos *in vivo* <sup>15</sup>, a produção de sideróforos em tecidos do hospedeiro <sup>11</sup>, e a importância destes sistemas para a virulência extraintestinal <sup>11, 15</sup>.

### **3.3. Fatores que contribuem para evasão das defesas do hospedeiro**

Microrganismos que causam doenças e estão hospedados em seres humanos e animais, podem ser eliminados pela resposta imunológica inata, já pré-existente no hospedeiro. Essa resposta elimina o patógeno em poucas horas após a infecção<sup>26</sup>. Porém, alguns micro-organismos possuem fatores de virulência que os capacitam a escapar do sistema imunológico do hospedeiro, não sendo eliminado por ele. Essa capacidade é devida a presença de alguns fatores como antígeno capsular K1, e a presença de plasmídios que codificam para determinadas proteínas de membrana, tais como TraT e Iss <sup>34</sup>.

De modo geral, isolados de *E. coli* são capazes de produzir dois antígenos específicos de superfície, de natureza polissacarídica: o antígeno O, que faz parte do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana externa e o antígeno K, presente na cápsula. A variação na estrutura desses polissacarídeos geram aproximadamente 170 tipos diferentes de antígeno O e aproximadamente 80 tipos diferentes de antígenos K. Diferenças nos antígenos capsulares permitiram a classificação de *E. coli* em quatro grupos capsulares distintos (1-4); onde ExPECs pertencem aos grupos 2 e 3, tendo como principais exemplos do grupo 2 os sorotipos K1 e K5 <sup>57</sup>.

A cápsula pode ser compreendida como um envoltório formado por polissacarídeos de alto peso molecular e que são fortemente ancorados à célula. Em UPEC, utilizando mutantes isogênicos e complementação genética para cápsula do grupo 2, constatou-se que esta é responsável por conferir resistência à ação do sistema complemento, sendo portanto um importante fator de virulência <sup>9</sup>.

As cápsulas produzidas pelos grupos 2 e 3 são codificadas pelo *locus* gênico *kps*, descrito por Silver e colaboradores em 1981 <sup>51</sup>, em um isolado de *E. coli* pertencente ao grupo 2. São três regiões gênicas responsáveis pela produção da cápsula, sendo a região 2 a responsável pela caracterização do sorotipo específico, produzindo polissacarídeos especializados <sup>57</sup>.

Os tipos capsulares K1 e K5 apresentam um mimetismo molecular, ou seja, possuem grande semelhança com constituintes de tecidos presentes no organismo hospedeiro. Assim, isolados pertencentes a esses tipos capsulares não são capazes de desencadear uma resposta imunológica efetiva no hospedeiro. Estruturalmente, o antígeno K1 é um polímero do ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), semelhante ao antígeno polissacarídico B encontrado em *Neisseria meningitidis*. Além de não desencadear uma resposta imune, este antígeno protege contra a fagocitose e a ação do sistema complemento. Além disso, parece ter um papel importante na passagem da bactéria pela barreira hematoencefálica, alcançando as meninges, justificando a elevada frequência do antígeno K1 em isolados MNEC <sup>5, 6</sup>.

Determinadas proteínas de membrana externa também contribuem para evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como TraT, Iss e OmpT. TraT é encontrada em grande número de cópias na membrana externa de *E. coli*, e é codificada pelo gene *traT*, presente no plasmídeo conjugativo F e plasmídeo de resistência à antibiótico F-like. Esta proteína inibe a fagocitose e

interfere no padrão de opsonização da via alternativa do sistema complemento, impedindo a deposição do fator C3 na membrana celular bacteriana <sup>1, 39</sup>.

O plasmídeo ColV apresenta grande importância em se tratando de resistência ao soro, pois, além de carregar genes relacionados com o sistema de replicação e genes para a produção de colicinas, este, também, transporta os genes *iss* (*increased serum survival*) e *ompT*. O gene *iss* codifica a proteína Iss que, juntamente com a proteína TraT, confere resistência ao sistema complemento do hospedeiro, fenômeno conhecido como resistência ao soro <sup>7, 12</sup>. Iss bloqueia a ligação dos componentes do sistema complemento à superfície celular bacteriana, impedindo a morte da bactéria <sup>7</sup>.

O gene *ompT*, codifica a protease OmpT capaz de degradar peptídeos com atividade antimicrobiana, e permitindo a colonização e persistência de *E. coli*, ao longo do trato urinário, apesar da presença de defensinas e outros peptídeos catiônicos produzidos pelos hospedeiros <sup>21, 25</sup>.

### 3.4. Fatores de virulência secretados

Em ExPEC, o mais importante fator de virulência secretado é uma lipoproteína chamada alfa-hemolisina (HlyA), pertence a um grupo de toxinas proteicas conhecidas como RTX <sup>6</sup>. Esta toxina é codificada pelo gene *hlyA*, presente em um operon que contém mais três genes acessórios conhecidos como *hlyB*, *hlyC* e *hlyD*, responsáveis pela ativação e exportação dessa proteína. O gene *hlyA* tem sido associado ao grupo filogenético B2 de isolados de UPEC, com frequência ao redor de 34% <sup>58</sup>. Os isolados hemolíticos predominam em infecções extraintestinais, tais como ITU, peritonite, apendicite, septicemia e meningite neonatal. Aproximadamente 50% dos casos de pielonefrite com complicações renais tem a presença de UPEC produtora de HlyA. A toxina tem a capacidade de formar poros na membrana celular em diferentes tipos de célula, levando assim à morte celular.

O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em isolados de APEC, porém já foi descrito em NMEC <sup>41</sup>. Trabalhos, como o de Skyberg e colaboradores <sup>52</sup>, mostram uma alta expressão da *hlyF* em isolados de *E. coli*, quando comparado a outros genes: *iroN*, *iutA*, *cvaC* e *tsh*.

Sat é uma proteína pertencente à subfamília serina protease autotransportada, codificada pelo gene *sat* localizado em PAIs. Essa proteína

causa modificações na estrutura celular do epitélio da bexiga e danos no epitélio do trato urogenital <sup>24</sup>.

O fator citotóxico necrosante 1 (CNF1) é uma toxina codificada pelo gene cromossômico *cnf* e promove a deamidação de pequenas proteínas, como a Rho-GTPase, que é responsável por regular diversas funções celulares. A sua deamidação pode levar a formação de fibras de estresse de actina resultando na entrada de *E. coli* nas células. CNF1 é produzido por um terço de *E. coli* isoladas de pielonefrite e pode estar envolvidas no processo de invasão ao tecido renal. Contudo, o real papel de CNF1 no processo de invasão durante a pielonefrite ainda não está elucidado <sup>6, 45</sup>.

Outra toxina de importância descrita em *E. coli* é a hemaglutinina termo-sensível (*Temperature-sensitive hemagglutinin* – Tsh) codificada pelo gene *tsh*. Esta proteína foi primeiramente descrita por Provence e Curtiss em 1994 <sup>44</sup>, quando observaram que quando uma linhagem de APEC era crescida em temperatura de 26°C, em meio com baixa osmolaridade, ocorria a presença de um fenótipo de hemaglutinação manose-resistente, para eritrócitos de galinha. Seu papel em ExPEC é questionado. Rodriguez-Siek e colaboradores <sup>46</sup>, comparando os fatores de virulência presentes em APEC e UPEC, detectaram a presença do gene *tsh* em 63% de APEC e 39,5% de UPEC. Heimer e colaboradores <sup>24</sup>, analisando isolados de amostras humanas encontraram o gene *tsh* em 63% de UPEC e em 33% de *E. coli* isolada de fezes. Esses dados sugerem que o gene *tsh* faz parte do conjunto de genes de virulência presentes em ExPEC.

A patogenicidade de ExPEC se deve a uma combinação multifatorial, na qual, o produto de genes cromossômicos e plasmidiais, juntamente com as características relacionadas ao hospedeiro e o ambiente, levam ao potencial patogênico destes isolados <sup>29</sup>. Esta miscelânea de fatores de virulência em uma mesma bactéria vem acompanhada de frequente aquisição e perda de informação genômica, assim como de altas taxas de recombinação. Estes fenômenos conduzem a elevada heterogeneidade genética e maior adaptabilidade a diferentes nichos teciduais do hospedeiro.

Portanto, para que uma linhagem de *E. coli* comensal passe a ser patogênica, requer a presença de genes funcionais que contribuam na virulência, colonização e adaptação a diferentes organismos ou até mesmo diferentes sítios anatômicos de um mesmo hospedeiro <sup>42</sup>. Para um melhor entendimento das bases biológicas das infecções por ExPEC é necessário mais

conhecimento quanto à filogenia, virulência e fatores do hospedeiro que contribuam para a susceptibilidade à diferentes grupos de ExPEC <sup>33</sup>.

#### 4. Referências

1. AGUERO M.E., ARON L., DeLUCA A.G., TIMMIS K.N., CABELLO F.C.A Plasmide-Encoded Other Membrane Protein, TraT, Enhances Resistance of *Escherichia coli* to Phagocytosis. **Infection and Immunity**, v.46, p.740-746, 1984.
2. ANANIAS M., YANO T. Serogroups and Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Isolated from Patients with Sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.877-883, 2008.
3. ANTÃO E.M., WIELER L.H., EWERS C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v.1, p.1-12, 2009.
4. BÉLANGER B. GARENAUX A., HAREL, J. BOULIANNE, M. NADEAU, E., DOZOIS C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.62, p.1-10, 2011.
5. BIDET P., BONACORSI S., BINGEN E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra- intestinaux. **Archives de Pédiatrie**, v.19, p.S80-S92, 2012.
6. BIEN J., SOKOLOVA, O., BOZKO, P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **International Journal of Nephrology**, v.2012, p.1-15, 2012.
7. BINNS M.M., MAYDEN, J., LEVINE, R.P. Further Characterization on Complement Resistance Conferred on *Escherichia coli* by the Plasmid Genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. **Infection and Immunity**, v.35, p.654-659, 1982.
8. BOWER J.M., ETO D.S., MULVEY A. Covert operation of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic**, v.6, p.18-31, 2005.
9. BUCKLES E.L., WANG, X., LANE, M.C., LOCKATELL, C.V., JOHNSON, D.E., RASKO, D.A., MOBLEY, H.L.T., DONNENBERG, M.S. R.Role of the K2 Capsule in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection and Serum Resistance. **Journal Infectious Diseases**, v.199, p.1-18, 2013.
10. CASTELAIN M., SJÖSTRÖM A.E., FÄLLMAM E., UHLIM B.E., ANDERSSON M. Unfolding and Refolding Properties of S Pili on Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **European Biophysics Journal**, v.39, p.1105-1115, 2010.
11. CAZA M., LÉPINE F., DOZOIS C.M. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.80, p.266-282, 2011.
12. CHUBA P.J., LEON M.A., BANERGEE A., PALCHAUDHURI S. Cloning and DNA Sequence of Plasmid Determinant *iss*, Coding for Increased Serum Survival and Surface Exclusion, which Has Homology with Lambda DNA. **Molecular and General Genetics**, v.216, p.287-292, 1989.
13. CLERMONT O., CHRISTENSON J.K., DENAMUR E., GORDON D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v.5, p.58-65, 2013.
14. CONCEIÇÃO R.A., LUDOVICO M.S., ANDRADE C.G.T.J., YANO T. Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p.45, p.376-472, 2012.
15. DOZOIS C.M., DAIGLE F., CURTISS 3RD, R. Identification of pathogen specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.247-252, 2003.
16. GAL-MOR O., FINLAY B.B. Pathogenics Islands: a Molecular Toolbox for Bacterial Virulence. **Cellular Microbiology**, v.8, p.1707-1719, 2006.
17. GARCIA, M. I., LE BOUGUENEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrheogenic *Escherichia coli*. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.94, p.201-236, 1996.
18. GARCIA E.C., BRUMBAUGH A.R., MOBLEY H.L.T. Redundancy and Specificity of *Escherichia coli* Iron Acquisition Systems during Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v.79, p.1225-1235, 2011.
19. GARÉNAUX A., CAZA M., DOZOIS C.M. The Ins and Outs of Siderophore Mediated Iron Uptake by Extraintestinal *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.89-98, 2011.

20. HACKER J., BENDER L., OTT M., WINGENDER J., LUND B., MARRE R., GOEBEL W. Deletions of Chromosomal Regions Coding for Fimbriae and Hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in Various Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates. **Microbial Pathogenesis**, v.8, p.213-225, 1990.
21. HAIKO J., SUOMALAINEN M., OJALA T., LÄHTEENMÄKI K., KORHONEN T.K. Breaking barriers — attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. **Innate Immunity**, v. 15, p. 67-80, 2009.
22. HANTKE K., NICHOLSON G., RABSCH W., WINKELMANN G. Salmochelins, Siderophores of *Salmonella enterica* and Uropathogenic *Escherichia coli* Strains, are Recognized by the Other Membrane Receptor Iron. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v.100, p.3677-3682, 2003.
23. HEIMER S.R., RASKO D.A., LOKCATELL V., JOHNSON D.E., MOBLEY H.L.T. Autotransporter Genes *pic* and *tsh* Are Associated with *Escherichia coli* Strains that Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed During Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v.72, p.593-597, 2004.
24. HENDERSON I.R., NATARO J.P. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. **Infection and Immunity**, v.69, p.1231-1243, 2001.
25. HUI C.Y., GUO Y., HE Q.S., PENG L., WU S.C., CAO, H., HUANG, S.H. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. **Microbiology and Immunology**, v. 54(8), p.452-459, 2010.
26. JANEWAY E TRAVERS; JOHANSON, I.; LINDSTEDT, R.; SVANBORG, C. Roles of the *pap*- and *prs*-Encoded Adhesins in *Escherichia coli* Adherence to Human Uroepithelial Cells. **Infection and Immunity**, v.60, p.3416-3422, 1992.
27. JOHNSON T.J., JORDAN D., KARIYAWASAM S., STELL A.L., BELL N.P., WANNEMUEHLER, Y.M., FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C., LI, G., TIVENDALE, K.A., LOGUE, C.M., NOLAN, L.K. Sequence Analysis and Characterization of a Transferable Hybrid Plasmid Encoding Multidrug Resistance and Enabling Zoonotic Potential for Extraintestinal *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.78, p.1931-1942, 2010.
28. JOHNSON T.J., WANNEMUEHLER Y., DOETKOTT C., JOHNSON S.J., ROSENBERGER S.C., NOLAN L.K. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.3987-3996, 2008.
29. KAPER J.B., KARMALI M.A. The continuing evolution of a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.105, p.4535-4536, 2008.
30. KAPER J.B., NATARO J.P., MOBLEY H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v.2, p.123-139, 2004.
31. KLINTH J.E., PINKNER J.S., HULTGREN S.J., ALMQVIST F., UHLIN B.E., AXNER O. Impairment of the biomechanical compliance of P *pili*: a novel means of inhibiting uropathogenic bacterial infections? **European Biophysics Journal**, v.41, p.285-295, 2012.
32. KOBAYASHI R.K.T., AQUINO I., FERREIRA A.L.S., VIDOTTO M.C. EcoR Phylogenetic Analysis and Virulence Genotyping of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains and *Escherichia coli* Isolates from Commercial Chicken Carcasses in Southern Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, p.631-634, 2011.
33. KÖHLER C., DOBRINDT U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, p.642-647, 2011.
34. KUBENS B.S., WETTSTEIN M., OPFERKUCH W. Two Mechanisms of Serum Resistance in *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v.5, p.371-379, 1988.
35. LEMAÎTRE C., MAHJOUR-MESSAI F., DUPONT D., CARO V., DIANCOURT L., BINGEN E., BIDET P., BONACORSI S. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLoS ONE**, v.8, p.1-10, 2013.
36. MANGES A.R., JOHNSON J.R. Food-Borne Origins of *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.55, p.712-9, 2012.
37. MIETHKE M., MARAHIEL M.A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, p.413-451, 2007.
38. NAKAZATO G., de CAMPOS T.A., STEHLING E.G., BROCCHI M., da SILVEIRA W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.479-486, 2009.
39. NEMETH J., MUCKLE C.A., LO R.Y.C. Serum Resistance and the *traT* Gene in Bovine Mastitis-Causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.28, p.343-351, 1991.
40. PARACUELLOS P., OHMAN A., SAUER-ERIKSSON A.E., UHLIN B.E. Expression and Purification of SfaX<sub>II</sub>, a Protein Involved in regulating Adhesion and Motility Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.86, p.127-134, 2012.

41. PEIGNE C., BIDET P., MAHJOURB-MESSAI F., PLAINVERT C., BARBE V., ME DIGUE C., FRAPY E., NASSIF X., DENAMUR E., BINGEN E., BONACORSI S. The Plasmid of *Escherichia coli* Strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to Avian Pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infection and Immunity**, v.77, p.2272-2284, 2009.
42. PITOUT J.D.D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: a Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-7, 2012.
43. PORCHERON G., GARÉNAUX A., PROULX J., SABRI M., DOZOIS C.M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-24, 2013.
44. PROVENCE D.L., CURTISS R. 3rd. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by na avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection an Immunity**, v.62, p. 1369-1380, 1994.
45. RIPPERE-LAMPE K.E., O'BRIEN A.D., CONRAN R., LOCKMAN H.A. Mutation of the Gene Encoding Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 (*cnf1*) Attenuates the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.69, p.3954-3964, 2001.
46. RODRIGUEZ-SIEK K.E., GIDDINGS C.W., DOETKOTT C., JOHNSON T.J., FAKHR M.K., NOLAN L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v.151, p.2097-2110, 2005.
47. SABATÉ M., MORENO E., PÉREZ T., ANDREU A., PRATS, G. Pathogenicity Islands Markes in Commensal and Urophatogenic *Escherichia coli* Isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.880-886, 2006.
48. SANTOS A.C.M., PIGNATARI A.C.C., SILVA R.M., ZIDKO A.C.M., GALES A.C. A Virulência em *Escherichia coli* Patogênica Extra-intestinal (ExPEC) em Relação à Idade e ao Sexo do Hospedeiro. **O Mundo da Saúde**,v.33,p.392-400, 2009.
49. SCHNEIDER G., DOBRINDT U., MIDDENDORF B.; HOCHHUT, B. SZIJÁRTÓ V., EMÖDY L., HACKER J. Mobilisation and remobilization of a large archetypal pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* *in vitro* support the role of conjugation for horizontal transfer of genomic islands. **BMC Microbiology**,v.11,p.1-14, 2011.
50. SCHWAN W.R. Regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**,v.1,v.17-25, 2011.
51. SILVER R.P., FINN C.W., VANN W.F., AARONSON W., SCHNEERSON R., KRETSCHMER P.J., GARON C.F. Molecular cloning of the K1 capsular polysaccharide genes of *E. coli*. **Nature**, v.289, p.696-698, 1981.
52. SKYBERG J.A., JOHNSON T.J., NOLAN L.K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. **BMC Microbiology**,v.8, p.1-8, 2008.
53. TARCHOUNA M., FERJANI A., BEN-SELMA W., BOUKADIDA J. Distribution of Uropathogenic Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. **International Journal of Infectious Diseases**,v.17,p.450-453, 2013.
54. TIVENDALE K.A., LOGUE C.M., KARIYAWASAM S., JORDAN D., HUSSEIN A., LI G., WANNEMUEHLER Y., NOLAN L.K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat strains model of human disease. **Infection and Immunity**,v.78,p.3412-3419, 2010.
55. VIEIRA M.A.M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**,v.33,p.406-414, 2009.
56. WANG Y., WEN Z.G., KIM K.S. Role of S Fimbriae in *Escherichia coli* K1 Binding to Brain Microvascular Endothelial Cells *in vitro* and Penetration into the Central Nervous Systems *in vivo*. **Microbial Pathogenesis**,v.37,p.287-293, 2004.
57. WHITFIELD C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annual Review of Biochemistry**,v.75,p.39-68, 2006.
58. ZHAO L., GAO S., HUAN H., XU X., ZHU X., YANG W., GAO Q., LIU X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**,v.155, p.1634-1644, 2009.

## Capítulo 5

### ***Enterococcus* sp. em alimentos: paradigmas**

---

Luciana Furlaneto-Maia<sup>1</sup>  
Mayara Baptistucci Ogaki<sup>2</sup>  
Cláudia Carneiro Brandalize<sup>3</sup>  
Katia Real Rocha<sup>2</sup>  
Márcia Cristina Furlaneto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Coordenação de Tecnologia em Alimentos.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. De Microbiologia.

<sup>3</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos.

---

#### **1. Introdução**

*Enterococcus* é o gênero mais controverso do grupo de bactérias ácido lácticas (BALs). A tecnologia de muitos queijos europeus têm indicado que os enterococos desempenham importante papel na maturação desses produtos, pelo processo de proteólise, lipólise e ruptura do citrato, contribuindo com o sabor característico desses queijos. Os enterococos também desempenham funções como biopreservadores, pela produção de bacteriocinas, em alimentos fermentados, como salsichas, azeitonas, embutidos, defumados, entre outros. Ainda, enterococos apresentam diversas características que os tornam potenciais probióticos.

No entanto, os enterococos têm sido associados a diversas infecções humanas. Vários fatores de virulência têm sido descritos e o número de isolamento de enterococos resistentes à vancomicina tem aumentado. A natureza controversa de enterococos resultou em um enorme aumento em artigos científicos e resenhas, onde pesquisadores se dividem entre os prós e contras, sendo que os traços negativos têm sido intensificamente focados. O objetivo deste capítulo é dar uma visão equilibrada de recursos tanto benéficos como de virulência deste grupo de micro-organismo divisionista, pois o equilíbrio de ambos conceitos permitirá a exploração segura dos enterococos como probióticos ou co-culturas.

O gênero *Enterococcus* consiste de cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas, Gram positivos, catalase negativa, não formador de esporo, embora algumas espécies resistam a 60°C por 30 minutos, anaeróbio facultativo e crescimento em ampla faixa de pH (4,6–9,9). Crescem na presença de 40% (p/v) de sais biliares, em 6,5% de NaCl e apresentam homeostase a cátion que contribui para a resistência a metais e dessecação. São produtores de reação  $\beta$ -hemólise em ágar Columbia ou tripticase de soja acrescida de 5% (v/v) de sangue desfibrinado de cavalo ou humano<sup>31,37, 138</sup>. São classificadas como BALs devido sua capacidade de converter glicose em ácido láctico (homofermentativa) durante o metabolismo primário.

Considerando que o gênero *Enterococcus* não é filogenicamente homogêneo, é comum o isolamento de espécies atípicas<sup>38</sup>. Assim, uma identificação adequada se faz necessário e entre as técnicas aplicadas, as técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas na identificação e/ou confirmação das espécies.

Atualmente são descritos mais de 40 espécies de *Enterococcus* sp. e estas podem ser isoladas de uma vasta diversidade de nichos ecológicos, desde matrizes alimentares, como produtos lácteos, carnes, vegetais, e bebidas, até superfícies de mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal. Ainda podem ser encontradas em insetos, caracóis, lama, solo e plantas. Essa capacidade de sobreviver a vários ambientes é devido a sua habilidade em utilizar diferentes substratos<sup>48, 58, 121</sup>. As espécies mais comumente isoladas de amostras clínicas, alimento e ambiente são *E. faecium* e *E. faecalis*<sup>34, 59</sup>, embora alguns estudos tem relatado o isolamento das espécies *E. mundtii* e *E. casseliflavus* as quais são mais frequentes em fontes vegetais<sup>76</sup>. *E. faecium* e *E. faecalis* são espécies geneticamente distintas baseados nas sequências de 16S do rRNA e do gene *housekeeping* *atpAse*<sup>90</sup>.

Por muitas décadas, espécies do gênero *Enterococcus* foram consideradas inofensivas aos seres humanos e sem importância médica. Por serem produtores de bacteriocinas, algumas espécies têm sido amplamente utilizadas na indústria de alimentos como probióticos ou como cultura *starter* em produtos fermentados<sup>37</sup>. Nas últimas décadas este micro-organismo tornou-se um dos mais comuns patógenos, com taxa de mortalidade chegando a 60%<sup>28</sup>. O dramático aumento dos casos de infecções hospitalares causados por espécies de *Enterococcus*, bem como o potencial uso como cultura *starter* e

probiótica, enfatiza a necessidade de conhecer a ecologia, epidemiologia e virulência deste micro-organismo.

As infecções mais comumente relacionadas com esse gênero incluem infecções do sistema nervoso central, intra-abdominal, infecções pélvicas<sup>33, 40</sup>, sepse hepatobiliar, infecções cirúrgicas e sepse neonatal<sup>100</sup>, infecções do trato urinário<sup>102</sup>, bacteremia<sup>123,131</sup> e endocardite<sup>23, 60, 104</sup>.

Entre os fatores de virulência mais estudados em *Enterococcus* destacam-se gelatinase (*gelE*), fatores relacionados a adesão e formação de biofilme (*efa*, *ace*, *acm*, *asp* e *esp*) e fatores com características hidrolíticas (hemolisina e hialuronidase). Os genes responsáveis por estas características encontram-se em ilhas de patogenicidade, porém sua expressão depende do local de isolamento<sup>69</sup>.

Gelatinase é uma metalopeptidase capaz de hidrolisar insulina, caseína, hemoglobina, fibrinogênio, colágeno e gelatina<sup>128</sup>. A citolisina é uma enzima com bifuncionalidade de bacteriocina/hemolisina<sup>87</sup>.

Hemolisina é capaz de lisar eritrócitos humanos, de cavalos e coelhos, porém não lisam sangue de carneiro. Em *Enterococcus* quando a hemolisina e bacteriocina são expressos pelo mesmo determinante genético, passam a ser denominados de citolisina<sup>12</sup>. Isolados produtores de hemolisina estão associados infecções graves<sup>51</sup>.

Substância de agregação (AS) contribui para a formação de agregados celulares e facilitam a troca de material genético via processo conjugativo<sup>40</sup>.

Esp são proteínas de superfície envolvidos na formação de biofilme e infecções do trato urinário<sup>60, 84</sup>. MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) e Acm são adesinas que se ligam ao colágeno e contribuem para a endocardite<sup>89, 88, 61, 124</sup>. A proteína Efa e Ace, presentes em *E. faecalis*, também são responsáveis pela adesão do micro-organismo ao tecido hospedeiro (colágeno)<sup>32</sup>.

O gene *hyl*, que codifica uma proteína funcionalmente semelhante a hialuronidase produzida por *Streptococcus* sp., é encontrado em diversos isolados clínicos de *Enterococcus*, porém com menor frequência em *E. faecium*<sup>105</sup>. Esta enzima causa lise de ácido hialurônico, que faz parte da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

*Enterococcus* sp. tem desenvolvido resistência intrínseca ou extrínseca a diversos antimicrobianos comumente utilizados na terapêutica clínica. A resistência intrínseca pode ser observada a vários antimicrobianos como

cefalosporinas, sulfonamidas, penicilinas, aminoglicosídeos e lincosamidas. Já a resistência adquirida, baseado na aquisição de transposons e plasmídeos, é relevante aos antimicrobianos: eritromicina, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina, aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos<sup>6, 35, 38, 135, 136</sup>. Contudo, a maior relevância clínica de resistência de *Enterococcus* é ao antimicrobiano vancomicina (cepas VRE: *vancomycin resistant enterococci*).

Diversos autores tem relatado um aumento no isolamento de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos, provenientes de diversas fontes: clínicas, alimento, água e solo. Em trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo, Rocha (2012) isolou e caracterizou a sensibilidade de *Enterococcus* proveniente de queijo. Neste estudo, 30% dos isolados foram resistentes à vancomicina, com concentração inibitória mínima (CIM) superior a 64  $\mu\text{g/mL}$ . Ainda, o mesmo autor relatou maior resistência ao antimicrobiano tetraciclina quando comparado com *Enterococcus* provenientes de amostras clínicas<sup>109</sup>.

A vancomicina tem sido o fármaco eleito no tratamento das infecções causadas por enterococos. Contudo, nos últimos anos se observou um aumento no número de VRE, o que tem agravado não só no tratamento de infecções por enterococos, mas também pelo fato desse micro-organismo transferir horizontalmente esse determinante de resistência a outras espécies sensíveis a vancomicina<sup>97</sup>. Até pouco tempo, VRE eram sensíveis a linezolida, porém, cepas resistentes a este antimicrobiano estão surgindo levantando questões sobre os fatores de virulência e mecanismos de sobrevivência de *Enterococcus* sp.<sup>86</sup>.

A resistência de *Enterococcus* sp. as temperaturas de pasteurização e a adaptação a diferentes substratos e condições de crescimento (elevada e baixa temperatura, pH extremo, salinidade) tem facilitado a sobrevivência desta bactéria na matéria prima crua (leite e carne) até produtos processados. Em contrapartida, essa capacidade de desenvolvimento em diversos substratos, corroboram a importância destas bactérias na microbiota de alimentos fermentados.

## **2. Produção de bacteriocinas**

A produção de bacteriocina tem despertado grande interesse no campo prático da microbiologia de alimentos. Bacteriocinas de BALs constituem um subgrupo de peptídeos com atividade antimicrobiana e têm sido sugeridas

como bioconservadores de alimentos por causa da sua classificação como *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Estas são consideradas uma alternativa aos conservantes químicos por serem tolerantes ao pH, calor, e facilmente digeridas por enzimas proteolíticas do trato digestório, devido a sua natureza proteica<sup>19,41,42,47,119</sup>, além de sua utilização veterinária ou como substâncias fitossanitárias para a proteção de plantas<sup>30</sup>.

Baseado nas propriedades estruturais, físico-químicas e moleculares das bacteriocinas, estas podem ser divididas em três grandes classes<sup>55, 74 91, 92</sup>, embora esta classificação tem sido continuamente revisada<sup>106, 110</sup>: bacteriocinas classe I são peptídeos lantibióticos, catiônicos, hidrofóbicos, termoestáveis e modificada pós-tradução. Já as bacteriocinas da classe II assemelham-se as da classe I, porém não apresentam modificações pós-traducionais, com exceção da clivagem do peptídeo líder da pré-bacteriocina formada. Esta classe é subdividida em IIa, IIb e IIc. Bacteriocinas da classe III são grandes peptídeos, hidrofóbicos e termolábeis<sup>140</sup>. Tais peptídeos antimicrobianos são ativos contra diversos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum*<sup>19, 49</sup>.

Embora a citolisina seja descrita como uma bacteriocina é também considerada como um fator de virulência, pois genes que codificam citolisina podem ser encontrados em isolados de pacientes e ambientes hospitalares, bem como de alimentos e indivíduos saudáveis<sup>98, 115, 137</sup>.

A literatura reporta diversas citações sobre enterocinas produzidas por isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. Embora, estudos recentes mostram a necessidade de isolar e caracterizar tecnologicamente novos isolados produtores de bacteriocinas, incluindo demais espécies.

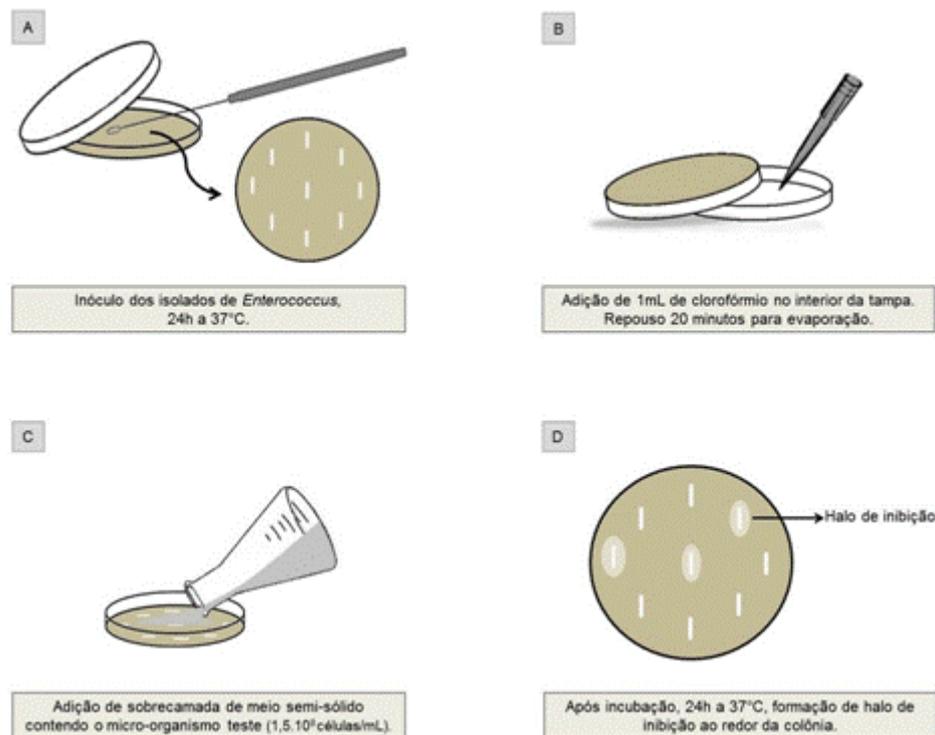
Em *E. faecium* a produção de bacteriocina é regulada por peptídeos feromônios, que quando atingem um limiar de concentração específico se ligam aos seus receptores proteína histidina quinase, seguidos da fosforilação de um regulador de resposta que por sua vez se liga a região promotora do gene da enterocina ativando sua expressão<sup>92</sup>.

A maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias alvo, sendo ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas, devido ao elevado teor de lipídeos aniônicos na membrana, formando poros e promovendo a dissipação da força próton motora (PMF) e inibindo diversos processos na membrana citoplasmática<sup>1</sup>.

Outras bacteriocinas podem também inibir bactérias Gram-negativas. Para tanto, estas transpõem a membrana externa da parede celular e alcançam a membrana plasmática da célula alvo para atuarem. Em contato com a membrana plasmática são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas<sup>24</sup>.

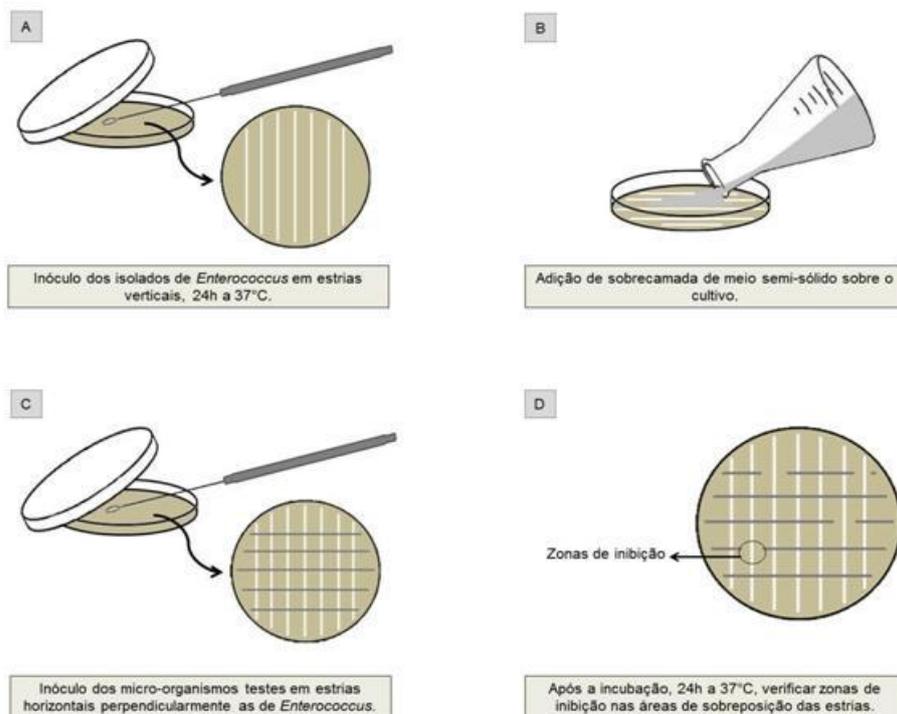
Os alimentos podem ser suplementados com bacteriocina *ex situ* ou por meio de inoculação com a espécie produtora, a fim de obter bacteriocinas *in situ*. No primeiro exemplo, as bacteriocinas são obtidas por cultivo da cepa produtora em fermentador de escala industrial, podendo ser adicionadas nos alimentos na forma parcialmente purificada ou já purificadas, sendo necessária uma aprovação legal de seu uso como conservante de alimentos <sup>42</sup>.

A ação da bacteriocina pode ser demonstrada em meio solidificado, líquido e semi-solidificado pela inibição do micro-organismo sensível<sup>64, 130</sup>. Os métodos mais utilizados são antagonismo por difusão em poços ou em discos de papel, antagonismo direto ou sobrecamada, e pelo método de estrias cruzadas (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** No antagonismo direto, a linhagem produtora de bacteriocina é inoculada em meio de cultura solidificado seguida de incubação (A). Na sequência é depositado clorofórmio na tampa para promover a morte celular (B). Sobre a cultura é depositada

uma sobrecamada semi-solidificada pré-inoculada com a linhagem indicadora (C). A inibição celular será observada pela formação do halo de inibição (D). Ilustração: Mayara Baptistucci Ogaki.



**Figura 2.** No método de estrias cruzadas a linhagem produtora é inoculada com alça no meio de cultura solidificado (A) e após crescimento o micro-organismo indicador é inoculado, também por estria, perpendicularmente à linhagem produtora de bacteriocina (B e C). A zona de inibição será observada na intersecção das duas culturas (D). Ilustração: Mayara Baptistucci Ogaki.

Diversos testes *in vitro* devem ser realizados a fim de comprovar a ação de enterocinas, descartando a possibilidade de outros metabólitos na inibição do micro-organismo alvo. Entre estes testes podemos citar: produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído e isômeros D de aminoácidos <sup>92, 98</sup>.

Alguns fatores são muito importantes para a produção e detecção de enterocinas, como os constituintes do meio de cultura e condições de cultivo <sup>11, 130</sup>. Variações nas condições de pH, temperatura e tempo de cultivo também podem interferir na produção de bacteriocina. Dependendo do isolado, o crescimento em determinadas temperaturas pode suprimir a produção de

bacteriocina e muitas vezes levar a uma perda irreversível da propriedade antagonista<sup>11, 130</sup>.

Na linhagem de *E. faecium* CTC492, a produção de enterocina A foi diminuída em pH baixo e concentrações elevadas de sal, porém foi restaurada por adição de um peptídeo indutor<sup>93</sup>. Em *E. faecalis*, o peptídeo CylLS induz alto nível de expressão dos genes estruturais da citolisina <sup>57</sup>. No entanto, o segundo componente, o peptídeo CylLL, pode formar um complexo com CylLS impedindo a indução da expressão dessa enzima. Assim, este mecanismo auto-regulador fornece às bactérias uma fina sintonia de produção de citolisina em presença da célula alvo (eritrócito) <sup>20</sup>.

Uma característica importante é a capacidade do micro-organismo produtor de bacteriocina sobreviver à ação da sua própria bacteriocina por mecanismo de imunidade específica, que consiste na produção de uma proteína imune<sup>3,19,68</sup>.

Os genes responsáveis pela produção e imunidade de muitas bacteriocinas estão agrupados e organizados em um ou até dois operons e geralmente o gene que codifica a imunidade específica está muito próximo do gene de produção<sup>19,78</sup>.

Segundo Allison & Klaenhammer (1999) existem dois mecanismos principais de imunidade: o fator de imunidade pode interagir com o receptor da bacteriocina ou as bacteriocinas podem ser importadas e inativadas pela célula<sup>3</sup>. Antes de serem liberadas, as bacteriocinas são acumuladas no citoplasma e transportadas na forma solúvel. Contudo, o transporte das bacteriocinas depende da expressão de um gene que codifica a proteína de liberação de bacteriocina (BRP), também chamada de proteína de lise<sup>26</sup>.

### **3. *Enterococcus* como probióticos**

*Enterococcus* sp. quando presentes em alimentos fermentados, especialmente queijos <sup>4</sup>, embutidos <sup>132</sup> e demais produtos fermentados <sup>44, 50, 52</sup>, contribuem para a ocorrência de características organolépticas desejáveis, relacionadas à consistência, textura e aroma característico <sup>36, 85, 94</sup>. Estas características somadas a resistência ao suco gástrico, a sais biliares e produtores de enterocina <sup>113</sup> tornam este gênero um potencial probiótico <sup>9, 80, 106, 114, 125</sup>. Ainda, algumas linhagens probióticas são resistentes a

antimicrobianos. Esta característica favorece sua utilização em combinação com os agentes antimicrobianos.

Probióticos são aditivos que afetam benéficamente o hospedeiro, com diversas propriedades medicinais, incluindo o estímulo do sistema imunológico, redução do colesterol sérico pela ativação do sistema enzimático hepático; aumento da absorção de minerais e vitamina, redução de diarreias e constipação; alívio dos sintomas de intolerância a lactose; contribuição no controle e redução de inflamações, alergias e doenças como o câncer do cólon <sup>7, 54, 112, 117</sup>. A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro <sup>103</sup>.

Diversas preparações farmacêuticas de enterococos probióticos estão no mercado mundial, sendo os mais difundidos: *E. faecium* SF68® (Cerbios-Pharma AS, Barbengo, Suíça), *E. faecalis* Symbioflor 1 (SynbioPharm, Herbom, Alemanha)<sup>39</sup>, BIOTHREE® (Toa Pharmaceutical Co), LEBENIN®-S POWDER (Wakamoto Co., Ltda), Bioflorin® (Sanova Pharm GesmbH), Medilac®-D.S (Hanmi Pharmaceutical Co) BIOFERMIN®-R POWDER (Biofermin Pharmaceutical Co) e Enteronon®-R (Ajinomoto Pharmaceuticals Co) <sup>94</sup>.

Em animais, *Enterococcus* probióticos são utilizados principalmente para tratar ou prevenir a diarreia e melhorar o crescimento durante o manejo. Estudos mostraram eficiência do uso de *E. faecium* (Cylactin ME 20 Plus ® 50g/T) no controle e redução de *Salmonella* Minnessota quando administrados em frangos. Isolados de *E. faecium* também foram responsáveis pela redução de *Campylobacter jejuni*<sup>108</sup>, *Listeria monocytogenes* <sup>18</sup> em aves.

Em suínos, a linhagem *E. faecium* SF68 reduziu a taxa de infecção por *Clamydia* <sup>80, 101</sup>. Já a linhagem *E. faecium* NCIMB 10415 reduziu patótipos de *Escherichia coli* <sup>8</sup>, vírus influenza A <sup>143</sup>, coronavírus <sup>16</sup> e vírus entéricos <sup>79</sup>. *E. faecium* também mostrou-se efetivo contra patógenos de peixes de água salgada em cativeiro <sup>72</sup>.

Em humanos, estudos com linhagens probióticas de *Enterococcus* têm sido conduzidos no tratamento de diarreia, diarreia associada ao uso de antimicrobianos, síndrome do intestino irritado, redução nos níveis de colesterol e melhora na imunidade do hospedeiro<sup>5</sup>. Ainda, há trabalhos

relatando o uso concomitante de *Enterococcus* com outras BALs como alternativa nas estratégias de biopreprofilaxia e bio-terapia contra câncer de colon<sup>133</sup>. Ainda, *E. faecium* é capaz de reduzir biofilme formado por *Streptococcus mutans*<sup>129</sup>.

Cepas probióticas são selecionadas de acordo com as propriedades funcionais e fisiológicas as quais podem ser determinadas *in vitro*, como resistência a sais biliares, baixo pH, produção de bacteriocinas, autoagregação e coagregação<sup>134</sup>.

Brandalize (2013) isolou e analisou cepas de *Enterococcus* sp., provenientes de queijo tipo minas frescal, quanto a sua capacidade probiótica em comparação com cepas probióticas comerciais. Esses isolados apresentaram taxas de sobrevivência superior à cepa controle, quando submetidos a condições de *stress* de pH e enzimático, semelhantes às condições encontradas no trato digestório. Neste estudo, os autores mostraram o potencial probiótico de *Enterococcus* sp presentes em alimentos<sup>13</sup>.

Alguns testes *in vitro* podem ser usados para determinar a tolerância ao ácido estomacal, porém, é importante ressaltar que os níveis de tolerância a diversos pH variam consideravelmente entre as bactérias probióticas<sup>75</sup>. Para que uma bactéria possa ser considerada probiótica, ela deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0, durante 3 horas<sup>53, 56, 96</sup>. A presença de sais biliares e pancreatina no intestino é outra barreira biológica à sobrevivência e colonização do probiótico. O tempo de permanência no trânsito intestinal deve ser de 1 à 4 horas em pH por volta de 8,0<sup>65</sup>.

Os mecanismos de resistência de *Enterococcus* ao baixo pH se dá pela: homeostase do pH intracelular pelo bomba de próton-ATPase; pelo sistema glutato descarboxilase; alcalinização do meio externo pela usease ou argina desaminase; alteração na densidade celular e mudança ao nível de membrana celular<sup>14, 27</sup>.

Ainda, a ausência de fatores de virulência e ausência de genes determinantes da resistência aos antimicrobianos estão entre os critérios mais relevantes de seleção de bactérias probióticas para uso humano<sup>22, 82, 113, 127</sup>. Um critério definitivo para a seleção de cepas probióticas irá depender da indicação clínica, além de considerações de segurança biológicas, como a capacidade de sobreviver ao trânsito gastrointestinal e a tolerância à acidez e à bile. Adicionalmente, não se pode aceitar o fato de que uma determinada cepa

probiótica será efetiva para todos os indivíduos ou mesmo para um mesmo indivíduo em diferentes fases de uma doença<sup>122</sup>, por isso da necessidade de estudar novos isolados com potenciais probióticos.

O potencial probiótico pode diferir até mesmo para diferentes cepas de uma mesma espécie. Cepas de uma mesma espécie podem ser incomparáveis por apresentar áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e mecanismos distintos de ação sobre a mucosa saudável ou com processo inflamatório<sup>67</sup>.

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso em humanos, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no substrato, sobrevivência no alimento durante a fabricação do produto e prazo de validade, além de propiciar propriedades sensoriais adequadas no produto e ser estáveis e viáveis durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados<sup>95, 145</sup>. Esses alimentos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do micro-organismo para serem considerados probióticos como, por exemplo, conter pelo menos  $10^7$  UFC/g de bactérias probióticas viáveis<sup>111, 139</sup>. Entretanto, vários autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g ou mL <sup>63, 83</sup>.

Os mecanismos de ação dos probióticos estão relacionados à competição por sítios de ligação ou à exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal formando, uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço, sendo, as fimbrias os elementos de aderência bacteriana mais conhecidos e estudados. São estruturas compostas por fosfoglicoproteínas que se projetam do corpo bacteriano, e seus receptores são específicos e se diferem entre as porções anatômicas, ao longo do trato intestinal<sup>73</sup>.

As ligações específicas entre o epitélio intestinal humano e *Enterococcus* são vinculadas à substância de agregação (Agg). Essa substância é uma proteína de superfície codificada e expressa em resposta a indução por ferormônios. A Agg converte a superfície celular bacteriana em uma superfície

aderente para as células, causando agregação ou aglutinação, facilitando a adesão na matriz das células eucarióticas<sup>69, 77, 87</sup>.

A auto-agregação pode ser definida como a aderência de bactérias que pertencem a mesma espécie e co-agregação ocorrem quando duas ou mais bactérias, de espécies diferentes, interagem formando um agregado composto estável e este último é altamente específico e pode ser considerado um fator de virulência<sup>71</sup>. A auto-agregação de micro-organismos é um importante requisito para que os mesmos possam fazer parte da microbiota intestinal <sup>21, 29, 141, 142</sup>.

Ainda, a tolerância ao fenol é desejável, já que este composto pode ser formado no intestino pela desaminação de aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou de proteínas endógenas <sup>99,120</sup>.

Segundo Charteris *et al* (1998) as metodologias *in vitro* representam uma importante forma de caracterização dessa capacidade, pois, além de garantir resultados confiáveis, são executadas com maior facilidade que os estudos *in vivo*<sup>17</sup>. Contudo, os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina. Em outras palavras, probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da eficácia em ensaios em humanos<sup>116</sup>.

Alguns autores relatam que o isolamento de *Enterococcus* de determinados alimentos tem potencial uso probiotico naquele alimento, pelo fato das células já estarem adaptadas ao produto. As espécies mais frequentemente isoladas em produtos lácteos são *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*. Estas são capazes de crescer em ambientes restritos, de elevado teor salino e baixo pH, como os encontrados em queijos, ao passo que demais BALs dificilmente se desenvolveriam sob tais condições<sup>58</sup>.

#### **4. *Enterococcus* como cultura starter**

Diversas espécies de *Enterococcus* são ubíquas e produzem uma variedade de produtos como compostos aromáticos <sup>15</sup>, enzimas <sup>46, 118</sup> e enterocinas <sup>2, 19</sup>. Nos últimos anos tem aumentado os trabalhos mostrando a importância de *Enterococcus* sp. como cultura *starter* ou adjunta. Este micro-organismo executa papel importante na maturação de queijos europeus, resultando em proteólise, lipólise e degradação de citrato contribuindo para a obtenção do aroma e sabor característicos destes queijos <sup>45, 37, 118</sup>.

Nos países mediterrâneos e na Alemanha, produtos cárneos tradicionais são fermentados pelas BALs, incluindo *Enterococcus*. Geralmente estes produtos apresentam baixa acidez (pH > 5,3) e elevada concentração de sal, que favorece o crescimento desse micro-organismo com produção de enterocinas. Ainda, *Enterococcus* sp. contribui para a aromatização, proteólise, lipólise e redução de metamioglobina da carne, levando às características organolépticas do produto final<sup>25, 66</sup>.

Em diversos países da Europa, *E. faecalis* tem sido utilizado no preparo de azeitonas em conserva<sup>10</sup>, produção de pasta de arroz fermentado (Idli)<sup>126</sup>, fermentação de bambu<sup>70</sup>, e fermentado de sorgo<sup>144</sup>.

Sendo assim, a capacidade de *Enterococcus* sp. em transformar matéria prima em produto com características desejáveis e qualidade diferenciada, o torna um potencial micro-organismo com diversas aplicações tecnológicas.

## 5. Conclusões

Os enterococos são comuns na natureza e estão presentes em produtos fermentados em geral, principalmente nos produtos lácteos. Esta bactéria contribui diretamente para o sabor e aroma típicos desses alimentos, além da acidificação de alguns embutidos. Ainda, possuem a capacidade de produzir bacteriocinas ativas contra micro-organismos responsáveis pela deterioração e/ou bactérias patogênicas, sendo uma alternativa no processo de bioconservação de alimentos.

Linhas de *Enterococcus* podem ser utilizadas como probióticos, com diversos benefícios ao consumidor, a exemplo: reduzindo e/ou evitando a incidência de diarreia, reduzindo o colesterol, estimulando o sistema imunológico, suprimindo células tumorais, protegendo contra o câncer de colon, mantendo o balanceamento da microbiota intestinal e atuando como antibiótico.

No entanto, alguns isolados de enterococos podem conter genes que codificam fatores de virulência, ocasionando diversas patologias no homem. Além disso, o número de VRE vem aumentando durante as últimas décadas, o que tem causado diversos debates e pesquisa na utilização de *Enterococcus* em alimentos e na promoção da saúde.

Novos isolados e técnicas modernas de análise devem ser utilizados afim de assegurar ao consumidor o uso potencial de *Enterococcus* sp. como

probióticos ou cultura *starter*, garantindo ao consumidor os benefícios de uma BAL.

## 6. Referências

1. ABEE T., KROCKEL L., HILL C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169-185, 1995.
2. ACHEMCHAM F., MARTINEZ-BUENO M., ABRINI J., VALDIVIA E., MAQUEDA M. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.141-150, 2005.
3. ALLISON, G.E.; KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use in novel industrial applications. In: DEMAIN, A. *et al.* **Manual of Industrial and Biotechnology**, 2ed. Washington: ASM Press, p.789-808, 1999.
4. ANDRIGHETTO C., KNIJFF E., LOMBARDI A., TORRIANI S., VANCANNEYT M., KERSTER K., SWINGS J., DELLAGLIO F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.303-316, 2001.
5. ARAÚJO T.F., FERREIRA C.L.L.F. The Genus *Enterococcus* as Probiotic: Safety Concerns. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, p.457-466, 2013.
6. ARIAS C.A., PANESSO D., SINGH K.V., RICE L.B., MURRAY B.E. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.4240-4246, 2009.
7. BADARÓ, A.C.L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V.; STRINGHETA, P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana. **Revista Digital de Nutrição**, v.2, 2008.
8. BEDNORZ C, GUENTHER S, OELGESCHLÄGER K, KINNEMANN B, PIEPER R, HARTMANN S, TEDIN K, SEMMLER T, NEUMANN K, SCHIERACK P, BETHE A, WIELER LH. Feeding the probiotic *Enterococcus faecium* strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa. **Applied Environmental Microbiology**, v.79, p.7896-904, 2013.
9. BENYACOUB J., CZARNECKI-MAULDEN G.L., CAVADINI C., SAUTHIER T., ANDERSON R.E. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. **Journal Nutrition**, v.133, p.1158-1162, 2003.
10. BEVILACQUA A., ALTIERI C., CORBO M.R., SINIGAGLIA M., OUOBA L.I. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. **Journal of Food Science**, v.75, p.536-544, 2010.
11. BISWAS S.R., RAY P., JOHNSON M.C., RAY B. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.1265-1267, 1991.
12. BOOTH M.C., BOGIE C.P., SAHL H.G., SIEZEN R.L., HATTER K.L., GILMORE M.S. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1175-1184, 1996.
13. BRANDALIZE C.C. **Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2013.
14. CAGGIA C., SCIFO G.O., RESTUCCIA C., RANDAZZO C.L. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. **Food Control**, v.20, p.59-66, 2009.
15. CENTENO J., MENENDEZ S., RODRÍGUES J. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.307-313, 1996.
16. CHAI W., BURWINKEL M., WANG Z., PALISSA C., ESCH B., TWARDZIOK S., RIEGER J., WREDE P., SCHMIDT M.F. Antiviral effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain against transmissible gastroenteritis coronavirus. **Archive Virology**, v.158, p.799-807, 2013.
17. CHARTERIS W.P., KELLY P.M., MORELLI L., COLLINS J.K. Ingredient election criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v.51, p.123-136, 1998.
18. CHOI H.J., SHIN M.S., LEE S.M., LEE W.K. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection. **Microbiological Immunology**, v.56, p.613-620, 2012.



41. FRANZ C.M.A.P., VAN BELKUM M. J., HOLZAPFEL W.H., ABRIQUEL H., GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.3, p.293-310, 2007.
42. GÁLVEZ A., ABRIQUEL H., LÓPEZ R. L., BEN OMAR N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1-2, p.51-70, 2007.
43. GALGANO F., CRUDELE M.A., FAVATI F., GUERZONI M.E., SUZZI G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.105-117, 2001.
44. GARDIN F., MARTUSCELLI M., CARUSO M.C., GALGANO F., CRUDELE M.A., FAVATI F., GUERZONI M.E., SUZZI G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.105-117, 2001.
45. GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T.M., SWINGS, J. . Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.312-319, 2003.
46. GHRAIRI T., FRERE J., BERJEAUD J.M., MANAI M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian Rigouta cheese. **Food Control**, v.19, p.162-169, 2008.
47. GILLOR O., ETZION A., RILEY M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.591-606, 2008.
48. GIRAFFA G. *Enterococci* from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.163-171, 2002.
49. GIRAFFA G. Functionality of *enterococci* in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.
50. GIRAFFA, G., OLIVARI, A.M., NEVIANI, E. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. **Food Microbiology**, v.17, p. 671-677, 2000.
51. GIRIDHARA-UPADHYAYA P.M., UMAPATHY B.L., RAVIKUMAR K.L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Laboratory Physicians**, v.2, p.100-104, 2010.
52. GOMES B.C, ESTEVES C.T, PALAZZO I.C.V, DARINI A.L.C, FELIS G.E, SECHI L.A. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, p.668-675, 2008.
53. GOMEZ-GIL B., ROQUE A., TURNBULL J.F., INGLIS V. A review on the use of microorganisms as probiotics. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.40, p.166-172, 1998.
54. GRANATO D., BLANCO G., CRUZ A.G., FARIA J.A.F. Functional foods and non-dairy probiotic product food development: trends, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.292-302, 2010.
55. GUDER A., WIEDEMANN I.; SAHL H.G. Post-translationally modied bacteriocins the lantibiotics. **Biopolymers**, v. 55, p. 62-73, 2000.
56. GUPTA P.K., MITAL B.K., GARG S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.105-109, 1996.
57. HAAS W., SHEPARD B. D., GILMORE M. S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, v.415, p.84-87, 2002.
58. HAJIKHANI R., BEYALTI Y., ASLIM B. Antimicrobial activity of *enterococci* strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, p.105-108, 2007.
59. HARDIE J.M., WHILEY R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Society for Applied Bacteriology Symposium**, v.26, p.1S-11S, 1997.
60. HEIKENS E., BONTEN M.J.M., WILLEMS R.J.L. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.8233-8240, 2007.
61. HENDRICKX A.P.A., VAN LUIT-ASBROEK M., SCHAPENDONK C.M.E., VAN WAMEL W.J.B., BRAAT J.C., WIJNANDS L.M., BONTEN M.J.M., WILLEMS R.J.L. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a Collagen Binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital acquired *Enterococcus faecium*. **Infection and Immunity**, v.77, p.5097-5106, 2009.
62. HENDRICKX A.P.A., VAN WAMEL W.J.B., POSTHUMA G., BONTEN M.J.M., WILLEMS R.J.L. Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p.8321-8332, 2007.
63. HOIER E., JANZEN T., HENRIKSEN C.M., RATTRAY F., BROCKMANN E., JOHANSEN E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., 2nd ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC Press, p.99-131, 1999.

64. HOOVER D.G., HARLANDER S.K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. California: Academic Press, p.23-39, 1993.
65. HUANG Y., ADAMS M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.253-260, 2004.
66. HUGAS, M., GARRIGA, M., AYMERICH, M.T. Functionality of *enterococci* in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 223-233, 2003.
67. ISOLAURI E., SALMINEN S., OUWEHAND A.C. Probiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v.18, p.299-313, 2004.
68. JACK R. W., TAGG J. R., RAY B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, p.171-200, 1995.
69. JETT B.D., HUYKE M.M., GILMORE M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v.7, p.462-478, 1994.
70. JEYARAM K., ROMI W., SINGH T.A., DEVI A.R., DEVI S.S. Bacterial species associated with traditional starter cultures used for fermented bamboo shoot production in Manipur state of India. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.1-8, 2010.
71. KHEMALLELAKUN S., BAUMGARTNER J.C., PRUKSAKOM S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v.32, p.312-318, 2006.
72. KIM Y.R., KIM E.Y., CHOI S.Y., HOSSAIN M.T., OH R., HEO W.S., LEE J.M., CHO Y.C., KONG I.S. Effect of a probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of Microbiology Biotechnology**, v.22, p.526-529, 2012.
73. KIMOTO H., KURISAKI J., TSUJI T.M., OHMOMO S., OKAMOTO T. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte- like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. **Letters Applied Microbiology**, v.29, p.313-316, 1999.
74. KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12,p. 39-86, 1993.
75. KLAENHAMMER T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2ed. Washington: ASM, p.797-811, 2001.
76. KLEIN G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.123-131, 2003.
77. KOCH S., HUFNAGEL M., THEILACKER C., HUEBNER J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, p.822-830, 2004.
78. KOLTER R., MORENO F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. **Annual Review Microbiology**, v.46, p.141-163, 1992.
79. KREUZER S., MACHNOWSKA P., ABMUS J., SIEBER M., PIEPER R., SCHMIDT M.F., BROCKMANN G.A., SCHAREK-TEDIN L., JOHNE R. Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. **Veterinary Research**, v.27, p.43-58, 2012.
80. KURITZA L.N., PICKLER L., MIGLINO L.B., WESTPHAL P., LOURENÇO M.C., TOLEDO M. Probióticos a base de *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 no controle da *Salmonella* Minnesota em frangos de corte (Abstract). In: **XXII Congresso Latino Americano de Aves**, Buenos Aires, Argentina, 2011.
81. LEAVIS H.L., BONTEN M.J.M., WILLEMS R.J.L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.454-460, 2006
82. LEE Y.K., NOMOTO K., SALMINEN S., GORBACH S.L. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. In: LEE, Y.K. **Handbook of probiotics and prebiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.
83. LEE Y.K., SALMINEN S. The coming age of probiotics. **Trends Food Science Technology**, v.6, p.241-245, 1995.
84. LEENDERTSE M., HEIKENS E., WIJNANDS L., VAN LUIT-ASBROEK M., TESKE G., ROELOFS J., BONTEN M.J., POLL VAN DER T., WILLEMS R.J. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium* induced urinary tract infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.1162-1165, 2009.
85. MANOLOPOULOU E., SARANTINOPOULOS P., ZOIDOU E., AKTYPIS A., MOSCHOPOULOU E., KANDARAKIS I.G., ANIFANTAKIS E.M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.153-161, 2003.
86. MARION A.K., ROSE A.D., TIMOTHY F.J., BRYAN P.S., KELLY M., SUSAN C. Response to emerging infection leading to outbreak of Linezolid-resistant Enterococci. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.13, p.1024-1030, 2007.

87. MUNDY L.M., SAHM D.F., GILMORE M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Review**, v.13, p.513-522, 2000.
88. NALLAPAREDDY S.R., SINGH K.V., MURRAY B.E. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. **Infection and Immunity**, v.76, p.4120-4128, 2008.
89. NALLAPAREDDY S.R., WEINSTOCK G.M., MURRAY B.E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v.47, p.1733-1747, 2003.
90. NASER S., THOMPSON F.L., HOSTE B., GEVERS D., VANDEMEULEBROECKE K., CLEENWERCK I., THOMPSON C.C., VANCANNEYT M., SWINGS J. Phylogeny and identification of Enterococci by atpA gene sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2224-2230, 2005.
91. NES I. F., DIEP D. B., HÅVARSTEIN L. S., BRURBERG M. B., ELJSINK V., HOLO H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.113-28, 1996.
92. NES I. F., DIEP D. B., HOLO H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.1189-1198, 2007.
93. NILSEN T., NES I. F., HOLO H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1848-1854, 1998.
94. NOGUCHI N., NAKAMINAMI H., NAKASE K., SASATSU M. Characterization of *Enterococcus* strains contained in probiotic products. **Biology Pharmaceutical Bull**, v.34, p.1469-1473, 2011.
95. OLIVEIRA M.N., SIVIERI K., ALEGRO J.H.A., SAAD S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.1-21, 2002.
96. PARK S.C., HWANG M.H., KIM Y.H., KIM J.C., SONG J.C., LEE K.W., JEONG K.S., RHEE M.H., KIM K.S., KIM T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.22, p.35-37, 2006.
97. PEARSON H. Superbug hurdles key drug barrier. **Nature**, p.418-469, 2002.
98. PIARD J.C., DESMAZEUD M. Inhibiting factors produced by lact acid bacteria 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. **Lait**, v.72, p.113-142, 1992.
99. PINTO M.G.V., FRANZ C.M.A.P., SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W.H. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p.205-214, 2006.
100. POH C.H., OH H.M.L., TAN A.L. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. **Journal Infection**, v. 52, p. 383-386, 2006.
101. POLLMANN M., NORDHOFF M., POSPISCHIL A., TEDIN K., WIELER L.H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural *Chlamydia* infection in swine. **Infection and Immunity**, v.74, p.4346-4353, 2005.
102. PROTONOTARIOU E., DIMITROULIA E., POURNARAS S., PITIRIGA V., BSOFIANOU DI, TSAKRIS A. Trends in antimicrobial bresistence of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. **Journal of Hospital Infection**, v.75, p.225-227, 2010.
103. PUUPPONEN-PIMIÄ R., AURA A.M., OKSMAN-CALDENTY K.M., MYLLÄRINEN P., SAARELA M., MATTILA-SANHOLM T., POUTANEN K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.
104. RASMUSSEN M., JOHANSSON D., SÖBIRK S.K., MÖRGELIN M., SHANNON O. Clinical isolates of *Enterococcus faecalis* aggregate human platelets. **Microbes and Infection**, v.12, p.295-301, 2010.
105. RICE L.B., CARIAS L., RUDIN S., VAEL C., GOOSSENS H., KONSTABEL C., KLARE I., NALLAPAREDDY S.R., HUANG W., MURRAY B.E. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, p.508-512, 2003.
106. RILEY, M. A., WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v.84, p.357-364, 2002.
107. RIVERA-ESPINOZA Y., GALLARDO-NAVARRO Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.
108. ROBYN J., RASSCHAERT G., MESSENS W., PASMANS F., HEYNDRIKX M. Screening for lactic acid bacteria capable of inhibiting *Campylobacter jejuni* in *in vitro* simulations of the broiler chicken caecal environment. **Beneficial Microbes**, v.3, p.299-308, 2012.
109. ROCHA R. K. **Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
110. RODRIGUEZ J. M., MARTINEZ M. I., HORN N., DODD H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.101-116, 2003.

111. RYBKA S., FLEET G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australian**, v.49, p.471-475, 1997.
112. SAAD S.M.I., BEDANI R., MAMKA E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD S.M.I., CRUZ A.G., FARIA J.A.F. (Org). **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, p.51-84, 2011.
113. SAARELA M., MOGENSEN G., FONDÉN R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.
114. SAAVEDRA L. Clinical applications of probiotic agents. **American Journal Clinical Nutrition**, v.73, p.1147S-1151S, 2001.
115. SÁNCHEZ-HIDALGO M., MAQUEDA M., GÁLVEZ A., ABRIQUEL H., VALDIVIA E., MARTÍNEZ-BUENO M. The genes coding for enterocin EJ 97 production by *Enterococcus faecalis* EJ 97 are located on a conjugative plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1633-1641, 2003.
116. SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutritional Review**, v.61, p.91-99, 2003.
117. SANTOS, A.C.A.L. **Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal**. Monografia (Especialização em Terapia Nutricional) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
118. SARANTINOPOULOS P., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p. 93-105, 2002.
119. SAVADOGO A., OUATTARA C. A. T., BASSOLE I. H. N., TRAORE S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.678-683, 2006.
120. SCHILLINGER U., GUIGAS C., HOLZAPFEL W.H. *In vitro* adherence and other properties of *lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. **Internacional Dairy Journal**, v.15, p.1289-1297, 2005.
121. SCHROETER J., KLAENHAMMER T. Genetics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v.292, p.1-6, 2009.
122. SHANAHAN F. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads to fantasy to facts and future. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.88, p.5-9, 2002.
123. SHANKAR N., BAGHDAYAN A.S, GILMORE M.S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v.417, p.746-750, 2002.
124. SILLANPÄÄ J., NALLAPAREDDY S.R., PRAKASH V.P., QIN X., HÖÖK M., WEINSTOCK G.M., MURRAY B.E. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of other predicted MSCRAMMs, including four distinct *pilus loci*, in *Enterococcus faecium*. **Microbiology**, v.154, p.3199-3211, 2008.
125. SIVIERI K., SPINARDI-BARBISAN A.L.T., BARBISAN L.F., BEDANI R., PAULY N. D., CARLOS I.Z. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male *Wistar* rats. **European Food Research Technology**, v.228, p.231-237, 2008.
126. SRIDEVI J., HALAMI P.M., VIJAYENDRA S.V. Selection of starter cultures for idli batter fermentation and their effect on quality of idlis. **Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.557-563, 2010.
127. STANTON C., DESMOND C., COAKLEY M., COLLINS J.K., FITZGERALD G., ROSS R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., 2<sup>nd</sup> ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press. p.27-58, 2003.
128. SU Y.A., SULAVIK M.C., HE P., MAKINEN K.K., MAKINEN P.L., FIEDLER S., WIRTH R., CLEWELL D.B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v.59, p.415- 420, 1991.
129. SUZUKI N., YONEDA M., HATANO Y., IWAMOTO T., MASUO Y., HIROFUJI T. *Enterococcus faecium* WB2000 inhibits biofilm formation by oral cariogenic *Streptococci*. **International Journal Dentistry**, v.11, p.83-87, 2011.
130. TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, p.722-756, 1976.
131. TAN C.K., LAI C.C., WANG J.Y., LIN S.H., LIAO C.H., HUANG Y.T., WANG C.Y., LIN H.I., HSUEH P.R. Bacteremia caused by non-*faecalis* and non-*faecium* *Enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. **Journal of Infection**, v.61, p.34- 43, 2010.
132. TANASUPAWAT S., SUKONTASING S., LEE J.S. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ("mum") in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1630-1634, 2008.
133. THIRABUNYANON M., HONGWITTAYAKORN P. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.169, p.511-525, 2013.

134. TOIT M.D., FRANZ C.M.A.P., DICKS L.M.T., HOLZAPFEL W.H. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.482-494, 2000.
135. TOP J., WILLEMS R., BLOK H., DE REGT M., JALINK K., TROELSTRA A., GOORHUIS B., BONTEN M. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p. 16-319, 2007.
136. TREITMAN A.N., YARNOLD P.R., WARREN J., NOSKIN G.A. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.462-463, 2005.
137. UPADHYAYA P.M. G., RAVIKUMAR K.L., UMAPATHY B.L. Review of virulence factors of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, p.301-305, 2009.
138. VAN DEN BERGHE E., DE WINTER T., DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 159-170, 2006.
139. VINDEROLA C.G., REINHEIMER J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000.
140. VUYST L., FOULQUIÉ-MORENO M.R., SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E. The role and application of *enterococci* in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.
141. XU Z., LI L., SHIRTLIFF M.E., PETERS B.M., PENG Y., ALAM M.J., YAMASAKI S., SHI L. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p.315-317, 2010.
142. WADSTROM T., ANDERSSON K., SYDOW M., AXELSSON L., LINDGREN S., GULLMAR B. Surface properties of *lactobacilli* isolated from the small intestine of pigs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.513-520, 1987.
143. WANG Z., CHAI W., BURWINKEL M., TWARDZIOK S., WREDE P., PALISSA C., ESCH B., SCHMIDT M.F. Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus *in vitro*. **Plos One**, v.8, p.522-531, 2013
144. YOUSIF N.M., DAWYNDT P., ABRIQUEL H., WIJAYA A., SCHILLINGER U., VANCANNEYT M., SWINGS J., DIRAR H.A., HOLZAPFEL W.H., FRANZ C.M. Molecular characterization, technological properties and safety aspects of *enterococci* from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.216-28, 2005.
145. ZAGO M., FORNASARI M.E., CARMINATI D., BURNS P., SUÀREZ V., VINDEROLA G., REINHEIMER J., GIRAFFA G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v.28, p.1033-1040, 2011.

## CAPÍTULO 6

### Resistência a Carbapenêmicos em Enterobactérias

---

Eliana Carolina Vespero<sup>1</sup>  
Ana Carolina Polano Vivan<sup>2</sup>  
Ana Paula Streling de Oliveira<sup>1</sup>  
Halha Ostrensky Saridakis<sup>2</sup>

Universidade Estadual de Londrina – UEL

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Depto. Patologia e Análises Clínicas e Toxicológicas

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### 1. Introdução

O reconhecimento de que microrganismos são capazes de resistir a agentes físicos e químicos origina-se do início da era antimicrobiana. Mesmo antes da introdução da penicilina na prática clínica, cepas resistentes haviam sido detectadas<sup>31</sup>. A emergência de resistência em enterobactérias por exemplo, é um problema que requer imediata atenção, considerando que fazem parte da microbiota intestinal do ser humano e outros animais homeotérmicos e algumas estão também no meio ambiente. Muitas, são responsáveis por uma enorme gama de infecções hospitalares e comunitárias. As bactérias de maior relevância clínica e epidemiológica, isoladas em ambientes hospitalares são *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., as quais estão relacionadas à origem de importantes infecções do trato urinário e respiratório, infecções intra-abdominais, sepse, entre outras <sup>1, 2, 48</sup>.

A habilidade das bactérias em ampliar seu nicho ecológico na presença de determinados antibióticos é explicada pela aquisição de genes por conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais em genes existentes. Vários mecanismos de resistência estão envolvidos, entre eles: alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo; alteração da permeabilidade da membrana celular da bactéria ao antimicrobiano; efluxo ativo e inativação enzimática do antimicrobiano. Resumidamente, resistência pode ser resultado da pressão seletiva promovida pelo uso inadequado de antimicrobianos, pela disseminação clonal de uma cepa

resistente ou pela transferência horizontal de genes de resistência<sup>48</sup>.

A emergência e a disseminação de resistência entre as espécies de *Enterobacteriaceae* tornam-se em complicações para o tratamento de infecções hospitalares graves e contribuem para o aparecimento de espécies resistentes, às vezes, a todos os antimicrobianos atualmente disponíveis<sup>48</sup>. O principal mecanismo de resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas é a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que inibem a ação de compostos  $\beta$ -lactâmicos<sup>37</sup>.

## **2. Produção de $\beta$ -lactamases em enterobactérias**

A produção de  $\beta$ -lactamases, em enterobactérias, tem importância primordial. Estas enzimas protegem os microrganismos contra a ação de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, clivando os anéis  $\beta$ -lactâmicos, convertendo-os em compostos sem ação. Conforme a classificação de Ambler, baseado na identificação da sequência de aminoácidos, as  $\beta$ -lactamases podem ser divididas em quatro diferentes classes moleculares A, B, C e D. As classes A, C e D apresentam resíduos de serina no sítio catalítico, já a classe molecular B inclui as chamadas metalo-enzimas, que requerem zinco como cofator para sua ação catalítica<sup>56</sup>. Em 2010, Bush e Jacoby<sup>5</sup> atualizaram sua prévia classificação das  $\beta$ -lactamases, resultando na distribuição esquemática da tabela 1.

A  $\beta$ -lactamase TEM-1, a enzima mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas, foi detectada inicialmente em Atenas, em 1963. O termo TEM deriva de “Temoniera”, nome da paciente de cuja hemocultura foi isolada a primeira cepa de *E. coli* produtora desta enzima. TEM-2, a primeira derivada de TEM-1, apresenta um único aminoácido substituído na molécula da  $\beta$ -lactamase original<sup>7</sup>. Outra  $\beta$ -lactamase comumente encontrada em enterobactérias, principalmente em *Klebsiella pneumoniae* é a enzima SHV-1. Seu primeiro relato ocorreu em 1972 e foi assim denominada pela característica química de apresentar variações na ligação ao seu grupo sulfidríla <sup>37</sup>. Estas  $\beta$ -lactamases, chamadas primordiais, têm a capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração <sup>7</sup>.

**Tabela 1.** Esquema de classificação para  $\beta$ -lactamases bacterianas, de acordo com as definições de Bush e Jacoby (2010)<sup>5</sup>

Grupo Bush-Jacoby (2010)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe molecular (subclasse)	Substrato(s) distintivo(s)	Inibição por		Características definidoras	Enzimas representativas
				AC / TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas em relação a benzilpenicilina; hidrolisa cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima e frequentemente outros oximino- $\beta$ -lactâmicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina em relação a cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas primordiais	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilina e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino- $\beta$ -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino- $\beta$ -lactâmicos combinada à resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- $\beta$ -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Sim	Não	Hidrolisa cefalosporinas. Inibição por ácido clavulânico mas não por aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenêmicos, oximino- $\beta$ -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1) B(B3)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro incluindo carbapenêmicos mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise carbapenêmicos	CphA, Sfh-1

## 2.1 Produção de $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL)

As ESBL ( $\beta$ -lactamases de espectro ampliado), englobam enzimas capazes de hidrolisar quase todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) e de carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). Estas enzimas têm como característica fenotípica importante o fato de permanecerem sensíveis à ação de inibidores de  $\beta$ -lactamases, como

sulbactam e ácido clavulânico, descritos na década de 70, e tazobactam, na década de 80. As espécies bacterianas produtoras de ESBL podem sobreviver por longos períodos de tempo em hospitais, ocasionando surtos com frequência<sup>7</sup>.

As ESBL são codificadas por genes presentes em grandes plasmídios, de 80 a 300 kb, os quais podem ser transferidos entre espécies bacterianas, facilitando sua disseminação. Em diversos casos, esses plasmídios codificam ainda outros genes de resistência antimicrobiana, sendo comum a ocorrência concomitantemente de ESBL e da resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, cloranfenicol e quinolonas<sup>20</sup>.

Utilizando testes de hibridação ou análise de sequência de nucleotídeos dos genes que codificam ESBL, foi mostrado que mutações ocorridas nos genes que codificam as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, em locais próximos aos seus sítios ativos, resultam em alterações na sequência de aminoácidos, originando as novas  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado<sup>5, 28</sup>.

O primeiro relato de ESBL data de 1983, a partir de três isolados de *K. pneumoniae* e um de *S. marcescens*, no oeste da Alemanha, que apresentaram resistência a cefotaxima e às demais cefalosporinas de terceira geração. Esta nova  $\beta$ -lactamase plasmidial chamada SHV-2, derivou de uma mutação de SHV-1<sup>28</sup>. Surtos ocasionados por espécies da família *Enterobacteriaceae*, mas também por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. portadores de ESBL do tipo SHV foram reportados em várias regiões do mundo <sup>24, 51</sup>.

As ESBL, em enterobactérias, são representadas por diferentes famílias, destacando-se: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV), Oxacilina (OXA) e as Cefotaximases (CTX-M); estas enzimas pertencem à classe D de Ambler e ao subgrupo 2d de Bush e à classe A e ao subgrupo 2e<sup>7, 25</sup>. Enterobactérias produtoras de ESBL são prevalentes em infecções hospitalares, no entanto, a emergência e disseminação dessas bactérias na comunidade também têm sido observadas, sendo o trato urinário o sítio clínico mais comumente acometido<sup>47</sup>. Atualmente, as ESBL estão disseminadas entre todas as espécies de enterobactérias de importância clínica, sendo que há relatos da identificação de mais de 217 diferentes ESBLs do tipo TEM, 183 SHV e 151 CTX-M (<http://www.lahey.org>) <sup>54</sup>.

No final da década de 90, a produção de ESBL por membros da família *Enterobacteriaceae* tornou-se endêmica em hospitais da América Latina. Entre 1997 e 2002, em estudo realizado pelo programa de vigilância aos

antimicrobianos SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), constatou que a prevalência de *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL em culturas de sangue de pacientes hospitalizados foi maior na América Latina do que na Europa e América do Norte (43%, 22% e 6%, respectivamente)<sup>17</sup>. Para isolados de urina, aproximadamente 45% de *Klebsiella* spp. apresentavam fenótipo de ESBL em 2000 (em comparação com aproximadamente 30% durante 1997-1999) e 5% de *E. coli* em ambos os períodos avaliados<sup>18</sup>. O percentual de isolados de enterobactérias produzindo ESBL também é elevado nos hospitais brasileiros. Estudos do SENTRY, entre 1997-1999, mostraram que 50% dos isolados de *K. pneumoniae* e 9% de *E. coli* eram produtores de ESBL<sup>19,44</sup>.

Embora o primeiro isolado bacteriano produtor de CTX-M tenha sido relatado em 1989, a detecção destas enzimas foi significativa somente a partir de 1995<sup>47</sup>. As enzimas CTX-M estão fortemente relacionadas com as  $\beta$ -lactamases de *Kluyvera* spp. e se originaram, provavelmente, da transferência horizontal de genes e subsequente mutação em diferentes espécies<sup>48</sup>. Inicialmente, bactérias produtoras desta enzima foram detectadas predominantemente em três áreas geográficas: América do Sul, Extremo Oriente e Europa Oriental. Atualmente, apesar de serem isoladas em todos os continentes, algumas enzimas CTX-M são predominantes em determinadas regiões. Na América do Sul, CTX-M-2 é predominante, sendo que na Argentina 75% das enterobactérias são produtoras de CTX-M-2<sup>19</sup>.

### **3. Resistência a carbapenêmicos**

Os carbapenêmicos atualmente representam os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções graves por isolados multirresistentes, principalmente bactérias Gram-negativas que produzem ESBL e/ou apresentam produção aumentada da  $\beta$ -lactamase Amp-C. Os carbapenêmicos mais comuns e utilizados na prática clínica são imipenem, meropenem e ertapenem. Entretanto, a resistência a essa classe de antimicrobianos tem sido detectada, principalmente associada à ação de enzimas do tipo carbapenemase, com grande significância em enterobactérias<sup>50</sup>. Além do mecanismo enzimático, outros fatores podem contribuir para a diminuição da eficácia dos carbapenêmicos, como a perda de proteínas de membrana externa (OMPs), também chamadas de

porinas, ou diminuição de expressão das mesmas. A seguir, serão descritos cada um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência aos antibióticos carbapenêmicos apresentados por enterobactérias: perda/alteração de porinas e inativação enzimática (produção de carbapenemases). Determinados mecanismos responsáveis pela resistência a esses antimicrobianos em alguns microrganismos, não são muito frequentes na família *Enterobacteriaceae*, como é o caso da alteração de PBP (proteínas ligadoras de penicilina), e sistemas de efluxo.

### **3.1 Alteração de canais de porinas**

Este mecanismo de resistência tem se tornado cada vez mais frequente em enterobactérias. Algumas cepas, embora sem atividade eficiente de carbapenemase, podem apresentar resistência a carbapenêmicos <sup>30</sup>. As proteínas de membrana externa (OMP) dos microrganismos Gram-negativos são capazes de formar canais constituídos por água no seu interior, que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. A alteração na sequência nucleotídica dos genes, bem como a redução da expressão dos genes que codificam OMPK35 e OMPK36 podem representar um importante papel na resistência a carbapenêmicos <sup>27, 30</sup>.

Alguns autores descreveram que a combinação da perda de porinas com a produção da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) pode resultar em aumento considerável na Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os carbapenêmicos <sup>15, 30</sup>. Muitas vezes, um mecanismo resistência somente, pode não ser suficiente para conferir a resistência a carbapenêmicos <sup>27</sup>.

### **3.2 Produção de carbapenemases**

As carbapenemases conferem resistência à maioria dos agentes  $\beta$ -lactâmicos e são comumente codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídios, o que facilita a transferência entre diferentes isolados. Por essa razão, isolados produtores de carbapenemases têm sido encontrados disseminados entre pacientes. Esses aspectos relevantes tornam as espécies de enterobactérias produtoras de carbapenemases importante problema no controle de infecções em instituições de cuidados de saúde <sup>46</sup>.

Conforme a classificação molecular de Ambler, as carbapenemases são  $\beta$ -lactamases pertencentes às classes moleculares A (penicilinases), B (metaloenzimas) e D (oxacilinases). Essas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, os carbapenêmicos, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas <sup>5</sup>. A existência de enzimas capazes de inativar carbapenêmicos limita as opções de tratamento. A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias tornou-se crescente nos últimos anos, sendo as  $\beta$ -lactamases da classe A as prevalentes entre essas bactérias <sup>55</sup>.

### 3.2.1 Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL)

As enzimas pertencentes à classe B de Ambler denominadas metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) foram descobertas há mais de 40 anos em um isolado de *Bacillus cereus*. Possuem íons zinco no seu sítio ativo, e conseqüentemente, sofrem inibição por quelantes iônicos, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mas não são bloqueadas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como clavulanato, sulbactam e tazobactam. Estas enzimas são as únicas da família das  $\beta$ -lactamases que não hidrolisam monobactâmicos, como o aztreonam <sup>4</sup>.

As MBL mais frequentemente detectadas em bacilos Gram negativos são dos tipos IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), GIM (German Imipenemase), SPM (São Paulo metalo  $\beta$ -lactamase) e SIM (Seoul Imipenemase). A primeira MBL descrita foi a IMP-1, detectada inicialmente em uma amostra de *S. marcescens* isolada no Japão em 1988. As enzimas VIM e IMP se encontram disseminadas mundialmente, principalmente entre as espécies de *P. aeruginosa* e membros da família *Enterobacteriaceae*. Na América do Sul, segundo estudos do SENTRY, os isolados produtores de MBL têm sido caracterizados pelo predomínio de VIM e SPM. No Brasil, em abril de 2003 foi identificada a primeira metalo  $\beta$ -lactamase produzida por *K. pneumoniae*, e paralelamente, a descrição de diversos isolados que apresentaram padrão de resistência similar, mostrando, dessa forma, o surgimento de novo mecanismo de resistência em hospitais brasileiros<sup>33,34,49,50,62</sup>.

Recentemente foi identificado um novo tipo de MBL, denominada NDM (New Delhi metalo  $\beta$ -lactamase) <sup>29</sup>. Essa nova MBL apresenta características semelhantes àquelas das enzimas IMP-1 e VIM-2. Esta enzima foi inicialmente identificada em cepas do norte europeu originadas de pacientes da Índia ou pacientes que viajaram à Índia para procedimentos médicos<sup>6</sup>. Foi descrita em

2008, pela primeira vez, em *K. pneumoniae* e *E. coli*. Essa nova MBL é capaz de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos<sup>43</sup>. Uma revisão na literatura, realizada por Bushnell e colaboradores (2013)<sup>8</sup>, detectou 94 publicações com relatos de NDM-1, entre 2008 e 2011. De uma perspectiva epidemiológica, os casos descritos nesse período representam uma população heterogênea, com muitos fenótipos de resistência, indicativo da disseminação do gene por plasmídios<sup>8,61</sup>. NDM-1 já foi relatada na Índia, Reino Unido, Estados Unidos, Austrália, Holanda, Quênia, Canadá e Brasil. As espécies de enterobactérias já descritas portadoras desta enzima incluem: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *Providencia* spp.<sup>23</sup>. Devido a facilidade de disseminação desta enzima é necessário a introdução de métodos confiáveis de detecção laboratorial, práticas eficazes de controle de infecção e sistemas de vigilância<sup>8</sup>.

### 3.2.2 Oxacilinases (OXA)

As oxacilinases são enzimas pertencentes à classe molecular D e estão inclusas no grupo 2d da classificação de Bush. Trezentas e noventa e oito oxacilinases foram descritas até o momento (<http://www.lahey.org>). Muitas delas são derivadas de OXA-2, OXA-3 e OXA-10 e são produzidas principalmente por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. As enzimas OXA têm mais de 50% de atividade hidrolítica contra cloxacilina e oxacilina quando comparada àquela contra benzilpenicilina e apresenta perfil variável de inibição por inibidores de  $\beta$ -lactamase. Em *K. pneumoniae*, foi detectada a  $\beta$ -lactamase OXA-48, a qual tem sido relatada em surtos na Turquia e Reino Unido. A descrição de isolados produzindo esta enzima tem ocorrido, também, no Líbano, Bélgica, França, Tunísia, Grécia, Israel, Marrocos, Espanha, Argentina e Índia<sup>13, 55</sup>. O relato da associação genética entre genes codificantes para ESBL e OXA-48 no mesmo transposon indica que essa combinação de genes de multirresistência pode se disseminar amplamente no futuro<sup>55</sup>.

### 3.2.3 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

As três principais famílias de carbapenemases da classe A incluem a SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI/NMC-A (imipenemase/*non-metallo*carbapenemase-A) e a KPC. Todas têm a habilidade de hidrolisar grande variedade de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas

e aztreonam. Na classe A, KPC é clinicamente e epidemiologicamente a enzima mais importante, comparada as dos tipos SME, IMI/NMC-A e GES (*Guiana espectro estendido*)<sup>10, 54</sup>. Até o momento, foram descritos nove subtipos (KPC-2 a KPC-10) da enzima KPC e pertencem a classe 2f de Bush<sup>5</sup>. Os genes que codificam KPC-1 e KPC-2 são idênticos<sup>46</sup>. Os perfis hidrolíticos de KPC-2 e KPC-3 são geralmente similares, tendo alta afinidade tanto por meropenem quanto por imipenem. A KPC-3, no entanto, apresenta maior afinidade por ceftazidima<sup>46</sup>. As enzimas do tipo KPC são codificadas por plasmídeos, característica que as diferencia daquelas codificadas em cromossomos, como SME e NMC/IMI<sup>26</sup>. A análise genética dos genes *bla*<sub>KPC</sub>, evidencia que sua mobilidade pode estar associada a plasmídios e transposons, facilitando a sua transmissão entre as bactérias. Isto pode ser corroborado pela presença desses genes em várias espécies de bactérias e diferentes clones de *K. pneumoniae*<sup>42</sup>.

A primeira descrição da enzima KPC ocorreu em uma cepa de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte, EUA, em 1996 e reportada posteriormente em outros isolados, em 2001, como publicação dos dados obtidos por meio do projeto ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*). Esse isolado apresentava resistência total a meropenem e imipenem e a enzima ficou mundialmente reconhecida como uma nova carbapenemase. Em 2003, foram isoladas quatro cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no nordeste dos EUA. Essas  $\beta$ -lactamases foram denominadas KPC-2 e as cepas se mostraram sensíveis ou com sensibilidade intermediária ao imipenem e meropenem, em contraste com a cepa produtora de KPC isolada na Carolina do Norte, que era totalmente resistente ao ertapenem<sup>38, 60</sup>. No mesmo ano, foi descrito o isolamento de *Klebsiella oxytoca* apresentando resistência ao imipenem, meropenem, aztreonam e cefalosporinas de amplo espectro. Esse isolado também apresentava a  $\beta$ -lactamase KPC-2 e, ao contrário do primeiro isolado de *K. pneumoniae* relatado, não foram detectadas alterações de porinas<sup>58</sup>.

Em 2004 houve o primeiro relato de um surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC-3, ocorrido em Nova York e outro no nordeste dos Estados Unidos. Os surtos ocorreram entre 2000 e 2001 e infectaram ou colonizaram 24 pacientes de UTI (Unidades de Terapia Intensiva)<sup>35</sup>. Os sítios das infecções variavam de sistemas respiratório, urinário e sangue, levantando a suspeita de contaminação do cateter de Foley, fato confirmado posteriormente<sup>63</sup>. No ano seguinte, ocorreu primeiro o isolamento de uma cepa de *E. coli* produzindo enzima KPC-3 durante monoterapia prolongada com meropenem e imipenem

22,39.

A primeira descrição da enzima KPC fora dos EUA ocorreu em 2005, na França, em um isolado clínico de *K. pneumoniae* identificada de um paciente que havia sido submetido a nefrostomia bilateral, a qual foi realizada em dezembro de 2004 em Nova York. Considerando esses dados é possível que a bactéria produtora da  $\beta$ -lactamase KPC encontrada na França seja resultado da transferência intercontinental a partir dos EUA<sup>39</sup>. Um segundo relato, no mesmo ano na França, é de um homem de 31 anos, com sepse relacionada à supuração intra-abdominal. O paciente havia realizado uma gastrectomia durante uma viagem a Nova York e permaneceu por 3 semanas na UTI de um hospital da região<sup>14</sup>.

A partir deste momento vários estudos foram realizados para detecção de bactérias produtoras de KPC no mundo. Atualmente este gene de resistência está disseminado mundialmente, e não somente em *Enterobacteriaceae*, mas também em bactérias não-fermentadoras (*P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*)<sup>56,57</sup>.

#### 4. Contexto genético das carbapenemases

Os genes *bla*<sub>KPC</sub> têm sido identificados em muitos plasmídios, de tamanho e estrutura diferentes. Esses plasmídios geralmente transportam também, determinantes de resistência a aminoglicosídeos, e têm sido associados com genes de outras  $\beta$ -lactamases, como de ESBL<sup>42</sup>. O gene *bla*<sub>KPC</sub> é identificado com frequência dentro de um transposon do tipo Tn3 de 10 kb, o Tn4401, que ocorre em quatro isoformas. Este possui uma transposase (*tnpA*) e uma resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção não relacionadas, ISKpn6 e ISKpn7. Este transposon pode ser responsável pela disseminação do gene<sup>40</sup>.

As MBLs constituem uma classe de enzimas (molecular classe B) que, apesar da sua diversidade significativa de sequência de aminoácidos, possui propriedades funcionais distintas, como capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e sensibilidade a agentes quelantes, tais como EDTA. Esta última propriedade indica que cátions bivalentes, mais comumente Zn<sup>2+</sup>, são essenciais para o ataque nucleofílico do anel  $\beta$ -lactâmico. A análise filogenética

sugere a existência de três linhagens de MBL: B1, B2 e B3 <sup>3</sup>. O subgrupo B1 inclui as enzimas adquiridas dos tipos VIM, IMP, GIM, SPM, SIM, AIM (*Australian imipenemase*), DIM (para Holandês Imipenemase) e NDM, que surpreendentemente, ainda são desconhecidas suas origens<sup>12</sup>.

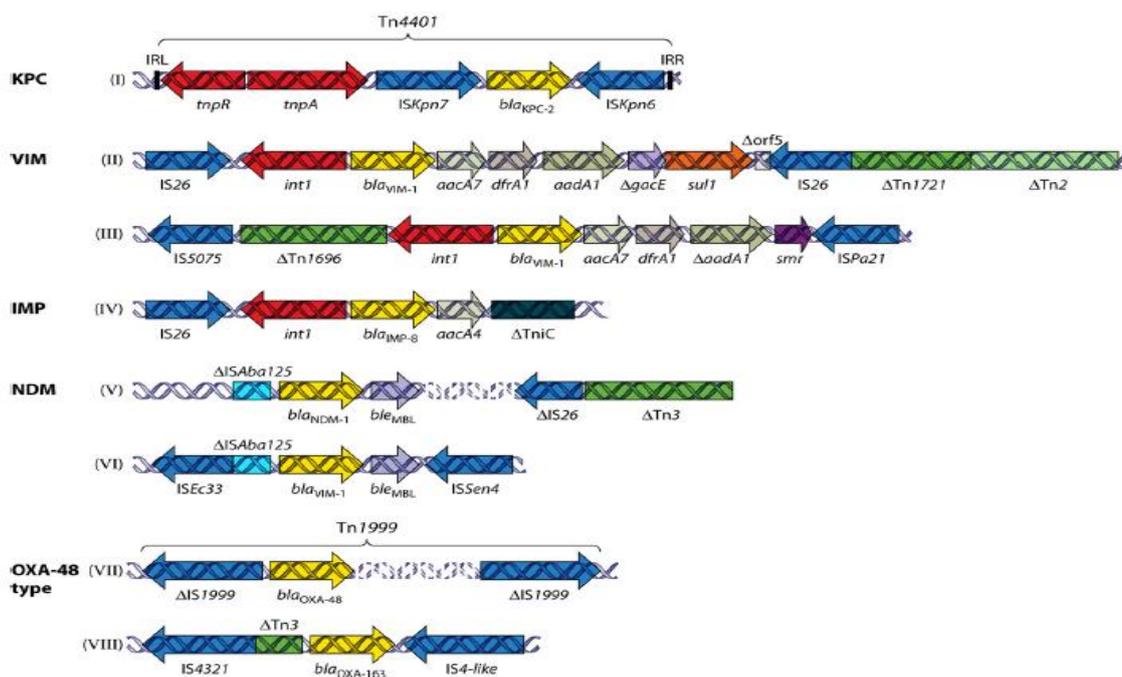
As variantes *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>, identificadas em *K. pneumoniae*, estão localizadas em cassetes gênicos incorporados nas regiões variáveis de integrons da classe 1. No entanto, os genes *bla*<sub>NDM</sub> não estão associados com este elemento genético <sup>57</sup>. A ampla variedade de plasmídios em *K. pneumoniae* codificando MBL indica que os apresentam mecanismos de mobilização. Os elementos de inserção (IS), como IS26, ISEc33, ISSen4, e ISAb125, quer isoladamente ou como parte de transposons (por exemplo, Tn3 e Tn1696), comumente flanqueiam as regiões que codificam as MBL<sup>56,57</sup>. As MBL VIM, IMP e NDM são as mais frequentes em *K. pneumoniae* e em outras espécies de enterobactérias, incluindo *E. coli* (VIM, IMP e NDM) *E. cloacae* (principalmente VIM e IMP), *S. marcescens* (principalmente IMP) e *P. mirabilis* (principalmente VIM), conforme mostra a tabela 2. Nestas espécies, a maioria das bases genéticas dos genes das MBL são semelhantes ao encontrado em *K. pneumoniae* <sup>58</sup>.

**Tabela 2.** Tipos, classificação e distribuição de carbapenemases plasmidiais em *Enterobacteriaceae* <sup>58</sup>.

Tipo	Classe molecular (sub-classe)	Grupo funcional	Variantes	Espécies
KPC	A	2 f	KPC-2 a -13	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Raultella</i> spp.
VIM	B (B1)	3 a	VIM-1, -2, -4, -5, -6 VIM-11, -12, -13, -19, -23 VIM-24, -25, -26, -27, -32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> <i>Serratia liquifaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> <i>M. organii</i> , <i>Proteus stuartii</i> , <i>P. mirabilis</i>
IMP	B (B1)	3 a	IMP-1, -3, -4, -6, -8 IMP-11, -24, -27	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>M. organii</i>
NDM	B(B1)	3 a	NDM-1, -4, -5, -6	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. organii</i> , <i>Providencia</i> spp.
OXA	D	2df		<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i>

Fonte: Bush and Jacoby, 2010 <sup>5</sup>; Tzouveleki et al., 2012 <sup>58</sup>.

Os genes *bla*<sub>OXA-48</sub> são transportados por plasmídeos conjugativos responsáveis pela sua disseminação entre *K. pneumoniae* e outras enterobactérias, tais como *E. coli* e *C. freundii*, como mostra a tabela 2<sup>9</sup>. Além disso, os plasmídeos que contêm as sequências *bla*<sub>OXA-48</sub> estão associados a IS1999, um elemento da família IS4 envolvido na mobilização e expressão de genes de resistência aos β-lactâmicos<sup>52,53</sup>.



**Figura 1.** Representação esquemática de sequências de plasmídeos transportando genes de MBL em isolados de enterobactérias. Mostrando as associações de genes codificadores de carbapenemases com vários elementos móveis<sup>19, 58</sup>. (I) Transposon Tn4401 contendo *bla*<sub>KPC-2</sub> (pNYC<sup>11</sup>). (II e III) Sequências codificando VIM (pNL194 e pCC416, respectivamente<sup>32</sup>). (IV) Sequência *bla*<sub>IMP</sub> (pFP10-258). (V e VI) Sequências contendo *bla*<sub>NDM-1</sub> em um plasmídeo de *K. pneumoniae* 05-506 e plasmídeo p271A, respectivamente<sup>52</sup>. (VII e VIII) Transposon Tn1999 codificando o gene OXA-48 (pA-1 e o segmento contendo *bla*<sub>OXA-163</sub> do plasmídeo p6299, respectivamente)<sup>52,53</sup>.

## 5. Tratamento de infecções causadas por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos

O tratamento de infecções causadas por patógenos produtores de carbapenemases ou resistentes a carbapenêmicos por outros mecanismos é considerado um desafio para o controle de infecção hospitalar. Poucos dados clínicos estão disponíveis para a conduta de administrações de antimicrobianos

<sup>21</sup>. A utilização de uma combinação de antibióticos para atingir a eficácia pode ser necessária. As combinações de antimicrobianos são utilizadas algumas vezes para prevenir ou adiar a emergência de subpopulações do micro-organismo em questão. Além disso, utilizando um agente adicional, pode ser possível a redução da dose de um antimicrobiano potencialmente tóxico. Por outro lado, administrar 2 antimicrobianos em alguns casos pode aumentar o risco de toxicidade e custo do tratamento<sup>45</sup>.

Alguns antimicrobianos ainda são eficazes contra alguns isolados produtores de carbapenemases, no entanto existem outros problemas envolvidos neste cenário<sup>36</sup>. A polimixina B e a colistina, que são amplamente utilizadas, apresentam nefrotoxicidade e eficácia duvidosa em infecções pulmonares, embora pareçam ser consistentemente efetivas em outros tipos de infecção. A tigeciclina é um antimicrobiano recomendado apenas em casos de infecções intra-abdominais e de pele e tecidos moles. Não é apropriada para infecções urinárias devido a baixas concentrações que atinge neste sítio<sup>36</sup>. A fosfomicina é um antimicrobiano “antigo” que inibe a primeira etapa da síntese de peptidoglicano e mostra potente ação bactericida contra muitos patógenos Gram-negativos e Gram-positivos. Este antimicrobiano apresenta baixa toxicidade, e atinge níveis muito elevados no soro e urina. A fosfomicina também penetra rapidamente em tecidos, uma propriedade altamente desejável no tratamento de infecções graves. Infelizmente, a resistência se estabelece rapidamente quando a fosfomicina é usada como monoterapia <sup>16</sup>.

Por isso, diversos autores e manuais recomendam para o tratamento de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos utilizar dois ou três antimicrobianos, sendo um deles a Polimixina B ou colistina em associações com aminoglicosídeos (amicacina ou gentamicina), carbapenêmicos (meropenem e doripenem) ou tigeciclina<sup>41</sup>. A escolha do(s) fármaco(s) de associação com Polimixinas deve se basear, preferencialmente, na CIM e no perfil de sensibilidade aos referidos antimicrobianos das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos detectadas no hospital. Deve-se considerar igualmente o local de infecção e a sua penetração na escolha do antimicrobiano a ser utilizado na combinação<sup>6,16,36,41,59</sup>.

## **6. Considerações finais**

Desde a produção de novos antimicrobianos até sua utilização é um longo caminho a ser percorrido, várias etapas são necessárias até sua liberação para a utilização na rotina clínica. Já, a emergência de novas cepas bacterianas multirresistentes, avança aceleradamente.

Diante desse panorama mundial, tão grave, é preciso intensificar e melhorar a aplicação de medidas preventivas, como: programas rigorosos de desinfecção e esterilização de materiais e ambientes hospitalares, detecção rápida e minuciosa de pacientes colonizados, controle constante da utilização de antimicrobianos e associações com outros, ou com inibidores de  $\beta$ -lactamases.

## 7. Referências

1. ABBOTT S.L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Versalovic J, Corroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML and Wamock DW editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: 10th edition, ASM Press, v.639, p.57, 2011.
2. ALVES R.P.R. Estudo das principais enterobactérias responsáveis pelas infecções no âmbito hospitalar e comunitário: uma revisão [manuscrito]. Campina Grande-PB, 2011.
3. BEBRONE C. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical pharmacology**, v.74, p.1686-1701, 2007.
4. BUSH K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.48-53, 1998.
5. BUSH K., JACOBY G.A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.969-976, 2010.
6. BUSH K., FISHER J.F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annuals Reviews Microbiology**, v.65, p.455-78, 2011.
7. BRADFORD P.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.933-951, 2001.
8. BUSHNELL G., MITRANI-GOLD F., MUNDY L.M. Emergence of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase type 1-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae*: global case detection and bacterial surveillance. **International Journal of Infectious Diseases**, v.17, p.325-333, 2013.
9. CARRER A., POIREL L., YILMAZ M., AKAN O.A., FERHA C., CUZON G., MATAR G., HONDERLICK P., NORDMANN P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p.1369-1373, 2010.
10. CASTANHEIRA M., DESHPANDE L.M., MATHAI D., BELL J.M., JONES R.N., MENDES R.E. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, p.1274-8, 2011.
11. COLINON C., MIRIAGOU V., CARATTOLI A., LUZZARO F., ROSSOLINI G.M. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.258-262, 2007.
12. CORNAGLIA G., GIAMARELLOU H., ROSSOLINI G.M. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, p.381-393, 2011.
13. CUZON G., QUANICH J., GONDRET R., NAAS T., NORDMANN P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.2420-2423, 2011.
14. DORTET L., RADU I., GAUTIER V., BLOT F., CHACHATY E., ARLET G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.455-457, 2008.
15. ENDIMIANI A., DEPASQUALE J.M., FORERO S., PEREZ F., HUJER A.M., ROBERTS-POLLACK D., FIORELLA P.D., PICKENS N., KITCHEL B., CASIANO-COLON A.E., TENOVER F.C., BONOMO R.A. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.64, p.1102-1110, 2009.
16. ENDIMIANI A., PATEL G., HUJER K.M., SWAMINATHAN M., PEREZ F., RICE L.B., JACOBS M.R., BONOMO R.A. *In vitro* activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates,

- including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.526-529, 2010.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data; 2011.
  18. GALES A.C., CASTANHEIRA M., JONES R.N., SADER H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative *bacilli* isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.73, p.354–360, 2012.
  19. GUZMÁN-BLANCO M., LABARCA J.A., VILLEGAS M.V., GOTUZZO E. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.18, p.421-433, 2014.
  20. HAWSER S.P., BOUCHILLON S.K., HOBAN D.J., BADAL R.E., HACKEL M.A., LASCOLS C.A., VILLEGAS M.V., ROSSI F. Low frequency ofertapenem-resistant intra-abdominal isolates of *Escherichia coli* from Latin America: susceptibility, ESBL occurrence, and molecular characterisation (SMART2008–2009). **Journal of Chemotherapy**, v.24, p.6–11, 2012.
  21. HIRSCH E.B., TAM V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1119-1125, 2010.
  22. HONG T.E.S., MOLAND E.S., ABDALHAMID B., HANSON N.D., WANG J., SLOAN C., FABIAN D., FARAJALLAH A., LEVINE J., THOMSON K.S. *Escherichia coli*: development of carbapenem resistance during therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.84-86, 2005.
  23. HSUEH P. New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): An Emerging Threat Among *Enterobacteriaceae*. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.109, p.685-687, 2010.
  24. HUANG Z.M., MAO P.H., CHEN Y., WU L., WU J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.2, p.5425–5427, 2004.
  25. JACOBY G.A., MUNOZ-PRICE L.S. The new  $\beta$ -lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v.352, p.380-391, 2005.
  26. KANTOPOULOU K., PROTONOTARIOU E., VASILAKOS K., KRITI M., KOTELI A., ANTONIADOU E., SOFIANO D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2  $\beta$ -lactamase resistant to colistin. **Journal of Hospital Infection**, v.76, p.70-73, 2010.
  27. KITCHEL B., RASHEED J.K., ENDIMIAMI A., HUJER A.M., ANDERSON K.F., BONOMO R.A., PATEL J.B. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.4201-4207, 2010.
  28. KNOTHE H. *In-vitro* activity of cefotaxima. **Wien Klin Wochenschr**, v.142, p.4-7, 1983.
  29. KUMARASAMY K.K., TOLEMAN M.A., WALSH T.R., BAGARIA J., BUTT F., BALAKRISHNAN R., CHAUDHARY U., DOUMITH, M., GISKE C.G., IRFAN S., KRISHNAN P., KUMAR A.V., MAHARJAN S., MUSHTAQ S., NOORIE T., PATERSON D.L., PEARSON A., PERRY C., PIKE R., RAO B., RAY U., SARMA J.B., SHARMA M., SHERIDAN E., THIRUNARAYAN M.A., TURTON J., UPADHYAY S., WARNER M., WELFARE W., LIVERMORE D.M., WOODFORD N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, p.597-602, 2010.
  30. LANDMAN D., BRATU S., QUALE J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.1303-1308, 2009.
  31. LAXMINARAYAN R., DUSE A., WATTAL C., ZAIDI A.K., WERTHEIM H.F., SUMPRADIT N., VLIEGHE E., HARA G.L., GOULD I.M., GOOSSENS H., GREKO C., SO A.D., BIGDELI M., TOMSON G., WOODHOUSE W., OMBAKA E., PERALTA A.Q., QAMAR F.N., MIR F., KARIUKI S., BHUTTA Z.A., COATES A., BERGSTROM R., WRIGHT G.D., BROWN E.D. CARB O. Antibiotic resistance - the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v.13, p.1057-1098, 2013.
  32. LI B., SUN J.Y., LIU Q.Z., HAN L.Z., HUANG X.H., NI Y.X. First report of *Klebsiella oxytoca* strain coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.2937-2941, 2011.
  33. LINCOPAN N., MCCULLOCH J.A., REINERT C., CASSETTARI V.C., GALES A.C., MAMIZUKA E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.516-519, 2005.
  34. LINCOPAN N., LEIS R., VIANELLO M.A., ELMOR DE ARAUJO M.A., RUIZ A.S., MAMIZUKA, E. *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v.7, p.1-3, 2006.
  35. LIVERMORE D.M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4793-4799, 2004.

36. LIVERMORE D.M., WARNER M., MUSHTAQ S., DOUMITH M., ZHANG J., WOODFORD N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.37, p.415-419, 2011.
37. MEDEIROS A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, p.19-45, 1995.
38. MOLAND E.S., HANSON N.D., HERRERA V.L., BLACK J.A., LOCKHART T.J., HOSSAIN A., JOHNSON J.A., GOERING R.V., THOMSON K.S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-carbapenemase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.711-714, 2003.
39. NAAS T.P., NORDMANN P., VEDEL G., POYART C. Plasmid mediated carbapenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4423-4424, 2005.
40. NAAS T., CUZON G., VILLEGAS M.V., LARTIGUE M.F., QUINN J.P., NORDMANN P. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *blaKPC* gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1257-1263, 2008.
41. NOTA TÉCNICA Nº01/2003. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 17 de abril de 2013.
42. NORDMANN P., CUZON G., NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, p.228-236, 2009.
43. NORDMANN P., POIREL L., WALSH T.R., LIVERMORE D.M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, v.19, p.588-595, 2011.
44. O'BRIEN T.F., STELLING J. Integrated multilevel surveillance of the world's infecting microbes and their resistance to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, p.281-295, 2011.
45. PANKEY G.A., ASHCRAFT D.S. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.70, p.561-564, 2011.
46. PATEL J.B., RASHEED J.K., KITCHEL B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology and Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.31, p.55-62, 2009.
47. PATERSON D.L., BONOMO R.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657-686, 2005.
48. PATERSON D.L. Resistance in Gram-negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Medicine**, v.119, p.20-28, 2006.
49. PAVEZ M. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009. São Paulo. 125p.
50. PEIRANO G., SEKI L.M., VAL PASSOS V.L., PINTO M.C., GUERRA L.R., ASENSI M.D. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.265-268, 2009.
51. POIREL L., HÉRITIER C., TOLÜN V., NORDMANN P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.15-22, 2004.
52. POIREL L., LAGRUTTA E., TAYLOR P., PHAM J., NORDMANN P. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.4914-4916, 2010.
53. POIREL L., CASTANHEIRA M., CARRÈR A., RODRIGUEZ C.P., JONES R.N., SMAYEVSKY J., NORDMANN P. OXA-163, an OXA-48-Related Class D  $\beta$ -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, p.2546-2551, 2011.
54. POTRON A., POIREL L., RONDINAUD E., NORDMANN P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. **Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles= European Communicable Disease Bulletin**, v.18, n.31, 2013.
55. RASMUSSEN J.W., HOIBY N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.470-482, 2007.
56. ROBLEDO I.E., AQUINO, E.E., SANTÉ M.I., SANTANA J.L., OTERO D.M., LEÓN C.F., VÁZQUEZ G.J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p.1354-1357, 2010.
57. ROBLEDO I.E., AQUINO E.E., VÁZQUEZ G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, p.2968-2970, 2011.

58. TZOUVELEKIS L.S., MARKOGIANNAKIS A., PSICHOGIOU M., TASSIOS P.T., DAIKOS G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, p.682-707, 2012.
59. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide; 2011.
60. YIGIT H., QUEENAN A.M., ANDERSON G.J., DOMENECH-SANCHEZ A., BIDDLE J.W., STEWARD C.D., ALBERTI S., BUSH K., TENOVER F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151-1161, 2001.
61. YONG D., TOLEMAN M.A., GISKE C.G., CHO H.S., SUNDMAN K., LEE K., WALSH T.R. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.5046-5054, 2009.
62. ZAVASCKI A.P., MACHADO A.B., DE OLIVEIRA K.R., SUPERTI S.V., PILGER D.A., CANTARELLI V.V., PEREIRA P.R., LIEBERKMECHT A.C., BARTH A.L. KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, p.286-288, 2010.

## Capítulo 7

### Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*

---

Giovana Carolina Bodnar<sup>1,4</sup>

Caio Ferreira de Oliveira<sup>2,4</sup>

Márcia Regina Eches Perugini<sup>3</sup>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,4</sup>

Gerson Nakazato<sup>1,4</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL

<sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Depto. Patologia e Análises Clínicas e Toxicológicas

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### 1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos é uma das ameaças mais graves para a saúde pública. Infecções por bactérias resistentes são cada vez mais comuns, sendo que alguns patógenos tornam-se resistentes a vários tipos ou classes de antimicrobianos. O limitado número de antimicrobianos disponíveis dificulta o controle de doenças infecciosas, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Quando a primeira e a segunda linha de opções de antimicrobianos para o tratamento são limitadas, por resistência ou indisponibilidade, os profissionais de saúde são forçados a utilizar antimicrobianos que podem ser mais tóxicos para o paciente e frequentemente mais caros e menos eficazes. Algumas estratégias podem ser propostas com a equipe de saúde para o controle de infecções hospitalares, tais como, imunização, administração adequada de antimicrobianos, e redução da transmissão pessoa-a-pessoa.

Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou um documento em 2013 descrevendo os principais micro-organismos resistentes no país. Estima-se que neste país mais de dois milhões de pessoas adoeceram todo ano com infecções resistentes aos antimicrobianos e pelo menos 23 mil morreram devido a estas infecções <sup>1</sup>.

Entre os micro-organismos classicamente descritos como agentes etiológicos das infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), destaca-se *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA).

## 2. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, com diâmetro aproximado de 0,8-1,0  $\mu\text{m}$ . São resistentes ao dessecação, sendo facilmente disseminados pelas partículas de poeira presentes no ar e superfícies. São micro-organismos imóveis, anaeróbios facultativos e não formam esporos. Produzem catalase, enzima que converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , o que diferencia estafilococos de estreptococos, que não produzem catalase. As colônias de *S. aureus* apresentam pigmentação amarela quando cultivadas em meio de cultura <sup>2</sup>.

*S. aureus* possui uma parede celular rígida externa à membrana celular, característica das bactérias Gram-positivas. O peptídeoglicano é a estrutura que confere rigidez e resistência à lise osmótica da parede celular é composto por dois açúcares alternados, o N-acetilglicosamina (NAC) e o N-acetilmurâmico (NAM), uma cadeia de quatro aminoácidos e uma ponte peptídica que entrecruza as cadeias. A enzima transpeptidase é quem catalisa as ligações cruzadas e reconhece o polímero vizinho à terminação *D-ala D-ala* efetuando a ligação intercadeia <sup>2</sup>.

Esta espécie bacteriana é encontrada na microbiota normal do trato respiratório superior ou da pele. Geralmente causam infecções da pele e ferimentos, sendo que a maioria dos casos a transmissão ocorre da microbiota de um indivíduo assintomático a um indivíduo suscetível <sup>2</sup>.

Podem causar várias doenças, como acne, furúnculos, pústulas, impetigo, pneumonia, osteomielite, cardites, meningites, artrite, infecções pós-cirúrgicas e bacteremia. Infecções severas ocorrem quando a resistência do hospedeiro encontra-se diminuída devido a situações que comprometem o sistema imune <sup>2,3</sup>.

A maioria das cepas de *S. aureus* produz fatores de virulência. A produção de hemolisina, responsável pela hemólise observada ao redor das colônias geradas em placa de ágar sangue, pode ser encontrada em *S. aureus*. Também pode ocorrer a produção de uma enterotoxina associada a intoxicações alimentares. São coagulase positivos, produzindo uma enzima que provoca a coagulação da fibrina e formação de coágulo. E algumas linhagens também podem produzir leucocidina, proteína que provoca destruição dos leucócitos. Fatores de virulência extracelulares, como enzimas proteolíticas, fibrinolisinase, lipase, ribonuclease e desoxirribonuclease também são produzidos por *S. aureus* <sup>2</sup>.

Outro exemplo de exotoxina é a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), que é decorrente de infecção estafilocócica e provoca febre alta, erupções, vômito, diarreia e, ocasionalmente, morte <sup>2</sup>.

Os fatores de virulência são importantes, principalmente, na interação do microrganismo com o hospedeiro, durante o processo inicial de colonização (adesão e invasão), nos mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro e na modulação da resposta imune. Além disso, esses micro-organismos podem secretar diversas proteínas, conhecidas como exoproteínas. Essas podem apresentar algumas funções, como as agressinas, que causam danos aos tecidos e órgãos do hospedeiro; as evasinas que irão evadir da ação das células de defesa do hospedeiro; ou então as modulinas, que vão modular a resposta imune <sup>4</sup>.

### **3. MRSA e medidas de prevenção**

Nos Estados Unidos o CDC reportou que, durante o ano de 2011, o número de pacientes com infecção por MRSA foi de 80.461, sendo que 11.285 resultaram em morte. Apesar dos elevados números, a incidência de MRSA vem diminuindo, e de 2005 para 2011 observou-se 31% de declínio nas taxas globais de MRSA invasivo. A maior queda (54%) foi observada nas infecções causadas em pacientes durante a internação, e isto ocorreu devido às medidas de prevenção<sup>1</sup>.

Porém durante a última década, entre a população em geral (pessoas que não tenham recebido, recentemente, cuidados em um ambiente de saúde), as taxas de infecções por MRSA aumentaram rapidamente<sup>1</sup>.

Nos Estados Unidos, o CDC preconiza algumas medidas para controlar a propagação das infecções, tais como (a) rastrear a doença e identificar fatores de risco para infecções resistentes aos antimicrobianos, utilizando dois sistemas, *National Healthcare Safety Network* e *Emerging Infections Program*; (b) proporcionar suporte como experiência pessoal, diretrizes de prevenção e assistência de laboratório; (c) desenvolver testes e recomendações de prevenção para controlar as infecções resistentes aos medicamentos; (d) ajudar as instalações de saúde a melhorar as práticas de prescrição de antibióticos<sup>1</sup>.

No Brasil não temos um órgão que abrange todo o país, que fiscaliza e controla as taxas de infecção ocorrentes. Cada hospital, ou cada região reporta e controla estas taxas, realizando medidas de prevenção, se necessário.

Alguns órgãos, como INCC (*International Nosocomial Infection Control Consortium*) e CDC-NHSN (*CDC's National Healthcare Safety Network*) realizam

estudos de vigilância que monitoram as taxas de infecção mundialmente <sup>5, 6</sup>. Entretanto a melhor forma de prevenção é a conscientização de médicos, assistentes de saúde e até mesmo pacientes em evitar a propagação da infecção com a lavagem adequada das mãos, cuidado ao manipular alimentos, prescrição adequada de antimicrobianos, limpeza e desinfecção adequada dos locais de assistência à saúde, e cuidado com o paciente também após o período de internação.

Em 2011, os programas de vigilância da América Latina (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* e vários outros), a fim de avaliar a resistência a antimicrobianos, realizaram teste de sensibilidade em isolados bacterianos provenientes de 11 países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, México, Panamá, Peru e Venezuela). Um total de 4979 isolados foram avaliados, sendo que 1588 originários de cinco diferentes hospitais do Brasil. Do total, 48% eram MRSA e 14% VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina), sendo que 29% dos isolados brasileiros eram resistentes à meticilina<sup>7</sup>.

Alguns compostos naturais e derivados de outros micro-organismos vem sendo pesquisados como alternativas aos antimicrobianos que não apresentam eficácia contra os MR. Um estudo realizado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), a fenazina-carboxamida, um composto derivado de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou efeito inibitório contra amostras de MRSA provenientes do Hospital Universitário, da UEL. Os resultados mostraram que este composto pode ser uma boa alternativa no tratamento e controle de infecções causadas por MRSA <sup>8</sup>.

#### **4. Resistência aos beta-lactâmicos**

Beta-lactâmicos foram os primeiros antimicrobianos a serem inseridos na prática clínica e são até então uma das classes mais efetivas utilizadas na medicina. Com a introdução da penicilina, em 1944, mais de 94% de *S. aureus* eram sensíveis e em 1950 a metade já se apresentava resistente. Em 1960 diversos hospitais apresentaram focos de *S. aureus* MR. O primeiro caso de *S. aureus* resistente a meticilina foi descoberto em 1961, quando chegou ao mercado a meticilina, uma penicilina semi-sintética, específica para o tratamento de infecções causadas por estafilococos produtores de beta-lactamase, enzimas capazes de hidrolizar o anel beta-lactâmico dessa classe de antimicrobiano <sup>9, 10</sup>. Desde então,

as epidemias devido a diferentes clones de MRSA ocorreram em diversas regiões geográficas. O resultado tem sido a persistência de MRSA como um importante patógeno em todo o mundo <sup>11</sup>.

Um dos mecanismos de resistência à meticilina em estafilococos ocorre devido a presença do gene *mecA* <sup>12</sup>. Este gene codifica novas proteínas, a PBP2a ou PBP2', que substitui as outras proteínas ligadoras de penicilina na membrana e tem baixa afinidade não só pela meticilina, como também para os outros antimicrobianos beta-lactâmicos. Dessa forma, a biossíntese da parede celular é restabelecida, mesmo na presença do antimicrobiano. O gene *mecA* pertence a um cassete cromossômico chamado *SCCmec*, que é um elemento genético móvel e também pode conter outros genes de resistência a antimicrobianos. O surgimento de cepas resistentes é devido a aquisição e inserção do elemento *SCCmec* no cromossomo de linhagens sensíveis <sup>9, 12, 13</sup>.

Elementos *SCCmec* são altamente diversificados em sua estrutura e conteúdo genético, podendo ser classificados em tipos e subtipos. Isto é comum na prática para definir clones de MRSA pela combinação do tipo de *SCCmec* e “sequence type – ST”, definida pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) <sup>9</sup>.

Algumas características do *SCCmec* são: presença do gene *mecA*, o qual é responsável por conferir resistência aos beta-lactâmicos; presença do complexo gênico *ccr*, que codificam uma ou mais recombinases responsáveis pela mobilidade do *SCCmec*; sequência de inserção (ISS), o qual serve como um marcador para recombinação mediada por *ccr* <sup>9</sup>. O restante do DNA presente no *SCCmec* é denominado como região J, que contém vários genes ou pseudogenes que aparentemente não são utilizados pela célula bacteriana, exceto os genes que codificam resistência para antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados, alguns dos quais são derivados de plasmídios ou de transposons <sup>14</sup>. Cada tipo de *SCCmec* pode ser classificado em subtipos com base nesta região <sup>15</sup>.

Os tipos de *SCCmec* são definidos pelo tipo do complexo de genes *ccr* e gene *mec*. Estes são os elementos chave responsáveis pela a integração e excisão do cassete *SCCmec*; e pelo fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos <sup>9</sup>.

Até hoje foram descobertos 11 diferentes tipos de *SCCmec* <sup>16</sup>. Os primeiros foram designados como tipo I, II e III. Em seguida surgiram os tipos IV a VIII. Mais recentemente os tipos IX, X e XI. Elementos *SCCmec* variam em tamanho de 20 kb (tipo IV e VI) a 67 kb (tipo III), mas a região *mecA* (2 kb) representa apenas uma pequena proporção do elemento *SCCmec* <sup>17, 18</sup>.

Após o surgimento de isolados de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) <sup>19, 20</sup>, observou-se que estes apresentavam características fenotípicas e genéticas distintas, quando comparadas às cepas típicas isoladas nos hospitais. A presença do SCC $mec$  do tipo IV ou V, e na grande maioria apenas resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, era característico de isolados de CA-MRSA. Enquanto MRSA isolados em infecções hospitalares eram na maioria multirresistentes e apresentavam SCC $mec$  I, II ou III <sup>21, 22</sup>. Hoje os isolados comunitários já se inseriram nos hospitais <sup>23</sup>, sendo disseminados em diversas regiões e adquirindo algumas características hospitalares, como resistência não só aos beta-lactâmicos, como também às outras classes de antimicrobianos.

As cepas de MRSA geralmente têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos beta-lactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol e quinolonas, e sensibilidade à linezolida <sup>24</sup>.

A presença de genes codificadores da exotoxina leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) é outra importante característica observada nos isolados comunitários. A presença desta toxina aumenta a virulência em muitas cepas CA-MRSA, causando necrose tecidual e destruição de leucócitos pela formação de poros na membrana celular. A maioria dos isolados portadores deste gene está associada a infecções de pele e tecidos moles, principalmente furúnculos e abscessos, geralmente em indivíduos jovens saudáveis; e em infecções mais graves, como pneumonia necrotizante e sepse grave <sup>25</sup>. A incidência de infecções por CA-MRSA também está aumentando rapidamente no mundo inteiro.

## **5. Sensibilidade diminuída e resistência aos glicopeptídeos**

Devido à resistência aos beta-lactâmicos, os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, foram utilizados no tratamento de infecções por MRSA, por mais de 40 anos, sem graves problemas com resistência ou sensibilidade diminuída <sup>26, 27</sup>. Apesar do uso substancial de glicopeptídeos durante este período, isolados de *S. aureus* que apresentaram resistência à teicoplanina *in vivo* durante falha na terapia antimicrobiana, foram primeiramente reportados nos anos 1990 nos EUA e Europa, sem relatos posteriores, mostrando que não houve disseminação <sup>28, 29</sup>.

O primeiro relato de diminuição da sensibilidade a vancomicina foi descrita por Hiramatsu e colaboradores (1997). Estes autores descreveram o isolamento de

cepas de *S. aureus*, a partir de materiais clínicos com o fenótipo de sensibilidade intermediária à vancomicina (VISA - *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), denominada Mu50, e fenótipo de heterorresistência à vancomicina (hVISA - *heteroresistant Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), denominada de Mu3 <sup>30</sup>.

Posteriormente foi reportado, em 2002, nos EUA o primeiro isolado clínico de VRSA (*Vancomycin-resistance Staphylococcus aureus*) devido a transferência conjugativa do operon *vanA* de *Enterococcus faecalis*, com relatos subsequentes na Índia e Irã. A partir de então, a investigação de VISA em outros países ao redor do mundo ganhou força e como consequência outros relatos tem ocorrido, como nos EUA, Coreia do Sul, China e Reino Unido <sup>31</sup>. Com isso, a redução na sensibilidade tem prejudicado o uso da vancomicina como antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções graves por MRSA <sup>32</sup>.

A maioria dos VISA e hVISA é reportada a partir de isolados clínicos de MRSA, presumivelmente devido à pressão seletiva sofrida no ambiente hospitalar, diferentemente dos isolados de MRSA e MSSA (*Methicilin-susceptible Staphylococcus aureus*) oriundos da comunidade <sup>33</sup>. Embora se aceite que hVISA seja fenotipicamente sensível à vancomicina por métodos laboratoriais de rotina, mesmo que contenha subpopulações de células com sensibilidade intermediária, não existe uma definição precisa de hVISA. Estas subpopulações estão tipicamente presentes em uma frequência de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  células <sup>34</sup>.

De fato, hVISA e, em particular, VISA, parecem surgir por evolução *in vivo* durante falha na terapia com vancomicina em infecções por MRSA aparentemente sensíveis à mesma. Isto corrobora com a alta taxa de isolamento de hVISA e VISA de pacientes com infecção prévia por MRSA e que fizeram tratamento com vancomicina <sup>35, 36</sup>. Vários fatores levam a evolução de um VSSA (*Vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus*) à hVISA e VISA, sendo a exposição à vancomicina o mais evidente. Entretanto, estudos vem mostrando que outras classes de antimicrobianos também podem contribuir para esta evolução. O beta-lactâmico imipenem, por exemplo, levou a geração *in vitro* de um hVISA com perfil fenotípico muito similar a um hVISA induzido por vancomicina <sup>37</sup>.

Testes de clonalidade inicialmente utilizando PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e MLST mostraram que isolados de VISA não são clonais <sup>34, 38</sup>. Entretanto, recentemente foram descritos isolados de VISA e hVISA pertencentes aos complexos clonais (CC) 5 ou 8, em particular ST5 (CC5) e ST239 (CC8), refletindo o sucesso de adaptação ao ambiente hospitalar. Estes isolados

apresentam CIM (Concentração Inibitória Mínima) aumentada de vancomicina, quando comparados com outros clones de MRSA, assim como altas taxas de isolados de VISA e hVISA, relacionados a estes clones <sup>26</sup>. Em outro estudo em um hospital onde MRSA ST239 (CC8) permaneceu dominante por muitos anos, quando testado todos os isolados de MRSA por análise populacional, foi detectado alta taxa de hVISA (quase 50%), sugerindo que a subpopulação de hVISA faça parte da população de MRSA <sup>39</sup>.

## 6. Dificuldades laboratoriais de detecção de VISA e hVISA

A detecção de hVISA e VISA no laboratório clínico ainda permanece incerta. Vários métodos foram desenvolvidos, porém, mostram-se muitas vezes ineficientes ou laboriosos para aplicá-los na rotina do laboratório clínico. Dentre eles o *E-TEST*<sup>®</sup> com incubação de 48 horas, *E-TEST*<sup>®</sup> macrométodo com alto inóculo e incubação por 48 horas e o *E-TEST*<sup>®</sup> GRD são utilizados para triagem de hVISA. Entretanto, o padrão ouro utilizado para detecção de hVISA é o PAP (*Population Analysis Profile*), que utiliza a cepa Mu3 ATCC<sup>®</sup> 700698 como controle do método, mas dificilmente é aplicado na rotina <sup>27</sup>.

Determinantes moleculares de resistência em *S. aureus* são geralmente bem compreendidos. Entretanto, determinantes moleculares de resistência em hVISA e VISA ainda desafiam os pesquisadores. Avanços nessa área mostram que mutações sequenciais, predominantemente em genes que expressam reguladores celulares globais, alteram parcial ou totalmente funções responsáveis pela emergência da resistência. Recentes estudos indicam que genes regulatórios *walKR*, *vraRS* e *graRS*, bem como gene que codifica RNA polimerase subunidade B (*rpoB*) estão fortemente associados ao fenótipo VISA <sup>40, 41, 42</sup>.

Essas mutações implicam em mudanças na espessura e composição da parede celular de hVISA e VISA, bem como, muitas vezes, estas células crescem em agregados multicelulares. A parede celular contém, frequentemente, aumento de terminações livres de resíduos de D-ala-D-ala, bem como níveis reduzidos de peptideoglicano. O espessamento da parede dificulta a difusão da vancomicina para o septo de divisão celular, local de ação do antimicrobiano <sup>31, 43, 44</sup>.

Alterações na expressão da coagulase, e demais fatores morfofisiológicos, são observados em hVISA e VISA. Além do espessamento da parede, eles também apresentam crescimento lento, colônias pequenas, diminuição da formação de pigmento e redução da atividade da coagulase, sendo esta o maior determinante

fenotípico de *S. aureus*. Assim, esta bactéria pode ser erroneamente identificada como *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS) no laboratório clínico de rotina<sup>31, 45</sup>.

Assim como a detecção, as implicações clínicas de VISA e hVISA também permanecem obscuras. Embora um estudo recente de meta-análise não associe infecções por hVISA e VISA com aumento na taxa de mortalidade, outros estudos mostram que estas mesmas infecções prolongam o tempo de internação, assim como aumentam o tempo de tratamento e os gastos com o mesmo <sup>46, 47</sup>. Falha no tratamento com vancomicina (bacteremia persistente, por exemplo) ocorre mais frequentemente em pacientes com infecções por MRSA e até mesmo VSSA exibindo CIM de vancomicina elevada, possivelmente devido a existência de hVISA não detectados <sup>27</sup>.

## 7. Opções terapêuticas para tratamento de infecções por VISA e hVISA

Com o advento da sensibilidade reduzida à vancomicina e até mesmo da resistência a este fármaco, bem como relatos de falhas terapêuticas mesmo com isolados de VSSA, outros antimicrobianos são utilizados como alternativas para o tratamento de infecções por *S. aureus* refratários ao uso de vancomicina. Dentre eles, a daptomicina foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para tratamento de bacteremia e endocardite, embora existam relatos de isolados de *S. aureus* com diminuição da sensibilidade e resistência a este fármaco <sup>48, 49</sup>.

Outros antimicrobianos utilizados são a linezolida, sobretudo para tratamento de pneumonias, porém apresenta toxicidade e induz alterações hematológicas; e novas cefalosporinas como ceftobiprole e ceftarolina, ainda não aprovadas para uso no Brasil, que visam ampliar o espectro de ação das cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração. A nova diaminopirimidina denominada iclaprim está sendo desenvolvida para o tratamento de infecções complicadas de pele e partes moles causadas por MRSA e VRSA <sup>27, 48, 50</sup>.

## 8. Referências

1. CDC, C. F. D. C. A. P. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. CDC 2013.
2. MADIGAN E.A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2010.
3. GELATTI L.C., BONAMIGO R.R., BECKER A.P., D'AZEVEDO P.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, p.501-506, 2009.
4. SCHLIEVERT P.M., STRANDBERG K.L., LIN Y.C., PETERSEON M.L., LEUNG D.Y. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.125, p.39-49, 2010.

5. ROSENTHAL V.D., BIJIE H., MAKI D.G., MEHTA Y., APISARNTHANARAK A., MEDEIROS E.A., LEBLEBICIOUGLU H., FISHER D., ÁLVAREZ-MORENO C., KHADER I.A., DEL ROCIO GONZÁLEZ MARTINEZ M., CUELLAR L.E., NAVOA-NG J.A., ABOUQAL R., GUANCHE GARCELL H., MITRE Z., PIREZ GARCIA M.C., HAMDI A., DUEÑAS L., CANCEL E., GURSKIS V., RASSLAN O., AHMED A., KANJ S.S., UGALDE O.C., MAPP T., RAKA L., YUET MENG C., THU LE T.A., GHAZAL S., GIKAS A., NARVÁEZ L.P., MEJÍA N., HADJIEVA N., GAMAR ELANBYA M.O., GUZMÁN SIRITT M.E., JAYATILLEKE K., INICC members. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American Journal of Infectious Control**, v.40, p.396-407, 2012.
6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, C. D. C. National Healthcare Safety Network (NHSN). Atlanta, September 24, 2013 2014. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/nhsn/> >. Acesso em: 20/01/2014.
7. JONES R.N., GUZMAN-BLANCO M., GALES A.C., GALLEGOS B., CASTRO A.L., MARTINO M.D., VEJA S., ZURITA J., CEPPARULO M., CASTANHEIRA M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, p.672-681, 2013.
8. CARDOZO V.F., OLIVEIRA A.G., NISHIO E.K., PERUGINI M.R., ANDRADE C.G., SILVEIRA W.D., DURÁN N., ANDRADE G., KOBAYASHI R.K., NAKAZATO G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials**, v.12, p.12, 2013.
9. IWG-SCC. **Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53, p.4961-4967, 2009.
10. LIVERMORE D.M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16 Suppl 1, p.S3-10, 2000.
11. LOWY F.D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Where Is It Coming From and Where Is It Going? **JAMA Internal Medicine**, v. 173, p.1978-1979, 2013.
12. BOUCHER, H.; MILLER, L. G.; RAZONABLE, R. R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.51 Suppl 2, p.S183-197, 2010.
13. LI M., DIEP B.A., VILLARUZ A.E., BRAUGHTON K.R., JIANG X., DELEO F.R., CHAMBERS H.F., LU Y., OTTO M. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.106, p.5883-5888, 2009.
14. ITO, T., OKUMA K., MA X.X., YUZAWA H., HIRAMATSU K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v.6, p.41-52, 2003.
15. ITO T., MA X.X., TAKEUCHI F., OKUMA K., YUZAWA H., HIRAMATSU K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.2637-2651, 2004.
16. IWG-SCC. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. 2013. Disponível em: < <http://www.sccmec.org/> >. Acesso em: 20/01.
17. CHONGTRAKOOL P., ITO T., MA X.X., KONDO Y., TRAKULSOMBOON S., TIENSASITORN C., JAMKLANG M., CHAVALIT T., SONG J.H., HIRAMATSU K. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1001-1012, 2006.
18. DEURENBERG R.H., VINK C., KALENIC S., FRIEDRICH A.W., BRUGGEMAN C.A., STOBBERINGH E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p.222-235, 2007.
19. VAN DER FLIER M., VAN DIJK N.B., FLUIT A.C., FLEER A., WOLFS T.F., VAN GESTEL J.P. Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine-leukocidin. **Nederland Tijdschrift voor Geneeskunde**, v.147, p.1076-1079, 2003.
20. RIBEIRO A., DIAS C., SILVA-CARVALHO M.C., BERQUÓ L., FERREIRA F.A., SANTOS R.N., FERREIRA-CARVALHO B.T., FIGUEIREDO A.M. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.1985-1988, 2005.
21. GRAHAM P.L. 3<sup>RD</sup>, LIN S.X., LARSON E.L. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. **Annals of Internal Medicine**, v.144, p.318-325, 2006.
22. NAIMI T.S., LEDELL K.H., COMO-SABETTI K., BORCHARDT S.M., BOXRUD D.J., ETIENNE J., JOHNSON S.K., VANDENESCH F., FRIDKIN S., O'BOYLE C., DANILA R.N., LYNFIELD R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA Internal Medicine**, v.290, p.2976-2984, 2003.
23. KLEIN E.Y., SUN L., SMITH D.L., LAXMINARAYAN R. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study. **American Journal of Epidemiology**, v.177, p.666-674, 2013.
24. GALES A.C., SADER H.S., RIBEIRO J., ZOCCOLI C., BARTH A., PIGNATARI A.C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.90-98, 2009.

25. GELATTI L.C., BONAMIGO R.R., INOUE F.M., CARMO M.S., BECKER A.P., CASTRUCCI F.M., PIGNATARI A.C., D'AZEVEDO P.A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, p.34-38, 2013.
26. HOWDEN B.P., PELEG A.Y., STINEAR T.P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.575-582, 2014.
27. VAN HAL S.J., FOWLER V.G., JR. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? **Clinical Infectious Diseases**, v.56, p.1779-1788, 2013.
28. KAATZ G.W., SEO S.M., DORMAN N.J., LERNER S.A. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.162, p.103-108, 1990.
29. MANQUAT G., CROIZE J., STAHL J.P., MEYRAN M., HIRTZ P., MICOUD M. Failure of teicoplanin treatment associated with an increase in MIC during therapy of *Staphylococcus aureus* septicaemia. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.29, p.731-732, 1992.
30. HIRAMATSU K., HANAKI H. INO T., YABUTA K., OGURI T., TENOVER F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p.135-136, 1997.
31. HOWDEN B.P., DAVIES J.K., JOHNSON P.D., STINEAR T.P., GRAYSON M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, v.23, p.99-139, 2010.
32. VAN HAL S.J., LODISE T.P., PATERSON D.L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, p.755-771, 2012.
33. PILLAI S.K., WENNERSTEN C., VENKATARAMAN L., ELIOPOULOS G.M., MOELLERING R.C., KARCHMER A.W. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p.1169-1174, 2009.
34. HOLMES N.E., JOHNSON P.D., HOWDEN B.P. Relationship between vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.2548-2552, 2012.
35. TENOVER F.C., SINNER S.W., SEGAL R.E., HUANG V., ALEXANDRE S.S., MCGOWAN J.E. Jr, WEINSTEIN M.P. Characterisation of a *Staphylococcus aureus* strain with progressive loss of susceptibility to vancomycin and daptomycin during therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.564-568, 2009.
36. GAO W., CHUA K., DAVIES J.K., NEWTON H.J., SEEMANN T., HARRISON P.F., HOLMES N.E., RHEE H.W., HONG J.I., HARTLAND E.L., STINEAR T.P., HOWDEN B.P. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLoS Pathogens**, v.6, p.e1000944, 2010.
37. KATAYAMA Y., MURAKAMI-KURODA H., CUI L., HIRAMATSU K. Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53, p.3190-3196, 2009.
38. FRIDKIN S.K., HAGEMAN J., MCDUGAL L.K., MOHAMMED J., JARVIS W.R., PERL T.M., TENOVER F.C. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. **Clinical and Infectious Diseases**, v.36, p.429-439, 2003.
39. HORNE K.C., HOWDEN B.P., GRABSCH E.A., GRAHAM M., WARD P.B., XIE S., MAYALL B.C., JOHNSON P.D., GRAYSON M.L. Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53, p.3447-3452, 2009.
40. HAFER C., LIN Y., KORNBLUM J., LOWY F.D., UHLEMANN A.C. Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.56, p.5845-5851, 2012.
41. SHOJI M., CUI L., IZUKA R., KOMOTO A., NEOH H.M., WATANABE Y., HISHINUMA T., HIRAMATSU K. *walK* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, p.3870-3881, 2011.
42. VIDAILLAC C., GARDETE S., TEWHEY R., SAKOULAS G., KAATZ G.W., ROSE W.E., TOMASZ A., RYBAK M.J. Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.208, p.67-74, 2013.
43. PFELTZ R.F., SINGH V.K., SCHMIDT J.L., BATTEN M.A., BARANYK C.S., NADAKAVUKAREN M.J., JAYASWAL R.K., WILKINSON B.J. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, p.294-303, 2000.
44. SIERADZKI K., TOMASZ A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.7103-7110, 2003.

45. TIWARI H.K., SAPKOTA D., SEN M.R. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. **Nepal Medical College Journal**, v.10, p.129-131, 2008.
46. BAE I.G., FEDERSPIEL J.J., MIRÓ J.M., WOODS C.W., PARK L., RYBAK M.J., RUDE T.H., BRADLEY S., BUKOVSKI S., DE LA MARIA C.G., KANJ S.S., KORMAN T.M., MARCO F., MURDOCH D.R., PLESIAI P., RODRIGUEZ-CREIXEMS M., REINBOTT P., STEED L., TATTEVIN P., TRIPODI M.F., NEWTON K.L., COREY G.R., FOWLER V.G. Jr, International Collaboration on Endocarditis-Microbiology Investigator. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. **The Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.1355-1366, 2009.
47. VAN HAL S.J., PATERSON D.L. New Gram-positive antibiotics: better than vancomycin? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.24, p.515-520, 2011.
48. LIU C., BAYER A., COSGROVE S.E., DAUM R.S., FRIDKIN S.K., GORWITZ R.J., KAPLAN S.L., KARCHMER A.W., LEVINE D.P., MURRAY B.E., RYBAK M.J., TALAN D.A., CHAMBERS H.F., Infectious Diseases Society of America.. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, p.e18-55, 2011.
49. PELEG A.Y., MIYAKIS S., WARD D.V., EARL A.M., RUBIO A., CAMERON D.R., PILLAI S., MOELLERING R.C.Jr, ELIOPOULOS G.M. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v.7, p.e28316, 2012.
50. QUEIROZ G.M.E.A. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.10, p.132-138, 2012.

## Capítulo 8

### Relação Mútua entre *Candida albicans* e Imunidade

---

Ionice Felipe<sup>1,3</sup>

Luis Carlos Jabur Gaziri<sup>2</sup>

Ivete Conchon Costa<sup>1</sup>

Tacito Graminha Campos<sup>3</sup>

Wagner Loyola<sup>4</sup>

Universidade Estadual de Londrina – UEL.

<sup>1</sup>Depto. de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas - UEL

<sup>2</sup>Depto. de Ciências Fisiológicas (*in memoriam*) Centro de Ciências Biológicas - UEL

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas - UEL

<sup>4</sup> Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC.

---

#### 1.Introdução

##### 1.1. Aspectos biológicos e patogênicos de *Candida albicans*

A incidência das doenças fúngicas aumentou nas últimas três décadas, principalmente devido a população de indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV: *Human Immunodeficiency Virus*), transplantados e portadores de câncer<sup>15,18,44,47</sup>. Outras condições tais como: o uso de antibióticos de amplo espectro por tempos prolongados e internação hospitalar por doenças severas ou procedimentos cirúrgicos, nutrição parenteral, uso de cateteres arteriais ou endovenosos, ventilação artificial podem predispor o paciente à candidíases que podem variar desde infecções superficiais de pele e mucosas até formas sistêmicas, podendo atingir órgãos profundos<sup>6,12,31,38,42,45</sup>.

A convivência de *C. albicans* com o homem é antiga e Hipócrates, Galeno e Samuel Pepys descreveram sintomas semelhantes aos das infecções por este fungo. Porém não existia em nenhuma língua um termo técnico que definisse a candidíase e havia incerteza se os sintomas da candidíase não seriam inatos. A questão foi resolvida em 1840, quando lesões orais foram atribuídas a infecções pelo fungo. Depois de vários anos, a confusão taxonômica foi resolvida pelo projeto de classificação codificado em 1923, nomeando *Candida albicans*. O nome deriva de Toga *Candida*, do latim, a designação do manto branco que identificava os

candidatos ao senado romano, e albicans devido à cor branca das lesões provocadas pelo fungo <sup>42</sup>.

Fungos do gênero *Candida* são microrganismos integrantes da microbiota bucal do homem desde o seu nascimento. Diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, da relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, as leveduras de *Candida* comportam-se como comensais sem causar dano, porém, mantêm a sua capacidade de aderência e de produção de toxinas e enzimas, e, se houver distúrbios na microbiota ou nas funções imunes do hospedeiro haverá transição de comensal para patógeno <sup>6,12,28,29,45,47</sup>.

A limitação de nutrientes no tecido hospedeiro é um fator importante para a atividade do patógeno. O microrganismo deve estar apto a realizar suas reações de catabolismo e anabolismo, para poder sobreviver como um saprófita ou como um patógeno, nos tecidos do hospedeiro. Quanto maior for o seu repertório genético, que regula estas duas vias, mais competente será o patógeno <sup>6</sup>. *C. albicans* manifesta fatores de virulência tais como moléculas de aderência do fungo a moléculas da matriz extracelular do tecido hospedeiro, a produção de fosfolipases, aspartil proteases e elastases, que podem lesar e impedir as defesas do hospedeiro<sup>47</sup>. A aderência às células do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo essencial no estabelecimento de infecções. *C. albicans* pode usar a ferritina como fonte de ferro para seu crescimento por intermédio de adesina Als3. Como a ferritina está dentro das células epiteliais orais, o patógeno usa Als3 presente na forma de hifa para invadir as células epiteliais causando danos as mesmas <sup>2</sup>.

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura complexa, formada por várias camadas e compõe-se de 47-60% de beta glucanas ( $\beta$ 1-3;  $\beta$ 1-6) e 10% de quitina, imersas em matriz amorfa de polímeros de manose, as mananas, associadas covalentemente a proteínas em ligações N e O glicosídicas. Além disso, a parede celular contém proteínas (6 a 25%) e uma porcentagem de lipídios (1 a 7%)<sup>8,29,50</sup>. Com relação às hifas, estas induzem danos celulares devido a alterações de parede celular que ativam inflamassoma e induzem o recrutamento de neutrófilos que operam para conter sua posterior ramificação no sítio de infecção. Proteínas de parede fúngica podem representar atributos de virulência (adesinas, invasinas, hidrolases), contudo, podem ser reconhecidas pelo hospedeiro <sup>28,29,43</sup>. As moléculas de carboidratos agem como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPS) que induzem imunidade protetora ou potencialmente patogênica superestimulando

uma resposta inflamatória <sup>29,47</sup>. Em todos esses processos dinâmicos a parede celular desempenha um papel central para definir o equilíbrio entre comensalismo e doença <sup>28,29,39</sup>.

A produção de aspartil proteinases (SAPs: *secreted aspartyl proteinases*) constitui um importante fator de virulência. Estas enzimas são codificadas por um grupo de dez genes, sendo que cada enzima SAP é codificada por um par de genes desta família gênica. As diferentes SAPs são expressas em diferentes condições de crescimento em laboratório e durante infecções experimentais *in vivo* e *in vitro*<sup>31,32,40</sup>. A contribuição das SAPs para a patogênese por *C. albicans* tem sido mostrada claramente pela utilização de mutantes deficientes nestas enzimas e pela utilização de inibidores de proteinases <sup>31,53</sup>. O fungo utiliza estas enzimas para obtenção de nutrientes, degradando estruturas do hospedeiro (imunoglobulinas, colágeno, albumina, queratina e proteínas de matriz extracelular), além de utilizá-las na evasão da resposta imune <sup>4,16,20,28</sup>.

A deleção de genes que codificam SAP1, SAP2 ou SAP3 em isolados de *C. albicans* resultou em menor dano ao organismo do hospedeiro, menor aderência às células epiteliais bucais e menor virulência no modelo de vaginite em ratos, sendo que cepas com o gene para SAP2 deletado foram avirulentas dentro do mesmo modelo. A degradação do tecido do hospedeiro pelas SAPs 1 e 3 está relacionada à capacidade de se aderirem à superfície das células do hospedeiro e à colonização. Nas infecções de mucosas, a SAP3 foi considerada a mais importante, sendo que em infecções profundas este papel é desempenhado pelas SAPs 4 e 6 <sup>4,41</sup>.

## **1.2. Aspectos clínicos**

A maior frequência das infecções por *C. albicans* ocorre no tegumento, tais como: da pele, das unhas e das mucosas oral, vaginal e do trato gastrintestinal <sup>44</sup>. Aproximadamente 85% dos pacientes portadores de HIV terão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea <sup>10</sup>. Cerca de 75 % das mulheres saudáveis terão algum caso de candidíase vaginal durante a vida, e 5% terão infecções recorrentes<sup>52</sup>. Porém, nos indivíduos com resposta imune deprimida por câncer, por transplantes ou com procedimentos cirúrgicos, este fungo poderá causar candidíase sistêmica contribuindo para a gravidade do caso clínico <sup>10</sup>.

Pacientes com candidíase mucocutânea, que tiveram seus leucócitos expostos a antígenos de *Candida in vitro*, manifestaram um padrão alterado na produção de citocinas. Assim, houve baixa produção de IFN- $\gamma$  e alta produção de IL-10 na maioria desses pacientes, o que poderia explicar a sua incapacidade em

montar uma resposta Th1, e falha na eliminação de *C. albicans*, com persistente infecção em unhas, pele e mucosas <sup>36</sup>. Um estudo realizado no Peru mostrou que dos 106 pacientes com AIDS cuja população de células TCD4 foi menor que 200 células/ $\mu$ l houve prevalência de candidíase oral (42,5%) e onicomicose (50,9%) entre as lesões mucocutâneas <sup>56</sup>

A Diabetes *mellitus* é uma das doenças autoimunes mais prevalentes no mundo, cuja incidência tem sido globalmente crescente nas últimas décadas de acordo com Van Belle, 2011, <sup>58</sup> e alguns trabalhos mostram que esses indivíduos são mais susceptíveis a infecções constantes, especialmente por *C. albicans* devido a alterações na produção de IL-17 <sup>33</sup>.

Nas crianças e adolescentes com síndrome de Down, além das alterações anatomo-fisiológicas bucais, macroglossia, estagnação salivar decorrente da incompetência muscular da boca e dificuldades motoras, as constantes doenças respiratórias e o comprometimento simultâneo das respostas imunológica inata e adquirida, fazem com que estes fatores adicionais as tornem mais suscetíveis a processos infecciosos, inclusive fúngicos, onde as espécies de *Candida* são os agentes etiológicos mais preponderantes <sup>46</sup>.

Outro aspecto relevante é que em alguns pacientes as complicações infecciosas, observadas em vísceras, aparecem semanas ou meses após o episódio de candidemia como o que acontece na meningite causada por *Candida* spp. <sup>9,11</sup> Quando presente, a disseminação aguda da candidemia para órgãos (fígado, rim e pulmões) pode também acometer pele e globo ocular. O padrão clínico mais freqüente de apresentação da candidemia em adultos é a ocorrência de febre em pacientes com antibioticoterapia. A febre pode ter início insidioso, ou apresentar-se de forma súbita, acompanhada de calafrios, mialgia, taquicardia e hipotensão <sup>19</sup>.

Endoftalmites podem ocorrer em cerca de 10 a 30% dos casos, sendo esta variação dependente das condições dos hospedeiros <sup>19</sup>. *C. albicans* pode infectar as estruturas oculares por disseminação hematogênica ou por inoculação direta, durante cirurgia ocular. Os sintomas incluem perturbações visuais, escotomas e dor bulbar. As anormalidades são caracterizadas por lesões na retina e no humor vítreo, manchas de Roth e uveíte. Todas as estruturas oculares podem ser afetadas, porém quando ocorre endoftalmite a terapia é difícil e a incidência de sequelas é alta <sup>18</sup>.

A antibioticoterapia prolongada e a quimioterapia podem causar modificações na microbiota das mucosas, além de diminuir o número de leucócitos circulantes levando à proliferação de *C. albicans* <sup>15,31</sup>. Os corticoterápicos promovem

modificações na rede de citocinas podendo afetar polimorfonucleares (PMN), macrófagos e principais atividades das células T, prejudicando assim a atividade antifúngica <sup>15</sup>.

O cateterismo pode promover lesões no tegumento e também fornecer um substrato para o desenvolvimento do fungo. Uma vez dentro do vaso sanguíneo, o patógeno pode ser rapidamente coberto por fibronectina, plaquetas e outros constituintes do sangue, que suportam a colonização e proliferação de microrganismos. Ocorre ainda formação de biofilmes sobre superfícies plásticas como próteses dentárias, cateteres e sondas urinárias, tornando-os mais resistentes e impedindo a ação dos antifúngicos <sup>11,44,54,57</sup>.

## **2. Resposta imune a *Candida albicans***

### **2.1 Imunidade inata**

Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem influenciar tanto na manifestação quanto na severidade das infecções fúngicas, e deste modo a forma clínica da doença dependerá da resposta imune do paciente. Os mecanismos e a capacidade de defesa dos organismos multicelulares contra o fungo evoluíram de sistema mais simples (imunidade inata), até mecanismos mais sofisticados (imunidade adaptativa) de defesa dos hospedeiros vertebrados <sup>47</sup>.

As defesas antifúngicas inatas dos mamíferos são mediadas por células, receptores celulares e vários fatores humorais. Fagócitos profissionais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas possuem papel fundamental nesta defesa, porém células NK, linfócitos T e células não hematopoiéticas, tais como células endoteliais e epiteliais, também participam no combate ao fungo <sup>47</sup>. Esta resposta possui dois papéis principais: ação antifúngica efetora levando à destruição do patógeno, por uma resposta imediata às partículas fúngicas ingeridas, ou pela secreção de mediadores pró-inflamatórios, influenciando a resposta imune adaptativa <sup>7,47</sup>. A atividade das células do sistema imune inato pode ser ampliada por quimiocinas e citocinas ou anticorpos <sup>1,47</sup>.

A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro ocorre após a infecção e depende de moléculas expressas constitutivamente pelo patógeno (PAMPS), que são reconhecidas por receptores que incluem os receptores de manose, receptores semelhantes a “Toll” e receptores Dectina-1<sup>5,25,34,35,48,55</sup>. Após as interações com as moléculas padrões do patógeno, as células do sistema imune do hospedeiro iniciam

um amplo espectro de mecanismos de defesa, tais como a produção de peptídeos antimicrobianos e a ativação de uma rede de citocinas e quimiocinas, o que resulta no desenvolvimento de resposta inflamatória e resistência à infecção<sup>1,7,28,29,30,48</sup>. Carvalho *et al.*<sup>7</sup> mostraram que a fagocitose de levedura através do receptor de manose e dectina-1 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  com resposta celular protetora Th1 e Th17. Receptores tipo “Toll” (TLRs) estão envolvidos no reconhecimento de *C. albicans* sendo que os receptores TLR2 e TLR4 reconhecem resíduos de manana e são os principais TLRs envolvidos no reconhecimento deste fungo<sup>28,41, 48</sup>.

Estudo recente mostrou que quatro mulheres de uma família foram afetadas por candidíase vaginal e onicomicoses recorrente devido mutação no receptor dectina-1. Além de pouco expresso, os receptores dectina-1 não faziam ligação com beta-glucana e também não induziam a produção de interleucina 17 (IL-17, Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina - 6<sup>22,23</sup>. Loyola *et al.*<sup>37</sup> mostraram que ArtinM extraído da semente de *Artocarpus integrifolia* aumentou a expressão de receptores de manose e dectina-1 e a produção de TNF- $\alpha$  os quais foram efetivos contra *C. albicans*.

## 2.2. Células fagocíticas

A localização estratégica das células dendríticas nos tecidos, superfície de mucosas e pele sugerem que estas células são as primeiras a iniciar uma resposta imune contra *C. albicans*. Estas células possuem uma atividade de apresentação de antígenos maior que as dos macrófagos<sup>49</sup>. Quando imaturas, capturam moléculas estranhas e migram ao órgão linfóide secundário mais próximo onde fazem a apresentação do antígeno ao linfócito específico, influenciando na diferenciação de células precursoras em linfócitos Th1 e Th17<sup>47,48,49</sup>.

Neutrófilos desempenham um importante papel na prevenção de doenças fúngicas em hospedeiros vertebrados<sup>45</sup>. Reduções no número ou nas funções deste fagócito facilitam a disseminação de *C. albicans*<sup>24</sup>. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima produzida por neutrófilos, catalisa reações do peróxido de hidrogênio com o íon cloro para produzir o ácido hipocloroso, que é utilizado pelos fagócitos para matar microrganismos<sup>45,51</sup>. Animais nocaute em MPO (MPO-KO) apresentaram uma redução significativa na sua atividade candidacida, mostrando que o sistema oxidativo dependente da MPO é um importante mecanismo de defesa. Custodio *et al.*<sup>14</sup> demonstraram que neutrófilos migraram para a cavidade peritoneal após 6 horas de administração de ArtinM, e foram eficientes para reduzir o inóculo de *C.*

*albicans* administrado intraperitonealmente ou quando retiradas estas células e co-incubados com *C. albicans in vitro*. Entretanto, a importância da MPO comparada a outros mecanismos oxidativos como a NADPH não está totalmente esclarecida, uma vez que indivíduos deficientes em MPO são saudáveis, enquanto que indivíduos com doença granulomatosa crônica apresentam sinais clínicos precoces de candidíase<sup>3</sup>. Neutrófilos possuem ainda mecanismos microbicidas não dependentes de oxigênio. Estes mecanismos envolvem as enzimas lisossomais, que são muito importantes nos tecidos onde a concentração de oxigênio é baixa e a cadeia respiratória não pode funcionar efetivamente. Dentre as hidrolases lisossomais podemos citar as peroxidases como a lactoperoxidase<sup>45,51</sup>.

As respostas antifúngicas pelas células efetoras incluem a morte e inibição de crescimento do fungo, ações que se contrapõem aos fatores de virulência de *C. albicans*, tais como o dimorfismo. Em geral, as células fagocíticas possuem atividade antifúngica intrínseca que pode ser potencializada por opsoninas (anticorpos, C3b, iC3b) ou citocinas derivadas de células T, o que indica que as respostas imune inata e adaptativa não funcionam de forma independente, mas são reciprocamente reguladas<sup>47</sup>.

A ativação dos macrófagos residentes confere ao hospedeiro maior resistência a infecções. O macrófago ativado difere do residente em vários aspectos, como mudanças morfológicas, expressão de receptores na superfície celular, aumento de reagentes oxidativos ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ) e nitrogenados ( $NO^-$ ), aumento da atividade microbicida e aumento na produção de citocinas<sup>60</sup>. *In vivo*, a ativação de macrófagos ocorre principalmente pela interação com linfócitos T e é mediada por citocinas tais como interleucinas  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que podem estimular outras células ou os próprios macrófagos em uma atividade autócrina<sup>13,14,26,37</sup>.

A concanavalina-A (Con-A) e ArtinM atuam sobre linfócitos aumentando sua secreção de IFN- $\gamma$ <sup>7,14,37</sup>, e o pré-tratamento com Con-A e ArtinM aumentaram significativamente o número de fagócitos na cavidade peritoneal de camundongos, a expressão de receptores de manose e a atividade fagocítica e candidacida<sup>7,13,21,26,27,37</sup>. Conchon-Costa *et al.*<sup>13</sup> mostraram que camundongos pré-tratados com Con-A tiveram um aumento na produção de TNF- $\alpha$ . Os macrófagos ativados além de fagocitarem mais do que os de camundongos controle foram efetivos em conter a transição de levedura para hifa. Esta ativação resultou na taxa de sobrevivência de 100% dos animais pré-tratados em relação aos controles,

quando expostos a um inóculo letal, e diminuiu a concentração de *C. albicans* nos órgãos (baço, fígado e rins) no decorrer da infecção<sup>13,14</sup>.

### **2.3.Imunidade adaptativa**

Dados experimentais e evidências clínicas indicam que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa regula a resistência do hospedeiro em infecções com *C. albicans*. Os linfócitos T auxiliares (Th1) produzem citocinas pró-inflamatórias como interleucina-2 (IL-2) e IFN- $\gamma$ , e os linfócitos com fenótipo 2 (Th2) produzem citocinas anti-inflamatórias como interleucinas-4, 5, 10 e 13<sup>7,47</sup>. Recentemente foi evidenciado o fenótipo Th17 que produz IL-17 e IL-22 e confere proteção e inflamação nas infecções fúngicas<sup>30,47</sup>. Nas infecções por *C. albicans* os componentes do inflamassoma tais como caspase-1 e asc 1 são necessários para ativar caspase-1 que cliva Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em citocina bioativa que direciona resposta Th17 de acordo com van de Veerdonk e colaboradores<sup>59</sup>.

O tratamento com Con-A ou Artin-M promove ativação da resposta imune por receptores de manose e dectina-1 que induzem uma resposta Th17 com produção de IL-17, uma citocina eficaz para aumentar o influxo de neutrófilos para o sítio de infecção como mostrado por Carvalho *et al.*<sup>7</sup> e Custodio *et al.*<sup>14</sup>. Interessantemente, a IL-10 produzida por células dendríticas pode imunoregular células T reguladoras (Treg) que também produzem IL-10 e causam regulação negativa de reatividade Th1 antifúngica e imunidade protetora de memória<sup>48</sup>. Trabalhos de Zelante *et al.*<sup>61</sup> mostram que indolamina 2,3 dioxigenase 1 (IDO1) faz o balanço entre células Th17 e Treg contribuindo para homeostase imune e reduzindo a virulência de *Candida*. A capacidade para tolerar *C. albicans*, um comensal humano do trato gastrointestinal e vagina, implica que os mecanismos de defesa de resistência e tolerância cooperem para limitar a carga fúngica e inflamação. IDO1 regula a tolerância ao fungo a nível vaginal e melhora a imunopatologia que positivamente correlaciona com a magnitude da resposta imune gerando células Treg IL-10+ que negativamente suprimem as células Th1 e Th17 limitando assim os danos teciduais. Em adição, a interleucina-22 (IL-22) foi positivamente regulada em condições de deficiência de IDO1. A IL-22 contribui para integridade do epitélio da mucosa<sup>17</sup>.

### **3. Referências**

1. AKIRA S., UEMATSU S., TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, p.783-801, 2006.
2. ALMEIDA R.S., BRUNKE S., ALBRECHT A., THEWES S., LAUE M., EDWARDS Jr. J.E., FILLER S.G., HUBE B. The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. **PLoS Pathogens**, v.4, p.2-17, 2008
3. ARATANI Y. Role of Myeloperoxidase in Host defense against Fungal Infection. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.47, p.195-199, 2006.
4. BORG-VON ZEPELIN M., BEGGAH S., BOGGIAN F., SANGLARD D., MONOD M. The expression of the secreted aspartyl proteinases SAP 4 to SAP6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Molecular Microbiology**, v.28, p.543-554, 1998.
5. BROWN G.D. Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.33-43, 2006.
6. CALDERONE R.A., FONZI W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9, p.327-335, 2001.
7. CARVALHO P.G.C., CUSTODIO L.A., CONCHON-COSTA I., ANDRADE C.G.T.J., QUIRINO G.F.S., ALMEIDA R.S.C., FELIPE I. Concanavalin-A induces IL-17 production during the course of *Candida albicans* infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology** v.74, p.276-279, 2012.
8. CHAFFIN W.L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, p.495-544, 2008.
9. COLOMBO A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: A Brazilian perspective. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.4, p.113-118, 2000
10. COLOMBO A.L., GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.599-607, 2003.
11. COLOMBO A.L., NUCCI M., PARK B.J., NOUËR S.A., ARTHINGTON-SKAGGS B., da MATA D.A., WARNOCK D., MORGAN J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.8 p.2816-2823, 2006
12. COLOMBO A.L., GUIMARÃES T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p. 332-337, 2007.
13. CONCHON-COSTA I., LOYOLA W., GAZIRI L.C.J., CUSTÓDIO L.A., FELIPE I. Low dose of Concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.49, p.330-336, 2007
14. CUSTODIO L.A., LOYOLA W., CONCHON-COSTA I., QUIRINO G.F.S., FELIPE I. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v.11 p.510-515, 2011.
15. DAVIES A.N., BRAILSFORD S.R., BEIGHTON D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, v.42, p.698-702. 2006.
16. De ANDRADE G.M., FELIPE I. Evidence for the participation of proteinase released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.25, p.167-174, 1992.
17. DE LUCA A., CARVALHO A., CUNHA C., IANNITTI R.G., PITZURRA L., GIOVANNINI G., MENCACCI A., BARTOLOMMEI L., MORETTI S., MASSI-BENEDETTI C., FUCHS D., DE BERNARDIS F., PUCETTI P., ROMANI L. IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. **PLOS Pathogens**, v.9, p.1-14, 2013.
18. DIGNANI M.C. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. **Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.28, p.1-16, 2002.
19. DIGNANI M.C., SOLOMKIN J.S., ANISSE E. **Candida**. In: ANAISSE E., MCGINNIS M.R., PFALLER M.A. (eds). *Medical Mycology*, 1ª ed., Churchill Livingstone, Filadélfia, p.195-239, 2003.
20. Dos SANTOS A.A., de SÁ E.A.C., GAZIRI L.C.J., FELIPE I. Treatment of serum with supernatants from cultures of *Candida albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.79-83, 2002.
21. FELIPE I., BIM S., SOMENSI C.C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pre-treated with concanavalin-A or jacalin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.477-483, 1995.
22. FERWERDA B., FERWERDA G., PLANTINGA T.S., WILLMENT J.A., VAN SPRIEL A.B., VENSELAAR H., ELBERS C.C., JOHNSON M.D., CAMBI A., HUYSAMEN C., JACOBS L., JANSEN T., VERHEIJEN K., MASTHOFF L., MORRÉ S.A., VRIEND G., WILLIAMS D.L., PERFECT J.R., JOOSTEN L.A., WIJMENGA C., VAN DER MEER J.W., ADEMA G.J., KULLBERG B.J., BROWN G.D., NETEA M.G. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **The New England Journal of Medicine**, v.361, p.1760-1767, 2009.
23. FERWERDA G., NETEA M.G., JOOSTEN L.A., VAN DER MEER J.W., ROMANI L., KULLBERG B.J. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. **Vaccine**, v.28, n.3, 2010

24. FRADIN C., DE GROOT P., MacCALLUN D., SCHALLER M., KILS F., ODDS F.C., HUBE B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Molecular Microbiology**, v.56, p.397-415, 2005
25. GANTNER B.N., SIMMONS R.M., UNDERHILL D.M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **The EMBO Journal**, v.24, p.1277-1286, 2005.
26. GERALDINO H.T., de VITO E, CUSTODIO L.A., CONCHON-COSTA I., GAZIRI L.C., LOYOLA W., FELIPE I. Increased tumour necrosis factor- $\alpha$  production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A activated macrophages. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.59, p.11-17, 2010.
27. GAZIRI G., GAZIRI L.C.J., KIKUCHI R., SCANAVACCA J., FELIPE I. Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. **Medical Mycology**, v.37, p.195-200, 1999.
28. GOW N.A., van der VEERDONK F., BROWN A.G.P., NETEA M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Review Microbiology**, v.10, p.112-122, 2012.
29. GOW N.A., HUBE B. Importance of *Candida albicans* of cell wall during commensalisms and infection. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.406-412, 2012
30. HERNANDEZ -SANTOS N., GAFFEN S.L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. **Cell Host Microbes**, v.11, p.425-435, 2012.
31. HUBE B. From commensal to pathogen: stage-and tissue- specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.336-341, 2004
32. HUBE B., NAGLIK J.R. Possible role of secreted proteinase in *Candida albicans* infections. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.15, p.65-68 2001
33. HUPPLER A.R. BISHU S., GAFFEN S.L. Mucocutaneous candidiasis: the IL-17 pathway and implications for targeted immunotherapy. **Arthritis Research Therapy**, v.14, p.217-222, 2012
34. JOUAULT T., SARAZIN A., MARTINEZ-ESPARZA M. FRADIN C., SENDID B., POULIN D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v.11, p.1077-1015, 2009.
35. KERRIGAN A.M., GORDON B.D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v.214, p.562-575, 2009
36. LILIC D., GRAVENOR, I., ROBSON, N., LAMMAS, D.A., DRSDALE, J.E.C., CANT, A.J., ABINUM, M. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Infection and Immunity**, v.71, p.5690-5699, 2003
37. LOYOLA W., CUSTODIO L.A., FELIPE I, CONCHON-COSTA,I., CARVALHO P.G.C., QUIRINO G.F.S., SILVA L.F.R.S., GAZIRI L.C.J. Artin M enhances TNF- $\alpha$  production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. **International Immunopharmacology**. v.12, p.378-383, 2012.
38. MALUCHE M.E., SANTOS J.I. *Candida* spp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, p.65-67, 2008.
39. MAYER F.WILSON D., HUBE B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v.4, p.119-128, 2013.
40. NAGLIK J.R, CHALLACOMBE S.J., HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.400-428. 2003.
41. NETEA M.G., GOW N.A.R., MUNRO C.A., BATES S., COLLINS C., FERWERDA G., HOBSON R.P., BERTRAM G., HUGHES H.B., JANSEN T., JACOBS L., BUURMAN E.T., GIJZEN K., WILLIAMS D.L., TORENSMA R., McKINNON A., MacCALLUM D.M., ODDS F.C., van DER MEER J.W.M., BROWN A.J.P., KULBERG B.J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and toll-like receptors. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.1642-1650, 2006.
42. ODDS F.C. ***Candida* and candidosis**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Bailliere Tindall. 1988.
43. OKSUZ S., SAHIN I., YILDIRIN M., GULCAN A., YAVUZ T., KAYA D., KOC A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.60, p.280-283, 2007
44. PFALLER M.A., DIEKEMA D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.133-163, 2007.
45. PHAM C.T.N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature**, v.6, p.541-550, 2006.
46. RIBEIRO E.L., CAMPOS C.C.C., CRESPO A.M.C.C., CASTRO J.S., ROCHA F.P., ALVES M., GOULART M.S., CARDOSO C., FERREIRA W., NAVES P.L., SOARES A.J., RIBEIRO S.M., PIMENTA F.C. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Acta Médica Portuguesa**, v.3, p.171-174, 2002.
47. ROMANI L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.275-288, 2011.
48. ROMANI L., BISTONI F., PUCCETTI P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v.10, p.508-514, 2002.
49. ROMANI L., MONTAGNOLI C., BOZZA S., PERRUCCIO K., SPRECA A., ALLAVENA P., VERBEEK S., CALDERONE R.A., BISTONI F., PUCCETTI P. The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells

- determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. **International Immunology**, v.16, p.149-161, 2004
50. RUIZ-HERRERA J., ELORZA M.V., VALENTIN E., SENTANDREU R. Molecular organization of cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.14-29, 2006.
  51. SILVA M.T., Macrophage phagocytosis of neutrophils atinflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. **Journal of Leukocytes Biology**, v.89, .675-683, 2011.
  52. SOBEL J.D. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.14, p.8148-8153, 1992.
  53. STAIB P., LERMANN U., BLA-WARMUTH J., DEGEL B., WURZNER R., MONOD M., SCHIRMEISTER T., MORSCHHAESER J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.146-156, 2008.
  54. TAMURA N.K., NEGRI M.F.N., BONASSOLI L.A., SVIDZINSKI T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, p.91-93, 2007.
  55. TAYLOR P.R., BROWN, G.D., REID D.M., WILLMENT J.A., MARTINEZ-POMARES L., GORDON S., WONG S.Y. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **The Journal of Immunology**, v.169, p.3876-3882, 2002.
  56. TELLO A.V.G., LÓPEZ, J.V., BEJARANO, S.C. Lesiones mucocutáneas como predictoras de recuento de linfócitos CD4<200 células/ $\mu$ l em pacientes infectados por el VIH. **Piel**, v.24, p.300-303, 2009.
  57. UPPULURI P., SRINIVASAN A., RAMASUBRAMANIAN A., LOPES-RIBOT J. Effects of fluconazole, amphoterecin B and caspofungin on *Candida albicans* biofilms and conditions of flow and on biofilm dispersion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.3591-3593, 2011.
  58. VAN BELLE T.L., COPIETTERS K.T., VON HERATH M.G. Type 1 diabetes: etiology , immunology, and therapeutics strategies. **Physiological Review**, v.91, p.79-118, 2011.
  59. VAN DE VEERDONK F.L., JOOSTEN L.A, SHAW P.J., SMEEKENS S.P., MALIREDDI R.K., VAN DER MEER J.W., KULLBERG B.J., NETEA M.G. KANNEGANTI T.D. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 immune responses in disseminated candidiasis. **European Journal of Immunology**, v.41, p.2260-2268, 2011.
  60. WELLS C.A., SLAVAGE-JONES J.A., LI X., HITCHENS K., BUTCHER S., MURRAY R.Z., BECKHOUSE AG., LO Y., MANZANERO S., COBBOLD C., SCHRODER K, MA B., ORR S., STUART L., LEBUS D., SOBIESZCZUK P., HUME D A., STOW J., BLANCHARD H., ASHMAN R.B. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is a essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. **The Journal of Immunology**, v.180, p.7404-7413, 2008.
  61. ZELANTE T., IANNITTI R.G., de LUCA A., ARROYO J., BLANCO N., SERVILLO G., SANGLARD D., REICHARD U., PALMER G.E., LATGÈ J.P., PUCETTI P., ROMANI L. Sensing of mammalian IL-17 A regulates fungal adaptation and virulence. **Nature Communications**, v.3, p.683-689, 2012.

## Capítulo 9

### ***Switching* Fenotípico em *Candida* spp.**

---

Márcia Cristina Furlaneto<sup>1</sup>

Alane Tatiana Pereira Moralez<sup>1</sup>

Emanuele Julio Galvão de França<sup>1,2</sup>

Luciana Furlaneto-Maia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Norte Paraná

<sup>3</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Coordenação de Tecnologia em Alimentos.

---

#### **1. Introdução**

O evento de *switching* fenotípico, ou seja, mudança de fenótipo ocorre em populações de micro-organismos procariotos e eucariotos, incluindo fungos patogênicos. Este evento é caracterizado pela emergência espontânea de colônias com morfologia alterada, a qual ocorre em taxas superiores às de mutação. *Switching* fenotípico ocorre de forma randômica e reversível, com taxas significativas de interconvertibilidade, sendo sua ocorrência atribuída a mecanismos epigenéticos<sup>1, 2, 3</sup>. Tais mecanismos são caracterizados pela ocorrência de mudanças estáveis na expressão gênica, que ocorrem durante a proliferação celular, sem que haja alteração na sequência do DNA<sup>3, 4</sup>.

Em fungos, o evento de *switching* difere de outras alterações fenotípicas, como a transição levedura-hifa, uma vez que ocorre em apenas uma parcela da população. Além disso, fenótipos provenientes de *switching* são estáveis por algumas gerações podendo proporcionar vantagens seletivas para determinados tipos morfológicos<sup>2</sup>. Assim, tem sido proposto que o *switching* fenotípico permite uma rápida micro-evolução, o que pode conferir melhor adaptação do micro-organismo a diferentes condições ambientais, incluindo as proporcionadas pelo organismo hospedeiro<sup>5, 6, 7</sup>.

A ocorrência de variantes morfológicas derivados de *switching* já foi descrita para diversas espécies fúngicas, incluindo *Candida albicans*, espécies de *Candida* não-*albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti* e *Histoplasma capsulatum*<sup>2, 8, 9</sup>. *Switching* fenotípico foi primeiramente descrito para *C. albicans* e

seu sistema denominado *White-opaque* tem sido o principal modelo para estudos de *switching* em fungos <sup>1</sup>.

## **2. *Switching* fenotípico em *Candida albicans***

*C. albicans*, como fungo oportunista, normalmente não estabelece infecções em indivíduos imunocompetentes, sendo comumente encontrado na microbiota de indivíduos saudáveis. No entanto, hospedeiros imunocomprometidos são suscetíveis a diversos tipos de infecções provocadas por essa levedura, que podem variar desde superficiais a sistêmicas <sup>10,11</sup>.

Esta espécie é polimórfica, sendo capaz de realizar transição entre os estados morfológicos blastoconídio, pseudo-hifa e hifa, o que pode estar associado ao seu potencial de invasão aos tecidos do hospedeiro bem como de outras características de sua virulência <sup>12, 13</sup>. Em termos epidemiológicos *C. albicans* é a principal espécie do gênero relacionada a casos de infecções em humanos em diversas partes do mundo, sendo responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade <sup>14, 15</sup>.

A partir da década de 80 a capacidade de *C. albicans* realizar *switching* fenotípico passou a ser extensivamente estudada. Em 1985, Pomes e colaboradores<sup>16</sup> submeteram células da cepa 1001 de *C. albicans* à radiação ultravioleta e observaram que após o tratamento mutagênico as colônias, que anteriormente apresentavam fenótipo liso, tornavam-se rugosas. Em plaqueamentos posteriores, ou seja, semeadura de células em meio solidificado, os autores notaram que células provenientes das colônias rugosas poderiam originar colônias setoriadas (apresentando porções de fenótipo liso) em frequências superiores às esperadas para mutação. Ainda, estes autores constataram que células das porções lisas de colônias setoriadas poderiam originar novas colônias rugosas, também em frequências elevadas.

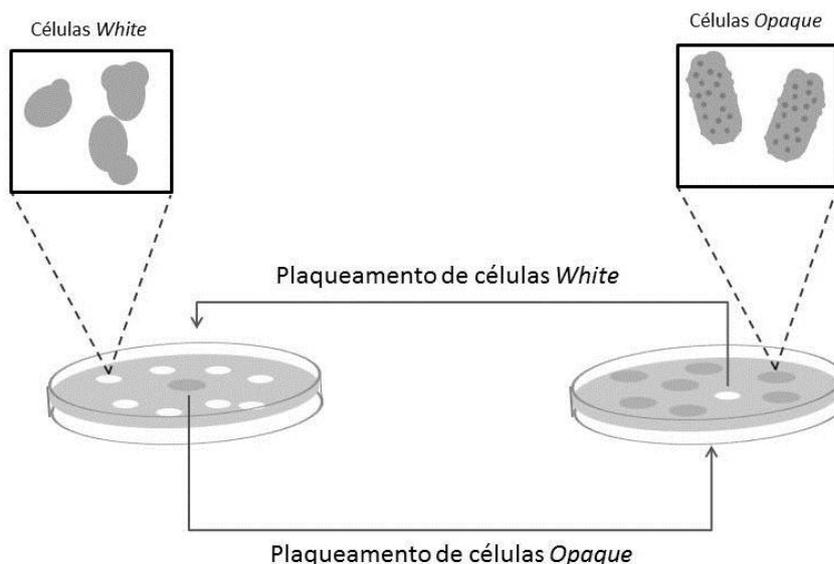
No mesmo ano, uma nova observação de variação fenotípica em colônias foi relatada para outra cepa de *C. albicans* <sup>17</sup>. Neste trabalho os autores relataram alta frequência de variação da cepa 3153A, tendo sido observado pelo menos sete morfologias distintas de colônia. Ainda na década de 80, *switching* fenotípico foi relatado em diversas outras cepas de *C. albicans* e foram constatados diferentes sistemas de *switching*, que diferiam entre si quanto ao repertório de variantes fenotípicos observados <sup>18,19</sup>.

Em 1987 foi identificado em *C. albicans* aquele que seria o sistema de *switching* mais amplamente estudado no gênero *Candida* até os dias de hoje -o sistema *White-opaque* <sup>20, 21</sup>.

O sistema *White-opaque* foi primeiramente evidenciado após o plaqueamento de células do isolado clínico WO-1, que originou colônias de dois fenótipos distintos, um predominante caracterizado pela coloração branca e pelo formato semi-esférico (*white*) e outro menos frequente, de coloração opaca e formato plano (*opaque*). Tanto células de colônias *white* quanto as de colônias *opaque* após serem plaqueadas isoladamente apresentavam uma minoria de fenótipos opostos, caracterizando um sistema reversível e interconvertível <sup>20</sup>. A representação esquemática de evidenciação do sistema *White-opaque* de *C. albicans* é mostrada na Figura 1.

Embora inicialmente caracterizado por mudanças reversíveis na morfologia de colônia, variações morfológicas nos fenótipos variantes do sistema *white-opaque* também são manifestados em nível celular. Enquanto as células na fase *white* possuem formato arredondado como a maioria dos outros isolados de *C. albicans*, as da fase *opaque* são duas vezes mais largas e alongadas, apresentando pequenas pontuações na parede celular e exibem padrões de brotamento particulares <sup>20, 21</sup>.

Além disso, os tipos celulares *white* e *opaque* também exibem diferenças marcantes com relação ao potencial de filamentação. Células *white* se diferenciam em formas filamentosas em resposta a uma variedade de condições ambientais, tais como presença de soro, temperaturas elevadas (próximas a 37°C), pH próximo a neutralidade e limitação nutricional. Células na fase *opaque*, ao contrário, não são estimuladas a filamentação em nenhuma dessas condições <sup>20, 22</sup>. No entanto a formação de hifas e pseudo-hifas a partir de células *opaque* pode ser induzida por condições distintas, como limitação de fosfato, meio sorbitol e temperaturas não superiores a 25°C <sup>22</sup>.



**Figura 1.** Sistema de *Switching White-opaque* de *Candida albicans*. Células provenientes de uma única colônia *white* são plaqueadas a uma baixa densidade em agar nutriente. A maioria das colônias formadas exibe o fenótipo *white* enquanto a minoria (cerca de  $10^{-3}$ ) exibe o fenótipo *opaque*. Quando células de uma única colônia *opaque* são semeadas a baixa densidade, a maior parte das colônias formadas são *opaque*, enquanto cerca de  $10^{-3}$  exibem fenótipo *white*. A morfologia das células formadoras das colônias *white* ou *opaque* diferem amplamente. As células componentes de colônias *white* são arredondadas a ovóides com superfícies relativamente lisas enquanto as formadoras das colônias *opaque* são cerca de duas vezes maiores e possuem diversas pontuações elevadas exclusivas em sua parede. Ilustração: Alane Tatiana Pereira Moralez.

As diferenças marcantes entre células ou colônias *white* e *opaque* levantavam suspeitas de ocorrência de expressão gênica diferencial entre estas fases. No início da década de 90 foi identificado o primeiro gene *opaque* específico – o gene *SAP1* (*Secreted Aspartic Proteases 1*). Estudos subsequentes identificaram diversos genes fase-específicos, bem como o efeito da transição *white-opaque* na expressão de um amplo número de genes. Atualmente é reconhecido que o gene *WOR-1* (*White-Opaque Regulator 1*) tem um papel fundamental na transição *white-opaque*, sendo que sua deleção suprime o evento de *switching* e sua superexpressão em células da fase *white* leva a uma conversão em massa para a fase *opaque* <sup>6</sup>.

Recentemente também foi constatado que além dos estímulos físico-químicos relacionados a filamentação serem diferenciados entre as fases *white* e *opaque* os perfis de expressão gênica durante a filamentação também diferem expressivamente entre essas duas fases. Si e colaboradores (2013) <sup>22</sup> verificaram que apenas 11 genes compartilhados pelos dois tipos celulares são induzidos durante a filamentação, enquanto 44 genes são induzidos especificamente nas células hifais do tipo *white* e 37 genes são induzidos especificamente nas células filamentosas de

*opaque*. No entanto, estes mesmos autores constataram que muitas das vias regulatórias que controlam a filamentação nesses dois tipos celulares são as mesmas.

A transição *white-opaque* também é uma etapa fundamental no processo de *mating* sexual em *C. albicans*, sendo que apenas células da fase *opaque* são *mating*-competentes. Tem sido sugerido que células da fase *opaque* liberam feromônios capazes de sinalizar e estimular células da fase *white* à formação de biofilme, o que facilitaria o *mating* uma vez que proporcionaria proteção do frágil gradiente de feromônios que direcionam o quimiotropismo, necessário para a ocorrência de fusão<sup>6</sup>.

Além de regular o *mating*, o sistema de *switching White-opaque* também regula várias outras características biológicas em *C. albicans*. Estudos revelaram que células *white* são mais virulentas em modelo animal de infecções sistêmicas comparativamente às células *opaque*<sup>23</sup>. Contrariamente, em modelo animal de infecção cutânea as células *opaque* apresentam-se mais virulentas em relação às *white*<sup>24</sup>. Ainda, células da fase *opaque* apresentam menor suscetibilidade à fagocitose por células do sistema imune inato em comparação às células *white*, o que pode representar um papel do sistema *White-opaque* na evasão à fagocitose<sup>25</sup>.

### **3. Switching fenotípico em *Candida* não-*albicans***

Além de *C. albicans* existem no gênero *Candida* cerca de outras 20 espécies patogênicas. Dentre estas, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida lusitanae* se destacam por estarem entre as mais comumente associadas a infecções humanas em diferentes regiões do mundo<sup>14,26</sup>. Apesar do sistema *white-opaque* de *C. albicans* ser extensivamente estudado tanto em nível celular quanto molecular, a maioria dos sistemas de *switching* em espécies não-*albicans* ainda não são tão bem caracterizados. No entanto, vários são os relatos de alterações celulares e fisiológicas promovidas pelos sistemas de *switching* em *Candida* não-*albicans*. Na Tabela 1 estão sumarizadas as principais modificações associadas à *switching* em *Candida* spp.

O primeiro sistema de *switching* fenotípico descrito para *C. glabrata*, denominado sistema central, foi evidenciado pela emergência espontânea de colônias de coloração variável entre branco e marrom escuro em meio de cultivo adicionado de íons cobre (CuSO<sub>4</sub>). O repertório de *switching* exibido nesse sistema

compreende os fenótipos *White* (Wh), *Light brown* (LB), *Dark Brown* (DB), *Very dark brown* (vDB), sendo Wh o mais instável e vDB o mais estável. Além do gradiente de coloração evidenciado em presença de CuSO<sub>4</sub>, os fenótipos do sistema central de *switching* também podem ser distinguidos em presença do corante floxina B, sendo nesse caso formadas colônias com coloração variável entre rosa escuro e branco. Os diferentes fenótipos desse sistema de *switching* não diferem quanto à morfologia celular e proporção de pseudo-hifas e tubos germinativos que constituem as colônias variantes<sup>38,40</sup>.

O sistema central de *switching* de *C. glabrata* está relacionado com a regulação diferencial da expressão do gene *MT-II*, que codifica uma proteína metalotioneína – responsável pela regulação da concentração celular de elementos traço - e do gene *HLP*, que codifica uma molécula capaz de promover a lise de eritrócitos. Para o gene *MT-II* foi constatado um gradiente de transcrito inversamente proporcional ao gradiente de coloração em presença de CuSO<sub>4</sub>, sendo os maiores níveis de transcrito constatados em células formadoras de colônias vDB e os menores em células de colônias Wh. Os níveis de transcrito para o gene *HLP* também são mais elevados em células de colônias DB comparativamente a Wh<sup>38,40</sup>.

Um segundo sistema de *switching* em *C. glabrata* foi denominado *irregular wrinkle*. Esse sistema é caracterizado pelo surgimento espontâneo de colônias de morfologia altamente enrugada, morfotipo denominado IWr, a partir de colônias DB ou LB. Ao contrário dos morfotipos do sistema central, IWr difere expressivamente de seus parentais com relação a proporção de formas filamentosas componentes da colônia. Colônias IWr são formadas predominantemente por pseudo-hifas desde as fases iniciais de desenvolvimento da colônia até colônias maduras de seis dias e após esse período inicia-se um acúmulo de células blastoconidiais e tubos germinativos. As colônias parentais, ao contrário, são formadas quase exclusivamente por células blastoconidiais no início de seu desenvolvimento, ocorrendo acúmulo de pseudo-hifas e tubos germinativos após três dias de desenvolvimento<sup>40</sup>.

Posteriormente foi mostrado que *C. glabrata* pode desenvolver *switching* fenotípico *in vivo* nos sítios de infecção em humanos, sendo que neste sistema o fenótipo *Dark Brown* (DB) foi predominante<sup>49</sup>. Em modelos animais de infecção sistêmica também foi verificado que DB é o fenótipo mais virulento dentre os variantes fenotípicos dos sistemas de *switching* central e *irregular wrinkle*. Quando células DB são injetadas nas veias caudais de camundongos são observados níveis de colonização dos principais órgãos muito superiores aos verificados quando

células de outros variantes fenotípicos são injetadas. Além disso, células DB mantêm a vantagem de colonização em modelos de infecções mistas, quando os camundongos são infectados com mais de um variante fenotípico, mostrando uma vantagem de DB com relação aos demais variantes <sup>39</sup>.

**Tabela 1.** Principais modificações fisiológicas e estruturais relacionadas à ocorrência de *switching* fenotípico em diferentes espécies do gênero *Candida*

<b>Espécie / Sistema de <i>switching</i></b>	<b>Modificações relacionadas ao evento de <i>switching</i></b>	<b>Referências</b>	
<i>Candida albicans</i>	Variações no potencial de filamentação	20; 22	
	Diferença na capacidade de reprodução por <i>mating</i>	27; 6	
	Evasão a mecanismos celulares de defesa do hospedeiro	28	
	Expressão gênica diferencial	5; 29; 30	
	Diferenças morfológicas a nível celular	31; 20	
	Diferenças na suscetibilidade a Anfotericina B, Flucitosina, Nitrato de miconazol e Nistatina	32	
	Demais sistemas de <i>switching</i>	Variações no potencial de filamentação	17; 33
		Variações no potencial de formação de biofilme	33
		Variações na produção de proteases aspárticas	34; 35
		Variações na capacidade de aderência e hidrofobicidade	36; 37; 35
Diferenças na suscetibilidade a fluconazol, voriconazol e flucitosina		34	
<i>Candida glabrata</i>	Expressão gênica diferencial	38	
	Varição na virulência	39	
	Sistema Irregular Wrinkle	Variações no potencial de filamentação	40
		Varição na virulência	39
<i>Candida tropicalis</i>	Sistema White-Opaque	Diferença na capacidade de reprodução por <i>mating</i>	41
		Expressão gênica diferencial	41
	Demais sistemas de <i>switching</i>	Varição no potencial de filamentação	42
		Diferenças no potencial de formação de biofilme	43; 42
		Produção de material extracelular (colônia tipo-biofilme)	43
		Diferenças na produção de fator hemolítico	42
Diferenças na suscetibilidade a Itraconazol	42		
<i>Candida parapsilosis</i>	Diferenças morfológicas a nível celular	44	
	Varição no potencial de filamentação	45; 44	
	Diferenças no potencial de formação de biofilme	44	
	Diferenças no potencial de invasão do ágar	44	
<i>Candida lusitanae</i>	Diferenças morfológicas a nível celular	46	
	Variações no potencial de filamentação	47	
	Diferenças na suscetibilidade a Anfotericina B	46; 47	
<i>Candida krusei</i>	Diferenças morfológicas a nível celular	48	
	Variações na capacidade de aderência	48	
	Diferenças na suscetibilidade a Clorexidina	48	

Para *C. parapsilosis* a primeira descrição de ocorrência de *switching* fenotípico ocorreu em 1993<sup>50</sup>, no entanto, somente anos depois, os efeitos de variações fenotípicas associados ao evento de *switching* foram pesquisados mais detalhadamente. Laffey e Butler (2005)<sup>44</sup> analisaram o fenômeno de *switching* fenotípico em 20 isolados de *C. parapsilosis*, identificando quatro fenótipos estáveis os quais foram denominados *crepe*, *concentric*, *crater* e *smooth*. Além das diferenças na morfologia da colônia, essas variantes também diferem quanto aos tipos celulares que compõem as colônias, sendo que colônias *crepe* e *concentric* são quase exclusivamente compostas por pseudo-hifas, enquanto blastoconídios são predominantes em colônias *smooth* e *crater*. Ainda, as células componentes das colônias *smooth* são menores que as dos três outros variantes fenotípicos e o crescimento deste variante é significativamente mais rápido que dos demais.

Analisando um único isolado capaz de variar entre os quatro fenótipos, os autores notaram diferenças entre os variantes quanto à capacidade de formação de biofilme e invasão do ágar. Células do fenótipo *concentric* foram capazes de formar quase duas vezes mais biofilme que as dos fenótipos *crepe* e *crater*, enquanto o menor potencial de formação de biofilme foi atribuído ao fenótipo *smooth*. Da mesma forma, células do fenótipo *concentric* apresentaram maior potencial de invasão do ágar que *crepe* e *crater*, enquanto *smooth* não foi invasivo. Assim, foi demonstrado que o *switching* fenotípico em *C. parapsilosis* pode afetar atributos de virulência nesta espécie.

O *switching* fenotípico também está associado a alterações em propriedades biológicas de *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Variantes fenotípicos de *C. krusei* apresentam maior potencial de adesão a superfícies abióticas, menor suscetibilidade ao antimicrobiano clorexidina além de diferenças na morfologia celular em relação a seus parentais (cepas originais)<sup>48</sup>. Já os variantes fenotípicos de *C. lusitaniae* apresentaram diferenças significativas na suscetibilidade a anfotericina B, além de diferenças no potencial de filamentação comparativamente a cepa original<sup>46,47</sup> (Tabela 1).

### **3.1 *Switching* fenotípico em *Candida tropicalis***

Estudos epidemiológicos apontam *C. tropicalis* como uma das principais espécies do gênero responsáveis por infecções em regiões de clima tropical, como países da América Latina e Ásia, sendo em alguns casos associada a níveis de incidência superiores aos registrados para *C. albicans*. Como fungo polimórfico, *C. tropicalis* tem capacidade de formar hifas verdadeiras, uma habilidade partilhada

com apenas duas espécies clinicamente relevantes do gênero – *C. albicans* e *Candida dublinensis*. Essa característica é provavelmente decorrente da proximidade filogenética entre essas três espécies<sup>51</sup>.

Alguns estudos com modelo de infecção *in vivo* sugerem que a patogenicidade de *C. tropicalis* seja equivalente ou superior à de *C. albicans*. No entanto estudos acerca dos fatores de virulência de *C. tropicalis*, incluindo *switching* fenotípico, ocorrem em extensão muito inferior quando comparado a *C. albicans*<sup>51</sup>.

A primeira descrição de ocorrência de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* ocorreu ainda nos anos 1980, quando a variação fenotípica foi verificada em isolados recuperados de infecções sistêmicas de pacientes<sup>19</sup>. No entanto novos estudos abordando a ocorrência desse fenômeno em *C. tropicalis* só foram realizados mais de 20 anos depois.

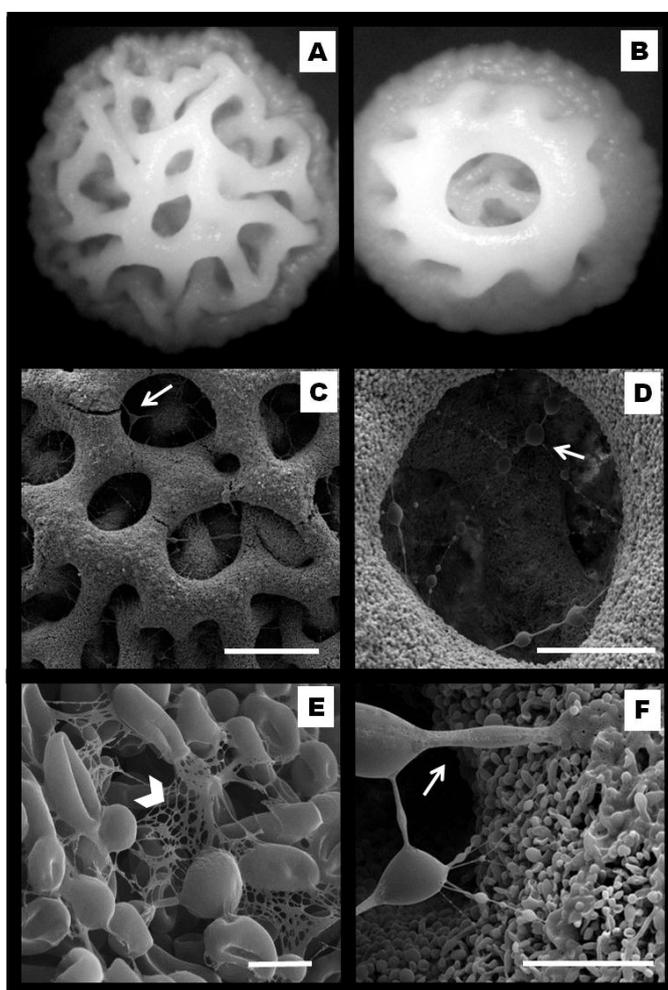
Em 2011 nosso grupo relatou pela primeira vez efeitos fisiológicos e alterações ultraestruturais em variantes fenotípicos de *C. tropicalis*. Nesse estudo foi avaliado um único isolado clínico (49/07) que apresenta um repertório de *switching* composto por quatro morfotipos – o parental *smooth* e os variantes *semi-smooth*, *ring* e *rough*. Além das diferenças marcantes com relação à morfologia de colônia, os morfotipos de 49/07 também diferem quanto à composição dos tipos celulares, sendo a quantidade de formas filamentosas presentes em colônias *ring* e *rough* significativamente superior às presentes em *smooth* e *semi-smooth*<sup>42, 43</sup>.

Avaliações ultraestruturais de colônias inteiras permitiram evidenciar a característica mais marcante dos variantes fenotípicos desse isolado - a presença abundante de matriz extracelular nas colônias de morfologia mais complexa. Colônias de *ring* e *rough* são caracterizadas pela presença de profundas depressões centrais e periféricas e apresentam no interior dessas depressões intensa quantidade de material extracelular em forma de uma rede de filamentos ou de fibras espessas, recobrando as células e conectando células próximas ou distantes (Figura 2). Esse material extracelular não é observado sob as células das colônias *smooth* e *semi-smooth*, estruturalmente mais simples.

Essa observação nos levou a hipótese de que o material extracelular teria participação na formação e manutenção da estrutura das colônias *ring* e *rough*. De fato, análises ultraestruturais posteriores realizadas em diferentes estágios do desenvolvimento das colônias evidenciaram um acúmulo gradual de material extracelular à medida que o desenvolvimento e complexidade da colônia progredem<sup>43</sup>. Mais investigações estão em andamento a fim de esclarecer o papel

desse material extracelular na estruturação de colônias variantes derivadas de *switching* fenotípico.

Após essas observações pioneiras nosso grupo buscou expandir o conhecimento acerca do evento de *switching* em *C. tropicalis*. Inicialmente investigamos uma possível associação entre variantes morfológicas de *switching* fenotípico e modificações de expressão fenotípica de características relacionadas a outros fatores de virulência da espécie. Para isso foram utilizados cinco isolados clínicos com um repertório de *switching* variado para cada isolado, sendo os morfotipos obtidos denominados *smooth*, *rough*, *crater*, *irregular center*, *mycelial* e *diffuse* <sup>42</sup>.



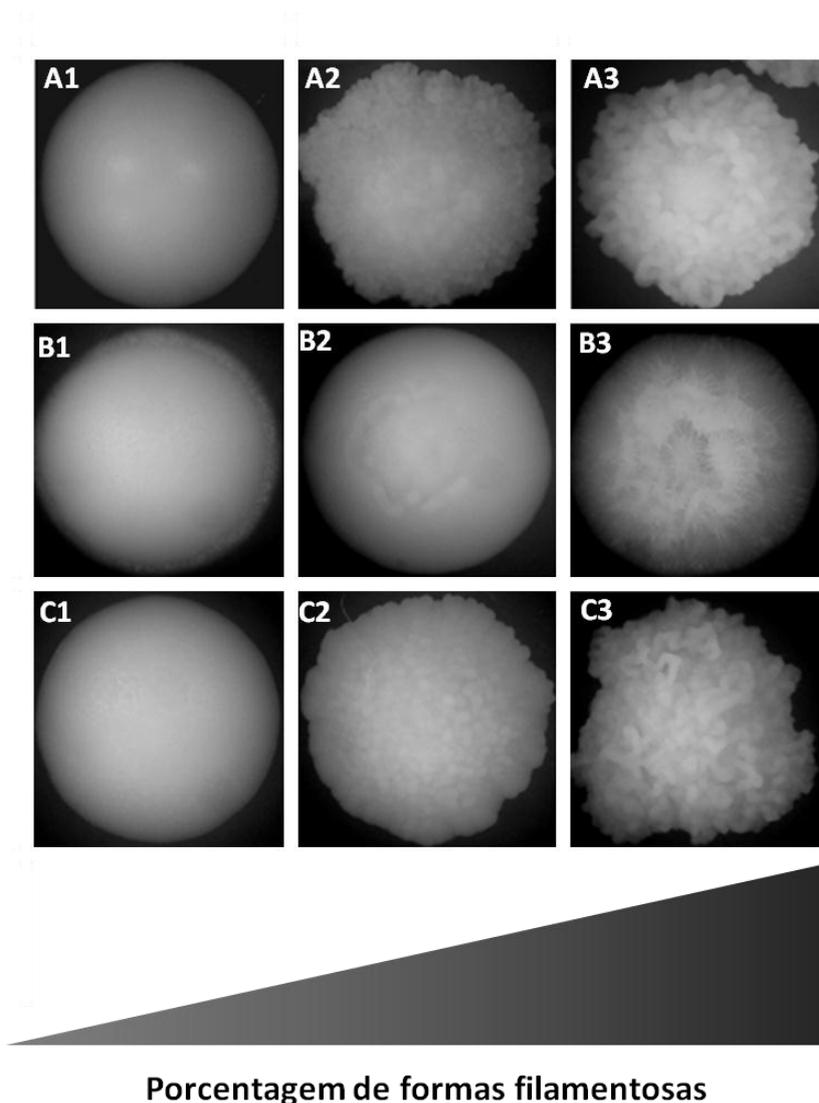
**Figura 2.** Morfotipos *Ring* e *Rough* do isolado 49/07 de *C. tropicalis*. (A) Microscopia de luz de colônia *Rough*; (B) Microscopia de luz de colônia *Ring*; (C e D) Ultraestrutura de colônias *rough* (C) e *ring* (D) evidenciando matriz extracelular (setas) no interior das depressões presentes nas colônias. (E) Ultraestrutura de colônia *rough* evidenciando matriz extracelular em forma de rede de filamentos conectando células vizinhas (cabeça de seta); (F) Ultraestrutura de colônia *rough* evidenciando matriz extracelular na forma de fibras espessas conectando células próximas e distantes (seta). As barras representam (C) 500 μm; (D) 200 μm; (E) 5 μm; (F) 50 μm. Fotografia: Emanuele Júlio Galvão de França.

Os morfotipos de todos os isolados apresentaram atividade hemolítica e para a maioria dos variantes fenotípicos foram verificadas diferenças quanto ao potencial hemolítico comparativamente aos seus parentais.

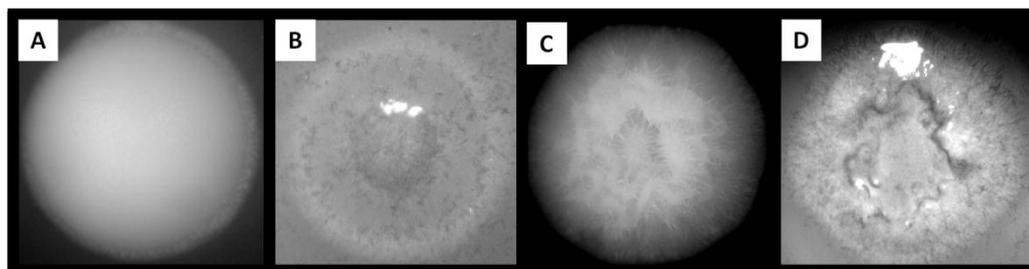
Tendo em vista que a capacidade de formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência de *C. tropicalis*<sup>51, 52</sup> nós também avaliamos o potencial de formação de biofilme dos diferentes morfotipos exibidos pelos isolados. Com essa avaliação constatamos que o *switching* fenotípico pode afetar a capacidade de formação de biofilme de *C. tropicalis*, sendo que dos oito variantes fenotípicos avaliados três produziram significativamente mais biofilme que seus parentais.

Ainda, o aprofundamento dos estudos de *switching* em *C. tropicalis* nos permitiu constatar novamente a presença de grande quantidade de material extracelular em variantes fenotípicos de morfologia de colônia complexa, dessa vez para um maior número de isolados e morfotipos. No entanto, a presença de matriz extracelular não é uma característica comum a todos os repertórios de *switching* da espécie pois algumas colônias altamente estruturadas não exibem grandes quantidades de matriz extracelular em sua composição. Por outro lado, temos verificado uma correlação positiva entre a complexidade estrutural de colônias de diferentes morfotipos de *C. tropicalis* e a quantidade de formas filamentosas presentes em sua constituição<sup>53</sup>, conforme ilustra a Figura 3.

É reconhecido que células filamentosas de fungos dimórficos têm participação na invasão de tecidos do hospedeiro durante episódios infecciosos<sup>13</sup>. Assim, também temos investigado o potencial de invasão de diferentes morfotipos de *C. tropicalis* empregando a metodologia de invasão de ágar denominada *footprint*<sup>54</sup>. Para isso, colônias crescidas na superfície de meio solidificado (meio suplementado com ágar) foram cuidadosamente removidas da superfície, seguido de coloração de células remanescentes presentes no interior do meio de cultivo. Essa metodologia permitiu verificar os principais pontos nos quais ocorreu invasão das células fúngicas, conforme ilustra a Figura 4. Com isso constatamos que a capacidade de invasão do ágar de colônias de morfologia mais estruturada é superior a de seus pares morfológicamente mais simples (Figura 4). Avaliações ultraestruturais de células no interior do ágar também revelaram presença abundante de formas filamentosas em suas camadas superficiais e profundas<sup>55</sup>.



**Figura 3.** Microscopia de luz de morfotipos de diferentes isolados de *C. tropicalis* mostrando correlação diretamente proporcional entre complexidade estrutural das colônias e quantidade de formas filamentosas em sua composição. Isolado 49.07-(A1) *smooth*, (A2) *rough*, (A3) *crepe*; Isolado 335.07-(B1) *smooth*, (B2) *irregular center*, (B3) *crater*; Isolado 100.10-(C1) *smooth*, (C2) *rough* e (C3) *crepe*. Fotografia e ilustração: Alane Tatiana Pereira Moralez.



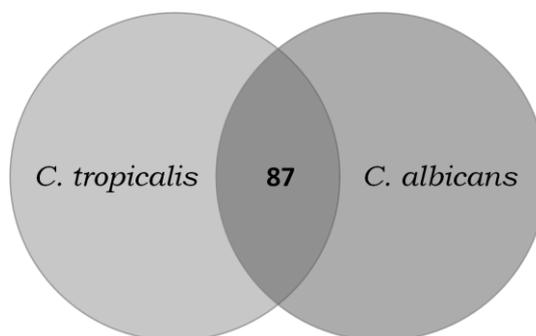
**Figura 4.** Perfil de invasão do meio de cultivo solidificado por morfotipos do isolado 335.07 de *C. tropicalis*. (A) Colônia do morfotipo parental *smooth*; (B) *footprint* da colônia *smooth* após sua remoção do ágar; (C) Colônia do morfotipo variante *irregular center*; (D) *footprint* da colônia *irregular center* após sua remoção do ágar. Fotografia: Alane Tatiana Pereira Moralez.

Além dessas características relacionadas a virulência, em nossos estudos também constatamos uma suscetibilidade diferenciada entre morfotipos de *C. tropicalis* ao antifúngico itraconazol. A ocorrência de associação entre *switching* fenotípico e variações na suscetibilidade a antifúngicos já foi constatada para outras espécies do gênero, conforme mencionamos anteriormente <sup>46, 47, 48</sup>. Estes dados sugerem que o evento de *switching* pode representar uma vantagem adaptativa do fungo em casos de infecção.

Recentemente um sistema de *switching white-opaque* também foi descrito para *C. tropicalis*. Assim como ocorre para *C. albicans*, esse sistema envolve modificações em nível celular, sendo as células *opaque* mais alongadas que as células *white*. Outra característica compartilhada entre os sistemas de *switching white-opaque* de *C. albicans* e *C. tropicalis* é sua regulação por um fator de transcrição denominado Wor1. Além disso, análises do perfil transcricional demonstraram que 87 genes relacionados à transição *white-opaque* são compartilhados entre essas duas espécies<sup>56</sup> (Figura 5).

No entanto, a regulação transcricional dos sistemas *white-opaque* também apresenta diferenças marcantes entre estas duas espécies. Um exemplo é a atuação de outros fatores de transcrição (Czf 1, Wor2 e Efg1) juntamente com Wor1 na regulação da transição *white-opaque* em *C. albicans*, o que não ocorre em *C. tropicalis* tendo em vista que a regulação *white-opaque* nessa espécie aparentemente não envolve a associação de fatores transcricionais diferentes do Wor1 <sup>56</sup>.

Conforme mencionado anteriormente, a conversão *white-opaque* tem papel central na regulação do *mating* sexual em *C. albicans*, tendo em vista que apenas células *opaque* são *mating* competentes. Além disso, nessa espécie o *switching white-opaque* é controlado pelo locus *MTL* (*mating-type-like*) e apenas células homozigotas para este locus são capazes de realizar a conversão do estado *white* para *opaque*. Diferentemente, a conversão *white-opaque* em *C. tropicalis* independe do controle de *MTL* e células *white* homozigotas (a/a; a/a) ou heterozigotas (a/a) são capazes de realizar a conversão para o estado *opaque*. Além disso, as células *white* de *C. tropicalis* são *mating* competentes, embora em eficiência inferiores *opaque* <sup>41</sup>.

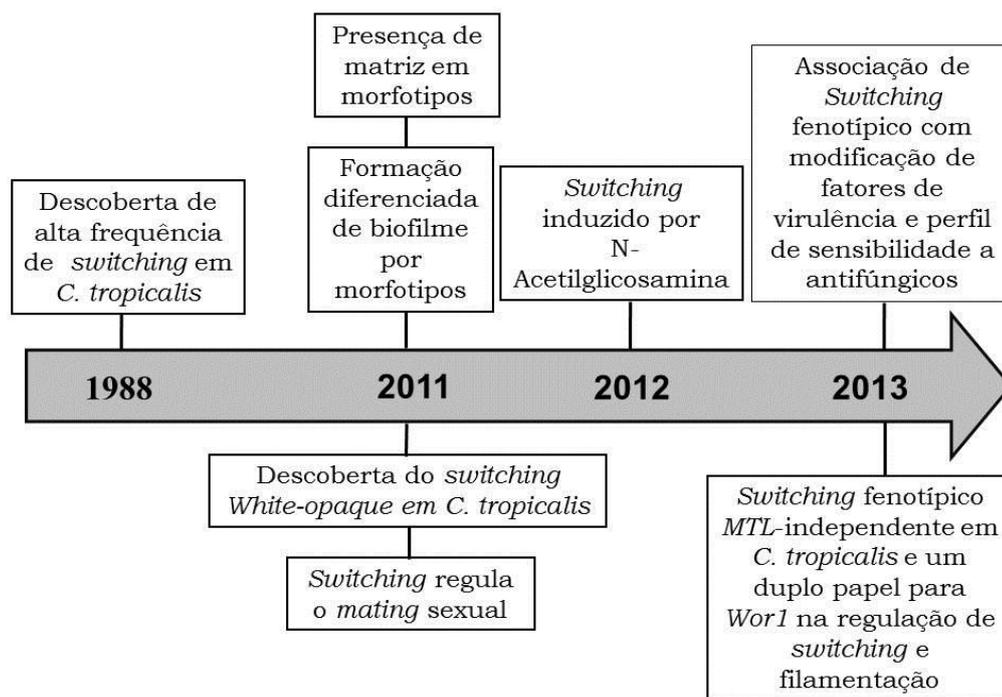


**Figura 5.** Compartilhamento de genes relacionados à conversão *white-opaque* entre *C. tropicalis* e *C. albicans*. Ilustração: Alane Tatiana Pereira Moralez.

Para *C. albicans* é reconhecido que uma série de variações ambientais influenciam na conversão *white-opaque*, incluindo o aminoaçúcar N-acetilglicosamina. A presença desse açúcar também induz a formação de células *opaque* em *C. tropicalis*, similarmente ao que ocorre em *C. albicans*. Outros experimentos revelaram que N-acetilglicosamina atua de modo negativo em *C. tropicalis* inibindo a filamentação de células *White-opaque*, um efeito oposto ao que acontece no sistema *White-opaque* de *C. albicans*<sup>7</sup>. Assim, até o momento tem sido demonstrado que apesar das características compartilhadas entre os sistemas *white-opaque* de *C. albicans* e *C. tropicalis*, diversas características desses sistemas de *switching* diferem substancialmente entre essas duas espécies.

Um resumo das principais informações relativas aos estudos de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* é mostrado na Figura 6.

Até o momento as investigações concernentes a ocorrência de *switching* fenotípico em *Candida* spp. demonstram que este evento pode influenciar de forma variável características morfológicas e fisiológicas de importantes espécies patogênicas do gênero. Nossos estudos tem buscado expandir o conhecimento sobre as alterações provocadas pela ocorrência de *switching* em isolados clínicos de *C. tropicalis*.



**Figura 6.** Principais eventos relacionados ao *switching* em *C. tropicalis* desde sua primeira descrição até o presente momento (referências no texto). Ilustração: Alane Tatiana Pereira Moralez.

#### 4. Referências

- SOLL D.R. High-frequency Switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p.183-203, 1992.
- JAIN N., HASAN F., FRIES B.C. Phenotypic Switching In Fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v.2, p.180-188, 2008.
- CASADESÚS J, LOW D.A. Programmed Heterogeneity: Epigenetic Mechanisms In Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.13929-13935, 2013.
- MULLER H.R., PRADO K.B. Epigenética: Um Novo Campo da Genética. **Rubs**, v.1, p.61-69, 2008.
- STRAUB A., MICHEL S., MORSCHHÄUSER J. Analysis Of Phase-Specific Gene Expression At The Single-Cell Level In The White-Opaque Switching System Of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.3761-3769, 2001.
- SOLL D.R. Why does *Candida albicans* Switch? **FEMS Yeast Research**, v.9, p.973-989, 2009.
- XIE J., TAO L., NOBILE C.J., TONG Y., GUAN G., SUN Y., CAO C., HERNDAY A.D., JOHNSON A.D., ZHANG L., BAI F.Y., HUANG G. White-Opaque Switching In Natural *MtlA*/A Isolates Of *Candida albicans*: Evolutionary Implications For Roles In Host Adaptation, Pathogenesis, And Sex. **Plos Biology**, v.11, p.e1001525, 2013
- KÜGLER S., SEBGHATI T.S., EISSENBERG L.G., GOLDMAN W.E. Phenotypic Variation And Intracellular Parasitism By *Histoplasma capsulatum*. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v.97, p.8794-8798, 2000.
- JAIN N., LI L., MACFADDEN D.C., BANARJEE U., WANG X., COOK E., FRIES B.C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with virulence and promotes dissemination to the central nervous system. **Infection and Immunity**, v.74, p.896-903, 2006.
- NAGLIK J.R., CHALLACOMBE S.J., HUBE B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p.400-428, 2003.
- MAVOR A., THEWES S., HUBE B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process, and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v.6, p.863-874, 2005.

12. SUDBERY P., GOW N., BERMAN J. The Distinct Morphogenic States of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.12, p.317-324, 2004.
13. THOMPSON D.S., CARLISLE P.L., KADOSH D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, v.10, p.1173-1182, 2011.
14. NUCCI M., QUEIROZ-TELLES F., ALVARADO-MATUTE T., TIRABOSCHI I. R., CORTES J., ZURITA J., GUZMAN-BLANCO M., SANTOLAYA M.E., THOMPSON L., SIFUENTES-OSORNIO J., ECHEVARRIA J.I., COLOMBO A.L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **Plos One**, v.8, p.e59373, 2013.
15. FLEVARI A., THEODORAKOPOULOU M., VELAGRAKI A., ARMAGANIDIS A. DIMOPOLOS G. Treatment of Invasive Candidiasis in The Elderly: A Review. **Clinical Interventions In Aging**, v.8, p.1199-1208, 2013.
16. POMES R., GIL C., NOMBELA C. Genetic Analysis of *Candida albicans* Morphological Mutants. **Journal of General Microbiology**, v.131, p.2107-2113, 1985.
17. SLUTSKY B., BUFFO J., SOLL D.R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, v.230, p.666-669, 1985.
18. SOLL D.R., LANGTIMM C.J., McDOWELL J., HICKS J. GALASK R. High-Frequency Switching in *Candida* Strains Isolated from Vaginitis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.1611-1622, 1987.
19. SOLL D.R., STAEBELL M., LANGTIMM C., PFALLER M., HICKS J., RAO T.V. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.1448-1459, 1988.
20. SLUTSKY B., STAEBELL M., ANDERSON J., RISEN L., PFALLER M., SOLL D.R. White-Opaque Transition: a Second High-Frequency Switching System in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.189-197, 1987.
21. ANDERSON J.M., SOLL D.R. Unique Phenotype of Opaque Cells in the White Opaque Transition of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.5579-5588, 1987.
22. SI H., HERNDAY A.D., HIRAKAWA M.P., JOHNSON A.D., BENNETT R.J. *Candida albicans* White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth. **Plos Pathogens**, v.9, p.e1003210, 2013.
23. KVAAL C.A., SRIKANTHA T., SOLL D.R. Misexpression of the white-phase-specific gene *wh11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. **Infection and Immunity**, v.65, p.4468-4475, 1997.
24. KVAL C., LACHKE S.A., SRIKANTHA T., DANIELS K., McCOY J., SOLL D.R. Misexpression of the Opaque-Phase-Specific Gene *PEP1(SAP1)* in the White Phase of *Candida albicans* Confers Increased Virulence in Mouse Model of Cutaneous Infection. **Infection and Immunity**, v.67, p.6652-6662, 1999.
25. LOHSE M.B., JOHNSON A.D. Differential Phagocytosis of White versus Opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and Mouse Phagocytes. **Plos One**, v.3, p.e1473, 2008.
26. PAPON N., COURDAVAULT V., CLASTRE M., BENNETT R.J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **Plos Pathogens**, v.9, p.e1003550, 2013.
27. MILLER, M. G., JOHNSON, A. D. White-opaque *switching* in *Candida albicans* controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, v.110, p.293-302, 2002.
28. SASSE C., HASENBERG M., WEYLER M., GUNZER M., MORSCHHAUSER J. White-Opaque Switching of *Candida albicans* Allows Immune Evasion in an Environment-Dependent Fashion. **Eukaryotic Cell**, v.12, p.50-58, 2013.
29. SOLL D.R. Gene Regulation During High-Frequency Switching In *Candida albicans*. **Microbiology**, v.143, p.279-288, 1997.
30. LAN C.Y., NEWPORT G., MURILLO L.A., JONES T.J., SCHERER S., DAVIS R.W., AGABIAN N. Metabolic Specialization Associated With Phenotypic Switching In *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.99, p.14907-14912, 2002.
31. ANDERSON J.M., SOLL D.R. Unique Phenotype of Opaque Cells in the White Opaque Transition of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.5579-5588, 1987.
32. GHANNOUM M.A., SWAIRJO I., SOLL D.R. Variation in Lipid and Sterol Contents in *Candida albicans* White And Opaque Phenotypes. **Medical Mycology**, v.28, p.103-115, 1990.
33. JIN Y., SAMARANAYKE H.K., SAMARANAYKE L.P. Characterization of Switch Phenotypes in *Candida albicans* Biofilms. **Mycopathologia**, v.160, p.191-200, 2005.
34. VARGAS K., MESSER S.A., PFALLER M., LOCKHART S.R., STAPLETON J.T., HELLSTEIN J., SOLL D.R. Elevated Phenotypic Switching and Drug Resistance of *Candida albicans* from Human Immunodeficiency virus-Positive Individuals prior to First Thrush Episode. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3595-3607, 2000.
35. ANTONY G., SARALAYA V., BHAT K., SHENOY M., SHIVANANDA P.G. Effect of Phenotypic Switching on Expression of Virulence Factors by *Candida albicans* Causing Candidiasis in Diabetic Patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.26, p.202-205, 2009.

36. VARGAS K., WERTZ P.W., DRAKE D., MORROW B., SOLL D.R. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153a cells exhibiting switch phenotypes of buccal epithelium and *stratum corneum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.1328–1335, 1994.
37. ANTONY G., SARALAYA V., BHAT G.K., SHIVANANDA P.G. Phenotypic Switching and its Influence on Expression of Virulence Factors by *Candida albicans* Causing Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.25, p.241, 2007.
38. LACHKE S.A., SRIKANTHA T., TSAI L.K., DANIELS K., SOLL D.R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and newly discovery hemolysin gene HLP. **Infection and Immunity**, v.68, p.884-895, 2000.
39. SRIKANTHA T., DANIELS K.J., WU W., LOCKHART S.R., YI S., SAHNI N., MA N., SOLL D.R. Dark brown is the more virulent of the switch phenotypes of *Candida glabrata*. **Microbiology**, v.154, p.3309-3318, 2008.
40. LACHKE S.A., JOLY S., DANIELS K., SOLL D.R. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v.148, p.2661-2674, 2002.
41. PORMAN A.M., HIRAKAWA M.P., JONES S.K., WANH N., NENNETT R.J. MTL-Independent Phenotypic Switching in *Candida tropicalis* and a Dual Role for Wor1 in Regulating Switching and Filamentation. **Plos Genetics**, v.9, p.e1003369, 2013.
42. MORALES A.T.P., FRANÇA E.J.G., FURLANETO-MAIA L., QUESADA M.B., FURLANETO M.C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v.52, p.106-114, 2014.
43. FRANÇA E.J.G., ANDRADE C.G.T.J., FURLANETO-MAIA L., SERPA R., OLIVEIRA M.T., QUESADA R.M.B., FURLANETO M.C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypic switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011.
44. LAFFEY S.F., BUTLER G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v.151, p.1073-1081, 2005.
45. ENGER L., JOLY S., PUJOL C., SIMONSON P., PFALLER M., SOLL D.R. Cloning and Characterization of complex DNA Fingerprinting Probe for *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.2001, p.658-669, 2001.
46. YOON S.A., VASQUEZ J.A., STEFFAN P.E., SOBEL J.D., AKINS R.A. High frequency, *in vitro* reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.836-845, 1999.
47. MILLER N.S., DICK J.D., MERZ W.G. Phenotypic Switching in *Candida lusitanae* on Cooper Sulfate Indicator Agar: Association with Amphotericin B Resistance and Filamentation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.1536-1539, 2006.
48. ARZMI M.H., RAZAK F.A., MUSA M.Y., HARUN W.H.A.W. Effect of phenotypic switching on biological properties and susceptibility to chlorhexidine in *Candida krusei* ATCC 14243. **Federation of European Microbiological Societies**, v.12, p.351-358, 2012.
49. BROCKERT P.J., LACHKE S.A., SRIKANTHA T., PUJOL C., GALASK R., SOLL D.R. Phenotypic Switching and Mating Type Switching of *Candida glabrata* at Sites of Colonization. **Infection and Immunity**, v.71, p.7109-7118, 2003.
50. LOTT T.J., KUYKENDALL R.J., WELBEL S.F., PRAMANIK A., LASKER B.A. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v.23, p.463-467, 1993.
51. CHAI L.Y.A., DENNING D.W., WARN P. *Candida tropicalis* in human disease **Critical Reviews in Microbiology**, v.36, p.282-298, 2010.
52. SILVA S., HENRIQUES M., MARTINS A., OLIVEIRA R., WILLIAMS D., AZEREDO J. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p.681–689, 2009.
53. FURLANETO M.C., ANDRADE C.G.T.J., ARAGÃO P.H.A., FRANÇA E.J.G., MORALES A.T.P., FERREIRA L.C.S. Scanning electron microscopy as a toll the analysis of colony architecture produced by phenotypic switching of a human pathogenic yeast *Candida tropicalis*. Electron Microscopy and Analysis Group Conference. **Journal of Physics: Conference Series**, v.371, p.012022, 2012.
54. ŠTOVÍČEK V., VÁCHOVÁ L., KUTHAN M., PALKOVÁ Z. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeasts colonies. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p.1012-122, 2010.
55. FURLANETO M.C., ANDRADE C.G.T.J., FURLANETO-MAIA L., FRANÇA E.J.G., MORALES A.T.P. Pathogenic attributes of Non-*Candida* Species Revealed by SEM. The Scanning Electron Microscopy. **Rijeka: In Tech**, cap.15, p.295-310, 2012.
56. PORMAN A.M., ALBY K., HIRAKAWA M.P., BENNETT R.J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.108, p.21158-21163, 2011.

## Capítulo 10

### ***Phytomonas* spp.: Modelo para Estudo de Processos Biológicos da Família Trypanosomatidae?**

---

Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1,2</sup>

Viviane Krominski Graça-de Souza<sup>1</sup>

Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza<sup>1</sup>

Cesar Armando Contreras Lancheros<sup>1,2</sup>

Priscila Mazzochi Hiraiwa<sup>2</sup>

Alexandre Haruo Inoue<sup>2</sup>

Mariana Serpeloni<sup>2</sup>

Mateus Lucas Falco<sup>2</sup>

Angelica Martins Batista<sup>2</sup>

Igor Alexandre Campos Damiani<sup>2</sup>

Rosiane Valeriano da Silva<sup>4</sup>

Alexandre Tadachi Morey<sup>2,3</sup>

Philenio Pinge Filho<sup>4</sup>

Lucy Megumi Yamauchi<sup>1,2</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL, Centro de Ciências Biológicas – CCB, Departamento de Microbiologia.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia/CCB/UEL.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia/CCB/UEL.

<sup>3</sup> Bolsista PNPd/CAPES, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia/CCB/UEL.

<sup>4</sup> Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas/CCB/UEL.

---

#### **1. A Família Trypanosomatidae**

A Família Trypanosomatidae (Doflein, 1951) pertence ao Filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981), Classe Kinetoplastea (Konigberg, 1963) Ordem Trypanosomatida (Kent, 1880) e Subordem Trypanosomatina<sup>72</sup>. Esta família compreende um grande número de protozoários flagelados agrupados nos gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Trypanosoma*<sup>57</sup>. Posteriormente foram incluídos os gêneros, *Wallaceina*<sup>105</sup> e *Sergeia*<sup>127</sup>, e outros dois *Angomonas* e *Strigomonas*, os quais agrupam espécies que apresentam betaproteobactérias como endossimbiontes intracitoplasmáticos<sup>128</sup>. Estes gêneros compartilham características peculiares, porém, nem sempre exclusivas da família Trypanosomatidae, tais como: presença de um único flagelo que emerge de uma abertura conhecida como bolsa flagelar; compartimentalização das primeiras

reações da via glicolítica em organelas conhecidas como glicossomas; organização do genoma em longas unidades policistrônicas; presença do cinetoplasto que consiste de uma rede de DNA (kDNA) organizada em mini e maxicírculos, localizado em uma mitocôndria única; edição de RNA mensageiro <sup>26, 32, 56</sup>.

Outra característica peculiar da família Trypanosomatidae é que seus membros utilizam diferentes vias metabólicas para a interconversão dos aminoácidos ornitina-citrulina-arginina. As enzimas envolvidas nesta via exibem um padrão relacionado aos diferentes gêneros, apresentando um valor taxonômico confiável <sup>7, 11, 60</sup>. Assim, arginase que converte arginina em ornitina, CO<sub>2</sub> e ureia é observada nos gêneros *Crithidia* e *Leishmania*, e também em algumas espécies de *Leptomonas*; arginina-deiminase converte arginina em citrulina e amônia, cuja atividade foi detectada no gênero *Herpetomonas* e algumas espécies de *Leptomonas* e *Phytomonas*; citrulina hidrolase converte citrulina em ornitina, CO<sub>2</sub> e amônia e foi detectada nos gêneros *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Crithidia*; ornitina carbamoil transferase catalisa a biossíntese de citrulina a partir de ornitina e carbamoil fosfato, e esta atividade enzimática, embora tenha sido definida como característica do gênero *Herpetomonas*, já foi detectada também em *Phytomonas*; argininosuccinato sintetase catalisa a biossíntese de argininosuccinato a partir de citrulina e aspartato; argininosuccinato liase catalisa a biossíntese de arginina e fumarato pela conversão de argininosuccinato, e foi detectada em *Herpetomonas* e *Leptomonas* <sup>7, 11, 13, 17, 60</sup>.

A maioria dos tripanossomatídeos apresenta um ciclo de vida complexo, exibindo uma variedade de estágios que refletem transformações morfológicas, ultraestruturais, funcionais e bioquímicas <sup>119</sup>. Esses protozoários podem desenvolver seu ciclo de vida parcial (heteroxênicos) ou exclusivamente (monoxênicos) em um hospedeiro invertebrado, insetos principalmente das ordens Diptera, Heteroptera ou Siphonaptera <sup>81</sup>. Tripanossomatídeos monoxênicos pertencem aos gêneros *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallaceina*. Os tripanossomatídeos heteroxênicos alternam seu ciclo de vida em um vertebrado (*Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*) ou um vegetal (*Phytomonas*), além do inseto (vetor). Contudo, em contraste aos fortes efeitos que provocam em hospedeiros vertebrados ou vegetais, na maioria das associações estes parasitos não afetam o seu vetor <sup>4, 87</sup>.

O estudo preferencial de alguns tripanossomatídeos heteroxênicos se justifica pelo fato de serem agentes etiológicos de doenças importantes em humanos

e animais domésticos (*Leishmania*, agente etiológico de leishmanioses e *Trypanosoma*, agente de tripanossomíases), e plantas (*Phytomonas*)<sup>11, 23, 34, 96</sup>. *Phytomonas*, juntamente com as espécies monoxênicas são denominados tripanossomatídeos inferiores<sup>83</sup>. Esses protozoários constituem-se em modelos experimentais úteis que auxiliam na compreensão da biologia, fisiologia e relação parasita-hospedeiro de espécies patogênicas ao homem.

## 2. O gênero *Phytomonas*

O gênero *Phytomonas* engloba parasitas heteroxênicos isolados do floema, dos tubos lactíferos, frutos ou sementes de várias famílias de plantas com ampla distribuição geográfica e de grande importância econômica. Formas promastigotas (formas alongadas apresentando flagelo livre na extremidade anterior da célula e com cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo) do parasita podem ser transmitidas por insetos fitófagos, infectados pertencentes às Famílias *Coreidae*, *Lygaeidae*, *Pyrhocoridae* e *Pentatomidae* presentes na saliva no momento da picada<sup>7, 104</sup>.

A primeira descrição de um protozoário em vegetais ocorreu em 1909 quando Alexandre Lafont<sup>69</sup> observou que vasos lactíferos de plantas pertencentes à Família *Euphorbiaceae* abrigavam protozoários flagelados e alongados. Ainda em 1909, Donovan<sup>38</sup> detectou a presença desses microrganismos em *Euphorbia pilulifera* e sugeriu a utilização de um novo gênero, *Phytomonas*, para descrever e diferenciar protozoários parasitas de vegetais, daqueles encontrados em insetos e vertebrados<sup>11</sup>.

Em um período de aproximadamente 20 anos a partir da descrição de Lafont<sup>69</sup>, inúmeras publicações relataram a presença de protozoários flagelados em vegetais. No entanto, as descobertas nessa época referiam-se apenas a microrganismos encontrados no látex. Em 1931, Stahel<sup>122</sup> descreveu pela primeira vez a presença de tripanossomatídeos (*Phytomonas leptovosorum*) no floema do cafeeiro. Estes são responsáveis pela fitopatologia conhecida como necrose do floema do cafeeiro ou murcha do cafeeiro. A doença caracteriza-se por amarelamento e queda das folhas e redução da quantidade e tamanho das folhas novas. A planta pode morrer no período de três a doze meses após o surgimento dos sintomas. Outras fitopatologias causadas por tripanossomatídeos foram definidas somente 40 anos mais tarde, com o isolamento e identificação de *Phytomonas*

*staheli* no floema de coqueiros e de dendezeiros, sendo associados a síndromes conhecidas como *Hartrot*<sup>99</sup> ou *Marchitez sorpresiva*<sup>36</sup>, respectivamente. Estas doenças são caracterizadas pelo amarelamento e queda parcial ou total das folhas e frutos imaturos, necrose das inflorescências e raízes, e murchamento pela presença dos parasitos nas placas crivadas do floema das palmas. Em 1986, Kitajima e colaboradores<sup>66</sup> descreveram uma nova patologia na mandioca, conhecida como chochamento das raízes, que é desencadeada por *Phytomonas francai* encontrado no látex. Esta doença é caracterizada pela atrofia do sistema radicular e clorose das partes aéreas, além de perda significativa no teor de amido.

A presença de tripanossomatídeos em frutos também tem sido relatada por vários autores e esses protozoários multiplicam-se somente no local da picada<sup>62</sup>. A Tabela 1 mostra diferentes tipos de hospedeiros infectados por *Phytomonas* spp.

O isolamento de formas promastigotas a partir de plantas e insetos fitófagos não é um critério suficiente para classificação como *Phytomonas*, uma vez que esta morfologia pode ser encontrada em outros gêneros, como *Herpetomonas* e *Leptomonas*, e que também podem ser isolados dos mesmos hospedeiros. Além disso, infecções mistas e presença de outros gêneros de tripanossomatídeos em plantas também têm sido relatadas na literatura<sup>17, 27</sup>.

Vários critérios têm sido utilizados para classificar os tripanossomatídeos isolados de plantas, entre eles: análise do DNA ribossomal<sup>12,76,130</sup>; aglutinação com lectinas<sup>102,111</sup>; perfil de izoenzimas<sup>45,55,89</sup>; reatividade com anticorpos monoclonais<sup>129,131</sup>; análise do kDNA<sup>2,45,124</sup>; utilização da sequência do mini exon ou *spliced leader* RNA (SL-RNA) em reações de hibridação de DNA genômico<sup>132</sup> ou amplificação em cadeia pela polimerase<sup>116,117,125</sup>; perfil enzimático do ciclo da ureia<sup>7,17</sup>; atividade da enzima mitocondrial isopropil álcool desidrogenase<sup>86,134</sup>, região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal<sup>37</sup>.

Espécies de *Phytomonas* são capazes de converter amido e celulose em monossacarídeos que são utilizados como nutrientes. Durante o crescimento exponencial, esses microrganismos utilizam preferencialmente glicose como fonte de carbono e energia, gerando etanol e acetato como principais produtos finais do catabolismo<sup>25</sup>. Evidências filogenéticas obtidas a partir do estudo de genes que potencialmente codificam piruvato/indolpiruvato descarboxilases (enzimas chave para fermentação alcoólica e biossíntese de ácidos, respectivamente) sugerem a ocorrência de eventos de transferência horizontal de genes de gama-proteobactéria para o ancestral de tripanossomatídeos de plantas. Estas enzimas, cujos genes são bastante conservados entre as espécies de *Phytomonas*, apresentam alta

similaridade de sequência de aminoácidos com proteínas ortólogas dessas bactérias<sup>59, 106</sup>.

**Tabela 1.** Detecção e isolamento de tripanossomatídeos em plantas.

Hospedeiro	Referências
Amora ( <i>Morus</i> sp.)	Cavazzana <i>et al.</i> <sup>19</sup>
Bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> )	Conchon <i>et al.</i> <sup>27</sup>
Café ( <i>Coffea arabica</i> )	Stahel <sup>122</sup> ; Felts <sup>44</sup>
Caju ( <i>Anacardium occidentale</i> )	Conchon <i>et al.</i> <sup>27</sup>
Carambola ( <i>Averhoa carambola</i> )	Conchon <i>et al.</i> <sup>27</sup>
Caruru ( <i>Amaranthus retroflexus</i> )	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> <sup>109</sup>
Cherimolia ( <i>Annona cherimolia</i> )	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> <sup>110</sup>
Coqueiro ( <i>Cocos nucifera</i> )	Parthasarathy <i>et al.</i> <sup>99</sup>
Espécies de <i>Euphorbia</i>	Attias e De Souza <sup>6</sup> ; Fiorini <i>et al.</i> <sup>49</sup>
Feijão guandu ( <i>Cajanus flavus</i> )	Cavazzana <i>et al.</i> <sup>19</sup>
Jiló ( <i>Solanum gilo</i> )	Fiorini <i>et al.</i> <sup>47</sup>
Laranja ( <i>Citrus aurantium</i> )	Fiorini <i>et al.</i> <sup>48</sup> , Carrara <i>et al.</i> <sup>16</sup>
Leguminosas	Itow-Jankevicius <i>et al.</i> <sup>61</sup>
Maçã ( <i>Malus</i> sp.)	Cavazzana <i>et al.</i> <sup>20</sup>
Mandioca ( <i>Manihot palmata</i> ; <i>M. esculenta</i> )	Aragão <sup>5</sup> , Vainstein <i>et al.</i> <sup>135</sup>
Manga ( <i>Mangifera indica</i> )	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> <sup>109</sup>
Milho ( <i>Zea mays</i> )	Itow-Jankevicius <i>et al.</i> <sup>58</sup>
Palmeira	Dollet <i>et al.</i> <sup>35</sup>
Pêssego ( <i>Prunus persica</i> )	Conchon <i>et al.</i> <sup>27</sup>
Pitanga ( <i>Eugenia</i> spp.)	Cavazzana <i>et al.</i> <sup>21</sup>
Romã ( <i>Punica granatum</i> )	Catarino <i>et al.</i> <sup>18</sup>
Tangerina ( <i>Citrus reticulata</i> )	Conchon <i>et al.</i> <sup>27</sup>
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Gibbs <sup>51</sup> ; Fiorini <i>et al.</i> <sup>47, 49</sup> ; Jankevicius <i>et al.</i> <sup>62</sup> ; Sánchez-Moreno <i>et al.</i> <sup>110</sup>
<i>Trifolium glomeratum</i>	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> <sup>109</sup>
Urucum ( <i>Bixa orellana</i> )	Almeida <i>et al.</i> <sup>3</sup>
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	Carrara <i>et al.</i> <sup>16</sup>

Um grande número de genes correspondentes à enzimas do metabolismo de carboidratos foi detectado no genoma de *Phytomonas* spp.<sup>77, 78, 98, 106</sup>. Corroborando esses dados, altas taxas de transporte de glicose e frutose foram detectadas em *Phytomonas* Jma isolada do látex de *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae) <sup>14</sup>. Entretanto, somente uma ORF (*Open Reading Frame*) com homologia ao gene que codifica GT2, uma proteína transportadora de açúcar, de tripanossomatídeos de

mamíferos foi detectado nos genomas de *Phytomonas* HART1 isolada de coqueiro com *Hartrot* e *Phytomonas* EM1 isolada do látex de *Euphorbia* sp.<sup>106</sup>. Como em outros tripanossomatídeos, a glicose é degradada pela via de Embden-Meyerhof, na qual as primeiras reações ocorrem nos glicossomas<sup>112</sup>. A mitocôndria de *Phytomonas* spp. não contém um ciclo de Krebs funcional<sup>25, 112</sup> e genes que codificam citocromo *c* oxidase e redutase, e citocromo *b* (CyB) não foram detectados nos maxicírculos do kDNA desse tripanossomatídeo<sup>80, 91, 106</sup>. Contudo, o consumo de oxigênio é inibido por ácido salicílico hidroxâmico (SHAM), indicando a presença de uma ubiquinol-oxigênio oxireductase, também conhecida como terminal oxidase alternativa<sup>112, 136</sup>. Dessa forma, espécies de *Phytomonas*, assim como formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* (agente etiológico da tripanossomíase africana), utilizam a via glicolítica para suprir suas necessidades energéticas e o NADH pode ser oxidado na mitocôndria por mecanismo dependente das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente glicossomal e glicerol-3-fosfato desidrogenase FAD-dependente mitocondrial<sup>10</sup>.

O genoma de *Phytomonas* sp. pode variar de 18,7 a 27,5 Mb de DNA distribuídas entre 7 a 21 cromossomas com tamanhos variando entre 0,3 e 3 Mb<sup>77,78,106</sup>. Poucos genes parecem ser exclusivos de determinadas espécies, apesar da grande variabilidade de hospedeiros. Além disso, a sintonia da maioria desses genes é bastante conservada, e aqueles que codificam enzimas do metabolismo apresentam-se como cópia única. No genoma dos tripanossomatídeos patogênicos para mamíferos, foi observada uma grande unidade policistrônica central que contém genes bastante conservados em sintonia. Nestes parasitos, genes parálogos e componentes de famílias gênicas são predominantes, e genes cópia única parecem ocorrer em frequência relativamente pequena<sup>43, 106</sup>.

Como mencionado anteriormente, o genoma dos tripanossomatídeos é organizado em longas unidades policistrônicas, contendo vários genes em tandem separados por regiões intergênicas curtas<sup>64, 97</sup>. Com poucas exceções, esses genes não contêm intron<sup>100, 106</sup>. Após a transcrição, os pré-RNAs mensageiros (mRNAs) policistrônicos são processados por duas reações de clivagem, uma associada ao *trans-splicing* e outra a poliadenilação, originando mRNAs monocistrônicos. Embora haja certa controvérsia com relação à hierarquia desses eventos, várias evidências sugerem que ambas as reações estão acopladas<sup>8, 71, 82</sup>. O processamento da extremidade 5' do mRNA é realizado pela reação de *trans-splicing*<sup>73, 93, 126</sup>. Este mecanismo envolve a transferência de uma sequência contendo 39 nucleotídeos, denominada *spliced leader* (SL) ou mini-exon, presente na extremidade 5' do SL-

RNA (que em *Phytomonas* spp. corresponde a um transcrito de aproximadamente 100 nucleotídeos <sup>93</sup>). Como no *cis-splicing*, o dinucleotídeo AG, o qual é precedido por um motivo rico em polipirimidina (com cerca de 8 a 25 nucleotídeos), é o sítio acceptor do *trans-splicing* <sup>58, 73</sup>.

O mini-exon, com propriedades similares ao “cap” encontrado em mRNAs de outros eucariotos, contém uma modificação na extremidade 5' que consiste de um resíduo de 7-metilguanossina seguido dos quatro nucleotídeos metilados (“cap4”: m<sup>7</sup>GpppAmAmCmUm - 7-metil-guanosina-ppp-N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>, 2' - O-trimetiladenosina -p-2'-O-metil-adenosina -p-2'-O-metilcitosina -p-N<sup>3</sup>,2'-O-dimetiluridina) <sup>101</sup>.

A adição da cauda poliadenilada é essencial para o processamento completo do mRNA. Em tripanossomatídeos não há uma sequência sinal consenso conhecida para poliadenilação. Evidências sugerem que a reação ocorra dentro de uma região curta localizada à montante (cerca de 100 a 400 nucleotídeos) do motivo de polipirimidinas <sup>82</sup>.

O kDNA representa aproximadamente 30% do total de DNA de *Phytomonas* spp. <sup>108</sup> e é constituído por moléculas organizadas em mini (1,45 kb) e maxicírculos (31 kb) concatenados e associados às proteínas <sup>79</sup>. Os maxicírculos assemelham-se em função ao DNA mitocondrial encontrado em outros organismos, ou seja, codificam para RNA ribossomais e um pequeno número de proteínas que estão envolvidas principalmente no metabolismo energético da mitocôndria <sup>118</sup>. Em *Phytomonas* spp., genes que codificam várias subunidades de NADH desidrogenase, subunidade 6 de ATPase, RNA ribossomais e várias proteínas com funções desconhecidas estão presentes e são ativamente transcritos. Contudo, como mencionado anteriormente, os genes que codificam para citocromo *c* oxidase e redutase, e citocromo *b* estão ausentes dos maxicírculos desses parasitas <sup>80, 91, 106</sup>.

A expressão dos genes presentes nos maxicírculos é um processo complexo. A maturação do mRNA ocorre por um processo pós-transcricional denominado edição do RNA e em tripanossomatídeos envolve a inserção e, com menor frequência, deleção de uridinas em uma determinada posição nos transcritos primários <sup>123</sup>. A reação de edição do RNA conduz à formação de códons de iniciação e terminação da tradução, à correção da fase aberta de leitura, ou mesmo à criação de uma fase de leitura completa, garantindo a produção de uma proteína funcional. Os minicírculos, por sua vez, codificam para pequenos RNAs guias, que controlam a especificidade do processo de edição do RNA <sup>118</sup>.

## **2.1 *Phytomonas serpens***

*P. serpens* é um parasito isolado do tomate <sup>62</sup> e facilmente cultivado em meio complexo GYPMI (*Glucose Yeast Phosphate Meat Infusion*) <sup>60</sup>. Diferente de outros tripanossomatídeos<sup>24,28</sup>, estes parasitos não requerem heme para sua sobrevivência<sup>67</sup>. Esta molécula é um importante cofator de proteínas essenciais para diversos processos celulares <sup>84</sup>. De fato, *P. serpens* 9T não apresenta a maioria das hemeproteínas, não requerendo heme para o transporte de elétrons na cadeia respiratória, resposta ao estresse oxidativo e dessaturação de ácidos graxos. Embora apresente a enzima lanosterol 14-alfa demetilase, uma hemeproteína envolvida na biossíntese do ergosterol, em ausência de heme no meio de crescimento, estes parasitos são capazes de incorporar o precursor lanosterol exógeno em suas membranas celulares <sup>67</sup>.

Esses tripanossomatídeos de plantas podem apresentar tamanhos variados de acordo com o local do parasitismo no hospedeiro. Assim, formas promastigotas isoladas do intestino do inseto vetor apresentam tamanho entre 4,1 e 16  $\mu\text{m}$  de comprimento; dos túbulos de Malpighi, 5,6  $\mu\text{m}$  e das glândulas salivares entre 5,7, 24 e 80  $\mu\text{m}$ . Na fase de crescimento exponencial em cultura axênica foram observadas, predominantemente, formas com 10  $\mu\text{m}$  de comprimento, alongadas e sem torções no corpo, e na fase estacionária, formas promastigotas de 60  $\mu\text{m}$  (sem levar em consideração o flagelo) exibindo torções do corpo <sup>4, 62</sup>.

Jankevicius e colaboradores <sup>62</sup> determinaram o ciclo biológico de *P. serpens* utilizando tomate (*Solanum lycopersicum*) experimentalmente infectado e os insetos fitófagos *Phthia picta* e *Nezara viridula*. Os insetos alimentam-se dos frutos parasitados, tornando-se infectados pela via digestiva. Formas promastigotas do parasito colonizam o trato digestivo dos insetos, atravessam a barreira intestinal e atingem a face externa das glândulas salivares pela hemolinfa. Uma vez ligados a essa superfície, esses tripanossomatídeos atravessam o epitélio, alcançam o lúmen da glândula e são inoculados em frutos maduros através da saliva no momento da picada. Nestes hospedeiros, os tripanossomatídeos permanecem concentrados no local de inoculação.

A infecção induz a ativação da resposta celular do inseto *Oncopeltus fasciatus* (um modelo experimental de *P. serpens*), caracterizada pelo aumento no número de hemócitos circulantes. Estas células formam nódulos (múltiplos agregados celulares) que envolvem as formas promastigotas. Os parasitos são fagocitados pelos hemócitos, localizando-se no interior de vacúolos do tipo-parasitóforo e se multiplicam ativamente. Aproximadamente 6 horas pós-infecção, formas promastigotas podem ser detectadas na face externa das glândulas salivares <sup>4</sup>.

A ligação de *P. serpens* com a glândula salivar do inseto constitui-se em um evento importante para a transmissão do tripanossomatídeo para a planta hospedeira. Uma metaloprotease [polipeptídeo de 63 kDa que apresenta similaridade antigênica com a glicoproteína 63 (gp63) de *Leishmania* spp.]<sup>29</sup> e duas cisteína-proteases<sup>41, 113</sup> (polipeptídeos de 38 e 40 kDa que apresentam similaridade antigênica com cruzipaina, a principal cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*<sup>22,115</sup>, o agente etiológico da doença de Chagas<sup>23</sup>) presentes na superfície de formas promastigostas de *P. serpens* parecem ser importantes para o processo de adesão à glândula salivar do inseto. Anticorpos anti-gp63 de *Leishmania amazonensis*, bem como inibidores de cisteína-proteases ou anticorpos anti-cruzipaina inibem parcialmente a ligação do parasito à glândula salivar de *O. fasciatus*<sup>29, 41, 113</sup>. Por outro lado, um polipeptídeo com cerca de 130 kDa (apresenta similaridade com a subunidade beta3 da laminina de humanos) presente na glândula salivar deste inseto parece mediar a ligação com *P. serpens*<sup>31</sup>.

Monossacarídeos como arabinose, manose e galactose, assim como D-*N*-acetilglucosamina e D-*N*-acetilgalactose estão presentes na superfície celular do parasito<sup>1, 90</sup>, podendo ter um efetivo papel na interação com a planta hospedeira<sup>50</sup>. Sialoglicomoléculas também já foram detectadas na superfície de *Phytomonas* (*P. serpens* 9T, *P. françai*, *P. mcgheeii*, *Phytomonas* spp.)<sup>120</sup>. A presença destas moléculas tem sido correlacionada a importantes processos biológicos e patogênicos que envolvem interação célula-célula em diferentes organismos. Quando expostas na superfície celular, sialoglicomoléculas podem mascarar ou servir de sítios de reconhecimento/ligação entre células<sup>65</sup>.

Os estudos sobre a biologia molecular de *Phytomonas* spp. têm sido direcionados para taxonomia e identificação das espécies<sup>12, 45, 76, 116, 117, 125, 130, 132</sup>. Dessa forma, poucos genes desses tripanossomatídeos têm sido caracterizados até o momento. Pappas e colaboradores<sup>98</sup> obtiveram 2190 sequências nucleotídicas a partir de uma biblioteca de cDNA de *P. serpens* 10T isolada de tomate. Essas sequências resultaram em 697 grupamentos, sendo 452 *singletons* (sequências únicas) e 245 *contigs* (sequências múltiplas) que foram categorizadas de acordo com a função, baseando-se no banco de dados KOG (*eukaryotic orthologous groups*). Assim, 39,6% das sequências geradas mostraram similaridade às proteínas que participam do processo de tradução e biogênese, bem como na formação dos ribossomas.

Sequências nucleotídicas similares ao gene que codifica uma proteína ligante de Ca<sup>2+</sup> flagelar (FCaBP – *flagellar calcium-binding protein*) com massa molecular de

24 kDa de *T. cruzi* foram detectadas em vários tripanossomatídeos, inclusive *P. serpens* <sup>75</sup>. Esta proteína é altamente imunogênica e tem sido utilizada como antígeno para reações imunológicas visando diagnóstico <sup>52, 133</sup> e monitorar pacientes em tratamento da doença de Chagas <sup>68</sup>.

Arginina quinase de *P. serpens*, um polipeptídeo de cerca de 40 kDa, apresenta 72% de similaridade na sequência de aminoácidos com a proteína homóloga de *T. cruzi* <sup>15</sup>. Este polipeptídeo catalisa a reação reversível de *trans*-fosforilação entre *N*-fosfo-L-arginina e ATP na via de biossíntese de fosfoarginina. Embora amplamente distribuída entre diferentes organismos, esta enzima não foi detectada em vertebrados <sup>42</sup> e em espécies dos gêneros *Leishmania* e *Crithidia* <sup>15</sup>.

### **3. Reatividade imunológica cruzada entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi***

Em 1926, Noguchi <sup>92</sup> realizou testes sorológicos com o objetivo de diferenciar tripanossomatídeos de insetos, do gênero *Herpetomonas*, e várias espécies de *Leishmania*. Os resultados mostraram uma série de reações cruzadas entre os diferentes isolados analisados. Desde então, vários autores têm mostrado a presença de reatividade antigênica cruzada entre diferentes espécies de tripanossomatídeos <sup>9, 29, 39, 41, 46, 53, 54, 74, 103, 113, 114, 121</sup>.

Souza e colaboradores <sup>121</sup> imunizaram camundongos com tripanossomatídeos de insetos do gênero *Leptomonas* e posteriormente infectaram com doses letais de tripomastigotas de *T. cruzi*. Foi observada uma proteção parcial dos animais imunizados com redução de tripomastigotas sanguíneos e um aumento significativo da sobrevivência quando comparados aos controles não imunizados.

A presença das cisteína-proteases de 38 e 40 kDa de *P. serpens* foi detectada utilizando-se anticorpos policlonais contra cruzipaina <sup>113, 114</sup>. Em estratégia similar, D'Avila-Levy e colaboradores <sup>29, 114</sup> detectaram, por meio de anticorpos policlonais contra a gp63 de *L. amazonensis*, o polipeptídeo de 60 kDa com atividade de metalopeptidase no sobrenadante de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com fosfolipase C.

Vários autores utilizaram soro de pacientes com doença de Chagas para detectar antígenos comuns entre *T. cruzi* e tripanossomatídeos monoxênicos <sup>39, 74, 88</sup>. Lopes e colaboradores <sup>74</sup> mostraram por meio de reações de imunofluorescência, fixação de complemento e aglutinação direta que antígenos provenientes de

diferentes tripanossomatídeos inferiores reagem com soro desses pacientes. Antígenos de *Herpetomonas muscarum muscarum* apresentaram 100% de reatividade. Monteón e colaboradores <sup>88</sup> mostraram por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que antígenos de *Crithidia luciliae* apresentam alta reatividade com soro de pacientes com doença de Chagas. Elias e colaboradores <sup>40</sup> mostraram por meio de ELISA e citometria de fluxo que anticorpos presentes no soro de pacientes com Doença de Chagas também reconhecem as cisteína-proteases de 38 e 40 kDa presentes tanto na superfície quanto no citoplasma de formas promastigotas de *P. serpens*.

A ocorrência de antígenos comuns entre *T. cruzi* e *P. serpens* 15T, um isolado do tomate, tem sido alvo de estudo por nosso grupo de pesquisa. Linfócitos de camundongos BALB/c previamente imunizados com *P. serpens* 15T mostraram um elevado índice de linfoproliferação quando incubados em presença de antígenos de *T. cruzi* <sup>53</sup>. Também foi mostrado, por meio de imunofluorescência indireta, que soro de pacientes com doença de Chagas apresenta uma forte reatividade com *P. serpens* 15T. Camundongos BALB/c imunizados previamente com *P. serpens*, por via oral, e posteriormente desafiados com um inóculo letal de formas sanguíneas de *T. cruzi*, apresentaram aumento da sobrevivência e diminuição de tripomastigotas sanguíneos significativos quando comparados com os controles não imunizados <sup>9</sup>. Essa proteção parece ser dependente da produção de óxido nítrico, uma vez que camundongos deficientes de óxido nítrico sintase indutível apresentaram maior parasitemia e elevada taxa de mortalidade quando comparados com animais normais. A imunização com *P. serpens* não foi capaz de gerar qualquer tipo de reação inflamatória no tecido cardíaco, como ocorre com a inoculação de proteínas isoladas de *T. cruzi* <sup>103</sup>. Além disso, previne a trombocitopenia e leucopenia resultantes da infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *T. cruzi* <sup>30</sup>.

Uma análise proteômica de *P. serpens* 15T utilizando soro de pacientes crônicos com a doença de Chagas foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa com o objetivo de selecionar proteínas que podem participar da reatividade antigênica com *T. cruzi*. Neste sentido foi realizada uma eletroforese em gel bidimensional (2-DE) de extrato proteico total de *P. serpens* 15T e trinta e um peptídeos do parasito reconhecidos pelo soro foram analisados por espectrometria de massa (MS/MS). Os peptídeos identificados foram agrupados em categorias funcionais e a maioria participa do metabolismo celular <sup>54</sup>.

Calmodulina (CAM), uma proteína ligante de Ca<sup>2+</sup>, foi identificada entre os peptídeos analisados. Este polipeptídeo de aproximadamente 17 kDa apresenta

95% de similaridade na sequência de aminoácidos com a proteína homóloga de *T. cruzi* <sup>33</sup>. CAM é uma molécula sensora de cálcio multifuncional, que participa de diversos processos celulares, modulando a atividade de diferentes proteínas. Em *T. cruzi*, essa proteína parece estar envolvida no movimento flagelar <sup>94, 107</sup> e diferenciação celular <sup>70, 95</sup>.

A ocorrência de relação antigênica, bem como presença de vias metabólicas comuns entre *T. cruzi* e *P. serpens*, aliado ao fato de que esses parasitas de vegetais não se desenvolvem a 37 °C, multiplicam-se rapidamente e são facilmente cultivados *in vitro* <sup>34</sup>, são lisados pelo sistema complemento e induzem uma resposta imune específica implica em vários aspectos de interesse prático, tais como: obtenção e utilização de antígenos de microrganismos inócuos ao homem para diagnóstico imunológico da doença de Chagas, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de imunização contra a infecção por *T. cruzi*; estudos de novos alvos para desenvolvimento de antimicrobianos para o tratamento de doenças humanas e de plantas; utilização como sistema de expressão heteróloga de proteínas funcionais de tripanossomatídeos; e estudos da biologia e fisiologia de tripanossomatídeos <sup>63, 85</sup>.

#### 4. Referências

1. ABREU-FILHO B.A., DIAS FILHO B.P., VERMELHO A.B., JANKEVICIUS S.I., JANKEVICIUS J.V., DOS SANTOS R.L. Surface component characterization as taxonomic tools for *Phytomonas* spp. identification. **Parasitology Research**, v.87, p.138-144, 2001.
2. AHOMADEGBE J.C., DOLLET M., COULAUD D., GARGANI D., RIOU G. Kinetoplast DNA permits characterization of pathogenic plant trypanosomes of economic importance. **Biology of the Cell**, v.70, p.167-176, 1990.
3. ALMEIDA M.L., CAVAZZANA M.Jr, SANTOS M.A., ITOW-JANKEVICIUS S., JANKEVICIUS J.V., ATTIAS M., DE SOUZA W. Isolation, axenic cultivation and ultrastructural characterization of *Phytomonas* sp. in urucum (*Bixa orellana*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, p.135, 1990.
4. ALVES E SILVA T.L., VASCONCELLOS L.R., LOPES A.H., SOUTO-PADRÓN T. The immune response of hemocytes of the insect *Oncopeltus fasciatus* against the flagellate *Phytomonas serpens*. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72076, 2013.
5. ARAGÃO H.B. Sur um flagellé du latex de *Maniot palmat*, *Phytomonas françai*. **Comptes Rendus des Sceances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, v.97, p.1077-1088, 1927.
6. ATTIAS M., DE SOUZA W. Axenic cultivation and ultrastructural study of a *Phytomonas* sp. isolated from the milkweed plant *Euphorbia hyssopifolia*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 33, p.84-87, 1986.
7. BATISTOTI M., CAVAZZANA M. Jr, SERRANO M.G., OGATTA S.F., BACCAN G.C., JANKEVICIUS J.V., TEIXEIRA M.M., JANKEVICIUS S.I. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. **The Journal of Parasitology**, v.87, p.1335-1341, 2001.
8. BERBEROF M., VANHAMME L., PAYS E. *Trypanosoma brucei*: a preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. **Experimental Parasitology**, v.80, p.563-567, 1995.
9. BREGANÓ J.W., PICÃO R.C., GRAÇA V.K., MENOLLI R.A., ITOW-JANKEVICIUS S., PINGE-FILHO P., JANKEVICIUS J.V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are

- recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.39, p.257-264, 2003.
10. BRINGAUD F., RIVIERE L., COUSTOU V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.149, p. 1-9, 2006.
  11. CAMARGO E.P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, v.42, p.29-112, 1999.
  12. CAMARGO E.P., SBRAVATE C., TEIXEIRA M.M., ULIANA S.R.B., SOARES M.B.M., AFFONSO H.T., FLOETER-WINTER L.M. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. **The Journal of Parasitology**, v.78, p.40-48, 1992.
  13. CAMARGO E.P., SILVA S., ROITMAN I., DE SOUZA W., JANKEVICIUS J.V., DOLLET M. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **The Journal of Protozoology**, v. 34, p. 439-441, 1987.
  14. CANEPA G.E., CARRILLO C., ARMESTO A.R., BOUVIER L.A., MIRANDA M.R., PEREIRA C.A. *Phytomonas*: transport of amino acids, hexoses and polyamines. **Experimental Parasitology**, v.117, p.106-110, 2007.
  15. CANEPA G.E., CARRILLO C., MIRANDA M.R., SAYÉ M., PEREIRA C.A. Arginine kinase in *Phytomonas*, a trypanosomatid parasite of plants. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B Biochemistry & Molecular Biology**, v. 160, p. 40-43, 2011.
  16. CARRARA F.E., ITOW-JANKEVICIUS S., CAVAZZANA M.Jr, CATARINO L.M.G.M., UENO C.T., JANKEVICIUS J.V., KANESHIMA E.N., TAKIHATA J.T. Detection and *in vitro* cultivation of flagellate protozoa found in orange (*Citrus aurantium*) cultivar *pera* and in grape (*Vitis vinifera*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.241, 1992.
  17. CATARINO L.M.G.M., SERRANO M.G., CAVAZZANA M.Jr, ALMEIDA M.L., KANESHIMA E.K., CAMPANER M., JANKEVICIUS J.V., TEIXEIRA M.M., ITOW-JANKEVICIUS S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.201, p.65-72, 2001.
  18. CATARINO L.M.G.M., CAVAZZANA M.Jr, SANTOS M.A., UENO C.T., ITOW-JANKEVICIUS S., JANKEVICIUS J.V., ATTIAS M., DE SOUZA W. Axenic cultivation and ultrastructure of *Phytomonas* sp. from pomegranate (*Punica* sp.) and from phytophagous hemipteran *Leptoglossus* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.271, 1991.
  19. CAVAZZANA M.Jr, ALMEIDA M.L., GARCIA J.F., CATARINO L.M.G.M., ONO C.J., JANKEVICIUS J.V., ITOW JANKEVICIUS S. Isolation and cultivation of trypanosomatid from mulberry (*Morus* sp.) and “guandu” beans (*Cajanus flavus*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.282, 1993.
  20. CAVAZZANA M.Jr, BACCAN G.C., CAMILO S.B., TAGATA E., JANKEVICIUS J.V., ITOW-JANKEVICIUS S. Isolation and *in vitro* cultivation of trypanosomatids found in apple (*Malus* sp.). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, suppl. I, 246, 1995.
  21. CAVAZZANA M.Jr, UENO CT, KANESHIMA E.N., DOMENE G.T., JANKEVICIUS J.V., ITOW-JANKEVICIUS S. Detection and isolation of protozoa in pitanga fruit (*Eugenia* sp. - Myrtaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, suppl I, 1996.
  22. CAZZULO J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*, potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.1261-1271, 2002.
  23. CHAGAS C. Nova tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.
  24. CHANG K.P., TRAGER W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. **Science**, v. 183, p. 531-532, 1974.
  25. CHAUMONT F., SCHANCK A.N., BLUM J.J., OPPERDOES F.R. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.67, p.321-331, 1994.
  26. CLAYTON C.E., MICHELS P. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. **Parasitology Today**, v.12, p.465-471, 1996.
  27. CONCHON I., CAMPANER M., SBRAVAT C., CAMARGO E.P. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.36, p.412-414, 1989.
  28. CUPELLO M.P., SOUZA C.F., MENNA-BARRETO R.F., NOGUEIRA N.P., LARANJA G.A., SABINO K.C., COELHO M.G., OLIVEIRA M.M., PAES M.C. Trypanosomatid essential metabolic pathway: new approaches about heme fate in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, p. 216-221, 2014.
  29. D'AVILA-LEVY C.M., SANTOS L.O., MARINHO F.A., DIAS F.A., LOPES A.H., SANTOS A.L.S., BRANQUINHA M.H. gp-63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. **Current Microbiology**, v.52, p.439-444, 2006.
  30. DA SILVA R.V., MALVEZI A.D., AUGUSTO L.A.S., KIAN D., TATAKIHARA V.L., YAMAUCHI L.M., YAMADA-OGATTA S.F., RIZZO L.V., SCHENKMAN S., PINGE-FILHO P. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates

- thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v.8, p.e68299, 2013.
31. DE ALMEIDA DIAS F., SOUZA DOS SANTOS A.L., SANTOS LERY L.M., ALVES E SILVA T.L., OLIVEIRA M.M., BISCH P.M., SARAIVA E.M., SOUTO-PADRÓN T.C., LOPES A.H. Evidence that a laminin-like insect protein mediates early events in the interaction of a phytoparasite with its vector's salivary gland. **PLoS One**, v.7, p.e48170, 2012.
  32. DE SOUZA W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.1, p.3-24, 2002.
  33. DE SOUZA T.de.A., GRAÇA-DE SOUZA V.K., LANCHEROS C.A., MONTEIRO-GÓES V., KRIEGER M.A., GOLDENBERG S., YAMAUCHI L.M., YAMADA-OGATTA S.F. Identification, molecular and functional characterization of calmodulin gene of *Phytomonas serpens* 15T that shares high similarity with its pathogenic counterparts *Trypanosoma cruzi*. **The Protein Journal**, v.30, p.212-219, 2011.
  34. DOLLET M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*). **Annual Review of Phytopathology**, v.22, p.115-132, 1984.
  35. DOLLET M., GIANNOTTI J., OLLAGNIER M. Observation de protozoaires flagellés dans les tubes cribles de Palmiers à huile malades. **Comptes Rendus de l' Académie de Sciences Paris**, v.284, p.643-645, 1977.
  36. DOLLET M., LOPES G. Study of the association between flagellate protozoa and *Marchitez sorpresiva* in South America oil palms. **Oleagineux**, v.33, p.209-217, 1978.
  37. DOLLET M., STURM N. R., CAMPBELL D. A. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.12, p.299-308, 2012.
  38. DONOVAN C. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connection with the dog and the bug (*Conorrhinus*). **Lancet**, v.177, p.1495-1496, 1909.
  39. ELIAS C.G., AOR A.C., VALLE R.S., D'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.57, p.247-256, 2009.
  40. ELIAS C.G., CHAGAS M.G., SOUZA-GONÇALVES A.L., PASCARELLI B.M., D'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L. Differential expression of cruzipain- and gp63-like molecules in the phytoflagellate trypanosomatid *Phytomonas serpens* induced by exogenous proteins. **Experimental Parasitology**, v.130, p.13-21, 2012.
  41. ELIAS C.G., PEREIRA F.M., DIAS F.A., SILVA T.L., LOPES A.H., D'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L. Cysteine peptidases in the tomato trypanosomatid *Phytomonas serpens*: influence of growth conditions, similarities with cruzipain and secretion to the extracellular environment. **Experimental Parasitology**, v.120, p.343-352, 2008.
  42. ELLINGTON, W. R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. **Annual Review of Physiology**, v.63, p.289-325, 2001.
  43. EL-SAYED N.M., MYLER P.J., BLANDIN G., BERRIMAN M., CRABTREE J., AGGARWAL G., CALER E., RENAULD H., WORTHY E.A., HERTZ-FOWLER C., GHEDIN E., PEACOCK C., BARTHOLOMEU D.C., HAAS B.J., TRAN A.N., WORTMAN J.R., ALSMARK U.C., ANGIUOLI S., ANUPAMA A., BADGER J., BRINGAUD F., CADAG E., CARLTON J.M., CERQUEIRA G.C., CREASY T., DELCHER A.L., DJIKENG A., EMBLEY T.M., HAUSER C., IVENS A.C., KUMMERFELD S.K., PEREIRA-LEAL J.B., NILSSON D., PETERSON J., SALZBERG S.L., SHALLOM J., SILVA J.C., SUNDARAM J., WESTENBERGER S., WHITE O., MELVILLE S.E., DONELSON J.E., ANDERSSON B., STUART K.D., HALL N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v.309, p.404-409, 2005.
  44. FELTS J.H. *Coffea arabica*. **North Carolina Medical Journal**, v.42, p.281, 1981.
  45. FERNANDEZ-BECERRA C., OSUNA A., MULLER E., DOLLET M., SÁNCHEZ-MORENO M. Characterization of *Phytomonas* isolated from fruits by electrophoretic isoenzymes and kinetoplast-DNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.463-468, 1996.
  46. FERREIRA L.R., KESPER N., TEIXEIRA M.M., LAURENTI M.D., BARBIERI C.L., LINDOSO J.A., UMEZAWA E.S. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. **Acta Tropica**, v.131, p.41-46, 2014.
  47. FIORINI J.E., FARIA e SILVA P.M., BRAZIL R.P., ROITMAN I., ANGLUSTER J., DE SOUZA W., ESTEVES M.J.G. Detection of trypanosomatids in *Solanum gilo* and *S. lycopersicum* in Alfenas, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.33, 1986.
  48. FIORINI J.E., FIORINI C.M., DE PAULA K.F., PEDREIRA R.C., DE ALMEIDA D.C., BRAZIL R.P. Cultivation of a *Phytomonas* isolated from orange (*Citrus aurantium* L. var. Lumia) and *Leptoglossus stigma* (Hemiptera, Coreidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, p.134, 1990.
  49. FIORINI J.E., DE FARIA E SILVA P.M., BRAZIL R.P., ATTÍAS M., ESTEVES M.J.G., ANGLUSTER J. Axenic cultivation of a pathogenic *Phytomonas* species isolated from tomato fruit, and from its phytophagous insect vector, *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). **Cytobios**, v.75, p.163-170, 1993.

50. GAZZINELLI R.T., ROMANHA A.J., FONTES G., CHIARI E., GAZZINELLI G., BRENER Z. Distribution of carbohydrates recognized by the lectins *Euonymus europaeus* and concanavalin A in monoxenic and heteroxenic trypanosomatids. **The Journal of Protozoology**, v.38, p.320-325, 1991.
51. GIBBS A.J. *Leptomonas serpens* n sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. **Parasitology**, v.47, p.297-303, 1957.
52. GODSEL L.M., TIBBETTS R.S., OLSON C.L., CHAUDOIR B.M., ENGMAN D.M. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2082-2085, 1995.
53. GRAÇA V.K., JANKEVICIUS J.V. Avaliação da reatividade cruzada humoral e celular entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina, 2002. 60p.
54. GRAÇA-DE SOUZA V.K., GRAÇA-DE SOUZA V.K., MONTEIRO-GÓES V., MANQUE P., SOUZA T.A., CORRÊA P.R., BUCK G.A., ÁVILA A.R., YAMAUCHI L.M., PINGE-FILHO P., GOLDENBERG S., KRIEGER M.A., YAMADA-OGATTA S.F. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. **Biological Research**, v.43, p.233-241, 2010.
55. GUERRINI F., SEGUR C., GARGANI D., TIBAYRENC M., DOLLET M. An isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*: genetic, taxonomic and epidemiologic significance. **The Journal of Protozoology**, v.39, p.516-521, 1992.
56. GULL K. The biology of kinetoplastid parasites, insights and challenges from genomics and post-genomics. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.443-452, 2001.
57. HOARE C.A., WALLACE F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v.212, p.1385-1386, 1966.
58. HUANG J., VAN DER PLOEG L.H. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. **The EMBO Journal**, v.10, p.3877-3885, 1991.
59. IENNE S., PAPPAS G., BENABDELLAH K., GONZÁLEZ A., ZINGALES B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.12, p.539-548, 2012.
60. ITOW-JANKEVICIUS S., ALMEIDA M.L., JANKEVICIUS J.V., CAVAZZANA M.Jr, ATTIAS M., DE SOUZA W. Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* - Coreidae) and their experimental transmission. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.40, p.576-581, 1993.
61. ITOW-JANKEVICIUS S., JANKEVICIUS J.V., DUTRA MENEZES M.C.N., TORREZAN H.C., MENEZES J.R., REZENDE M.I. *Phytomonas* sp. found in leguminous crop. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, p.35, 1987.
62. JANKEVICIUS J.V., ITOW-JANKEVICIUS S., CAMPANER M., CONCHON I., MAEDA L., TEIXEIRA M.M., FREYMULLER E., CAMARGO E.P. The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. **The Journal of Protozoology**, v.36, p.265-271, 1989.
63. JASKOWSKA E., BUTLER C., PRESTON G., KELLY S. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments. **PLoS Pathogens**, v.11, p.e1004484, 2015.
64. JOHNSON P.J., KOOTER J.M., BORST P. Inactivation of transcription by UV radiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**, v.51, p.273-281, 1987.
65. KELM S., SCHAUER R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. **International Review of Cytology**, v.175, p.137-240, 1997.
66. KITAJIMA E.W., VAINSTEIN M.H., SILVEIRA J.M. Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo state, Brazil. **Phytopathology**, v.76, p.638-642, 1986.
67. KORENÝ L., SOBOTKA R., KORÁROVÁ J., GNIPOVÁ A., FLEGONTOV P., HORVÁTH A., OBORNÍK M., AYALA F.J., LUKES J. Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v.109, p.3808-3813, 2012.
68. KRAUTZ G.M., GALVÃO L.M., CANÇADO J.R., GUEVARA-ESPINOZA A., OUAISSI A., KRETTLI AU. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2086-2090, 1995.
69. LAFONT A. Sur la presence d'un parasite de la classe des flagellés dans le latex de *Euphorbia pilulifera*. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, v.66, p.1011-1013, 1909.
70. LAMMEL E.M., BARBIERI M.A., WILKOWSKY S.E., BERTINI F., ISOLA E.L. *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. **Experimental Parasitology**, v.83, p.240-249, 1996.
71. LEBOWITZ J.H., SMITH H.Q., RUSCHE L., BEVERLEY S.M. Coupling of poly A site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development**, v.7, p.996-1007, 1993.

72. LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R.3rd, LOM J., LYNN D., MEINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F.G. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**, v.27, p.37-38, 1980.
73. LIANG X., HARITAN A., ULIEL S., MICHAELI S. *Trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell**, v.2, p.830-840, 2003.
74. LOPES J.D., CAULADA Z., BARBIERI C.L., CAMARGO E.P. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.1183-1188, 1981.
75. MALDONADO R.A., LINSS J., THOMAZ N., OLSON C.L., ENGMAN D.M., GOLDENBERG S. Homologues of the 24-kDa flagellar Ca<sup>2+</sup>-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. **Experimental Parasitology**, v.86, p.200-205, 1997.
76. MARCHÉ S., ROTH C., PHILIPPE H., DOLLET M., BALTZ T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.71, p.15-26, 1995.
77. MARÍN C., ALBERGE B., DOLLET M., PAGÈS M., BASTIEN P. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). **Genomics**, v.91, p.88-93, 2008.
78. MARÍN C., DOLLET M., PAGÈS M., BASTIEN P. Large differences in the genome organization of different plant Trypanosomatid parasites (*Phytomonas* spp.) reveal wide evolutionary divergences between taxa. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.9, p.235-240, 2009.
79. MASLOV D.A., HOLLAR L., HAGHIGHAT P., NAWATHEAN P. Demonstration of mRNA editing and localization of guide RNA genes in kinetoplast-mitochondria of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.93, p.225-236, 1998.
80. MASLOV D.A., NAWATHEAN P., SCHEEL J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.99, p.207-221, 1999.
81. MASLOV D.A., VOTÝPKA J., YURCHENKO V., LUKEŠ J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, v.29, p.43-52, 2013.
82. MATTHEWS K.R., TSCHUDI C., ULLU E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & Development**, v.8, p.491-501, 1994.
83. MCGHEE R.B., COSGROVE W.B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological Review**, v.44, p.140-173, 1980.
84. MENSE S.M., ZHANG L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. **Cell Research**, v.16, p.681-692, 2006.
85. MIRANDA M.R., SAYÉ M., REIGADA C., CARRILLO C., PEREIRA C.A. *Phytomonas*: a non-pathogenic trypanosomatid model for functional expression of proteins. **Protein Expression and Purification**, v.114, p.44-47, 2015.
86. MOLINAS S.M., ALTABE S.G., OPPERDOES F.R., RIDER M.H., MICHELS P.A., UTTARO A.D. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.36169-36175, 2003.
87. MOLYNEUX D.H., STILES J.K. Trypanosomatid-vector interactions. **Annales de la Societé Belge de Médecine Tropicale**, v.71, p.151-166, 1991.
88. MONTEÓN V.M., GUZMÁN-ROJAS L., NEGRETE-GARCIA C., ROSALES-ENCINA J.L., LOPES P.A. Serodiagnosis of American trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.3316-3319, 1997.
89. MULLER E., GARGANI D., SCHAEFFER V., STEVENS J., FERNANDEZ-BECERRA C., SANCHEZ-MORENO M., DOLLET M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.). associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, p.425-434, 1994.
90. NAKAMURA C.V., ESTEVES M.J.G., ANDRADE A.F.B., ALVIANO C.S., DE SOUZA W., ANGLUSTER J. Cell surface saccharides in three *Phytomonas* species differing in host specificity. **The Journal of Protozoology**, v.39, p.303-309, 1992.
91. NAWATHEAN P., MASLOV D.A. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Current Genetics**, v.38, p.95-103, 2000.
92. NOGUCHI H. Comparative studies of Herpetomonads and Leishmanias. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. **The Journal of Experimental Medicine**, v.44, p.327-337, 1926.

93. NUNES L.R., TEIXEIRA M.M., CAMARGO E.P., BUCK G.A. Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.74, p.233-237, 1995.
94. OGUETA S.B., SOLARI A., TÉLLEZ-INÓN M.T. *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent protein kinase. **FEBS Letters**, v.337, p.293-297, 1994.
95. ORR G.A., TANOWITZ H.B., WITTNER M. *Trypanosoma cruzi*: stage expression of calmodulin-binding proteins. **Experimental Parasitology**, v.74, p.127-133, 1992.
96. PACHECO R.S., MARZOCHI M.C., PIRES M.Q., BRITO C.M., MADEIRA M. de F., BARBOSA-SANTOS E.G. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.531-537, 1998.
97. PALENCHAR J.B., BELLOFATTO V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.146, p.135-141, 2006.
98. PAPPAS G.J.Jr, BENABDELLAH K., ZINGALES B., GONZÁLEZ A. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.142, p.149-157, 2005.
99. PARTHASARATHY M.V., VAN SLOBBE W.G., SOUDANT C. Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. **Science**, v.192, p.1346-1348, 1976.
100. PAYS E. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends in Parasitology**, v.21, p.517-520, 2005.
101. PERRY K.L., WATKINS K.P., AGABIAN N. Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, p.8190-8194, 1987.
102. PETRY K., SCHOTTELIUS J., DOLLET M. Differentiation of *Phytomonas* sp. and lower trypanosomatids (*Herpetomonas*, *Crithidia*) by agglutination tests with lectins. **Parasitology Research**, v.74, p.1-4, 1987.
103. PINGE-FILHO P., PERON J.P., DE MOURA T.R., MENOLLI R.A., GRAÇA V.K., ESTEVÃO D., TADOKORO C.E., JANKEVICIUS J.V., RIZZO L.V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. **Immunology Letters**, v.96, p.283-290, 2005.
104. PODLIPAEV S. The more insect trypanosomatids under study the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.648-652, 2001.
105. PODLIPAEV S.A., FROLOV A.O., KOLESNIKOV A.A. *Proteomonas inconstant* sn. gen. n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a parasite of the bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae). **Parazitologija** (St. Petersburg), v.24, p.339-45, 1990.
106. PORCEL B.M., DENOEUDE F., OPPERDOES F., NOEL B., MADOU M.A., HAMMARTON T.C., FIELD M.C., DA SILVA C., COULOUX A., POULAIN J., KATINKA M., JABBARI K., AURY J.M., CAMPBELL D.A., CINTRON R., DICKENS N.J., DOCAMPO R., STURM N.R., KOUMANDOU V.L., FABRE S., FLEGONTOV P., LUKEŠ J., MICHAELI S., MOTTRAM J.C., SZŐÖR B., ZILBERSTEIN D., BRINGAUD F., WINCKER P., DOLLET M. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. **PLoS Genetics**, v.10, p.e1004007, 2014.
107. RIDGLEY E., WEBSTER P., PATTON C., RUBEN L. Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.109, p.195-201, 2001.
108. RIOU J.F., DOLLET M., AHOMADEGBE J.C., COULAUD D., RIOU G. Characterization of *Phytomonas* sp. kinetoplast DNA: a plant pathogenic trypanosomal species. **FEBS Letters**, v.213, p.304-308, 1987.
109. SÁNCHEZ-MORENO M., FERNANDEZ-BECERRA C., FERNANDEZ-RAMOS C., LUQUE F., RODRIGUEZ-CABEZAS M.N., DOLLET M., OSUNA A. Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. **Parasitology Research**, v.84, p.354-361, 1998.
110. SÁNCHEZ-MORENO M., FERNANDEZ-BECERRA C., MASCARO C., ROSALEZ M.J., DOLLET M., OSUNA A. Isolation, *in vitro* culture, ultrastructure study and, characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherymoyas (*Anona cherimolia*) in southeastern Spain. **Parasitology Research**, v.81, p.575-581, 1995a.
111. SÁNCHEZ-MORENO M., FERNANDEZ-BECERRA C., ENTRALA E., OPPERDOES F.R., DOLLET M., OSUNA A. *In vitro* culture of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by <sup>1</sup>H NMR. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.42, p.314-320, 1995b.
112. SÁNCHEZ-MORENO M., LASZTITY D., COPPENS I., OPPERDOES F. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.54, p.185-199, 1992.
113. SANTOS A.L., D'ÁVILA-LEVY C.M., DIAS F.A., RIBEIRO R.O., PEREIRA F.M., ELIAS C.G., SOUTO-PADRÓN T., LOPES A.H., ALVIANO C.S., BRANQUINHA M.H., SOARES R.M. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.47-56, 2006.

114. SANTOS A.L., D'ÁVILA-LEVY C.M., ELIAS C.G., VERMELHO A.B., BRANQUINHA M.H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v.9, p.915-921, 2007.
115. SCHARFSTEIN J., RODRIGUES M.M., ALVES C.A. DE SOUZA W., PREVIATO J.O., MENDONÇA-PREVIATO L. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. **Journal of Immunology**, v.131, p.972-976, 1983.
116. SERRANO M.G., NUNES L.R., CAMPANER M., BUCK G.A., CAMARGO E.P., TEIXEIRA M.M. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. **Experimental Parasitology**, v.91, p.268-279, 1999a.
117. SERRANO M.G., CAMPANER M., BUCK G.A., TEIXEIRA M.M., CAMARGO E.P. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p.241-246, 1999b.
118. SHAPIRO T.A., ENGLUND P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.117-143, 1995.
119. SOUTO-PADRÓN T. The surface charge of trypanosomatids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74, p.649-675, 2002.
120. SOUZA dos SANTOS A.L., ALVIANO C.S., de ARAÚJO SOARES R.M. Detection of sialoglycomolecules in five plant trypanosomatids and an insect phytophagous isolate. **FEMS Microbiology Letters**, v.214, p.19-23, 2002.
121. SOUZA M. do C., REIS A.P., DA SILVA W.D., BRENER Z. Mechanism of acquired immunity induced by "*Leptomonas pessoai*" against *Trypanosoma cruzi* in mice. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.21, p.579-584, 1974.
122. STAHEL G. Zur Kenntnis der Slebrohren Krankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Surinam. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.4, p.64-82, 1931.
123. STUART K., ALLEN T.E., HEIDMANN S., SEIWERT S.D. RNA editing in kinetoplastid protozoa. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.105-120, 1997.
124. STURM N.R., DOLLET M., LUKES J., CAMPBELL D.A. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) based on minicircle conserved region analysis. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.7, p.570-576, 2007.
125. STURM N.R., FERNANDES O., CAMPBELL D.A. The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. **FEMS Microbiology Letters**, v.130, p.177-182, 1995.
126. SUTTON R.E., BOOTHROYD J.C. Evidence for *trans*-splicing in trypanosomes. **Cell**, v.47, p.527-535, 1986.
127. SVOBODOVÁ M., ZÍDKOVÁ L., CEPICKA I., OBORNÍK M., LUKES J., VOTÝPKA J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.57, p.423-432, 2007.
128. TEIXEIRA M.M., BORGHESAN T.C., FERREIRA R.C., SANTOS M.A., TAKATA C.S., CAMPANER M., NUNES V.L., MILDRE R.V., DE SOUZA W., CAMARGO E.P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, v.162, p.503-524, 2011.
129. TEIXEIRA M.M., CAMARGO E.P. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.36, p.262-264, 1989.
130. TEIXEIRA M.M., CAMPANER M., CAMARGO E.P. Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA. **Parasitology Research**, v.80, p.512-516, 1994.
131. TEIXEIRA M.M., CAMPANER M., CAMARGO E.P. Characterization of the target antigens of *Phytomonas*-specific monoclonal antibodies. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.42, p.232-237, 1995.
132. TEIXEIRA M.M., SERRANO M.G., NUNES L.R., CAMPANER M., BUCK G.A., CAMARGO E.P. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. **Experimental Parasitology**, v.84, p.311-319, 1996.
133. UMEZAWA E.S., SILVEIRA J.F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.285-288, 1999.
134. UTTARO A.D., SÁNCHEZ-MORENO M., OPPERDOES F.R. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.90, p.337-342, 1997.
135. VAINSTEIN M.H., ROITMAN I., KITAJIMA E.W. Cultura de *Phytomonas* sp. isolada de mandioca com sintomas de chochamento das raízes. **Fitopatologia**, v.9, p.428, 1984.
136. VAN HELLEMOND J.J., SIMONS B., MILLENAAR F.F., TIELENS A.G. A gene encoding the plant-like alternative oxidase is present in *Phytomonas* but absent in *Leishmania* spp. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p.426-430, 1998.

# Capítulo 11

## Rotavirus

Flávio Lauretti<sup>1</sup>

Nayara Lopes<sup>1,2</sup>

Ligia Carla Faccin-Galhardi<sup>1</sup>

Rosa Elisa Carvalho Linhares<sup>1,2</sup>

Carlos Nozawa<sup>1,2</sup>

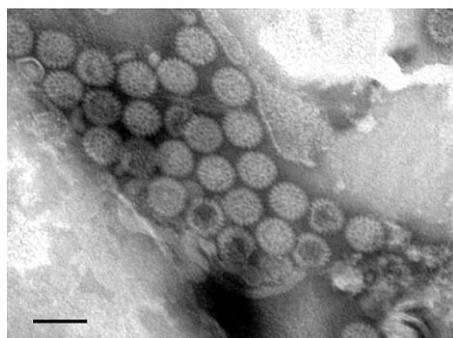
Universidade Estadual de Londrina – UEL

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

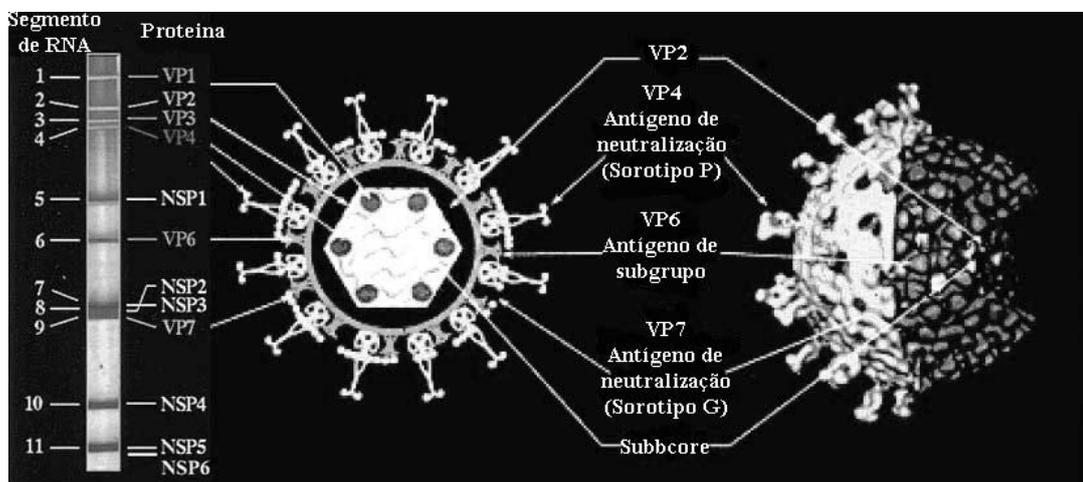
### 1. Introdução

Os rotavírus (RV) são os mais importantes agentes virais causadores de gastroenterite em crianças e animais jovens. Estima-se que sejam responsáveis por 440.000 mortes de crianças anualmente, especialmente nos países em desenvolvimento <sup>38</sup>. Foram descritos, inicialmente, no princípio da década de 60 por Adams e Kraft <sup>1</sup> que observaram, por microscopia eletrônica (ME), partículas virais em biópsia intestinal de camundongos jovens com diarreia, denominando-as de EDIM (*Epizootic Diarrhea of Infant Mice*). Durante as décadas de 60 e 70 vários vírus semelhantes foram descritos em outros animais e em humanos. Foi observado que todos estes agentes, até então descritos, possuíam o mesmo aspecto morfológico à ME e compartilhavam as mesmas características antigênicas. O nome rotavírus (rota do latim, roda) foi proposto por Flewett *et al.* <sup>19</sup>, devido ao aspecto de roda de carroça da partícula viral (Figura 1). Em 1979, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus classificou estes vírus como pertencentes ao então novo gênero *Rotavirus* dentro da família *Reoviridae* <sup>34</sup>.



**Figura 1.** Eletromicrografia de partículas de RV humanos (amostra HL141) por contraste negativo <sup>37</sup>. Barra: 100 nm.

Os RV são vírus não envelopados, de duplo capsídeo e que têm cerca de 70 nm de diâmetro (Figura 2). O genoma viral é constituído de 11 segmentos de RNA de fita-dupla (RNAfd). Cada segmento genômico é monocistrônico, exceto o décimo primeiro que codifica duas proteínas <sup>41</sup>.



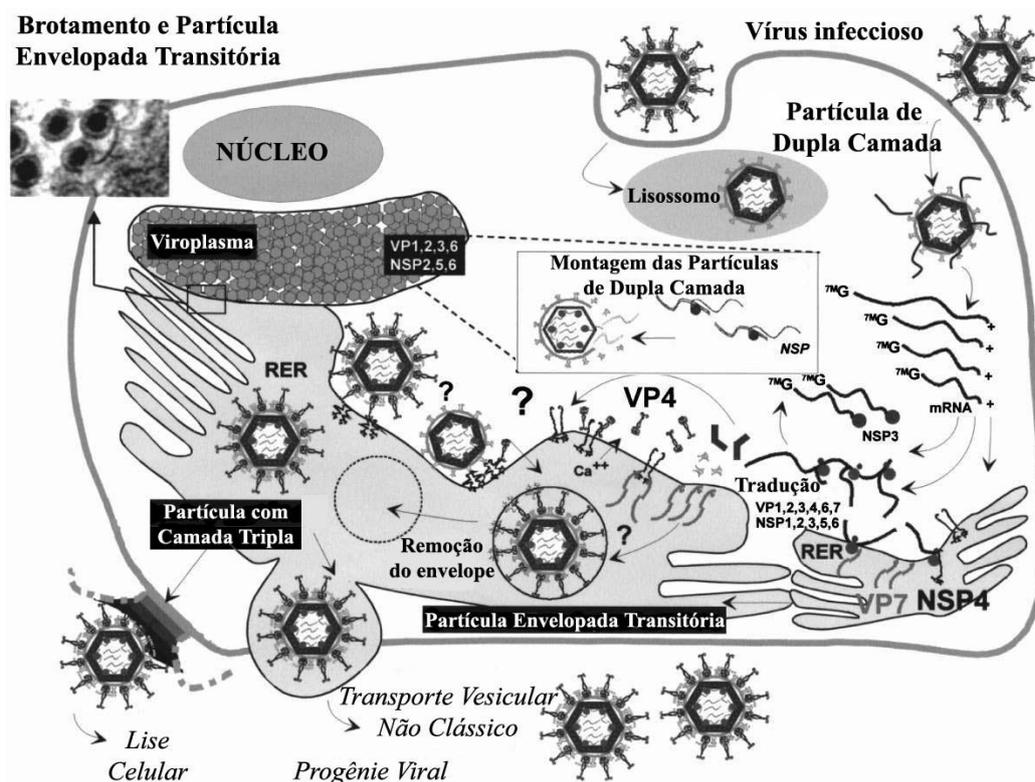
**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliácridamida do genoma RNAfd dos rotavírus, suas respectivas proteínas e representação esquemática do vírus <sup>15</sup>.

A replicação viral ocorre exclusivamente no citoplasma e ao todo são transcritas 12 proteínas, sendo 6 estruturais (VP1, 2, 3, 4, 6 e 7) e seis não estruturais (NSP 1 a 6). O cerne viral é formado pelas proteínas VP1, uma transcriptase com massa molecular (MM) de 125 kDa, VP2, que tem atividade de ligação inespecífica ao RNA com 94 kDa e VP3, com atividade de guanililtransferase com 88 kDa <sup>15</sup>. A camada mais externa do cerne é recoberta pela VP6 com 41 kDa, que constitui 51% das proteínas virais, e é antígeno determinante de grupo e subgrupo sorológico <sup>35</sup>. O capsídeo externo é formado pelas proteínas VP4 e VP7. A VP4 se projeta na superfície do vírus sob a forma de 60 espículas e com 88 kDa, é clivada por proteases, como a tripsina, dando origem a VP5\* e VP8\*, com 60 kDa e 28 kDa, respectivamente. A VP4 ainda é determinante de sorotipo P (**P**rotease sensível) e está envolvida em diversas propriedades como restrição do crescimento em cultura de células, aumento da infecciosidade pelo tratamento com protease, formação do plaque, hemaglutinação em algumas cepas e ligação à célula hospedeira <sup>31</sup>. A VP7 é uma proteína glicosilada de 38 kDa, que forma a superfície lisa da partícula; é determinante de sorotipo G (**G**licosilada); foi demonstrado que ela pode modular a VP4 na ligação a receptores, além de interagir com moléculas da superfície celular após ligação inicial da VP4 <sup>5, 15, 25</sup>.

## 2. Ciclo replicativo

Os RV têm um tropismo celular muito específico, eles infectam somente enterócitos do topo da vilosidade intestinal e, *in vitro*, ligam-se a várias linhagens celulares, mas infectam somente as de origem intestinal ou epitelial<sup>5</sup>. A replicação ocorre exclusivamente no citoplasma e está representada abaixo (Figura 3). Os primeiros estudos demonstraram, pela ME, que a entrada do RV ocorria através de vesículas, por endocitose. Entretanto, esta hipótese não foi sustentada porque o uso de substâncias que bloqueiam a endocitose não interferia na infecção e somente partículas tratadas com tripsina eram infecciosas<sup>15</sup>. A tripsina aumenta a infecciosidade e provavelmente a maioria das cepas de RV é dependente de tripsina. A tripsina não interfere na ligação do vírus, mas aumenta a capacidade de penetração na célula<sup>15</sup>.

A entrada do vírus na célula é mediada pelas proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 e os receptores celulares ainda são pouco conhecidos. Em geral, é aceito que o ácido N-acetilneuramínico ou, simplesmente, ácido siálico (Sia) é o receptor celular para algumas cepas de RV. Sugere-se que a porção VP8\* da VP4 interaja primeiro com um receptor que contenha Sia. Alternativamente, os gangliosídeos GM1, GM2 e GM3 são implicados como possíveis receptores<sup>23</sup>. Após interação inicial da VP8\*, a VP5\* se ligaria a um pós-receptor independente de Sia, provavelmente, as integrinas  $\alpha_2\beta_1$  e  $\alpha_4\beta_1$ . Muitas cepas animais e a maioria das cepas isoladas de humanos são independentes de Sia, e, provavelmente, utilizam estas integrinas como receptores celulares<sup>5,30</sup>. Foi demonstrado que a VP7 também medeia a interação dos RV com integrinas  $\alpha v\beta_3$  e  $\alpha x\beta_2$ <sup>30,49</sup>. A Hsc 70, um membro da família Hsp70 (*Heat shock protein*) das chaperonas, também é implicada como pós-receptor para os RV. Anticorpos contra Hsc 70 ou a incubação do RV com esta proteína inibem a infecção do vírus sem alterar a sua ligação nas células suscetíveis. Os gangliosídeos, integrinas e Hsc 70 são organizados na membrana da célula em microdomínios lipídicos<sup>30</sup>. Estes microdomínios lipídicos seriam “plataformas” para os RV entrarem nas células. O tratamento de células com substâncias que sequestram colesterol da membrana torna a célula refratária à infecção pelos RV<sup>32</sup>. Independente dos receptores usados, a interação vírus-receptor promove alterações conformacionais nas proteínas virais que levam a entrada na célula e a perda do capsídeo externo.



**Figura 3.** Ciclo replicativo do rotavírus mostrando as vias propostas de entrada do vírus na célula. a) desnudamento da partícula de tripla camada; b) partícula subviral onde é transcrito o RNAm; c) tradução das proteínas; d) montagem das partículas no viroplasma; e) transporte para o retículo endoplasmático rugoso (RER) com aquisição transitória de envelope; f) liberação da progênie viral <sup>15</sup>.

Durante a penetração do RV na célula hospedeira, o capsídeo externo é perdido, e o cerne permanece intacto como uma partícula ativa que sintetiza RNA mensageiro viral (RNAm). Os RNAm são traduzidos por ribossomos livres no citoplasma, exceto os RNAm das proteínas VP7 e NSP4 que são glicosiladas e, por isso, são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso (RER). As proteínas virais VP1, 2, 3, 6, NSP2, 5, 6 e o RNAm são transportados para o interior de vesículas, conhecidas como viroplasma, onde as partículas virais são montadas e ocorre a transcrição da fita complementar do genoma RNAdf. As partículas migram do viroplasma para o RER, momento em que ganham um envelope transitório que é perdido depois que a VP4 e VP7 são “montadas”, com o auxílio da NSP4, na camada externa do vírus e a progênie liberada por lise celular ou por vesículas através da membrana <sup>15</sup>.

### 3. Classificação

Os RV possuem três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo. Os grupos são determinados por especificidade sorológica da VP6, sendo sete os grupos, nomeados de A até G. O grupo A ainda pode ser subdividido em dois subgrupos, I e II, também determinados pela VP6 <sup>15</sup>.

Os RV do grupo A, os mais frequentes em humanos, possuem um sistema de classificação binário, semelhante ao do vírus influenza. As proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4, induzem a formação de anticorpos neutralizantes e permitem diferenciar sorotipos de VP7, ou sorotipos G (**G**licoproteína), e da VP4, ou sorotipos P (**P**rotease sensível). São 16 sorotipos G e 15 sorotipos P. Os *loci* genômicos de VP7 e VP4, ainda permitem classificar os RV em genótipos G e P. São 16 genótipos G completamente relacionados com os sorotipos G, e por outro lado, existem 28 genótipos P não relacionados com os sorotipos P<sup>13, 15, 22</sup>.

Além da sorologia e genotipagem, a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do RNAfd genômico, também é usada para caracterizar os RV. Os 11 segmentos têm MM que variam de 667 pares de base (pb) a 3.3 kpb e são enumerados de 1 a 11, segundo a ordem de migração no gel (Figura 2). Estes segmentos migram em quatro grupos, sendo o primeiro que contém os quatro primeiros segmentos de maior MM, o segundo grupo, com os segmentos 5 e 6, o terceiro grupo com os segmentos 7 a 9, e o quarto grupo, com os segmentos 10 e 11, de menor MM. A maioria das cepas de RV do grupo A tem perfil eletroforético 4:2:3:2 e ainda pode ser subdividida em dois perfis, curto e longo, que são determinados pela velocidade de migração dos segmentos 10 e 11, em relação aos demais segmentos. A maioria das cepas do subgrupo sorológico I tem perfil eletroforético curto e do subgrupo II é de perfil longo <sup>15</sup>.

Pela eletroferotipagem é possível fazer o diagnóstico, detectar infecções mistas, infecções interespecie, recombinações e rearranjos no genoma viral <sup>27, 42</sup>.

### 4. Epidemiologia

A gastroenterite por RV é mais comum em crianças com idade entre seis e vinte quatro meses. No mundo, estima-se que 95 % das crianças até os cinco anos de idade serão infectadas, pelo menos uma vez <sup>38</sup>. Abaixo dos seis meses as crianças estão menos sujeitas a desenvolver diarreia, provavelmente, pela proteção conferida pela amamentação ou pelo epitélio intestinal ainda imaturo <sup>8</sup>. Infecções

subsequentes conferem proteção aos sintomas da diarreia, por este motivo, a diarreia por RV é menos frequente em crianças maiores que cinco anos <sup>48</sup>. As infecções em adultos são geralmente subclínicas, ocasionalmente, ocorre diarreia em pais de crianças infectadas, pacientes imunocomprometidos, idosos e viajantes<sup>40</sup>.

Uma das propriedades epidemiológicas mais salientes da diarreia por RV é a sazonalidade. Nos países de clima temperado são observados picos durante o inverno, enquanto que no verão, os casos são menos frequentes. Nos países de clima tropical, a doença ocorre quase o ano todo, embora possam ocorrer picos nos meses de clima mais frio em determinadas regiões <sup>4</sup>.

A via de transmissão é fecal-oral, porém, mesmo em países com padrão sócioeconômico elevado os rotavírus ainda são a maior causa de hospitalização infantil associada à diarreia. Por isso, outras vias de transmissão podem estar envolvidas <sup>18</sup>.

Durante a fase aguda, as crianças infectadas excretam mais de 100 bilhões de partículas por grama de fezes. A excreção do vírus pode começar antes do início dos sintomas e persistir por até 10 dias <sup>6</sup>. O vírus é altamente contagioso e infeccioso em baixas doses, além de ser estável nas fezes por meses <sup>18, 43</sup>. Todas essas propriedades conferem ao vírus uma alta taxa de morbidade mundial.

A maioria das infecções em humanos é causada pelos RV do grupo A. Os RV do grupo B causaram grandes epidemias de diarreia em adultos na China na década de 80, acometendo mais de um milhão de pessoas e foi detectado em casos esporádicos de diarreia aguda em adultos e crianças na Índia, durante 1997 a 2001<sup>45</sup>. O grupo C foi detectado, inicialmente, em suínos em 1980 e hoje é encontrado em surtos esporádicos de diarreia em adultos e crianças em vários países do mundo, inclusive no Brasil, onde já foi detectado no Rio de Janeiro, Belém, São Paulo, Goiânia e Londrina <sup>47</sup>. Os demais grupos foram encontrados somente em animais <sup>25</sup>.

Ainda com relação ao grupo A, onze sorotipos P e dez sorotipos G têm sido detectados em humanos. Entretanto, no mundo, 96% das infecções são provocadas por quatro cepas: G1, G3 e G4, combinados com P1A[8] e G2, combinado com P1B[4]. A distribuição das cepas pode variar a cada ano de acordo com os aspectos temporais e locais. A cepa mais frequentemente detectada mundialmente é P[8]G1, mas, na Índia, por exemplo, os sorotipos G9 e G2 são os mais prevalentes <sup>2,24,36</sup>.

## 5. Diagnóstico laboratorial

As fezes do primeiro ao quarto dia de diarreia são ideais para detecção do vírus, mas em alguns casos a eliminação de partículas virais pode persistir por até três semanas. A ME foi a primeira técnica usada para diagnóstico e ainda é muito empregada devido a sua especificidade e rapidez. Com o auxílio da ME é possível detectar os RV em 80% a 90% das fezes de indivíduos infectados <sup>25</sup>.

A detecção de antígenos virais nas fezes por imunoenensaio enzimático (IE) é uma das técnicas mais difundidas. É altamente sensível e não necessita de equipamentos especializados, além de possuir controle interno contra reações cruzadas. Atualmente existem *kits* de IE para detecção de RV dos Grupos B e C <sup>25</sup>. Outras técnicas como a aglutinação de látex e imunocromatografia também são usadas no diagnóstico; elas permitem a detecção de cepas circulantes, do grupo A, e possuem sensibilidade semelhante ao IE, além de serem rápidas e de simples execução <sup>36,40</sup>. A detecção do RNA viral por EGPA, hibridação do RNA viral com sondas e a reação em cadeia da polimerase associada à transcriptase reversa (RT-PCR) são provas moleculares também empregadas para o diagnóstico e caracterização dos rotavírus. A hibridação é 10 a 100 vezes mais sensível que o IE. A RT-PCR é 5.000 e 100.000 vezes mais sensível que a hibridação e a EGPA, respectivamente <sup>25</sup>.

Também é possível isolar os RV em culturas de células. O isolamento permite desde a sorotipagem, utilizando testes de neutralização, à adaptação de cepa para vários estudos. As linhagens celulares mais empregadas são as de origem renais de macaco, MA-104 e LLC-MK<sub>2</sub>, e de carcinoma de cólon intestinal humano, Caco-2. O efeito citopático do vírus em MA-104 é bem característico, com aumento de refringência, seguido de redução do volume citoplasmático, com formação de grumos celulares e células repuxadas, com distribuição focal <sup>16, 29</sup>.

## 6. Imunidade

Os anticorpos do soro e do lúmen intestinal desempenham um papel importante tanto na proteção à infecção quanto no desenvolvimento de diarreia por RV. Em crianças menores de 18 meses, a pré-existência de IgA anti-RV nas fezes em título maior que 1:20 e 1:80, confere proteção contra diarreia e a infecção, respectivamente <sup>33</sup>. Da mesma maneira, anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus no soro também estão relacionados com a proteção à infecção e doença <sup>33</sup>.

A infecção natural ou a vacinação conferem proteção cruzada a outras cepas de RV. Voluntários infectados com o RV humano sorotipo G1 foram protegidos da diarreia pela pré-existência de anticorpos contra o sorotipo G2. Ainda neste estudo, os pacientes que tiveram diarreia desenvolveram anticorpos neutralizantes séricos contra a cepa administrada e também contra os sorotipos G2 e G6<sup>26</sup>. A proteção contra a reinfecção é conferida, principalmente, por anticorpos anti-VP4 e VP7. As cepas homólogas são mais potentes que as cepas heterólogas para induzir resposta humoral local contra a reinfecção. A importância dos anticorpos homólogos e heterólogos também é sustentada por estudos em suínos, camundongos, coelhos e bois<sup>25</sup>.

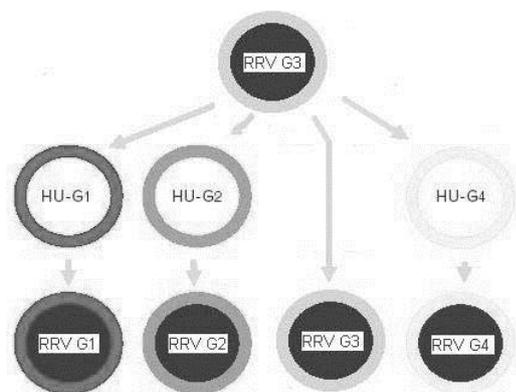
As VP4 e VP7 induzem, de maneira independente, a formação de anticorpos neutralizantes. Como consequência, cada uma dessas proteínas do capsídeo externo desempenha um papel na proteção à doença. Até o momento, não se sabe qual a proteína de superfície e que região desta proteína é mais eficiente na indução de imunidade protetora. Anticorpos IgA anti-VP6 também inativam os RV intracelulares, durante o processo de transcitose da IgA<sup>25</sup>.

A imunidade celular também tem sido estudada na infecção pelo RV, em modelos animais e humanos. A maioria dos estudos é desenvolvida em camundongos e aponta para a importância dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e resposta MHC classe I. Após a primeira infecção, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> conferem proteção contra a reinfecção por duas semanas. Esta proteção vai diminuindo com o passar do tempo e pode durar até oito meses<sup>25</sup>.

## **7. Vacina**

A infecção natural por RV não confere proteção completa contra a reinfecção ou diarreia leve, portanto, a vacina é fundamental para proteção. O objetivo de uma vacina deve ser a prevenção da diarreia por RV durante os dois primeiros anos de vida, período que esse quadro clínico é mais sério<sup>25</sup>. As primeiras cepas candidatas a vacina, derivadas do RV bovino (RIT 4237 e WC3), atenuadas em cultura de células, foram desenvolvidas e testadas na década de 80. Estas vacinas, administradas por via oral, foram testadas em vários países, e apresentaram modesta eficácia contra a diarreia leve, porém, eficazes na diarreia severa. Apesar dos esforços, estas vacinas foram abandonadas após insucessos em vários países<sup>8,21,38</sup>. Seguiu-se ao desenvolvimento de outra vacina, semelhante à RIT e WC3, derivada da cepa de RV símio, RRV, também atenuada em cultura de células.

A RRV também apresentou resultados variáveis dependendo, em parte, dos sorotipos circulantes nos locais de testes. Esta foi, posteriormente, modificada por recombinação (Figura 4), com a adição de outros três sorotipos humanos mais comuns, G1, G2 e G4, criando a RRV-TV (*Rhesus Rotavirus Tetravalent Vaccine*)<sup>38</sup>.



**Figura 4.** Desenvolvimento da vacina recombinante RRV-TV. O RV símio cepa RRV sorotipo G3 é cultivado com os RV humanos (HRV) cepas: D sorotipo G1, DS1 sorotipo G2 e ST3 sorotipo G4, produzindo recombinantes RRV x HRV. Cada partícula recombinante possui o gene da VP 7 dos respectivos HRV e os outros 10 segmentos do RRV. Modificado de Parashar et al.<sup>36</sup>

A RRV-TV foi eficaz em testes em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento, demonstrando alto nível de proteção (>90%) contra diarreia severa<sup>18</sup>. Finalmente, em 1998, foi licenciada nos EUA, com o nome de Rotashield. Esta vacina chegou a ser testada no Brasil, mas um ano após o licenciamento nos EUA, a vacina foi associada a 15 casos de intussuscepção tendo sido reprovada e não mais recomendada<sup>11, 28</sup>. Atualmente, pretende-se reintroduzir a vacina<sup>8, 21, 38</sup>. Em 2000, foi licenciada na China uma vacina monovalente derivada de RV de carneiro cepa LLR sorotipo G10. Embora não faça parte do calendário chinês de imunizações, esta vacina é usada em várias regiões daquele país<sup>21</sup>.

Duas novas vacinas foram recentemente desenvolvidas com metodologias diferentes. A Rotateq, uma vacina oral constituída de cinco cepas recombinantes do RV bovino, WC3, com RV humanos sorotipos G1 a G4 e G6 P 1A. Estes são os sorotipos mais comuns no mundo e testes demonstraram segurança e alta eficiência, protegendo contra 74% dos casos de diarreia<sup>14, 21</sup>. A outra vacina desenvolvida foi a Rotarix, uma vacina monovalente de RV humano sorotipo G1, o mais frequente no mundo. Esta vacina apresentou boa segurança e eficácia de 85% na proteção contra diarreia severa, inclusive contra os sorotipos G2 e G9. A vacina foi testada em vários países, inclusive no Brasil, onde foi licenciada em 2005 e adotada no calendário de imunizações desde 2006<sup>7</sup>. Outros três candidatos à vacina estão em triagem clínica ou processo de licenciamento<sup>21</sup>.

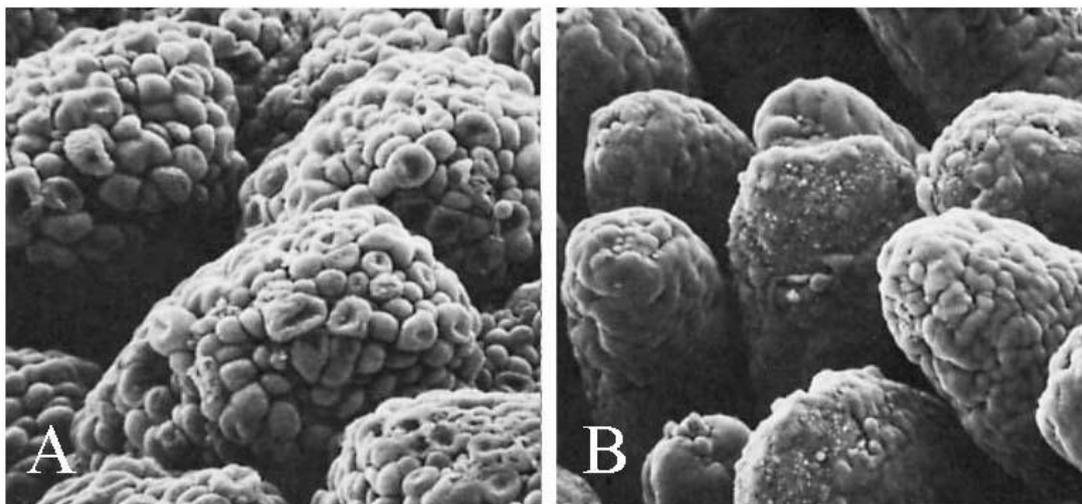
Vacinas experimentais estão sendo desenvolvidas com a utilização de metodologias alternativas, tais como: o uso de vírus inativado, proteínas virais recombinantes, partículas semelhantes a vírus e DNA que expressa genes de RV.

## **8. Patogenia e citopatogenia**

A patofisiologia da diarreia por RV tem sido estudada, primariamente, em modelos animais. As maiores alterações são observadas na porção superior do intestino delgado e são, geralmente, discretas ou imperceptíveis<sup>42</sup>. Os RV infectam enterócitos maduros no topo das vilosidades intestinais. Estas células não são proliferativas e têm as funções de secreção e absorção. Durante a infecção, o epitélio colunar se torna cuboide, com encurtamento e achatamento das microvilosidades (Figura 4), ocorre aumento na permeabilidade do epitélio, diminuição da atividade da Na, K ATPase e co-transporte de sódio-glicose. Ocorre ainda diminuição da atividade de dissacaridasas como maltase, lactase e sacarase e ainda, inversão do transporte de fluidos do tecido para a luz intestinal. Todas essas alterações promovem diarreia profusa<sup>31</sup>. Embora a má absorção seja geralmente aceita como mecanismo da diarreia induzida pelo RV, outros fatores também estão sendo considerados. A administração oral em camundongos de NSP4 purificada promove aumento da secreção de Cl-dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e diminuição da absorção de Na<sup>+</sup> e água. Este efeito é semelhante à enterotoxina termoestável (ST) de *Escherichia coli*. Suspeita-se que a NSP4 e a inflamação promovida pela infecção estimulem o sistema nervoso entérico aumentando a motilidade e diminuindo o tempo de trânsito intestinal<sup>31</sup>.

A patogenia dos RV depende de múltiplos fatores virais e do hospedeiro. Vários fatores do hospedeiro afetam a severidade da diarreia. A má nutrição agrava a diarreia, retarda a recuperação do intestino e modifica a resposta inflamatória<sup>50</sup>. A idade é um fator preponderante na diarreia por RV. Em neonatos, até os seis meses, as infecções geralmente são assintomáticas, provavelmente devido a anticorpos maternos adquiridos durante a amamentação, imaturidade do epitélio intestinal e baixa secreção de proteases intestinais, importantes para ativação da infecciosidade do vírus pela clivagem de VP4<sup>8,9</sup>. Após o período de maior incidência da doença, entre seis meses e dois anos de idade, as infecções sintomáticas diminuem em frequência, devido à imunidade e outros fatores do hospedeiro. A

secreção intestinal de mucinas, taxa de reposição do epitélio intestinal e absorção de fluidos são todos dependentes da idade e afetam a severidade da diarreia <sup>42</sup>.



**Figura 5.** Micrografia eletrônica de varredura do tecido intestinal de bezerro não infectado **(A)**, cujas vilosidades, em condições normais, se apresentam com células epiteliais arredondadas e ressaltadas e **(B)**, 30 minutos após o início da diarreia por RV, com vilosidades encurtadas e desnudadas <sup>25</sup>.

Já foram relatados casos de disseminação extraintestinal após infecção por RV em humanos e animais infectados experimentalmente <sup>42</sup>. Os RV foram encontrados no fígado de uma criança imunodeficiente e após casos de diarreia fatal <sup>20</sup>. Os RV do grupo C foram associados a atresia biliar em crianças <sup>44</sup>. Embora a replicação do vírus tenha sido mostrada no fígado de uma criança imunodeficiente, a disseminação extraintestinal é rara e é provável que estes achados sejam em decorrência da viremia <sup>42</sup>.

Alguns genes do RV têm sido associados com a habilidade de causar doença ou serem patogênicos em cultura de células. As proteínas não estruturais NSP1, NSP2 e NSP4 estão envolvidas na virulência em camundongos e as proteínas estruturais VP3 e VP7 em suínos. A VP4 está envolvida com inúmeras propriedades *in vitro*, incluindo restrição do crescimento em cultura de células, infecciosidade aumentada pelo tratamento com protease, formação do plaquete, ligação à célula, e virulência e patogenicidade em camundongos. Entretanto, não há um único gene responsável pela virulência, aparentemente, o(s) gene(s) responsável(eis) varia(m) entre as cepas e entre os hospedeiros <sup>9</sup>.

Embora muitos aspectos da citopatogenia dos RV tenham sido estudados e estabelecidos, o mecanismo de morte celular induzida pelo vírus permanece incerto.

Neste aspecto, a morte celular é discutida de maneira dicotômica entre apoptose e necrose. A apoptose é um processo ativo e programado de desmantelamento da célula que evita a inflamação. Por outro lado, a necrose é um processo passivo e acidental, resultante de perturbação no meio, com liberação descontrolada de conteúdo celular pró-inflamatório<sup>17</sup>. Na infecção experimental em cultura de células foram demonstrados, além de arredondamento celular e desorganização do citoesqueleto, os seguintes aspectos: formação de vacúolos citoplasmáticos, perda da integridade da membrana para cátions e macromoléculas, aumento da concentração de Ca<sup>++</sup> intracelular, consumo de ATP e liberação do conteúdo da célula. Estes achados sugerem que a morte celular, após infecção por RV, ocorre por necrose<sup>10,42</sup>. Entretanto, alterações citopatológicas que são próprias de apoptose, como condensação da cromatina, formação de fragmentos do DNA associados a histonas e dano na membrana da mitocôndria com liberação de citocromo C, também foram demonstrados em células de carcinoma de cólon intestinal humano Caco-2 e HT-29, infectadas com RV<sup>12, 46</sup>.

Embora os trabalhos com RV e outros patógenos descrevam os mecanismos de morte como processos separados e independentes, observações recentes não sustentam esse paradigma. Dependendo da intensidade do estímulo, estado de diferenciação ou ativação da célula, vários tipos de morte podem ser observados simultaneamente<sup>3, 17</sup>. Uma pequena porcentagem de células com fragmentação nuclear sugestiva de apoptose foi demonstrada durante a necrose de células MA-104 infectadas com RV<sup>10</sup>. O aumento do Ca<sup>++</sup> intracelular durante a infecção por RV está relacionado com a necrose em células MA-104 e também com apoptose em Caco2<sup>12, 39</sup>. Portanto, o mecanismo de morte da célula na infecção por RV ainda permanece controverso. A compreensão destes mecanismos tem papel fundamental na patogênese da diarreia causada por RV.

## 9. Referências

1. ADAMS W.R., KRAFT L.M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v.141, p.359-360, 1963.
2. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Prevention of Rotavirus Disease: Guidelines for use of rotavirus vaccine. **Pediatrics**, v.119, p.171-182, 2007.
3. ANKARCRONA M., DYPBUKT J.M., BONFOCO E., ZHIVOTOVSKY B., ORRENIUS S., LIPTON S.A., NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v.15, p.961-973, 1995.
4. ANSARI S.A., SPRINGTHORPE V.S., SATTAR S.A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Reviews of Infectious Diseases**, v.13, p.448-461, 1991.

5. ARIAS C.F., ISA P., GUERRERO C.A., MÉNDEZ E., ZÁRATE S., LÓPEZ T., ESPINOSA R., ROMERO P., LÓPEZ S. Molecular biology of Rotavirus cell entry. **Archives of Medical Research**, v.33, p.356-361, 2002.
6. BISHOP R.F. Natural history of human rotavirus infection. **Archives of Virology, supplement**, v.12, p.119-128, 1996.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH. **Informe Técnico**, Brasília, v.1, n.36, 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_rotavirus2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus2.pdf)>. Acesso em: 06 dez. 2007.
8. BRESEE J.S., PARASHAR U.D., WIDDOWSON M., GENTSCH J.R., STEELE A.D., GLASS R.I. Update on rotavirus vaccines. **Pediatrics Infectious Disease Journal**, v.24, p.947-952, 2005.
9. BURKE B., DESSELBERGER U. Rotavirus pathogenesis. **Virology**, v.218, p.299-305, 1996.
10. CASTILHO J.G., BOTELHO M.V.J., LAURETTI F., TANIWAKI N., LINHARES R.E.C., NOZAWA C.M. The *in vitro* cytopathology of a porcine and the simian (SA-11) strains of rotavirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.1-5, 2004.
11. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998-1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, United States, v.27, p.577-581, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/mm4827a1.htm>>. Acesso em: 06 dez. 2007.
12. CHAÏBI C., COTTE-LAFFITTE J., SANDRÉ C., ESCLATINE A., SERVIN A.L., QUÉRO A., GÉNITEAU-LEGENDRE M. Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. **Virology**, v.322, p.480-490, 2005.
13. CHAN-IT W., KHAMRIN P., SAEKHOW P., PANTIP C., THONGPRACHUM A., PEERAKOME S., USHIJIMA H., MANEEKARN N. Multiple combination of P[13]-like genotype with G3, G4 and G5 in porcine rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1169-1173, 2008.
14. CLARK H.F., OFFIT P.A., PLOTKIN S.A., HEATON P.M. The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (Strain WC3) -human rotavirus reassortants. **Pediatrics Infectious Disease Journal**, v.25, p.577-583, 2006.
15. ESTES M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M. **Fields Virology**, 4.ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. p.1747-1785.
16. ESTES M.K., GRAHAM D.Y., GERBA C.P., SMITH E.M. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. **Journal of Virology**, v.31, p.810-815, 1979.
17. FINK S.L., COOKSON B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v.73, p.1907-1916, 2005.
18. FISCHER T.K., BRESEE J.S., GLASS R.I. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. **Vaccine**, v.22, p.49-54, 2004.
19. FLEWETT T.H., BAVIES H., BRYDEN A.S. Diagnostic electron microscopy of feces. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. **Journal of Clinical Pathology**, v.27, p.608-614, 1974.
20. GILGER M.A., MATSON D.O., CONNER M.E., ROSENBLATT H.M., FINEGOLD M.J., ESTES M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **Journal of Pediatrics**, v.120, p.912-917, 1992.
21. GLASS R.I., BRESEE J.S., PARASHAR U., TURCIOS R., FISCHER T., JIANG B., WIDDOWSON M.A., GENTSCH J. Rotavirus vaccines: past, present, and future. **Archives of Pediatrics**, v.12, p.844-847, 2005.
22. GULATI B.R., DEEPA R., SINGH B.K., RAO C.D. Diversity in indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.972-978, 2007.
23. ISA P., ARIAS C.F., LÓPEZ S. Role of sialic acids in rotavirus infection. **Glycoconjugate Journal**, v.23, p.27-37, 2006.
24. JAIN V., DAS B.K., BHAN M.K., GLASS R.I., GENTSCH J.R., The Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3524-3529, 2001.
25. KAPIKIAN A.Z., HOSHINO Y., CHANOCK R. M. Rotaviruses. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M. **Fields Virology**, 4.ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833.
26. KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., LEVINE M.M., YOLKEN R.H., VANKIRK D.H., DOLIN R., GREENBERG H.B., CHANOCK C.K. Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. **Journal of Infectious Disease**, v.147, p.95-106, 1983.
27. LAURETTI F., MELO F.L., BENATI F.J., VOLOTÃO E.M., SANTOS N., LINHARES R.E.C., NOZAWA C. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Journal of Virological Methods**, v.114, p.29-35, 2003.
28. LINHARES A.C., GABBAY Y.B., MASCARENHAS J.D.P., FREITAS R.B., OLIVEIRA C.S., BELLESI N., MONTERIO T.A., LAINSON L.Z., RAMOS F.L., VALENTE S.A. Immunogenicity, safety, and efficacy of

- tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v.74, p.491-500, 1996.
29. LONDRIGAN S.L., HEWISH M.J., THOMSON M.J., SANDERS G.M., MUSTAFA H., COULSON B.S. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. **Journal of General Virology**, v.81, p.2203-2213, 2000.
  30. LÓPEZ S., ARIAS C. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends in Microbiology**, v.12, p.271-278, 2004.
  31. LUNDGREN O., SVENSSON L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v.3, p.1145-1156, 2001.
  32. MARTÍN C.S.S., LÓPEZ T., ARIAS C.F., LÓPEZ S. Characterization of rotavirus cell entry. **Journal of Virology**, v.78, p.2310-2318, 2004.
  33. MATSON D.O., O'RYAN M.L., HERRERA I., PICKERING L.K., ESTES M.K. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. **Journal of Infectious Disease**, v.167, p.577-583, 1993.
  34. MATTHEWS R.E.F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirology**, v.11, p.133-135, 1979.
  35. MATTION N.M., COHEN J., ESTES M.K. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN A. **Viral infections of the gastrointestinal tract**, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p.169-249.
  36. NOZAWA C.M., KERNTOPF G.F., CZERNISZ E.S., ALBUQUERQUE D., ROMANIN P., FREITAS J.F.E., SANTOS N., BENATI F.J., PIETRUCHINSKI E., LINHARES R.E.C. Detection and characterization of human rotavirus in hospitalized patients in the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai - PR, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, p.427-432, 2010.
  37. PARASHAR U.D., BRESEE J.S., GENTSCH J.R., GLASS R. Rotavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.561-570, 1998.
  38. PARASHAR U.D., HUMMELMAN E.G., BRESEE J.S., MILLER M.A., GLASS R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Disease**, v.9, p.565-572, 2003.
  39. PÉREZ J.F., CHERMELLO M.E., LIPRANDI F., RUIZ M.C., MICHELANGELI F. Oncosis in MA 104 cells is induced by rotavirus infection through an increase of cellular Ca<sup>++</sup> concentration. **Virology**, v.252, p.17-27, 1998.
  40. PIETRUCHINSKI E., BENATI F., LAURETTI F., KISIELIUS J., UEDA M., VOLOTÃO E.M., SOARES C.C., HOSHINO Y., LINHARES R.E.C., NOZAWA C., SANTOS, N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: Distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **Journal of Medical Virology**, v.78, 1241-1249, 2006.
  41. RAMIG R.F. Genetics of the rotaviruses. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.225-55, 1997.
  42. RAMIG R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v.78, p.10213-10220, 2004.
  43. RAMOS A.P., STEFANELLI C.C., LINHARES R.E., BRITO B.G., SANTOS N., GOUVEA V., CASSIA L.R., NOZAWA C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.1-8, 2000.
  44. RIEPENHOFF-TALTY M., GOUVEA V., EVANS M.J., SVENSSON L., HOFFENBERG E., SOKOL R.J., UHNOO I., GREENBERG S.J., SCHAKEL K., ZHAORI G., FITZGERALD J., CHONG S., EL-YOUSEF M., NEMETH A., BROWN M., PICCOLI D., HYANS J., RUFFIN D., ROSSI T. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. **Journal of Infectious Disease**, v.174, p.8-15, 1996.
  45. SANEKATA T., AHMED M.U., KADER A., TANIGUCHI K., KOBAYASHI N. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. **Journal Clinical of Microbiology**, v.41, p.2187-2190, 2003.
  46. SUPERTI F., AMMENDOLIA M.G., TINARI A., BUCCI B., GIAMMARIOLI A.M., RAINALDI G., RIVABENE R., DONELLI G. Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus. **Journal of Medical Virology**, v.50, p.325-334, 1996.
  47. TEIXEIRA J.M.S., CAMARA G.N.N.L., PEMENTEL P.F.V., FERREIRA M.N.R., FERREIRA M.S.N., ALFIERI A.A., GENTSCH J.R., LEITE J.P.G. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1397-403, 1998.
  48. VELAZQUEZ F.R., MATSON D.O., CALVA J.J., GUERRERO M.L., MORROW A.L., CAMPBELL S.C., GLASS R.I., ESTES M.K., PICKERING L.K., PALACIOS G.M.R. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. **New England Journal of Medicine**, v.335, p.1022-1028, 1996.
  49. ZÁRATE S., ROMERO P., ESPINOSA R., ARIAS C.G., LÓPEZ S. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin  $\alpha\beta 3$  through a novel integrin-binding site. **Journal of Virology**, v.78, p.10839-10847, 2004.
  50. ZIJLSTRA R. T., MCCRACKEN B.A., ODLE J., DONOVAN S.M., GELBERG H.B., PETSCHOW B.W., ZUCKERMANN F.A., GASKINS H.R. Malnutrition modified pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. **Journal of Nutrition**, v.129, p.838-843, 1999.

## Capítulo 12

### **Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da busca à identificação**

---

Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>

Ane Stefano Simionato<sup>1</sup>

Miguel Octavio Pérez Navarro<sup>1</sup>

Galdino Andrade<sup>1</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL, Centro de Ciências Biológicas – CCB, Depto. de Microbiologia,  
Laboratório de Ecologia Microbiana

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia/CCB/UEL

---

#### **1. Introdução**

Os seres humanos sempre contaram com produtos naturais (PNs), e têm explorado continuamente sua aplicação para melhorar vários aspectos de nossas vidas. Durante séculos, PNs, tais como especiarias, aromatizantes, perfumes, cosméticos e corantes foram utilizados para controlar e/ou curar doenças. Alguns foram reconhecidos como venenos e outros, foram usados como inseticidas e pesticidas. Esta área de pesquisa continua atraindo a cada dia mais interesse como fonte de novos compostos naturais bioativos<sup>11</sup>.

Mais de 60% de produtos de uso animal aprovados são PNs ou derivados, não incluindo produtos biológicos, tais como vacinas e/ou anticorpos. Seis por cento são PNs, 27% são derivados de PNs, 5% são farmacóforos, e 22% são mímicos sintéticos de PNs. Os PNs e seus derivados representam mais de US\$ 40 bilhões em vendas <sup>11</sup>.

Por muitos anos, a maioria dos pesquisadores em PNs estavam mais preocupados com o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários do que com a sua bioatividade<sup>11</sup>. Os modernos avanços nas técnicas de isolamento de compostos têm fornecido ferramentas para a purificação e análise estrutural que atingiu níveis extraordinários de sensibilidade e sofisticação. Armado com essas ferramentas, os pesquisadores se aventuraram em isolamentos biomonitorados de metabólitos, e agora eles estão voltando sua atenção para as origens da bioatividade<sup>11</sup>.

Segundo Meinwald<sup>20</sup>, pioneiro no campo da ecologia química, os químicos precisam conversar com biólogos. Bons biólogos de campo tendem a perceber as interações que podem fornecer pistas interessantes para a química de PNs<sup>11</sup>.

O significado desta afirmação é mais evidente quando considerado do ponto de vista da biodiversidade global. Para as plantas com flores, aproximadamente metade do total estimado de 500.000 espécies foram descritas. No entanto, apenas cerca de 10% têm sido estudadas quimicamente e muitas destas apenas de forma muito superficial<sup>11</sup>.

A população fúngica do solo tem sido estimada em cerca de 1,5 milhões de espécies, das quais apenas 100.000 foram descritas<sup>15</sup>. Bactérias do solo têm sido ricas fontes de PNs, proporcionando antimicrobianos e biocatalisadores farmacologicamente importantes<sup>11</sup>.

Todos esses organismos nos ecossistemas coexistem e interagem uns com os outros de várias maneiras em que a química desempenha um importante papel. Esclarecer essas interações, e aplicar o conhecimento adquirido, exige uma compreensão multidisciplinar e colaboração interdisciplinar entre químicos de PNs, orgânicos e analíticos; biólogos moleculares e celulares, bioquímicos, veterinários, farmacêuticos, entre outros.

## **2. Uma breve história dos antimicrobianos naturais**

Historicamente, o estudo das moléculas orgânicas bioativas de ocorrência natural foi impulsionado principalmente pela curiosidade química, mas, recentemente, e de forma mais intensa, está em franco desenvolvimento pela necessidade de terapêuticas mais eficientes contra doenças provocadas por microrganismos multirresistentes.

O estudo dos antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos (ANPM) teve início há muitos anos, precisamente no século 19. Louis Pasteur foi o primeiro cientista a mostrar o antagonismo entre dois microrganismos ao inibir a proliferação de uma cepa de *Bacillus anthracis* na urina adicionando-se outras bactérias<sup>3,13</sup>. No entanto, foi no século 20 que as pesquisas em busca de compostos bioativos começaram a avançar.

O pesquisador escocês Alexander Fleming ao concluir o curso de medicina na Universidade de Londres começou a se dedicar a pesquisa de compostos com potencial bactericida e que não fossem tóxicos para o organismo humano<sup>13,34</sup>. Após

a Primeira Guerra Mundial, esse pesquisador buscou um antisséptico que diminuísse e evitasse as infecções causadas durante a guerra. Em 1921, descobriu a lisozima acidentalmente<sup>3</sup>.

Em 1928, ao realizar uma limpeza em algumas culturas microbianas antigas, observou que em uma placa de cultura de *Staphylococcus aureus* havia uma colônia de um fungo contaminante, posteriormente identificado como *Penicillium notatum*. Fleming notou que ao redor do fungo não havia crescimento bacteriano, foi então que os passos iniciais para a descoberta do primeiro composto antimicrobiano natural começaram a ser dados, a Penicilina estava por vir. Fleming presumiu que o *P. notatum* produzia algum composto que era responsável por esse efeito antibiótico. A produção e a purificação desse composto eram difíceis e a comunidade científica da época não lhe dava muita atenção e a Penicilina começou a cair no esquecimento<sup>3,34</sup>.

Entretanto, durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), devido as graves infecções bacterianas, metade dos soldados haviam morrido, o mundo olhou com outros olhos para a penicilina. Então, Sir Howard Florey e Sir Ernst Chain, de Oxford, retomaram as pesquisas de Fleming e conseguiram produzir penicilina com fins terapêuticos em escala industrial, inaugurando uma nova era para a medicina - a “era dos antibióticos”<sup>3,13</sup>.

Após os anos 70, a descoberta de ANPM decresceu consideravelmente. O número de antimicrobianos aprovados entre 1983 e 1987 foi de apenas 16. Entre 1988 e 1992 foram 14, entre 1998 e 2002 foram 6 e entre 2003 e 2007 foram 4 compostos. Devido a essa desaceleração do fluxo de novos produtos e a emergência de cepas de microrganismos multirresistentes, as indústrias farmacêuticas estão voltando suas atenções novamente para os antimicrobianos naturais em busca de novos compostos com alto potencial de ação<sup>9</sup>.

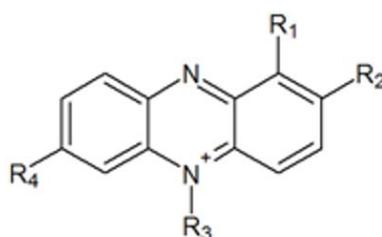
Dentre os mais diferentes organismos produtores de antimicrobianos, os microrganismos procariotos se destacam pela capacidade de produzir milhares de compostos bioativos. Um bom exemplo para ilustrar esse cenário é a cepa de *Micromonospora*, produtora da gentamicina, de onde já foram isolados cerca de 50 compostos derivados do seu metabolismo secundário<sup>4</sup>. Essa enorme diversidade de produção dos microrganismos ajuda no desenvolvimento de novos fármacos. As bactérias existem na terra há mais de 3 bilhões de anos e em torno de 95% dos microrganismos existentes ainda não foram isolados em culturas de laboratórios, e dos 5% isolados, somente uma minoria deles foram estudados quanto a produção de metabolitos secundários<sup>2</sup>.

Um total de 200.000-250.000 de produtos bioativos, tóxicos ou não, são conhecidos, mas sabe-se que existem mais de 1 milhão de compostos esperando serem descobertos. Estima-se que mais de 160.000 estruturas de compostos derivados de PNs foram elucidados, sendo que mais de 20.000 compostos sejam derivados do metabolismo secundário de microrganismos<sup>9</sup>.

Para ilustrar essa ideia de que metabólitos secundários têm grande potencial para desempenhar funções bioativas, vamos nos concentrar em uma classe de compostos conhecidos como “fenazinas”, que têm sido de grande interesse para os grupos de pesquisa de bioprodutos nos últimos 50 anos<sup>26</sup>.

As fenazinas são substâncias heterocíclicas aromáticas produzidas, quase que exclusivamente, por bactérias e das quais podem ser facilmente extraídas a partir do cultivo microbiano, analisadas e quantificadas por métodos cromatográficos (Tabela 01).

**Tabela 01.** Características de algumas fenazinas produzidas pelo gênero *Pseudomonas*.



Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Aeruginosin A	COOH		CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>
Fenazina-1-carboxílica (PCA)	COOH			
Piocianina (PYO)	OH		CH <sub>3</sub>	
2-Hidroxi-fenazina-1-carboxílica (2-OHPCA)	COOH	OH		
Fenazina-1-carboxiamida (PCN)	CONH <sub>2</sub>			
1-Hidroxifenazina (1-OHPHZ)	OH			

Fonte: Adaptado de Prince-Whelan et al. <sup>26</sup>

Estas substâncias compõem uma grande família contendo nitrogênio em sua estrutura química e pigmentos coloridos brilhantes com atividade antimicrobiana de largo espectro (Tabela 01). São produzidos principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium* e *Xanthomonas* <sup>25</sup>.

Pequenas modificações no núcleo da estrutura das fenazinas (Tabela 1) dá origem a um espectro de cores que vão desde o vermelho escuro (aeruginosin A); amarelo (fenazina-1-carboxamida) ou azul brilhante (piocianina). A combinação e variedade de grupos funcionais podem afetar a sua atividade biológica, que pode variar de antibacteriana<sup>5,28</sup>, antifúngica<sup>14,21</sup> e/ou antinematódeos<sup>6</sup>.

### **3. Produção de ANPM**

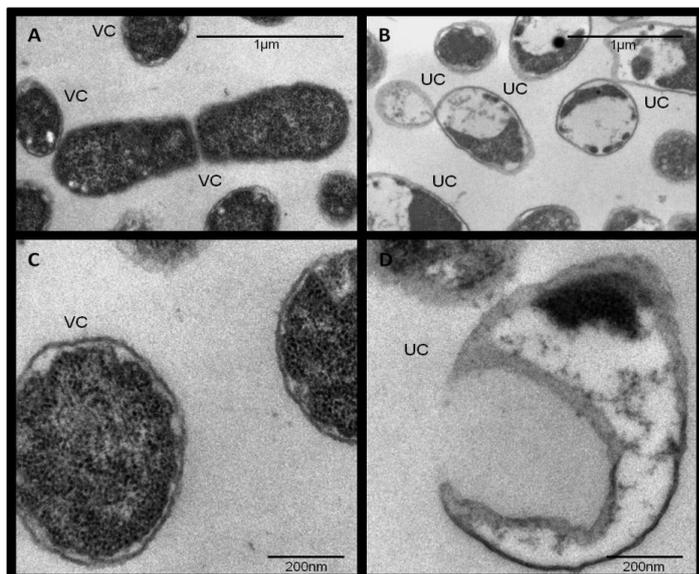
O metabolismo secundário (MS) revela uma ausência na função metabólica primária, não sendo essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos que os produzem<sup>10</sup>. No entanto, em termos competitivos, por exemplo, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Esses tipos de substâncias bioativas matam ou inibem o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades.

Uma das características dos compostos produzidos no MS é que eles são frequentemente produzidos depois dos processos celulares associados ao crescimento. O MS pode ser reconhecido como um fenômeno geral de manutenção de algumas espécies. Usualmente é associado com plantas e microrganismos, no entanto, existe uma variedade de exemplos no reino animal <sup>19</sup>.

O MS microbiano tem propiciado um grande número de trabalhos com substâncias bioativas que podem ser usadas tanto no controle de doenças na agricultura como na medicina terapêutica, desempenhando funções antimicrobianas, antifúngicas, antivirais entre outras <sup>23</sup>.

Devido aos crescentes problemas com as cepas de microrganismos multirresistentes que a cada dia podem ser selecionadas, tanto os patógenos de importância médica, veterinária ou agrônômica, a necessidade de novos agentes terapêuticos é emergencial. As novas tecnologias permitem que hajam rápidos avanços nas terapias de doenças, podendo renovar os métodos clássicos de tratamento e suprir a grande demanda por novos quimioterápicos <sup>2</sup>.

A busca por microrganismos com potencial de uso como agente de biocontrole, e/ou a obtenção de metabólitos com ação antimicrobiana, é uma das alternativas para o controle de patógenos, principalmente as cepas multirresistentes <sup>22</sup>.



**Figura 01.** Alterações ultraestruturais de *Klebsiella pneumoniae* (isolado clínico 2812-4) analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. **A. e C:** Controle sem tratamento com antibiótico. **B e D:** 90 min após o tratamento com antibiótico natural produzido por bactéria. VC: Células viáveis. UC: Células inviáveis. Fonte: Oliveira<sup>22</sup>.

Entre as bactérias, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* se destacam como os mais bem estudados agentes de biocontrole, mais especificamente nas últimas décadas. Cerca de 3.800 compostos bioativos, 17 % de todos os metabólitos microbianos com atividade antibiótica<sup>2</sup>, são produzidos por estas bactérias.

Com relação ao grupo dos actinomicetos já foram estudados mais de 10 mil compostos bioativos, 7.600 derivados de *Streptomyces* e 2.500 dos chamados actinomicetos raros, representando o maior grupo (45%) de metabólitos microbianos bioativos<sup>2</sup>.

Entre os fungos, os ascomicetos, espécies de fungos filamentosos e endofíticos, são os mais significativos produtores de compostos bioativos. Os basidiomicetos também são frequentemente relatados como bons produtores, enquanto leveduras, raramente produzem esses metabólitos. O número total de produtos fúngicos bioativos é de aproximadamente 8.600, representando 38 % de todos os produtos microbianos (Tabela 02)<sup>2</sup>.

Do total de aproximadamente 22.500 antibióticos e compostos bioativos microbianos, menos de um por cento (cerca de 150 compostos) estão em uso direto na medicina humana, veterinária e/ou agricultura.

**Tabela 02:** Número aproximado de antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos (ANPM) de acordo com seus produtores

Fonte	ANPM
<b>Bactéria</b>	<b>2900</b>
Eubactéria	2170
<i>Bacillus</i> sp.	795
<i>Pseudomonas</i> sp.	610
<b>Actinomicetos</b>	<b>8700</b>
<i>Streptomyces</i> sp.	6550
Actinos raros	2250
<b>Fungos</b>	<b>4900</b>
<i>Penicillium/Aspergillus</i>	1000
Basidiomicetos	1050
Leveduras	105
<b>Total</b>	<b>16500</b>

Fonte: Adaptado de Bérdy<sup>1</sup>

#### 4. Separação e Isolamento de ANPM

Uma das tarefas do pesquisador de PNs é isolar e identificar uma ou mais substâncias, embora muitas vezes as informações sobre a natureza e classe a que pertence o metabólito não estejam disponíveis. A identificação do metabólito biologicamente ativo não é mais importante do que assegurar que o composto está puro e corretamente caracterizado. No entanto, o pesquisador tem que obter uma quantidade adequada do metabólito isolado em sua forma mais pura, para permitir a caracterização adequada, tanto química como, por exemplo, verificar a atividade antibiótica do produto puro frente a diferentes microrganismos<sup>11</sup>.

##### 4.1 Extração de ANPM

Existem muitos processos e sistemas de extração descritos na literatura que podem ser experimentados e ajustados, se necessário. No entanto, muitas vezes é necessária uma abordagem de tentativa e erro. O isolamento de compostos bioativos é quase sempre repleto de dificuldades e cada passo requer julgamento, improvisação e novas descobertas. As técnicas mais comumente utilizadas e descritas nesse texto para extração e/ou pré-concentração de compostos

antimicrobianos naturais ou qualquer composto bioativo são: extração em fase líquida, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas<sup>11</sup>.

#### **4.1.1 Extração líquido-líquido**

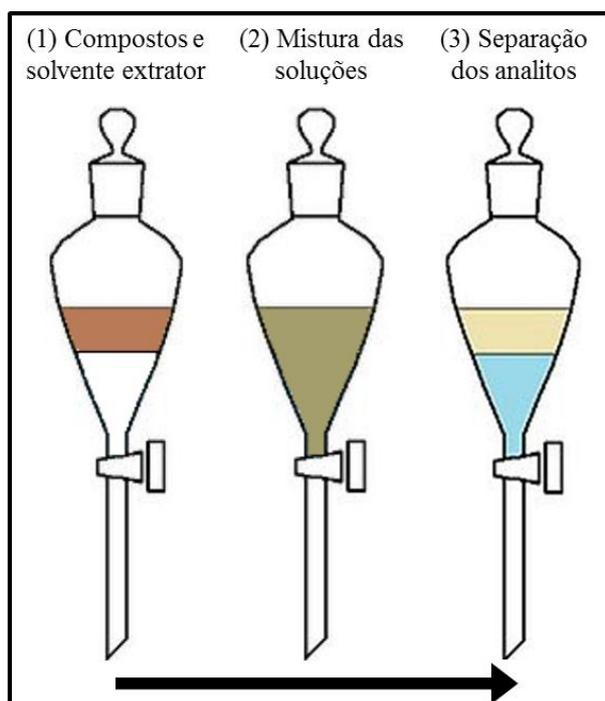
Na extração líquido-líquido (ELL) ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) (Figura 2). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição ( $K_D$ ), entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa. A extração de substâncias básicas é, normalmente, realizada a pH maiores que 7 e a extração de substâncias ácidas é feita em pH menores que 5<sup>11</sup> (Figura 2).

A ELL apresenta as vantagens de ser simples (na configuração mais comum usa-se um funil de separação ou tubos de centrífuga) e utilizar um grande número de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica<sup>11</sup>.

Por outro lado, esta técnica possui uma série de desvantagens, tais como:

1. As amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito;
2. Impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros;
3. Pode ocorrer formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo;
4. Volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes;
5. Decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração;
6. O processo é suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação.

Apesar destas desvantagens, a ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em meios de cultivos líquidos de microrganismos, sendo possível obter fases orgânicas bastante limpas e altamente seletivas para alguns analitos<sup>11</sup>.



**Figura 02.** Extração líquido-líquido utilizando funil de separação. No processo os compostos e o solvente extrator são adicionados (1), misturados por agitação (2) e os analitos passam para fase na qual está o solvente extrator com maior afinidade aos analitos (3). Ilustração: Admilton Gonçalves de Oliveira Jr

#### 4.1.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de tubos ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros (exemplo: vidro sinterizado)<sup>11</sup>.

Em geral, os procedimentos de EFS contêm 5 etapas<sup>11</sup>:

1. Ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis.
2. Condicionamento do sorvente com solvente adequado.

3. Introdução da amostra.
4. Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito.
5. Eluição e separação do analito.

Dependendo do solvente de condicionamento e de eluição, os grupos mais frequentemente usados como sorventes à base de sílica podem ser divididos em 3 categorias<sup>11</sup>:

1. Fase reversa (FR) quando o sorvente é menos polar que o solvente de eluição.
2. Fase normal (FN) quando o solvente é menos polar que o sorvente.
3. Troca iônica.

Para aumentar a seletividade da extração os sorventes podem ser combinados das seguintes maneiras<sup>11</sup>:

1. Dentro de um mesmo cartucho de extração, usando as chamadas fases mistas com vários grupos funcionais de características diferentes ligados ao mesmo suporte.
2. Fazendo sucessivas extrações com cartuchos de diferentes recheios, passando o material eluído do primeiro cartucho para o segundo no modo “*on-line*” ou “*off-line*”.
3. Recheando o mesmo cartucho com diferentes sorventes, em camadas, resultando em uma coluna de extração tipo sanduíche.

Os recentes desenvolvimentos em EFS têm sido direcionados para a síntese de sorventes mais seletivos e para novas configurações cromatográficas.

Um exemplo de variação da EFS é a extração em disco de fase sólida (EDFS), neste método são utilizados discos de vários diâmetros, 4 a 90 mm. Os discos possuem uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição, ausência de caminhos preferenciais e melhor reprodutibilidade. Uma das desvantagens da EDFS é que a etapa de condicionamento. Diferente da EFS em cartuchos, a secagem do disco deve ser evitada, pois, devido à grande área superficial, uma interface ar/água é formada facilmente, resultando em um decréscimo das recuperações<sup>11</sup>.

Da mesma forma que os cartuchos, os poros dos discos podem ser obstruídos quando se extrai amostras contendo uma concentração relativamente alta de macromoléculas ou de material particulado. Assim, é aconselhável filtrar as amostras aquosas antes da extração ou usar pré-filtro inerte<sup>11</sup>.

Outra variação da EFS é a Micro extração em fase sólida (MEFS). Nesta técnica é empregada uma fase extratora de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. Esta fase extratora é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa<sup>11</sup>. A extração pode ser feita de duas maneiras<sup>11</sup>:

1. Mergulhando a fibra diretamente na solução da amostra e após esta etapa a fibra é recolhida para dentro da agulha.
2. Pela técnica de *headspace*, na qual a amostra é frequentemente aquecida. Após a extração os analitos presentes na fibra são dessorvidos termicamente pela sua introdução no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás (CG).

#### **4.1.3 Extração com fluido supercrítico**

O fluido supercrítico é o estado da matéria acima da temperatura crítica e da pressão crítica onde o vapor e o líquido têm a mesma densidade e o fluido não pode ser liquefeito pelo simples aumento da pressão. Em extração com fluido supercrítico (EFSC) o fracionamento pode ser feito pela mudança de pressão e/ou temperatura. Comparados com solventes líquidos, os fluidos supercríticos têm viscosidades mais baixas e maiores coeficientes de difusão de solutos, o que facilita a transferência de massa durante a extração<sup>11</sup>.

A extração pode ser feita em matrizes sólidas, semissólidas ou líquidas. A EFSC tem mostrado ser uma alternativa viável aos métodos tradicionais de extração. Uma das principais vantagens desta técnica é que não se utiliza solventes orgânicos, que são normalmente tóxicos, diminuindo assim os riscos de manipulação e minimizando os custos. Entretanto, a principal desvantagem da técnica é que o analito deve ser solúvel no fluido supercrítico<sup>11</sup>.

#### **4.2 Separação com Membranas**

Uma membrana é uma barreira seletiva entre duas fases, sendo a fase 1 chamada de doadora e a fase 2 de receptora. A separação é obtida devido à

capacidade da membrana em transportar alguns componentes da fase doadora para a receptora mais rapidamente que outros. Em geral a membrana nunca é uma barreira semipermeável perfeita. As membranas podem ser classificadas baseadas na estrutura e no mecanismo de separação.

#### **4.2.1 Diálise**

Na diálise os solutos difundem do lado doador para o lado receptor da membrana como resultado de um gradiente de concentração, sendo principalmente utilizada para a separação de solutos de massa molar baixa dos de massa molar alta. Para a obtenção de recuperações elevadas por unidade de tempo deve-se ter uma membrana com grande área superficial, um grande coeficiente de difusão, uma camada fina e uma baixa tortuosidade. Entretanto, a maior desvantagem desta técnica é que, com o aumento do tempo, o gradiente de concentração e o fluxo decrescem lentamente até se tornarem zero. Para contornar este problema, a diálise continuada é aplicada. Neste caso o soluto que atravessa a membrana é retirado continuamente do compartimento receptor, mantendo o gradiente de alta concentração e um fluxo maior<sup>11</sup>.

#### **4.2.2 Ultrafiltração**

Na ultrafiltração tanto o soluto como o solvente são permeados na membrana através de um gradiente de pressão. A ultrafiltração tem sido largamente utilizada para a remoção de proteínas e/ou peptídeos com atividades antimicrobianas, devido a uma série de vantagens<sup>11</sup>:

1. Técnica simples.
2. As membranas são disponíveis comercialmente.
3. Não possui problemas de diluição da amostra.
4. Não possui problemas de troca de solvente.

Por outro lado, um problema comum que ocorre é quando a solução a ser filtrada contém solutos que não podem passar pela membrana. Neste caso, há a formação de uma camada de gel devido ao acúmulo de solutos retidos, que fornece uma resistência adicional à transferência de massa. Este problema pode ser minimizado pela remoção constante destes solutos da superfície da membrana<sup>11</sup>.

### **4.3 Isolamento por cromatografia**

O isolamento de uma ou mais substâncias a partir de um extrato bruto ou de frações de um extrato pode ser um processo longo e caro. A obtenção de um composto puro muitas vezes exige várias etapas de purificação envolvendo diferentes técnicas. Este é particularmente o caso quando se trata de metabólitos bioativos em que o composto alvo (exemplo: antimicrobianos naturais) podem estar presentes apenas em quantidades vestigiais em uma matriz de centenas de outros constituintes ou ainda não ter padrão para comparação.

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes<sup>7,8,11</sup>.

As técnicas cromatográficas variam desde as de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipuladas por não peritos, até as de alta sofisticação, usadas somente por especialistas. Entre estes dois extremos existem muitas variações de maior ou menor complexidade<sup>11</sup>.

#### **4.3.1 Cromatografia em camada delgada**

Cromatografia em camada delgada (CCD) é um termo coletivo usado para todos os tipos de métodos de separação ou análise em que consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve início na década de 40, sendo que somente a partir da década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substâncias orgânicas<sup>11,16</sup>.

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em curto espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da quantidade de amostra em análise<sup>11</sup>.

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas<sup>16</sup>.

Estes métodos são divididos basicamente em: cromatografia em CCD preparativa, um método mais popular e muito utilizado para semi-purificação de frações com muitas misturas onde a banda cromatográfica pode ser raspada, filtrada e novamente eluída e testada quanto sua bioatividade ou repurificada; CCD analítica, muito utilizada para análise de compostos puros ou frações com alta pureza, além de ser um método muito eficiente para analisar o fator de retenção (*retention factor* = *Rf*) dos compostos e, posteriormente, os dados usados para uma purificação em colunas; e CCD em fluxo forçado onde o movimento dos compostos a serem separadas é o resultado de uma força de condução por um fluxo em uma fase móvel e a ação de retardamento da fase estacionária<sup>11</sup>.

Todos os métodos descritos podem fornecer alta resolução, reprodutibilidade e alta taxa de transferência. Os analitos são avaliados nas placas de cromatograma principalmente por: luz ultravioleta (254 nm e 365 nm), visível direto na placa ou por reveladores de grupos e/ou classes de substâncias (impregnação de compostos químicos). Os reveladores mais comuns são à base de ácido sulfúrico/metanol ou vapor de iodo<sup>16</sup>.

#### **4.3.2 Cromatografia por adsorção**

Empiricamente considera-se a cromatografia quando se usa uma coluna recheada com um sorvente (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. Esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples, não exigindo equipamentos caros. Dependendo do tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por CCD<sup>11,35</sup>.

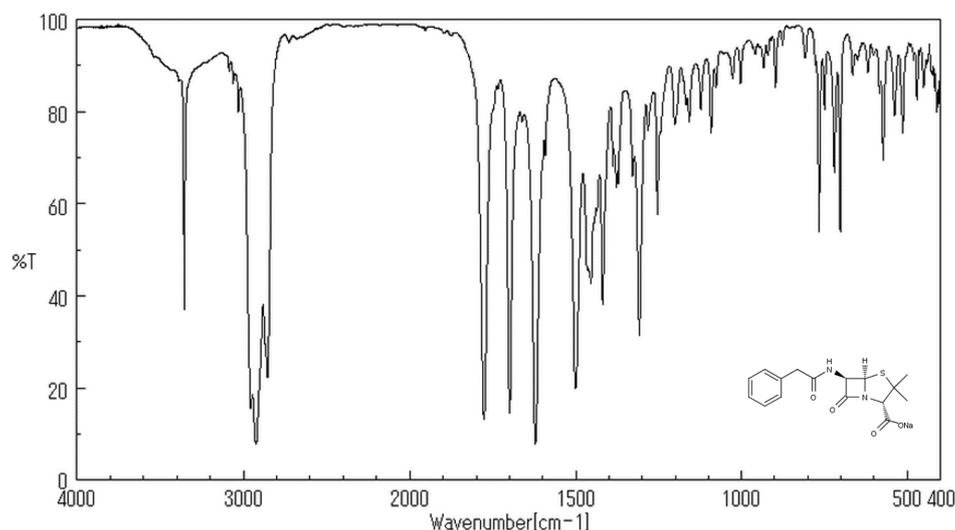
A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo separada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice-versa. Conclui-se, portanto, que quanto

maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). Esta separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der Waals) entre eles e o adsorvente<sup>27,35</sup>.

## 5. Identificação molecular dos ANPM

Após todos os processos de produção, extração e purificação do antibiótico natural, é possível realizar a identificação molecular. Com a estrutura molecular e os grupos funcionais que ela possui, é possível determinar suas propriedades físicas, reatividade e inferir outras atividades biológicas<sup>30</sup>. Uma das técnicas clássicas para determinação molecular é a espectroscopia. Quando aplicamos uma energia a uma matéria, ela pode ser absorvida, emitida e/ou causar uma modificação química e ser transmitida. A espectroscopia é o estudo da interação entre a energia e a matéria, e seus resultados podem fornecer informações detalhadas sobre a estrutura molecular do composto<sup>29</sup>.

É muito utilizada a espectroscopia no infravermelho (*Infrared spectroscopy* = IR), onde é possível definir os grupos funcionais presentes na molécula (Figura 03).



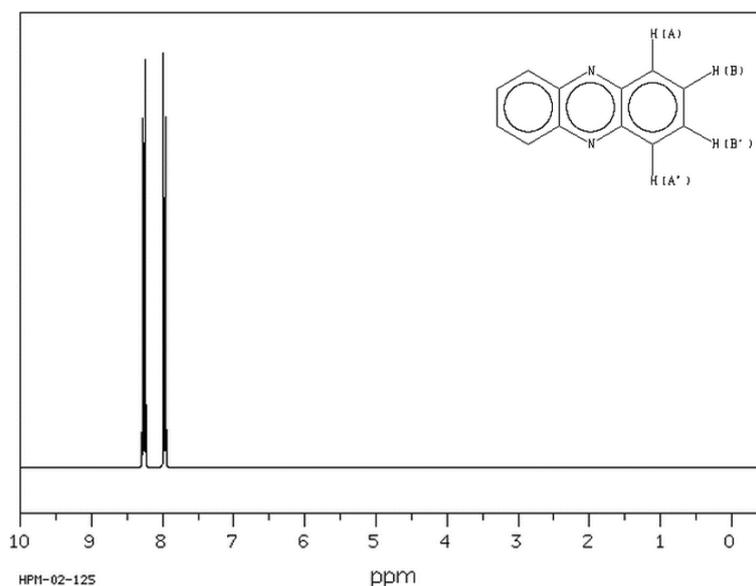
**Figura 03.** Espectro de Infravermelho do antibiótico Penicilina G. Fonte: *Spectral Database for Organic Compounds*<sup>32</sup>.

Nesta técnica é observada a interação da molécula com a radiação infravermelha emitida pelo equipamento, já que a radiação é absorvida de forma

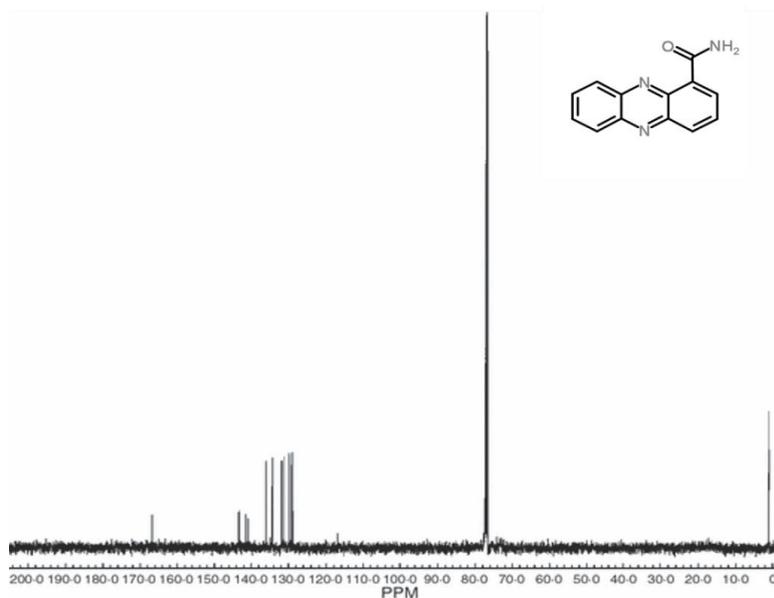
característica dos tipos de ligação e átomos presentes nos grupos funcionais. É então gerado um espectro (Figura 03), mostrando absorvância (capacidade de absorver a radiação) obtida versus a frequência. O espectro obtido é como uma impressão digital para a molécula. Os dados obtidos são comparados com os dados característicos de cada grupo funcional<sup>24,30</sup>.

Uma das técnicas mais importantes utilizadas na identificação molecular dos ANPM é a ressonância magnética nuclear (RMN), que, diferentemente das demais técnicas, é um método rápido e não há destruição e alteração da amostra. Os núcleos de hidrogênios ( $^1\text{H}$ ) e carbonos ( $^{13}\text{C}$ ) da amostra são submetidos a um campo magnético forte e, simultaneamente, se irradiam com energia eletromagnética, e podem absorver a energia através da ressonância magnética. Cada núcleo atômico possui um valor numérico (em ppm ou em  $\delta$ ) de deslocamento químico, e cada próton tem apenas uma faixa limitada de valores da qual gera a ressonância<sup>17,24,30</sup>.

Com esta técnica são gerados espectros em que é possível determinar os átomos distintos presentes na molécula e estudar os núcleos de hidrogênio (Figura 04) e carbono (Figura 05) e a suas correlações.



**Figura 04.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância Fenazina. Fonte: *Spectral Database for Organic Compounds*<sup>31</sup>.



**Figura 05.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Fenazina-1-Carboxiamida em  $\text{CDCl}_3$ , produzido por *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. Fonte: *Spectral Database for Organic Compounds*<sup>28</sup>.

Utilizando os dados obtidos no RMN com os dados do IR são, em alguns casos, suficientes para se determinar a estrutura da molécula<sup>24</sup>.

Um dos pontos críticos da análise de RMN é a preparação da amostra. Para obter um bom espectro, com alta resolução, são necessários alguns cuidados básicos para a preparação da amostra. Em uma análise de RMN com amostra líquida, um dos maiores problemas é a escolha do solvente de diluição<sup>12</sup>. É preciso encontrar um solvente que dilua facilmente e totalmente a amostra, pois a amostra não pode precipitar no tubo durante a análise. É necessária a utilização de solventes deuterados, que possuem uma quantidade de água residual extremamente baixa e alto teor de pureza, pois a presença de qualquer contaminante pode interferir e dificultar a análise do espectro<sup>12</sup>.

Outra técnica muito importante na identificação de moléculas é a espectroscopia de massas (*Mass spectrometry* = MS). Com esta técnica é possível identificar os diferentes átomos que compõe a substância pela massa molecular dos átomos presentes na molécula. O espectro gerado apresenta uma série de picos de diferentes tamanhos que são registrados ao longo de uma escala numérica. As massas moleculares dos metabólitos secundários já identificados variam de 70 a 12.524<sup>24</sup>.

No entanto, a identificação molecular do composto nem sempre é fácil como pode parecer para muitos. Na verdade, tudo depende da característica e dos

elementos da molécula. Se for uma molécula muito complexa, com alto peso molecular e/ou com a presença de metais em sua estrutura são necessárias outras técnicas de espectroscopia.

Uma pequena porcentagem dos novos ANPM foi elucidada estruturalmente e a maioria deles é apenas variações de antimicrobianos já existentes<sup>1</sup>. Pela elucidação molecular do composto é possível definir seu ineditismo e produzi-lo sinteticamente e em larga escala para comercialização. Porém, é uma das etapas mais difíceis e demoradas. No caso da penicilina, por exemplo, foram gastos 15 anos para se obter a estrutura molecular, e necessários mil químicos em 39 laboratórios associados nos Estados Unidos e Grã-Bretanha para trabalhar nos problemas envolvendo a elucidação molecular em busca da sua síntese. A estrutura foi determinada em 1946, mas só foi possível sintetizá-la em 1957<sup>3</sup>.

## 6. Perspectivas futuras

A descoberta de antibióticos passou por várias fases importantes na história. A fase mais produtiva ocorreu entre as décadas de 1940 e 1970. Estes foram os anos de glória, quando muitas classes novas de antimicrobianos foram descobertas por esforços acadêmicos e da indústria farmacêutica. Após a década de 1980 até a atualidade, poucos antibióticos foram desenvolvidos, no entanto, é esta a nossa linha de frente para combater os microrganismos patogênicos multirresistentes.

E sobre o futuro? Os esforços devem continuar para descobrir e desenvolver novos antimicrobianos. Isto é essencial se quisermos proteger a saúde da população mundial. Precisa-se aproximar cada vez mais a química (definição estrutural, relação estrutura atividade, combinações de síntese), a microbiologia (bioprospecção de compostos bioativos e processos fermentativos) e a biotecnologia (melhoria genética para aumentar a diversidade de produção) para esclarecer as interações e aplicar o conhecimento adquirido para melhor explorarmos conscientemente a grande biodiversidade existente em nosso planeta.

## 7. Referências bibliográficas

1. BÉRDY J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v.65, p.385-395, 2012.
2. BÉRDY J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v.58, p.1-26, 2005.

3. BURRESON J., COUTEUR P.L. **Os Botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Zahar, 2006. p.167-183.
4. BUTLER M.S., BLASKOVICH M.A., COOPER M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics**, v.66, p.571-591, 2013.
5. CARDOZO V.F., OLIVEIRA A.G., NISHIO E.K., PERUGINI M.R.E, ANDRADE C.G.T.J., SILVEIRA W.D., DURÁN N., ANDRADE G., KOBAYASHI R.K.T., NAKAZATO G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.12, p.12, 2013.
6. CEZAIIRLIYAN B., VINAYAVEKHIN N., GRENFELL-LEE D., TUEN G.J., SAGHATELIAN A., AUSUBEL F.M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. **PLOS Pathogens**, v.9, n.1, p.1-9, 2013.
7. COLLINS C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS C.H., BRAGA, G.L., BONATO P.S. (org.) **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora UNICAMP, p.17-42, 2011.
8. DEGANI A.L.G., CASS Q.B., VIEIRA P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola**, n.7, p.21-25, 1998.
9. DEMAİN A.L. Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. **Medicinal Research Reviews**, v.29, p.821-842, 2009.
10. DEMAİN A.L., MARTIN J.F. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v.44, p.230-251, 1980.
11. GHISALBERTI E.L. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In: COLEGATE S. M, MOLYNEUX R. J. (Org.). **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. 2. ed.: CRC Press, 2008. p 11-76.
12. GOTTLIEB H.E., KOTLYAR V., NUDELMAN A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v.62, p.7512-7515, 1997.
13. GUIMARÃES D.O., MOMESSO L.S., PUPO M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novo agentes. **Química Nova**, v.33, p.667-679, 2010.
14. KARPAGAM S.A, SUDHAKAR T., LAKSHMIPATHY M. Microbicidal response of pyocyanin produced by *p. aeruginosa* toward clinical isolates of fungi. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, p870-873, 2013.
15. KRISHNASWAMY N.R. **Chemistry of Natural Products**. 5ª edição. India: Universities Press, 2012. P. 5-30.
16. LOPES J.L.C. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS C.H., BRAGA, G.L., BONATO P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora UNICAMP, p. 67-85, 2011.
17. MACEDO JR F.C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C no estudo de rotas biossintéticas de PNs. **Química nova**, v.30, p.116-124, 2007.
18. MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., DUNLAP P.V., CLARK D.P. Microbiologia Industrial. In: MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., DUNLAP P.V., CLARK D.P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 734-760.
19. MANN J. **Secondary metabolism**. Inglaterra: Oxford University Press, 2 ed, 1987.
20. MEINWALD J., EISNER T. Natural Products Chemistry: New Opportunities, Uncertain Future. **Helvetica Chimica Acta**. v. 86, p.3633-3637, 2003.
21. MORALES D.K., JACOBS N.J., RAJAMANI S., KRISHNAMURTHY M., CUBILOS-RUIZ J.R., HOGAN D.A. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. **Molecular Microbiology**, v.78, p.1379-1392, 2010.
22. OLIVEIRA A.G. Produção e Purificação de metabólitos Secundários com Atividade Antibiótica Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra Bactérias Gram Negativas: Agente Causal do Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e Isolados Clínicos de *Klebsiella pneumoniae* Produtora de Carbapenemase. 2011. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
23. OUHDOUCH Y., BARAKATE M., FINANCE C. Actinomycete of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v.37, p.69-74, 2001.
24. PAVIAN D.L., LAMPMAN G.M., KRIZ G.S., VYVYAN J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.
25. PIERSON III L.S., PIERSON E.A. Metabolism and function of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1659-1670, 2010.
26. PRINCE-WHELAN A., DIETRICH L.E., NEWMAN D.K. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. **Natural Chemical Biology**, v.2, p.71-78, 2006.
27. RIBANI M., BOTTOLI C.B.G., COLLINS C.H., JARDIM I.C.S.F., MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.

28. SHANMUGAIAH V., MATHIVANAN N., VARGHESE B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**. v.108, p.703-711, 2010.
29. SILVERTEIN R.M., WEBSTER F., KIEMLE D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Estados Unidos: Wiley, 7 ed, 2005.
30. SOLOMONS T. W. G., FRYHLE C. B. **Química Orgânica**. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC editora, 2000. v.1
31. SPCRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS SDBS. SDBS <sup>1</sup>H NMR No. 1370HSP-03-011 phenazine. Disponível em: [http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) Acesso em: 24 fev 2014.
32. SPCRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS SDBS. SDBS-IR penicillin G sodium salt No 52233 Disponível em: [http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) Acesso em: 24 fev 2014.
33. SPCRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS SDBS. SDBS-Mass penicillin G sodium salt No 52233 Disponível em: [http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) Acesso em: 24 fev 2014.
34. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945: Sir Alexander Fleming Biographical. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html) Acesso em 27 jan 2014.
35. VICHENEWSKI W. Cromatografia por adsorção. COLLINS C.H., BRAGA, G.L., BONATO P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora UNICAMP, p. 87-102, 2011.

## Capítulo 13

### Antivirais Naturais

---

Nayara Lopes<sup>1,2</sup>

Ligia Carla Faccin-Galhardi<sup>1</sup>

Carlos Nozawa<sup>1,2</sup>

Rosa Elisa Carvalho Linhares<sup>1,2</sup>

Universidade Estadual de Londrina – UEL

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia, Depto. de Microbiologia,

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas

---

#### 1. Introdução

A ameaça que as viroses representam principalmente à saúde pública é notória, seja pela ampla distribuição, facilidade de transmissão, capacidade de alguns vírus de estabelecer infecções latentes, ou pela dificuldade no controle e no desenvolvimento de vacinas e antivirais. Desta forma, apesar dos contínuos avanços, as doenças virais se tornaram uma das mais importantes causas de morte em humanos no mundo, além do impacto para a saúde animal. Adicionalmente, infecções causadas por vírus até então desconhecidos têm surgido com frequência e representam riscos para a saúde pública mundial <sup>1,2</sup>.

O estudo de antivirais teve início na década de 50, apesar do restrito conhecimento da biologia dos vírus e da toxicidade dos primeiros quimioterápicos, com a síntese de 5-iodo-2'-desoxiuridina (IDU). IDU foi primeiramente sintetizado como um potencial agente antitumoral e depois comercializado como o primeiro medicamento antiviral para infecções herpéticas oculares, porém de uso tópico, pois além de atuar na síntese do DNA viral, também interferia na síntese do DNA celular. Posteriormente, as tiossemicarbazonas foram sintetizadas contra o vírus vaccinia e a metisazona para a profilaxia e tratamento da varíola. Somente no final da década de 70, foi desenvolvido o primeiro antiviral com elevado índice de seletividade, a acicloguanosina - Aciclovir (ACV), representando um marco no estudo da terapia antiviral e incentivando a busca de novos fármacos com efeito seletivo similar <sup>3</sup>. Esses estudos foram amplamente estimulados com o reconhecimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como o agente

causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em 1983, e estendido para outros vírus como vírus da hepatite B (VHB) e vírus da hepatite C (VHC) <sup>4</sup>.

Atualmente, 45 compostos estão aprovados para a utilização como antiviral e outros em fase de avaliação <sup>5</sup>. A maioria destes compostos foi introduzida nos últimos 20 anos e são usados no tratamento de pacientes infectados pelo HIV, vírus das hepatites B e C, herpes simplex, varicela-zoster, citomegalovírus, vírus respiratório sincicial e influenza (Tabela 1).

**Tabela 1.** Exemplos de compostos antivirais aprovados.

<b>Droga</b>	<b>Vírus</b>	<b>Alvo/Ação</b>
Vidarabina	Herpesvirus	Inibição da polimerase viral
Aciclovir	Herpes simplex (HSV) e varicela-zoster.	Inibição da polimerase viral
Ganciclovir e valganciclovir	Citomegalovirus (CMV)	Inibição da polimerase viral
Inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo : Zidovudina (AZT), Didanosina (ddI), Zalcitabina (ddC), Lamivudina (3TC), Abacavir, estavudina	Vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite B (VHB).	Inibição da transcriptase reversa
Inibidor de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo: Nevirapina, Delavirdina, efavirenz	HIV	Inibição da transcriptase reversa
Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, amprenavir, lopinavir.	HIV	Processamento de proteínas: Inibição da HIV protease
Ribavirin	Vírus da hepatite C (HCV), vírus respiratório sincicial (VRS)	Análogo sintético de nucleosídeo: Inibidore da monofosfato desidrogenase
Amantadina / Rimantadina	Influenza A	Bloqueio das etapas de penetração e desnudamento
Relenza (zanamivir) e Tamiflu (oseltamivir)	Influenza A e B	Inibição da Neuraminidase
Pleconaril	Picornavirus	Bloqueio das etapas de adsorção e desnudamento
Interferon	VHB e VHC	Bloqueio da síntese de proteínas e liberação do vírus.

Embora haja eficácia no emprego clínico destes antivirais, o uso constante, e em particular por via sistêmica, está associado a efeitos colaterais adversos e à emergência de cepas resistentes <sup>6</sup>. Além disso, a descoberta de novos compostos antivirais faz-se necessária, principalmente, para o tratamento de doenças responsáveis por alta morbidade e mortalidade, tais como aquelas causadas pelo

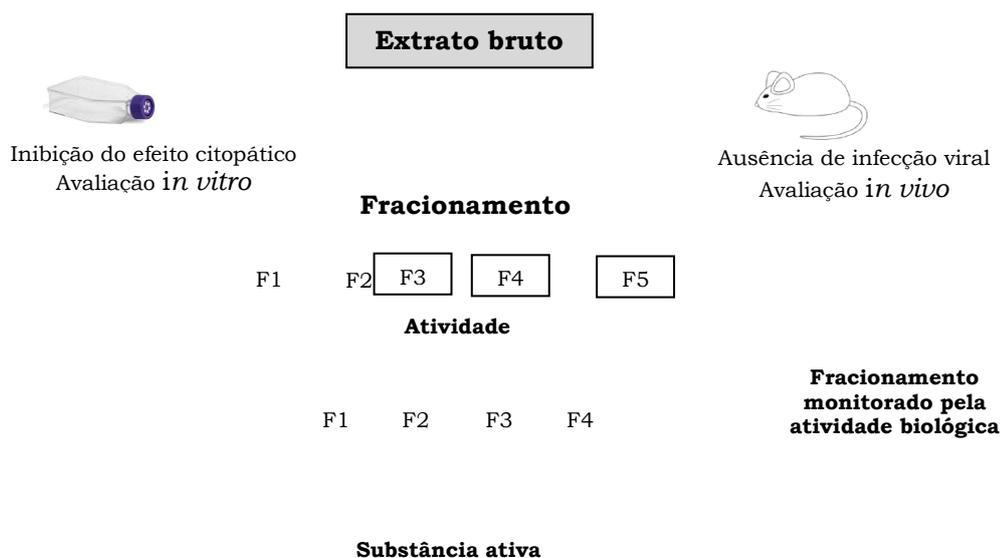
HIV, vírus influenza, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus causadores de febres hemorrágicas e herpesvírus <sup>7</sup>.

Nesse contexto, a busca por novos antivirais, a partir de produtos naturais como bactérias, fungos, fauna e flora, incluindo a de origem marinha, tem sido amplamente incentivada nos últimos anos. No Brasil, esses estudos também são incentivados pela grande biodiversidade existente, visando principalmente o manejo adequado e a preservação das espécies exploradas, assim como o registro do conhecimento etnofarmacológico.

## **2. Produtos naturais**

Os produtos naturais possuem uma fonte inesgotável de compostos com grande diversidade de estruturas químicas e que tem levado à síntese de muitos fármacos úteis clinicamente para o tratamento de várias doenças humanas <sup>8</sup>. A partir da descoberta da atividade biológica de um produto natural, *in vitro* ou *in vivo*, com ou sem embasamento etnofarmacológico, em seu estado bruto e atóxico, pode-se iniciar as análises fitoquímicas dos compostos presentes (Figura 1). Para isto, o extrato bruto é submetido a um processo de fracionamento, com diferentes solventes, visando a identificação e o isolamento das substâncias ativas. A obtenção dos compostos ou substâncias, a partir do extrato bruto, também pode ocorrer por combinação de técnicas (cromatográficas, espectrofotométricas e ressonância) para o isolamento de grupos com propriedades farmacológicas já conhecidas como polissacarídeos, peptídeos e compostos fenólicos. Após uma reavaliação da toxicidade e da manutenção da atividade biológica pelo composto isolado é realizada a elucidação estrutural, com possíveis modificações químicas (sulfatação, metilação, carboxilação) que melhorem as características do composto como solubilidade, absorção e espectro de ação. Finalmente, essa molécula é utilizada como modelo para a síntese em larga escala e comercialização.

Os compostos isolados dos produtos naturais mostram grandes vantagens por serem mais seletivos e, portanto, com menos efeitos colaterais. Além disso, contêm uma variedade de princípios ativos que podem proporcionar efeitos diferentes, porém, sinérgicos, por exemplo, inibindo a infecção viral em várias etapas da replicação, concomitantemente, e ao mesmo tempo, dificultando a seleção de mutantes resistentes. Dessa forma, os produtos naturais podem ser utilizados como referência, ou ainda, como uma opção terapêutica para viroses com fármacos disponíveis.



**Figura 1.** Esquema representativo das fases envolvidas na obtenção de uma substância ativa isolada de um produto natural. A atividade antiviral do composto é avaliada a partir do extrato bruto até a identificação e síntese da molécula. **Ilustração: Nayara Lopes**

### 3. Antivirais naturais

O interesse no desenvolvimento de antivirais, a partir dos produtos naturais, ocorreu na Europa, em 1952, quando a Boots Drugs Company testou a eficácia de 228 extratos de plantas contra o vírus influenza A, sendo que destas, 12 mostraram-se farmacologicamente ativas <sup>9</sup>. Os antivirais citarabina<sup>®</sup> (Ara-C) e vidarabina<sup>®</sup> (Ara-A) foram sintetizados, na década de 70, usando como modelo os nucleosídeos espongotimidina e espongouridina, isolados da esponja marinha *Tethya crypta* <sup>10, 11, 12</sup>. Além da síntese de novos fármacos antivirais, essa descoberta demonstrou, pela primeira vez, a ocorrência de nucleosídeos naturais bioativos contendo açúcares diferentes da ribose e da deoxirribose que, quando incorporados ao DNA durante a replicação, levam à inibição do processo de síntese e consequente bloqueio da proliferação. Pode-se dizer ainda que essa constatação deu origem a toda uma geração de nucleosídeos incomuns e não naturais com potencial terapêutico, incluindo os fármacos acicloguanosina (Aciclovir) <sup>13</sup> e azidotimidina (Zidovudina) ou AZT <sup>14</sup>.

A atividade antiviral dos produtos naturais deve-se a presença de princípios ativos como flavonoides, taninos, alcalóides, peptídeos, proteínas e polissacarídeos, cientificamente mostrados em diversos estudos <sup>15</sup>. Cecílio *et al.* <sup>16</sup> mostraram que os

extratos etanólicos de quatro plantas nativas do cerrado brasileiro (*Byrsonima verbascifolia*, *Myracrodruon urundeuva*, *Eugenia dysenterica* e *Hymenaea courbaril*), com elevado teor de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas e terpenos, inibiram o rotavírus, em células MA-104. Cepas de Influenza, sensíveis e resistentes a Amantadina e Oseltamivir, foram inibidas com extrato de *Psidium guajava*<sup>17</sup>. Os polifenóis de extratos de *Marrubium deserti* impediram a infecção do vírus Coxsackie B3<sup>18</sup>. Yang *et al.*<sup>19</sup> mostraram o efeito antiviral do composto polifenólico punicalagina de *Punica granatum* contra o Enterovírus 71 *in vitro* e *in vivo*. Esse mesmo composto também inibiu a replicação do HIV<sup>20</sup>, vírus influenza<sup>21</sup> e HSV<sup>22</sup>. A estricnina, um tanino hidrolisado obtido do chá verde, mostrou efeito inibitório para o vírus Influenza<sup>23</sup>. Lv *et al.*<sup>24</sup> mostraram que uma hemolisina isolada do basidiomiceto *Pleurotus nebrodensis* apresentou atividade contra o vírus HIV *in vitro*. Jain *et al.*<sup>25</sup> mostraram que extratos da planta *Hippophae rhamnoides* apresentaram atividade contra o vírus da dengue 2 (DEN2). O polissacarídeo sulfatado *fucoïdãna*, obtido de alga marinha *Cladosiphon okamuranus*, foi efetivo contra o DEN2, porém não apresentou atividade em outros sorotipos<sup>26</sup>. O extrato etanólico da folha de *Myrica rubra* mostrou atividade contra o vírus Influenza em células MDCK<sup>27</sup>. A atividade anti-poliiovírus também foi mostrada por compostos naturais, como os polissacarídeos de *Agaricus brasiliensis*<sup>28</sup> e de *Lentinus edodes*<sup>29</sup>. Foram efetivos, da mesma forma, os extratos de *Coffea arabica*<sup>30</sup>, *Heteropteris aphrodisiaca*<sup>31</sup>, *Lippia alba*<sup>32</sup>, *Dianella longifolia*<sup>33</sup> e *Anagallis arvensis*<sup>34</sup>.

Os antivirais naturais podem agir em vários estágios do ciclo de replicação do vírus como: a) na adsorção do vírus, bloqueio de receptores celulares e fusão do envelope; b) bloqueio do desnudamento e sequente liberação do ácido nucleico viral; c) inibição da transcrição inicial, tendo como alvo algumas enzimas virais precoces, como a DNA polimerase, transcriptase reversa e integrase; d) interferência na tradução e no processamento de proteínas virais que regulam o ciclo replicativo; e) bloqueio da síntese de ácido nucleico viral; f) interferência na tradução e o processamento de proteínas virais estruturais e/ou funcionais, agindo no processo de clivagem ou glicosilação; g) inibição da montagem e maturação das partículas virais e h) inibição da liberação da progênie viral<sup>35,36</sup>.

Os produtos naturais que inibem a multiplicação viral nos estágios iniciais da infecção atuam nas etapas (a) e (b), onde um dos mecanismos de ação deve-se a capacidade de determinados compostos de se ligarem diretamente à partícula viral, caracterizando um efeito virucida. Gescher *et al.*<sup>37</sup> analisaram o extrato de *Myrothamnus flabellifolia*, rico em polifenóis (proantocianidinas, taninos

hidrolisáveis e flavonoides), contra a infecção de HSV-1 e mostraram a atividade virucida do extrato pela interação dos produtos com alguns aminoácidos das glicoproteínas virais, principalmente gD, necessárias para entrada na célula. Camargo Filho *et al.* <sup>38</sup> reportaram o efeito virucida de um peptídeo (2 kDa) isolado de *Sorghum bicolor* contra o Herpesvírus, entretanto, quando testado contra um vírus não envelopado (Poliovírus) o composto não foi efetivo. Muitos trabalhos que avaliam comparativamente o efeito virucida entre os vírus envelopados e não envelopados demonstram que, nestes últimos, geralmente a inibição é menor ou nula, sugerindo que a atividade virucida seja derivada da ligação direta do peptídeo às glicoproteínas do vírus e, portanto, dependente da presença do envelope lipídico<sup>39,40,41</sup>. Zhu *et al.* <sup>42</sup> propõem que a atividade virucida dos compostos decorre da desintegração e solubilização do envelope viral, ou de alterações químicas, degradação e mascaramento das proteínas de adsorção.

A atividade virucida também vem sendo detectada em uma grande quantidade de polissacarídeos. Os polissacarídeos (PLS) são polímeros longos, constituídos principalmente de cadeias do tipo  $\beta$ -glucanas <sup>43</sup> e suas propriedades antivirais são conhecidas por quase 50 anos, principalmente em vírus envelopados<sup>44</sup>. Estas moléculas, com cargas negativas, exercem seu efeito inibitório pela interação com as cargas positivas do vírus, prevenindo, assim, a adsorção e/ou penetração na célula hospedeira <sup>45,46,47</sup>. Em alguns organismos marinhos como bactérias, algas, esponjas, fungos e corais têm sido isolados polissacarídeos, naturalmente sulfatados, o que aumenta a quantidade de cargas negativas da molécula, favorecendo o desenvolvimento de uma ação virucida. A relação da carga de vários compostos com a atividade antiviral tem sido relatada em diversos estudos. Saha *et al.* <sup>48</sup> testaram a ação de dois PLS isolados de *Azadirachta indica* e suas respectivas formas sulfatadas e verificaram que a sulfatação química aumentou o efeito antiviral contra o herpesvírus bovino. Por outro lado, quando esses PLS foram avaliados contra poliovírus a sulfatação diminuiu a atividade virucida detectada nos PLS originais <sup>49</sup> sugerindo que, para os vírus não envelopados, a sulfatação ou o aumento de cargas não parece influenciar na atividade antiviral. Yamamoto *et al.* <sup>50</sup> compararam a atividade anti-herpética do PLS isolado de *Agaricus brasiliensis* e de seu derivado sulfatado (PLSS) e observaram que a sulfatação aumentou a inibição viral apenas quando adicionado à célula simultaneamente com o vírus, o que pode ser explicado pelo aumento das cargas na molécula. Além dos PLS, a adição de cargas negativas a outros compostos naturais tem sido estudada desde a década de 90. Por exemplo, como descrito para

a lactoferrina, uma substância isolada do leite, esta adição resultou em um forte efeito antiviral contra o HIV, enquanto que a adição de cargas positivas diminuiu drasticamente o efeito anti-HIV <sup>51,52,53</sup>.

Além do efeito virucida, alguns antivirais naturais inibem a adsorção e penetração viral por competirem com os vírus pelos receptores na célula alvo. Nance *et al.* <sup>54</sup> mostraram que catequinas isoladas do chá verde ligam-se fortemente aos receptores CD4 das células T, inibindo a ligação da gp120 do HIV. Marchetti *et al.* <sup>55,56</sup> observaram que a lactoferrina inibia os estágios iniciais da infecção pelo HSV e essa inibição era decorrente da ligação do composto com as cadeias de glicosaminoglicanas dos receptores sulfato de heparana e de condroitina. Talarico *et al.* <sup>57</sup> avaliaram o efeito inibitório de dois PLS sulfatados isolados das algas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* na adsorção e penetração dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DEN1 – DEN4), em diferentes linhagens celulares (hepatoma humano, HEpG2, Vero e C6/36) e mostraram uma forte inibição para o DEN2, seguido do DEN3 e DEN4, não sendo ativos para o DEN1. Além disso, essa inibição também variou de acordo com a célula testada. No caso das células C6/36 os compostos foram totalmente inativos para todos os sorotipos. Esses dados demonstram a dependência de alguns compostos naturais com os tipos de proteínas na estrutura viral (sorotipos) e interação entre o vírus e o receptor na célula alvo.

Dessa forma, a ação dos compostos nas células alvo também pode impedir a adsorção e penetração viral, descrito como efeito profilático ou preventivo. Alguns compostos fenólicos, como os flavonoides, acumulam-se nas células dificultando a ligação do vírus <sup>58</sup>. Outros compostos como os PLS alteram a polaridade e/ou aumentam a hidrofobicidade da membrana celular afetando a penetração do vírus<sup>59</sup>. Além disso, muitos compostos ativos naturais são conhecidos pela propriedade imunomoduladora quando se ligam a receptores celulares. Nesse caso, o efeito antiviral é indireto, decorrente da ativação das vias de sinalizações intracelulares, levando a expressão de citocinas como o Interferon <sup>60</sup>.

Para o vírus infectar a célula hospedeira, além de receptores específicos, esta deve ser capaz de prover todo o ciclo replicativo deste vírus. Dentre a infinidade de espécies virais já estudadas, existe uma variação muito grande com relação às fases do processo de replicação, e cada uma destas etapas representa um possível alvo para a terapia antiviral, que possibilitaria a contenção da disseminação do vírus. Sendo assim, além dos compostos que interferem nas etapas precoces da

infecção viral (etapas *a* e *b*), alguns são também capazes de inibirem fases posteriores à entrada do vírus na célula hospedeira (etapas *c*, *d*, *e*, *f*).

Biesert *et al.* <sup>61</sup> descreveram o polissacarídeo polissulfatado HOE/BAY 946, o qual inibiu seletivamente a transcriptase reversa do HIV e a replicação viral *in vitro*. Da mesma forma, Ng *et al.* <sup>62</sup> mostraram a inibição da transcriptase reversa, protease e integrase do HIV-1 por proteínas do leite bovino, como a lactoferrina, lactoalbumina e caseína.

Ren *et al.* <sup>63</sup> descreveram um alcaloide obtido de *Tripterygium hypoglaucum*, o qual inibiu a transcrição dos genes da DNA polimerase e da ribonucleotídeo redutase do HSV-1, que são absolutamente necessários para o seu ciclo replicativo, além do gene da glicoproteína gD, principal glicoproteína do envelope viral.

No estudo conduzido por Johari *et al.* <sup>58</sup> mostrou inibição do vírus da encefalite japonesa (JEV) pelo flavonoide baicaleína. Os resultados deste estudo indicam que uma significativa redução no número de cópias de RNA é consistente com uma inibição da síntese do RNA viral. Os pesquisadores relatam ainda que a atividade antiviral pode estar relacionada à interação da baicaleína com proteínas estruturais e não estruturais. Outros estudos relatam atividade deste flavonoide interferindo na atividade de integrase e transcriptase reversa do HIV-1, sugerindo que o composto pode se ligar à enzimas virais essenciais para a replicação.

Yamamoto *et al.* <sup>50</sup> mostraram que polissacarídeos extraídos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* formam um complexo glucana-proteína, e que a predominância de  $\beta$ -glucanas pode ser responsável pela atividade antiviral.  $\beta$ -glucanas podem diminuir os níveis de ácidos nucleicos virais em células infectadas e estimular o sistema imune pela ligação aos receptores toll-like e dectinas, induzindo a expressão de várias citocinas, entre as quais o interferon. A indução de interferon estimula determinadas vias de sinalização intracelular gerando um estado antiviral.

O efeito de alguns poliânions naturais e sintéticos atribuído à indução da produção de interferon também tem sido relacionado a inibição da transcrição, tradução e processamento de proteínas. Gonzalez *et al.* <sup>64</sup> relataram que a carragenina, um polissacarídeo extraído de algas, não teve nenhum efeito sobre a adsorção ou penetração na célula hospedeira, mas inibiu a síntese de proteínas virais dentro da célula. Estes autores relataram ainda que em experimentos com partículas virais marcadas verificou-se claramente que estas são internalizadas na célula, mesmo com concentrações de carragenina 10 vezes maiores que as necessárias para bloquear a replicação viral.

De forma mais específica e analisando proteínas virais isoladamente, um estudo conduzido por Cardozo *et al.* <sup>65</sup> descreveram um polissacarídeo sulfatado extraído do corpo de frutificação de *Agaricus brasiliensis* que inibe consideravelmente a expressão de proteínas sintetizadas em diferentes fases do ciclo replicativo do HSV-1.

Bertol *et al.* <sup>66</sup> testaram cerca de 10 compostos isolados da planta *Digitalis lanata* e mostraram atividade antiviral para cepas de HSV-1 sensível e resistente ao ACV. Um dos compostos, glucoevatromonosídeo, inibiu a replicação viral por até 12 horas pós-infecção, apresentando efeito na síntese de proteínas virais (ICP27, UL42, gB, gD), além de bloqueio da liberação do vírus e redução da disseminação viral nas células.

Outros pesquisadores têm estudado, ainda, a capacidade da lactoferrina bovina, saturada com íons ferro, zinco e manganês, em combater a infecção por poliovírus. Suspeita-se que esta atividade se deve à internalização dos íons, já que o efeito ocorre de maneira dose-dependente. Sabe-se que o zinco pode prejudicar o processo de maturação de proteínas, e considerando o poliovírus, sugere-se que esta inibição ocorra no momento da clivagem proteolítica pós-traducional da poliproteína sintetizada, resultando em interrupção da infecção viral <sup>67,68,69</sup>.

Atualmente, devido a um maior conhecimento do ciclo de replicação de alguns vírus, novos alvos terapêuticos como o bloqueio da montagem, maturação e liberação das novas partículas virais têm chamado a atenção (etapas *g* e *h*). Sabe-se que, durante a montagem do vírion, ocorrem interações específicas entre as subunidades proteicas, e os compostos naturais podem competitivamente interferir nessas interações <sup>70</sup>. Além disso, as proteínas do capsídeo são, em sua maioria, altamente conservadas em uma família viral, indicando que os compostos que agirem nessa etapa induzirão pouco ou nenhuma seleção de resistência. Essa conservação também sugere a possibilidade de ação de largo espectro, isto é, pequenas moléculas dirigidas à montagem do capsídeo podem ter efeito em membros de uma ou mais famílias virais, ao invés de ser limitado a determinados vírus <sup>71</sup>.

Substâncias que interferem na liberação e disseminação da progênie viral também têm despertado o interesse de vários pesquisadores. Alguns estudos têm mostrado a redução do tamanho do plaque como evidência da inibição da disseminação célula-a-célula do HSV, causada por polissacarídeos sulfatados<sup>65,72,73</sup>. Uma vez que a eficiente disseminação do vírus desempenha um papel importante

na sua infecciosidade, a inibição da difusão intercelular é um alvo bastante atrativo para novas substâncias antivirais.

Dessa forma, considerando a importância das doenças virais com respeito à epidemiologia, latência, número restrito de antivirais disponíveis e a seleção de cepas mutantes e/ou resistentes aos medicamentos convencionais, é mister a consolidação do desenvolvimento de novas moléculas a partir dos produtos naturais, mais específicos e com menor efeito colateral, para uso de referência ou como alternativa contra as infecções virais. Além disso, destaca-se o grande potencial do Brasil para a pesquisa nessa área devido à ampla biodiversidade e registros etnofarmacológicos de muitas plantas medicinais.

#### 4. Referências

1. LU W.W., SUN J.R., WU S.S., LIN W.H., KUNG S.H. A dual reporter cell assay for identifying serotype and drug susceptibility of herpes simplex vírus. **Analytical Biochemistry**, v.415, p.97-104, 2011.
2. CHATTOPADHYAY D., CHAWLA-SARKAR M., CHATTERJEE T., DEY R.S., BAG P., CHAKRABORTI S., KHAN M.T.H. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. **New Biotechnology**, v.25, p.347-368, 2009.
3. JONES P.S. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, v.9, p.283-302, 1998.
4. DE CLERCQ E. Antivirals: past, present and future. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p.727-744, 2013.
5. ANTONELLI G., TURRIZIANI O. Antiviral therapy: old and current issues. **International Journal of Antimicrobial Agentes**, v.40, p.95-102, 2012
6. DE CLERCK E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.552-560, 2005.
7. VISALLI R.J., ZEIJL M.V. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. **Antiviral Research**, v.59, p.73-87, 2003.
8. CHATTOPADHYAY D., DAS S., CHAKRABORTY S., BHATTACHARYA S.K. Ethnomedicines for the development of anti-herpesvirus agents. In: CHATTOPADHYAY, D. **Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics**, p.117-147, 2010.
9. CHANTRILL B.H., COULTHARD C.E., DICKINSON L., INKLEY G.W., MORRIS W., PYLE A.H. The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. **Journal of General Microbiology**, v. 6, p.74-84, 1952.
10. BERGMANN W., FEENEY R.J. The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, p. 2809-2810, 1950.
11. BERGMANN W., FEENEY R.J. Contribution to The Study of Marine Products. XXXII. The Nucleosides of Sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, v.16, p.981-987, 1951.
12. COSTA-LOTU L.V., WILKE D.V., JIMENEZ P.C., EPIFANIO R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, No. 3, p. 703-716, 2009.
13. ELION G.B., FURMAN P.A., FYFE J.A., DE MIRANDA P., BEAUCHAMP L., SCHAEFFER H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.74, p.5716-5720, 1977.
14. SUCKLING C.J. Chemical approaches to the Discovery of new drugs. **Sci. Prog. Edin.** v.75, p.323- 360, 1991.
15. JASSIM S.A.A., NAJI M.A. Novel antiviral agents from plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.412-427, 2003.
16. CECÍLIO A.B., FARIA D.B., OLIVEIRA P.C., CALDAS S., OLIVEIRA D.A., SOBRAL M.E.G., DUARTE M.G.E., MOREIRA C.P.S., SILVA C.G., ALMEIDA V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.975- 981, 2012.

17. SRIWILAJAROEN N., FUKUMOTO S., KUMAGAI K., HIRAMATSU, H.; ODAGIRI, T.; TASHIRO, M.; SUZUKI, Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. **Antiviral Research**, v.94, p.139-146, 2012.
18. EDZIRI H., MASTOURI M., AOUNI M., VERSCHAEVE L. South African Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. **Journal of Botany**, v.80, p.104-109, 2012
19. YANG Y., XIU J., ZHANG L., QIN C., LIU, J. Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v.20, p.67-70, 2012.
20. NONAKA G., NISHIOKA I., NISHIZAWA M., YAMAGISHI T., KASHIWADA Y., DUTSCHMAN G.E., BODNER A.J., KILKUSKIE R.E., CHENG Y.C., LEE K.H. Anti-AIDS agents, 2: inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. **Journal of Natural Products**, v.53, p.587-595, 1990.
21. HAIDARI M., ALI M., WARD C.S., MADJID M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. **Phytomedicine**, v.16, p.1127-1136, 2009.
22. LIN L.T., CHEN T.Y., CHUNG C.Y., NOYCE R.S., GRINDLEY T.B., MCCORMICK C., LIN T.C., WANG G.H., LIN C.C., RICHARDSON C.D. Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v.85, p.4386-4398, 2011.
23. SAHA R.K., TAKAHASHI T., KUREBAYASHI Y., FUKUSHIMA K., MINAMI A., KINBARA N., ICHITANI M., SAGESAKA Y.M., SUZUKI T. Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication. **Antiviral Research**, v.88, p.10-18, 2010a.
24. LV H., KONG Y., YAO Q., ZHANG B., LENG F., BIAN H., BALZARINI J., DAMME E.V., BAO J. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. **Phytomedicine**, v.16, p.198-205, 2009.
25. JAIN M., GANJU L., KATIYAL A., PADWAD Y., MISHRA K.P., CHANDA S., KARAN D., YOGENDRA K.M., SAWHNEY R.C. Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. **Phytomedicine**, v.15, p.793-799, 2008.
26. HIDARI K.I., TAKAHASHI N., ARIHARA M., NAGAOKA M., MORITA K., SUZUKI T. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.376, p.91-95, 2008.
27. MOCHIDA K. Anti-influenza virus activity of *Myrica rubra* leaf ethanol extract evaluated using Madino-Darby canine kidney (MDCK) cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.72, p.3018-3020, 2008.
28. FACCIN L.C., BENATI F., RINCÃO V.P., MANTOVANI M.S., SOARES S.A., GONZAGA M.L., NOZAWA C., LINHARES R.E.C. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.24-28, 2007.
29. RINCÃO V.P., YAMAMOTO K.A., RICARDO N.M.P.S., SOARES S.A., MEIRELLES L.D.P., NOZAWA C., LINHARES R.E.C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. **Virology Journal**, v.9, p.1-6, 2012.
30. UTSUNOMIYA H., ICHINOSE M., UOZAKI M., TSUJIMOTO K., YAMASAKI H., KOYAMA H. Antiviral activities of coffee extracts *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1919-1924, 2008.
31. MELO F.L., BENATI F.J., ROMAN-JUNIOR W.A., MELLO J.C.P., NOZAWA C., LINHARES R.E.C. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. **Microbiological Research**, v.163, p.136-139, 2008.
32. ANDRIGHETTI-FRÖHNER C.R., SINCERO T.C.M., DA SILVA A.C., SAVI L.A., GAIDO C.M., BETTEGA J.M.R., MANCINI M., DE ALMEIDA M.T.R., BARBOSA R.A., FARIAS M.R., BARARDI C.R.M., SIMÕES C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v.76, p.3-4, 2005.
33. SEMPLE S.J., PYKE S.M., REYNOLDS G.D., FLOWER R.L.P. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**, v.49, p.169-178, 2001.
34. AMOROS M., FAUCONNIER B., GIRRE R.L. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. **Antiviral Research**, v.8, p.13-25, 1987.
35. RÁCZ M.L. Controle das Infecções virais. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 565-572.
36. WIGG M.D. Antivirais. In: SANTOS N.O., ROMANOS M.T.V., WIGG M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 117-146.
37. GESCHER K., KÜHN J., LORENTZEN E., HAFEZI W., DERKSEN A., DETERS A., HENSEL A. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, p.468-474, 2011.
38. CAMARGO FILHO I., CORTEZ D.A., UEDA-NAKAMURA T., NAKAMURA, C.V., DIAS FILHO B.P. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. **Phytomedicine**, v.15, p.202-208, 2008.

39. TANG J., COLACINO J.M., LARSEN S.H., SPITZER W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v.6, p.313-325, 1990.
40. ARAKAWA T., YAMASAKI H., IKEDA K., EJIMA D., NAITO T., KOYAMA A.H. Antiviral and virucidal activities of natural products. **Current Medicinal Chemistry**, v.16(20), p. 485-2497, 2009.
41. JAIME M.F.V., REDKO F., MUSCHIETTI L.V., CAMPOS R.H., MARTINO V.S., CAVALLARO L.V. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v.10, p.245, 2013.
42. ZHU W., CHIU L.C., OOI V.E., ANG JR. P.O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.81-85, 2004.
43. SHANNAN W.M. Antiviral agents and viral diseases of man. In: GALASSO, G.J.; MERIGAN, T.C.; BUCHANAN, R.A. (Eds.). **Antiviral Agents and Viral Diseases of Man**. New York: Raven Press, 1984. p. 55– 121.
44. SINHA S., ASTANI A., GHOSH T., SCHNITZLER P., RAY B. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochemistry**, v.71, p.235-242, 2010.
45. EHRESMANN D.W., DEIG E.F., HATCH M.T. **Marine algae in pharmaceutical science**. Berlin: Gruyter, 1979. p. 293-302.
46. GHOSH T., CHATTOPADHYAY K., MARSCHALL M., KARMAKAR P., MANDAL P., RAY B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v.19, p.2-15, 2009.
47. HATCH M., EHRESMANN D., DEIG E., WEDROS N. Further studies on the chemical composition and an initial *in vivo* evaluation of antiviral material in extracts of macroscopic algae. **Journal of Phycology**, v.13, p.28-35, 1977.
48. SAHA S., GALHARDI L.C.F., YAMAMOTO K.A., LINHARES R.E.C., BANDYOPADHYAY S.S., SINHA S., NOZAWA, C., RAY B. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.47, p.640-645, 2010b.
49. FACCIN-GALHARDI L.C., YAMAMOTO K.A., RAY S., RAY B., LINHARES R.E.C., NOZAWA C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.86-90, 2012.
50. YAMAMOTO K.A., FACCIN-GALHARDI L.C., RINCÃO V.P., SOARES S.A., VIERA I.G.P., RICARDO N.M.P.S., NOZAWA C., LINHARES R.E.C. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.52, p.9-13, 2013.
51. HARMSSEN M.C., SWART P.J., DE BETHUNE M.P., PAUWELS R., DE CLERCQ E., THE T.H., MEIJER D.K. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows a potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication *in vitro*. **The Journal of Infectious Diseases**. v.172, p.380-388, 1995.
52. SWART P.J., KUIPERS M.E., SMITH C., PAWELS R., DE BETHUNE M.P., DE CLERCK E., MEIJER D.K., HUISMAN J.G. Antiviral effects of milk proteins: Acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 *in vitro*. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.12, p.769-775, 1996.
53. SWART P.J., HARMSSEN M.C., KUIPERS M.E., VAN DIJK A.A., VAN DER STRATE B.W., VAN BERKEL P.H., NUIJENS J.H., SMIT C., WITVROUW M., DE CLERCQ E., DE BÉTHUNE M.P., PAUWELS R., MEIJER D.K. Charge modification of plasma and milk proteins results in antiviral active compounds. **Journal of Peptide Science**, v.5, p.563-576, 1999.
54. NANCE C.L., SIWAK E.B., SHEARER W.T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.123, p.459-465, 2009.
55. MARCHETTI M., TRYBALA E., SUPERTI F., JOHANSSON M., BERGSTROM T. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. **Virology**, v.318, p.405-413, 2004.
56. MARCHETTI M., AMMENDOLIA M.G., SUPERTI F. Glycosaminoglycans are not indispensable for the anti-herpes simplex virus type 2 activity of lactoferrin. **Biochemistry**, v.91, p.155-159, 2009.
57. TALARICO L.B., PUJOL C.A., ZIBETTI R.G.M., FARÍA P.C.S., NOSEDA M.D., DUARTE M.E.R., DAMONTE E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v.66, p.103-110, 2005.
58. JOHARI J., KIANMEHR A., MUSTAFA M.R., ABUBAKAR S., ZANDI K. Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.16785-16795, 2012.
59. BIESERT L., ADAMSKI M., ZIMMER G., SUHARTONO H., FUCHS J., UNKELBACH U., MEHLHORN R., HIDEK K., MILBRADT R., RUBSAMEN-WAIGMANN H. Anti- human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. **Medical Microbiology and Immunology**, v.179, p.307-321, 1990.

60. HUHEIHEL M., ISHANU V., TAL J., ARAD S.M. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.50, p.189-200, 2002.
61. BIESERT L., SUHARTONO H., WINKLER I., MEICHSNER C., HELSBERG M., HEWLETT G., KLIMETZEK V., MÖLLING K., SCHLUMBERGER H.D., SCHRINNER E. Inhibition of HIV and virus replication by polysulphated polyxylan: HOE/BAY 946, a new antiviral compound. **AIDS**, v.2, p.449-457, 1988.
62. NG T.B., LAM T.L., AU T.K., YE X.Y., WAN C.C. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase by bovine milk proteins. **Life Sciences**, v.69, p.2217-2223, 2001.
63. REN Z., ZHANG C., WANG L., CUI Y., QI R., YANG C., ZHANG Y., WEI X., LU D., WANG Y. *In vitro* Anti-viral Activity of the Total Alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* against Herpes Simplex Virus Type 1. **Virologica Sinica**, v.25, p.107-114, 2010.
64. GONZALEZ M.E., ALARCÓN B., CARRASCO L. Polysaccharides as Antiviral Agents: Antiviral Activity of Carrageenan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1388-1393, 1987.
65. CARDOZO F.T.G.S., CAMELINI C.M., MASCARELLO A., ROSSI M.J., NUNES R.J., BARARDI C.R.M., MENDONÇA M.M., SIMÕES C.M.O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, v.92, p.108-114, 2011.
66. BERTOL J. W., RIGOTTO C., PÁDUA R.M., KREIS W., BARARDI C.R.M., BRAGA F.C., SIMÕES C.M.O. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v.92, p.73-80, 2011.
67. RATKA M., LACKMANN M., UECKERMANN C., KARLINS U., KOCH G. Poliovirus-associated protein kinase: Destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by  $Zn^{2+}$ . **Journal of Virology**, v.63, p.3954-3960, 1989.
68. MARCHETTI M., SUPERTI F., AMMENDOLIA M.G., ROSSI P., VALENTI P., SEGANTI L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. **Medical Microbiology and Immunology**, v.187, p.199-204, 1999.
69. BERLUTTI F., PANTANELLA F., NATALIZI T., FRIONI A., PAESANO R., POLIMENI A., VALENTI P. Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. **Molecules**, v.16, p.6992-7018, 2011.
70. BOCANEGRA R., NEVOT M., DOMENECH R., LOPEZ I., ABIAN O., RODRIGUEZ-RUETE A., CAVASOTTO C.N., VELAZQUEZ-CAMPOY A., GOMEZ J., MARTINEZ M.A., NEIRA J.L., MATEU M.G. Rationally Designed Interfacial Peptides Are Efficient *In Vitro* Inhibitors of HIV-1 Capsid Assembly with Antiviral Activity. **Plos One**, v.6: e23877, p.1-14, 2011.
71. LINGAPPA V. R., HURT C.R., GARVEY E. Capsid assembly as a point of intervention for novel antiviral therapeutics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.14, p.1-11, 2013.
72. EKBLAD M., ADAMIAK B., BERGSTROM T., JOHNSTONE K.D., KAROLI T., LIU L., FERRO V., TRYBALA E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v.86, p.196-203, 2010.
73. LOPES N., FACCIN-GALHARDI L.C., ESPADA S.F., PACHECO A.C., RICARDO N.M.P.S., LINHARES R.E.C., NOZAWA C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.60, p.93-99, 2013.

## Capítulo 14

### Nanopartículas Metálicas com Atividade Antimicrobiana

---

Viviane Ferreira Cardozo<sup>1,3</sup>

Erick Kenji Nishio<sup>1,3</sup>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,3</sup>

Luciano Aparecido Panagio<sup>2,3</sup>

Gerson Nakazato<sup>1,3</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL

<sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia

---

#### 1. Introdução

A atividade antimicrobiana de íons metálicos é conhecida há muito tempo. O emprego de metais como cobre, prata e mercúrio tem sido descrito na desinfecção de água e tratamento de feridas há milênios. Propriedades antibacterianas da prata são conhecidas desde os tempos antigos. No Egito Antigo barras de prata eram colocadas em água, cuja ingestão dessa água servia como um medicamento para úlceras. Comida e vinho eram armazenados em vasos de prata, afim de impedir a deterioração. Os gregos utilizavam formulações com cobre para o tratamento de doenças pulmonares e tratamento de água. Soldados romanos costumavam colocar moedas de prata em suas feridas para acelerar a cura. Na Idade Média as pessoas tinham o hábito de dar aos seus filhos colheres de prata para sugar, como uma proteção contra várias doenças. Além disso, um pó de prata era administrado por via oral servindo como medicamento <sup>16, 24</sup>.

Em 1884 um obstetra alemão administrou solução de nitrato de prata a 1% para prevenir conjuntivite gonocócica em neonatos. Este foi provavelmente o primeiro uso da prata cientificamente documentado. Ainda hoje utiliza-se nitrato de prata na prevenção de moléstias oftálmicas (na forma solúvel de AgNO<sub>3</sub>) e tratamento de queimaduras (em forma insolúvel, sulfadiazina de prata).

Os compostos químicos que continham prata eram a principal arma contra infecções durante a 2<sup>a</sup> Guerra Mundial. A pigmentação irreversível da pele e dos olhos que resulta da deposição de compostos de prata levou à sua retirada como agente antibacteriano <sup>11</sup>.

O desenvolvimento de resistência por microrganismos aos antibióticos e emergência de novos patógenos (devido ao aumento da longevidade, AIDS, transplantes e tratamentos imunossupressivos) impulsiona o a procura por novos antimicrobianos. Alternativamente pode-se viabilizar novas formas de veiculação dos antimicrobianos. Assim, a incorporação da prata em nanopartículas, produzidas por diferentes plataformas, pode ser uma alternativa viável para seu uso como antimicrobiano<sup>16, 40</sup>.

As pesquisas envolvendo nanotecnologia vêm atraindo atenções e crescendo cada vez mais como uma ciência e tecnologia interdisciplinar envolvendo diferentes áreas como física, química, biologia e medicina <sup>11, 15, 32</sup>.

A concepção inicial de nanotecnologia foi apresentada por Richard Feynman do Instituto Americano de Tecnologia em 1959. O prefixo “*nano*” é derivado do Grego, com o significado de “*anão*”, referindo-se a objetos de um bilionésimo de tamanho ( $10^{-9}$  m). As nanopartículas comumente possuem em torno de 0.1 a 1000 nm em cada dimensão espacial <sup>32</sup>.

As nanopartículas são um intermediário entre os materiais a granel e estruturas moleculares ou atômicas. Enquanto os materiais a granel possuem propriedades físicas constantes, as nanopartículas possuem características físicas, químicas, eletrônicas, elétricas, mecânicas, magnéticas, térmicas, dielétricas, ópticas além de propriedades biológicas. Estas propriedades físicas são devido ao átomo com superfície maior, grande energia de superfície, confinamento espacial e imperfeições reduzidas. Desta forma os materiais a granel quando estudados em escala nanométrica apresentam propriedades interessantes <sup>6, 32, 49, 55</sup>.

## **2. Nanopartículas metálicas**

Sabe-se que alguns metais são responsáveis por funções celulares não encontradas em moléculas orgânicas, sendo estes metais indispensáveis para a vida de todos os organismos. No entanto esses metais cruciais são letais para as células quando presentes em altas concentrações. Além disso, outros metais, ditos não essenciais, como prata (Ag), mercúrio (Hg) e telúrio (Te) são extremamente tóxicos para bactérias, apresentando atividade antimicrobiana. Devido a essa toxicidade para bactérias e leveduras, alguns metais vêm sendo utilizados como agentes antimicrobianos desde antigamente <sup>23, 50</sup>. A prata em sua forma ionizada é altamente reativa e liga-se facilmente com uma grande variedade de íons carregados negativamente, assim como a proteínas, RNA e DNA <sup>38</sup>.

Partículas metálicas em escala nanométrica são particularmente interessantes devido à sua facilidade de síntese e modificação química. A diminuição do tamanho dos metais a granel para escalas nanométricas é uma oportunidade única para desenvolver uma nova classe de materiais altamente adaptáveis, combinado a uma rica diversidade de composições, estruturas, propriedades e suas constantes ópticas (dielétricas) que se assemelham às dos metais a granel com a vantagem de dimensões extremamente pequenas <sup>3, 5</sup>.

### **3. Síntese das nanopartículas metálicas**

Existem duas abordagens alternativas para sintetizar as nanopartículas metálicas: a abordagem "bottom-up" (de baixo para cima) e a "top-down" (de cima para baixo) <sup>11, 18, 33, 49</sup>.

A abordagem "bottom-up" se refere à produção de materiais em escala nanométrica por nanotecnologia molecular, consistindo na construção de estruturas átomo por átomo, molécula por molécula ou aglomerado por aglomerado. Inicialmente são formados os blocos nano-estruturados de forma precisa e controlada, posteriormente a montagem é finalizada por procedimentos químicos ou biológicos <sup>3, 49</sup>. A abordagem "bottom-up" refere-se a construção de sistemas funcionais e dispositivos com auto-organização, ou seja, automontagem de átomos e moléculas sem desperdícios ou necessidade de fazer ou eliminar partes do sistema final <sup>3</sup>.

A abordagem "top-down" refere-se à produção de materiais em escala nanométrica utilizando ferramentas controladas por parâmetros experimentais consistindo em quebras graduais dos materiais a granel até atingirem escalas nanométricas com formas e características desejadas por métodos físicos ou químicos <sup>3, 10, 30</sup>. Normalmente são utilizados processos litográficos onde o material é protegido por uma máscara e então exposto ao ataque externo, ataque este por métodos químicos utilizando-se ácidos ou físicos como luz ultravioleta, raio X ou feixes de elétrons <sup>3</sup>.

A vantagem das abordagens "top-down" é a produção em grande escala, porém em contrapartida a síntese de partículas uniformes e com tamanho controlado é difícil de conseguir <sup>18</sup>. Em contraste, nas abordagens "bottom-up" podem ser obtidas nanopartículas com composição química mais homogênea e com menos defeitos <sup>48</sup>.

As nanopartículas vêm sendo produzidas de forma física e química por um longo período de tempo. Porém, recentemente, a contribuição dos microrganismos e sistemas biológicos (plantas) na produção das nanopartículas metálicas tomou grande proporção <sup>15</sup>. É evidente, porém, em se tratando de reagentes químicos, que há necessidade de monitoramento sobre a absorção desses reagentes pelo solo e distribuição na água.

As pesquisas estão se voltando cada vez mais para a síntese de nanopartículas metálicas por métodos biológicos devido ao fato de não requerer reagentes tóxicos, não agredir o meio ambiente além de ser um método rápido e rentável <sup>8, 9, 37</sup>. Tais métodos biológicos envolvem normalmente o uso de microrganismos para a produção de nanopartículas metálicas. Vários micro-organismos são bastante conhecidos como algas, bactérias, fungos e actinomicetos. Além desses micro-organismos plantas e peptídeos também vêm sendo utilizados como um método de síntese <sup>8, 31</sup>.

Além disso, sempre deve ser considerada a possibilidade de toxicidade a seres humanos. Portanto, toda prudência é necessária e testes de toxicidade devem sempre ser realizados. <sup>17, 33</sup>.

### 3.1. Bactérias

As bactérias são os organismos mais extensivamente pesquisados para a síntese de nanopartículas metálicas. Uma das razões para tal preferência é devido a facilidade de manipulação desses organismos <sup>44, 49</sup>.

Um dos primeiros trabalhos envolveu a descoberta de uma bactéria resistente à prata, *Pseudomonas stutzeri* AG259, isolada de uma mina de prata com acúmulo de nanopartícula de prata no espaço periplasmático. Após esta primeira descoberta seguiram vários outros relatos de bactérias produtoras de nanopartículas metálicas como, *Morganella* sp., *Lactobacillus*, *Plectonema borynum*, *Escherichia coli*, *Clostridium thermoaceticum*, *Actinobacter* spp., *Shewanella algae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus* sp., *Thermomonospora* sp., *Shewanella oneidensis* e *Rhodopseudomonas capsulata*<sup>49</sup>.

As bactérias diferem entre o tipo de nanopartícula produzida (Ag, Au - ouro, CdS - cádmio sulfeto, FeS - magnetita e urânio), local (intra ou extracelular), pH (ácido a alcalino) e tamanho (2 a 500 nm). Diversos estudos mostram que a concentração do metal, condições e tempo de incubação influenciam no tamanho das nanopartículas formadas <sup>49</sup>.

Uma desvantagem associada a utilização de fungos para biossíntese de nanopartículas reside na dificuldade de manipulação genética para obtenção de cepas recombinantes capazes de superexpressar enzimas específica <sup>49</sup>.

Panacék e colaboradores (2009) mostraram a capacidade de uma bactéria recombinante em sintetizar nanopartículas metálicas. Nesse estudo os autores introduziram no gene que codifica a proteína fitoquelatina sintetase (PCS) de *Arabidopsis thaliana*, e o gene que codifica a proteína metalotioneína (MT) de *Pseudomonas putida* em *Escherichia coli*. Estas proteínas apresentam capacidade de se ligar e formar complexos com metais pesados como Cu, Cd, Zn, Se e Te.

A coexpressão das proteínas PCS e MT resultou na formação de diversas nanopartículas metálicas altamente ordenadas, e o tamanho das partículas pode ser controlado pela concentração de metais no meio <sup>36</sup>.

### 3.2. Fungos

Devido a sua tolerância aos metais e capacidade de bioacumulação os fungos estão se tornando o centro dos estudos de biossíntese de nanopartículas metálicas. Uma das maiores vantagens em utilizar fungos para a redução de nanopartículas é devido a facilidade de síntese e secreção de enzimas fúngicas extracelulares em grande escala <sup>41, 49</sup>.

Estudos com o fungo *Fusarium oxysporum* produtor de nanopartículas de prata sugerem que umas das proteínas envolvidas no processo de produção é uma redutase NADH-dependente. Esta redutase seria a responsável pela redução dos íons de prata e subsequente formação de nanopartículas de prata <sup>7</sup>.

Além do fungo *F. oxysporum*, vários outros foram relatados como produtores de nanopartículas como, *Phoma* sp., *Verticillium*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma asperellum* e *Phaenerochaete chrysosporium* <sup>12, 49</sup>.

Apesar da vantagem de produção em grande escala de enzimas a utilização de fungos para a biossíntese de nanopartículas possui uma desvantagem, a manipulação genética para super expressão de enzimas específicas. Uma tarefa muito mais complicada em eucariotos comparada aos procariotos <sup>49</sup>.

### 3.3. Plantas

Enquanto pesquisas envolvendo microrganismos vêm sendo realizadas com grande intensidade, o uso de plantas para biossíntese de nanopartículas de forma similar ainda é um campo pouco explorado <sup>49</sup>. Estudos mostram a capacidade de síntese extracelular de nanopartículas metálicas, por meio de redução da prata

aquosa por extratos de folha de *Pelargonium graveolens*. Em comparação com a biossíntese de nanopartículas por bactérias e fungos, a redução da prata pelo extrato de planta ocorre de forma bastante rápida. Para que ocorra uma completa redução da prata usando bactérias ou fungos é requerido entre 24 a 124 horas. Em contrapartida a maioria das reações usando extratos de folha de *P. graveolens* é completo requer nove horas <sup>44, 49</sup>.

A produção de nanopartículas de prata por *Callicarpa maingayi* a partir de extrato metanólico provou-se efetiva, com a esperada biorredução e estabilização dos íons prata nas nanopartículas <sup>42</sup>.

Apesar dos diversos estudos sobre biossíntese de nanopartículas por extratos de plantas, o exato mecanismo de síntese ainda não foi elucidado, várias hipóteses foram propostas tentando explicar esse mecanismo. Alguns estudos mostram que a presença de açúcares (aldoses), cetonas e proteínas servem como agentes redutores dos íons metálicos <sup>8</sup>.

### **3.4. Peptídeos**

De acordo com este modelo de biossíntese, quando os peptídeos são à solução de íons prata, interagem com os nano-aglomerados pré-formados ou com o núcleo da prata o primeiro metal a ser testado para esse método. Quando os peptídeos se aderem ao núcleo ou aos nano-aglomerados de metal de prata, aceleram a redução dos íons de prata e crescimento de cristais <sup>8</sup>.

A interação entre o peptídeo e o metal resulta em redução química dos íons metálicos, formando em cristais com diferentes tamanhos variando de 60 a 150  $\eta$ m. Arginina, cisteína, lisina, metionina e tirosina são os resíduos de aminoácidos que podem ser utilizados para a biossíntese <sup>8</sup>.

## **4. Atividade antimicrobiana**

### **4.1. Atividade antibacteriana**

As propriedades de nanopartículas, por exemplo, sua área de superfície ativa, reatividade química e atividade biológica, muitas vezes são radicalmente diferentes das partículas de um tamanho maior. Por exemplo, a eficácia antimicrobiana de nanopartículas metálicas tem sido atribuída ao seu tamanho e elevada relação superfície-volume. Em teoria, essas características permitem que

elas interajam diretamente com as membranas microbianas e, assim, provoquem um efeito antimicrobiano que não é apenas devido à liberação de íons metálicos <sup>1</sup>.

As partículas orgânicas e inorgânicas nanométricas são criadas para utilização em práticas médicas e pesquisa, tais como óxidos de zinco (ZnO), cobre (CuO), ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). A atividade antimicrobiana das nanopartículas tem sido amplamente estudadas em bactérias patogênicas humanas, tais como a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A atividade bactericida destas nanopartículas em parte depende do tamanho, da estabilidade e da concentração no meio de crescimento <sup>2</sup>.

Acredita-se que o principal efeito antibacteriano das nanopartículas de prata é a interação com os grupos tióis do peptidoglicano encontrado na parede celular bacteriana e nas proteínas presentes na membrana celular, assim como ao fósforo presente na membrana e enzimas celulares. A função da parede celular dos fungos, deenzimas e proteínas estruturais fúngicas e virais também são afetadas <sup>22, 31</sup>.

A ligação das nanopartículas de prata na superfície da célula bacteriana pode causar deficiência no transporte de íons e outras substâncias na membrana celular, afetando a permeabilidade celular. A atividade reduzida da bomba de sódio/potássio permite entrada de água e aumento do volume celular, ocasionando lise celular <sup>4, 18, 26</sup>.

Os íons de prata também penetram na célula bacteriana causando danos nas estruturas internas e desnaturação de proteínas, impedindo síntese de proteínas. Os íons de prata podem também ligar-se ao DNA bacteriano impedindo a sua replicação e portanto a multiplicação bacteriana <sup>17</sup>.

A gama de possíveis mecanismos de ação antibacteriana das nanopartículas de prata é responsável pela baixas taxas de resistência bacteriana a estes compostos, pois não interfere em mecanismos específicos, dado sua natureza de sua ligação ao enxofre e fósforo em qualquer estrutura microbiana. Além disso, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio que também participam da destruição da célula bacteriana <sup>23</sup>.

Observou-se que a exposição de micro-organismos patogênicos às nanopartículas de zinco levou à ruptura da membrana celular bacteriana e extravasamento do citoplasma. Estas nanofibras danificam a membrana celular bacteriana, bem como inibem a atividade das enzimas de membrana causando a morte celular ao longo do tempo <sup>23, 37</sup>.

#### **4.2. Atividade antifúngica**

Nanopartículas de prata também apresentam atividade antifúngica frente a fungos isolados de materiais clínicos humanos. Atividade fungistática foi observada em fungos leveduriformes e filamentosos frequentemente causadores de micoses humanas, como *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Trichopyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus*, entre outros <sup>35, 39, 54</sup>. Com o auxílio da microscopia eletrônica foi mostrado que nanopartículas de prata provocam a formação de poros na membrana celular de *C. albicans*, causando a morte celular <sup>34</sup>. O efeito inibitório também foi observado em fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Curvularia lunata*. Estudos indicam que as nanopartículas de prata destroem a integridade da membrana plasmática e interagem com compostos contendo fósforo ou enxofre, causando danos no DNA e em proteínas <sup>20, 21</sup>.

## 5. Aplicações

A propriedade antimicrobiana das nanopartículas de prata tem sido aplicada em muitas formulações e produtos como tecidos sintéticos, dispositivos cirúrgicos, processamento de alimentos e embalagens, e também na purificação de água <sup>14</sup>. Estas nanopartículas metálicas podem ser combinadas com polímeros e outros materiais de base, assim como revestindo superfícies para proporcionar um variado potencial antimicrobiano na área de saúde bucal <sup>1</sup>.

Nanopartículas de prata são utilizadas em tintas para o ambiente hospitalar, para cobrir as paredes de consultórios, laboratórios e salas de cirurgia; são incorporadas a materiais adesivos, limpadores de janelas, tecidos, papéis de parede e outros <sup>25</sup>. Estas partículas são também usadas para impregnar roupas e na produção de meias, para redução de odores desagradáveis. Estão também presentes em uma variedade de produtos cosméticos para a higiene diária, como sabonetes, shampoos, desodorantes, géis e cremes <sup>41</sup>.

As nanopartículas de prata são úteis ainda em produtos médicos, onde são incorporadas em roupas, ataduras, colchões, artigos de cama, luvas, seringas, máscaras e tubos para respirador, com eficiência estimada em 99% na eliminação de potenciais patógenos. Cabe ainda lembrar da utilização há décadas, na prevenção de infecções em queimaduras, em feridas e úlceras (acelerando a cicatrização), na forma de cremes ou soluções de nitrato de prata.<sup>27, 33, 53</sup>.

Uma potencial fonte de infecção é a utilização de cateteres intravenosos, seja para retirada de amostras de sangue para análise, seja para administração de fármacos ou nutrição parenteral. O recobrimento de cateter por nanopartículas de

prata pode prevenir o surgimento de infecções, inibindo o crescimento bacteriano por ao menos 72 horas <sup>28</sup>.

Nanofibras metálicas tem atraído muita atenção devido ao enorme potencial para uma ampla gama de aplicações: na engenharia têxtil, em biomateriais, purificação de água, confecção de embalagens, construção civil, medicamentos e alimentos.

O efeito larvicida contra *Aedes aegypti* (transmissor do vírus da dengue) e os vetores da filariose e malária demonstra mais um emprego das nanopartículas de prata. Estas doenças ocorrem frequentemente em países pobres e em desenvolvimento, causando centenas de milhares de mortes todos os anos. O uso das nanopartículas de prata pode, portanto, também contribuir para diminuição de transmissão de agentes infecciosos que flagelam milhões de pessoas <sup>13, 46, 47</sup>.

Tendo em perspectiva todos os estudos e comprovações dos efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata, podemos vislumbrar uma ampla empregabilidade destes compostos e diversos produtos. O atual estágio de desenvolvimento das nanopartículas metálicas nos permite afirmar que, alcançada a viabilização econômica de produção, teremos em breve uma gama de produtos à base de nanopartículas de prata ao alcance de nossas mãos.

## 6. Referências

1. ALLAKER R.P., MEMARZADEH K. Nanoparticles and the control of oral infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.43, p.95-104 , 2013.
2. AZAM A., AHMED A.S., OVES M., KHAN M.S., HABIB S.S., MEMIC A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal of Medicine**, v.7, p.6003-6009, 2012.
3. BISWAS A., BAYER I.S., BIRIS A.S., WANG T., DERVISHI E., FAUPEL F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.170, p.2-27, 2012.
4. BOOMI P., PRABU H.G., MATHIYARASU J. Synthesis, characterization and antibacterial activity of polyaniline/Pt-Pd nanocomposite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.72, p.18-25, 2014.
5. CARNÉ A., CARBONELL C., IMAZ I, MASPOCH D. Nanoscale metal-organic materials. **Chemical Society Reviews**, v.40, p.291-305, 2011.
6. DESIREDDY A., CONN B.E., GUO J., YOON B., BARNETT R.N., MONAHAN B.M., KIRSCHBAUM K., GRIFFITH W.P., WHETTEN R.L., LANDMAN U., BIGIONI T.P. Ultrastable silver nanoparticles. **Nature**, 2013. ISSN 0028-0836.
7. DHANASEKARAN D., LATHA S., SUBHASISH SAHA, THAJUDDIN N., PANNEERSELVAM A. Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. **International Journal of Green Nanotechnology**, v.3, p.72-82, 2011.
8. DURÁN N., MARCATO P.D., DURÁN M., YADAV A., GADE A., RAI M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied microbiology and biotechnology**, v.90, p.1609-1624, 2011.
9. FAYAZ A.M., BALAJI K., GIRILAL M., YADAV R., KALAICHELVAN P.T., VENKETESAN R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.6, p.103-109, 2010.
10. FELDHEIM D.L., COLBY JR A. **Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications**. CRC Press, 2002. ISBN 0824706048.

11. GADE A., INGLE A., WHITELEY C., RAI M. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. **Biotechnology Letters**, v.32, n. p.593-600, 2010.
12. GADE A., GAIKWAD S., DURAN N., RAI M. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. **Micron**, v.59, p.52-59, 2014.
13. GHOSH A., CHOWDHURY N., CHANDRA G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **The Indian Journal of Medical Research**, v.135, p.581, 2012.
14. GORDON O., VIG SLENTERS T., BRUNETTO P.S., VILLARUZ A.E., STURDEVANT D.E., OTT M. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p.4208-4218, 2010.
15. GUZMAN M., DILLE J., GODET S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.8, p.37-45, 2012.
16. INGLE A.P., DURAN N., RAI M. **Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.98, p.1001-1009, 2014.
17. IRAVANI S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v.13, p.2638-2650, 2011.
18. JIA C.-J., SCHÜTH F. Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.13, p.2457-2487, 2011.
19. JUNG W.K., KOO H.C., KIM K.W., SHIN S., KIM S.H., PARK Y.H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, p. 2171-2178, 2008.
20. KIM S.W., JUNG J.H., LAMSAL K., KIM Y.S., MIN J.S., LEE Y.S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v.40, p.53-58, 2012.
21. KRISHNARAJ C., RAMACHANDRAN R., MOHAN K., KALAICHELVAN P. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.93, p.95-99, 2012.
22. LARA H.H., AYALA-NUÑEZ N.V., IXTEPAN-TURRENT L., RODRIGUEZ-PADILLA C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v.8, p.1-10, 2010.
23. LEMIRE J. A., HARRISON J.J., TURNER R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.371-384, 2013.
24. LEUNG Y.H., NG A.M.C., XU X., SHEN Z., GETHINGS L.A., WONG M.T., CHAN C.M.N., GUO M.Y., NG Y.H., DJURISIC A.B., LEE P.K.H., CHAN W.K., YU L.H., PHILLIPS D.L., MA A.P.Y., LEUNG F.C.C. Mechanisms of Antibacterial Activity of MgO: Non-ROS Mediated Toxicity of MgO Nanoparticles Towards *Escherichia coli*. **Small**, v.10, p.1-13, 2014.
25. LI Q.L., MAHENDRA S., LYON D.Y., BRUNET L., LIGA M.V., LI D., ALVAREZ P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Research**, v.42, p.4591-4602, 2008.
26. LIKUS W., BAJOR G., SIEMIANOVICZ K. Nanosilver - does it have only one face? **Acta Biochimica Polonica**, v.60, p.1-7, 2013.
27. LIMA E., GUERRA R., LARA V., GUZMÁN A. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. **Chemistry Central Journal**, v.7, p.1-7, 2013.
28. LOK C.N., HO C.M., CHEN R., TAM P.K., CHIU J.F., CHE C.M. Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. **Journal of Proteome Research**, v.7, p.2351-2356, 2008.
29. MADHUMATI K., SUDHEESH KUMAR P.T., ABHILASH S., SREEJA V., TAMURA H. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.21, p.807-813, 2010.
30. de MEL A., CHALOUPKA K., MALAM Y., DARBYSHIRE A., COUSINS B., SEIFALIAN A.M. A silver nanocomposite biomaterial for blood-contacting implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.100, p.2348-2357, 2012.
31. MOHANPURIA P., RANA N.K., YADAV S.K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v.10, p.507-517, 2008.
32. NARAYANAN K.B., SAKTHIVEL N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.156, p.1-13, 2010.
33. NARAYANAN K.B., SAKTHIVEL N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.169, p.59-79, 2011.
34. NASROLLAHI A., POURSHAMSIAN K., MANSOURKIAEE P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **International Journal of Nano Dimension**, v.1, p.233-239, 2011.

35. PANACĚK A., KOLÁR M., VECEROVÁ R., PRUCEK R., SOUKUPOVÁ J., KRYSŤOF V. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v.31, p.6333–6340, 2009.
36. PARK T.J., LEE S.Y., HEO N.S. SEO T.S. *In vivo* synthesis of diverse metal nanoparticles by recombinant *Escherichia coli*. **Angewandte Chemie**, v.122, p.7173-7178, 2010.
37. PATTABI M., PATTABI R.M. Antibacterial Applications of Silver Nanoparticles. **Materials Science Forum**, Trans Tech Publ. p.131-142, 2013.
38. PELGRIFT R.Y., FRIEDMAN A.J. Nanotechnology as a therapeutical tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.1803-1815, 2013.
39. QIAN Y., YU H., HE D., YANG H., WANG W., WAN X., WANG L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. **Bioprocess and biosystems engineering**, v.36, p.1613-1619, 2013.
40. RAI M., YADAV A., GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, p.76-83, 2009.
41. SASTRY, M., AHMAD A., ISLAM KHAM I., KUMAR R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. **Current Science**, v. 85,p.162-170, 2003.
42. SHAMELI K., AHMAD M.B., ZAMANIAN A., SANGPOUR P., SHABANZADEH P., ABDOLLAHI Y., ZARGAR,M. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.5603-5610, 2011.
43. SINGH R., SINGH D. Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.23, p.2649-2658, 2012.
44. SHANKAR S.S., AHMAD A., SASTRY M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology progress**, v.19, p.1627-1631, 2003.
45. SLAWSON R.M., VAN DYKE M.I., LEE H., TREVORS J.T. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. **Plasmid**, v.27, p.72-79, 1992.
46. SUBARANI S., SABHANAYAKAM S., KAMARAJ C. Studies on the impact of biosynthesized silver nanoparticles (AgNPs) in relation to malaria and filariasis vector control against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.112, p.487-499, 2013.
47. SUGANYA G., KARTHI S., SHIVAKUMAR M.S. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from *Leucas aspera* leaf extracts against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 113, p. 875-880, 2014.
48. TAN K. S., CHEONG K.Y. Advances of Ag, Cu, and Ag–Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route. **Journal of Nanoparticle Research**, v.15, p. 1-29, 2013.
49. THAKKAR K.N., MHATRE S.S., PARIKH R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.6, p.257-262, 2010.
50. THARKOR A.S., JOKERST J., ZAVALETA C., MASSOUD T.F., GAMBHIR S.S. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. **Nano Letters**, v.11, p.4029-4036, 2011.
51. TOUSEEF A., HASSAN M.S., BARAKAT N.A.M, PANDEYA D.R., HONG S.T., KHIL M., KIM H.Y. Antibacterial activity and interaction mechanism of electrospun zinc-doped titanium nanofibers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, p.743-751, 2012.
52. WALSER T., DENOU E., LANG D.J., HELLWEG S. Prospective environmental life cycle assessment of nanosilver T-shirts. **Environmental Science & Technology**, v.45, p.4570–4578, 2011.
53. WU J., ZHENG Y., SONG W., LUAN J., WEN X., WU Z., CHEN X., WANG Q., GUO S. *In situ* synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v.102, p.762-771, 2014.
54. XU Y., GAO C., LI X., HE Y., ZHOU L., PANG G., SUN S. *In vitro* antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.29, p.270-274, 2013.
55. ZAHMAKIRAN M., ÖZKAR S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, v.3, p.3462-3481, 2011.

## Capítulo 15

### **Plantas Medicinais: A Busca de Novos Fármacos no Tratamento de Doenças Causadas por Protozoários Tripanossomatídeos**

---

Celso Vataru Nakamura<sup>1,2</sup>  
Adriana Oliveira dos Santos<sup>1</sup>  
Erika Izumi<sup>1</sup>  
Raissa Bocchi Pedroso<sup>1</sup>  
Rodrigo Hinojosa Valdez<sup>1</sup>  
Tânia Ueda-Nakamura<sup>2</sup>  
Benedito Prado Dias Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá - UEM, Centro de Ciências da Saúde, Depto. de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina – UEL.

---

#### **1. Introdução**

Plantas Medicinais têm sido utilizadas desde tempos antigos como medicamentos para o tratamento de várias doenças. Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. Assim, as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maioria dos medicamentos, e pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina convencional <sup>76</sup>. Apesar do grande avanço observado na medicina, as plantas ainda têm uma importante contribuição nos cuidados com a saúde <sup>15</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para os cuidados primários com a saúde.

Um acentuado crescimento no mercado de fitoterápicos mundial tem ocorrido nos últimos anos. Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas <sup>30, 77</sup>. Em alguns casos em particular, como substâncias antitumorais e antimicrobianas, mais de 60% dos medicamentos do mercado e em estudos clínicos, são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas <sup>21</sup>. Apesar da grande utilização de plantas na medicina popular, para a maioria dos fitoterápicos comercializados faltam evidências científicas que comprovem sua eficácia e segurança, sendo que seus supostos méritos terapêuticos devem-se principalmente a informações empíricas e

subjetivas da medicina folclórica <sup>10</sup>. A maioria das companhias farmacêuticas tem demonstrado interesse na investigação de plantas como fontes de novas estruturas e também para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados que mostrem eficácia, segurança e qualidade <sup>6, 11, 30</sup>.

De um modo geral tem-se a idéia de que fitoterápicos são seguros e livre de efeitos tóxicos. Entretanto, as plantas contêm vários constituintes e alguns deles são muito tóxicos, como substâncias citotóxicas anticâncer derivadas de plantas, digitálicos e os alcaloides pirrolizidínicos <sup>15</sup>. É importante apontar que cerca de 11% das plantas estudadas têm sido relatadas como tendo efeitos tóxicos. Essa consideração aumenta a preocupação sobre o uso popular e o abuso no emprego de plantas no tratamento de diversas doenças.

As plantas medicinais estão distribuídas mundialmente, mas existem em maior abundância nos países tropicais. A floresta Amazônica é um extenso e heterogêneo território apresentando um grande número de espécies ainda não descritas e várias tribos indígenas com vasta experiência no emprego de plantas medicinais. Além da floresta Amazônica há mais quatro regiões no Brasil com uma grande quantidade de plantas nativas <sup>70</sup>, mas faltam estudos farmacológicos e químicos. Um total de 93 compostos com um ou mais efeitos farmacológicos foram isolados da flora brasileira <sup>12</sup>.

## **2. Os Tripanossomatídeos**

A família *Trypanosomatidae* compreende um grande número de protozoários, alguns dos quais são agentes de importantes doenças, tais como leishmaniose, doença de Chagas e tripanossomíase africana, afetando homens e animais. Essa família está classificada na ordem Kinetoplastida. Os organismos pertencentes a essa ordem possuem uma estrutura celular conhecida como cinetoplasto, que é uma região diferenciada da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial organizado em mini e maxi-círculos, denominado k-DNA <sup>56</sup>. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular e a observação do flagelo, localizado na região anterior, são critérios para determinação da forma evolutiva dos tripanossomatídeos, sendo estas: promastigota, paramastigota, coanomastigota, amastigota, epimastigota, opistomastigota e tripomastigota <sup>31</sup>. A família é constituída de protozoários parasitas uniflagelados, mono ou heteroxênicos, na qual

também estão presentes outros parasitas de importância médica, agrônômica e veterinária.

Doenças causadas por protozoários são responsáveis por consideráveis índices de mortalidade em países tropicais e subtropicais. Novos fármacos são urgentemente requeridos para o tratamento de amebíases, leishmanioses, tripanossomíases e malária, visto que os compostos disponíveis, tais como antimônios pentavalentes, pentamidina, benzonidazol, nifurtimox, melarsoprol, cloroquina e primaquina são altamente tóxicos, requerem longo tempo de uso, além de serem inacessíveis a maioria da população carente <sup>23, 34, 95</sup>. Alternativas terapêuticas são necessárias e as plantas superiores devem ser investigadas, visto que são fontes potenciais de novos fármacos para a quimioterapia antiprotozoários.

### **3. *Leishmania amazonensis* e as Leishmanioses**

As doenças causadas por protozoários são um grande problema para a saúde, sobretudo em populações de baixo nível sócio-econômico. Dentre estas, está a leishmaniose, causada por várias espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. A leishmaniose manifesta-se em um amplo espectro de formas clínicas, que dependem da espécie ou subespécie do parasita infectante, da distribuição dos macrófagos infectados e, especialmente, da resposta imune do hospedeiro. As principais síndromes de leishmaniose humana, em ordem crescente de acometimento sistêmico e provável gravidade clínica, classificam-se como: formas cutâneas, mucocutâneas e visceral. Essa parasitose é causa de considerável mortalidade no mundo, uma vez que afeta mais de 12 milhões de pessoas, com 1 a 2 milhões de novos casos registrados anualmente. No Brasil, a incidência de leishmaniose cutânea tem aumentado em praticamente todas as regiões do país <sup>46</sup>, sendo considerada endêmica, inclusive, no norte do Estado do Paraná <sup>78</sup>. Perspectivas de controle dependem de alguns fatores, como o desenvolvimento de novas estratégias para o controle do vetor e tratamento <sup>16, 18, 20, 35, 47, 71, 88, 93</sup>.

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxênico, alternando entre formas promastigotas (extracelulares) e amastigotas (intracelulares). Promastigotas são transmitidas exclusivamente pelo hospedeiro invertebrado, que são mosquitos flebótomos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* <sup>18</sup>. Esses inoculam as formas promastigotas metacíclicas, infectando o hospedeiro vertebrado. Uma vez no interior do hospedeiro, as formas promastigotas são

internalizadas pelos macrófagos, onde se diferenciam em formas amastigotas imóveis constituindo o principal alvo das quimioterapias para a leishmaniose<sup>14,26,47,55</sup>.

As formas clássicas de leishmanioses, tais como, leishmaniose cutânea e visceral, impõem dificuldades específicas em termos de diagnóstico e tratamento. Não há nenhuma vacina contra essa doença e o tratamento é dependente de um limitado número de fármacos. Antimoniais pentavalentes, os quais foram desenvolvidos antes de 1960, são as linhas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Anfotericina-B e pentamidina estão sendo utilizadas como tratamento alternativo. Todas essas substâncias são limitadas pela sua toxicidade, requerem administração intravenosa por um longo período e custo elevado. Novos fármacos estão sendo adotados no tratamento das leishmanioses, como a Miltefosina®, que é considerada o primeiro fármaco de aplicação oral. No entanto, ainda é muito pequeno o número de substâncias efetivas, seguras e disponíveis<sup>24</sup>. Assim, a busca de novas substâncias antiparasitárias é uma prioridade na área médica. Nesse contexto, o uso de produtos naturais com baixa toxicidade e potente atividade biológica é uma alternativa bastante promissora<sup>15, 25, 79</sup>. Dentro desta perspectiva, o Brasil é um país privilegiado, pelo fato de deter extensa e diversificada flora, sobretudo em algumas regiões, tais como: a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal<sup>15, 81, 96</sup>.

Alcaloides, terpenos, quinonas e flavonoides são exemplos que ilustram a diversidade de compostos encontrados em plantas superiores, que podem apresentar atividade seletiva em relação ao parasito. Portanto, esses grupos químicos podem ser objetos de estudo para a identificação de novas substâncias e/ou para modificações semi-sintéticas para melhorar a atividade terapêutica e diminuir seus efeitos tóxicos<sup>3, 68</sup>. Em todo o mundo, inúmeros grupos de pesquisa investigam as possíveis atividades biológicas das plantas, baseando-se em informações etnobotânicas. Os dados obtidos atestam, cada vez mais, e de maneira científica, as propriedades terapêuticas das plantas, em detrimento aos resultados empíricos de outrora. Cientistas franceses selecionaram 17 espécies de plantas e, a partir destas, prepararam extratos de algumas de suas partes, que foram posteriormente testados *in vitro* sobre protozoários e muitos apresentaram atividade antiproliferativa<sup>63</sup>. Vinte e nove extratos de 18 plantas medicinais usadas na França foram avaliados *in vitro* contra *Leishmania donovani*. Dentre as plantas selecionadas *Scaevola balansae* e *Premna serratifolia* L. foram capazes de inibir o

crescimento do parasito nas concentrações inibitórias 50% (IC<sub>50</sub>) entre 5 e 10 µg/ml<sup>36</sup>.

Estudos sobre o efeito antileishmania de produtos naturais têm sido realizados por nosso grupo de pesquisa e resultados promissores foram obtidos com a planta *Tanacetum parthenium*, a partir da qual foi isolado o composto partenolídeo<sup>85</sup> e também com as neolignanas isoladas de folhas de *Piper regnellii*<sup>89</sup>.

Tiuman e colaboradores<sup>85</sup> mostraram que extrato bruto e frações obtidas do *T. parthenium* apresentaram significativa atividade antileishmania. A partir da fração diclorometano obteve-se a substância purificada partenolídeo, ativa contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com IC<sub>50</sub> de 0,37 µg/ml e 0,81 µg/ml respectivamente. No estudo realizado por Vendrametto<sup>88</sup> foi verificada a atividade antileishmania do extrato bruto e frações da planta *Piper regnellii* var. *pallenscens* pertencente a Família *Piperaceae*. As frações hexano e clorofórmio foram as que apresentaram melhor atividade com IC<sub>50</sub> de 21,5 e 32,0 µg/ml, respectivamente. Testes de citotoxicidade mostraram que o extrato bruto e frações não são tóxicos para células de mamíferos. A análise cromatográfica da fração clorofórmio revelou a presença de quantidade substancial da neolignana eupomatenoide-5, a qual apresentou atividade antileishmania sobre formas promastigotas, amastigotas axênica e intracelular.

Outra alternativa para o tratamento de infecções parasitárias são as substâncias sintéticas e semi-sintéticas, tais como as tiossemicarbazonas. Pesquisas indicam que a atividade biológica das tiossemicarbazonas está relacionada com a habilidade de quelar íons metálicos de transição<sup>53, 54</sup>. Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou a atividade antileishmania de duas tiossemicarbazonas: 1-benzaldeído-4-R-(+)-limoneno tiossemicarbazona (Tio 1) e 1-p-nitrobenzaldeído-4-R-(+)-limonenotiossemicarbazona (Tio 11) sobre *L. amazonensis*. Para a substância Tio 1, a inibição do crescimento do protozoário foi maior do que 90% nas concentrações acima de 10 µg/ml. Já para a substância Tio 11, esta mesma porcentagem de inibição de crescimento ocorreu nas concentrações maiores que 5 µg/ml<sup>50</sup>.

Entre as últimas pesquisas realizadas pelo nosso grupo, na busca de fármacos para o tratamento da leishmaniose a partir de produtos naturais, estão os estudos com o óleo da copaíba obtido a partir de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (Figura 1). As plantas do gênero *Copaifera* são nativas das regiões tropicais da América Latina. São árvores de grande porte distribuídas na Amazônia e região Central do Brasil<sup>86</sup> a partir das quais é extraído o óleo da copaíba, que é o

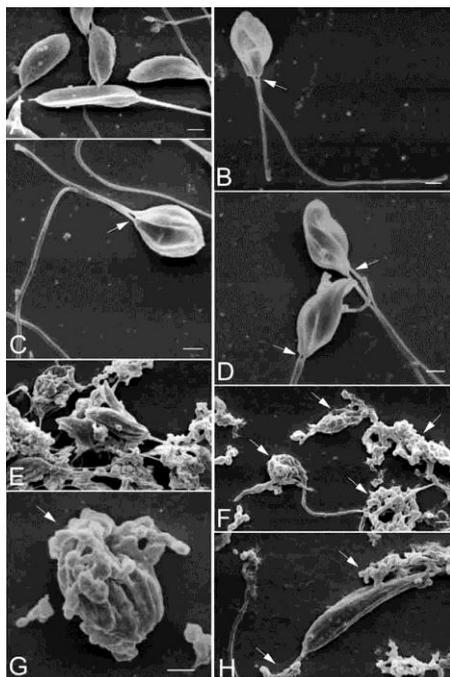
produto da exsudação patológica do lenho dessas árvores<sup>13</sup> e são constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos<sup>19</sup>. O óleo da copaíba pode ser facilmente encontrado em toda a Amazônia, onde é vendido em mercados e feiras populares, com diferentes denominações, dentre as quais podem ser citadas: Panchimoiti, Palo de aceite, Cabimo, Copahyba, Copaibarana, Copaúba, Copaibo, Copal, Maram, Marimari e Bálsamo dos Jesuítas<sup>86</sup>. Muitas propriedades dos óleos da copaíba estão sendo investigadas, dentre elas, destacam-se: antiinflamatória, antitumoral, antitetânica, antiblenorrágica, para cura da bronquite, sífilis, doenças da pele, úlcera, e também como cicatrizante de feridas<sup>4, 5, 13, 19, 57, 65, 87</sup>.



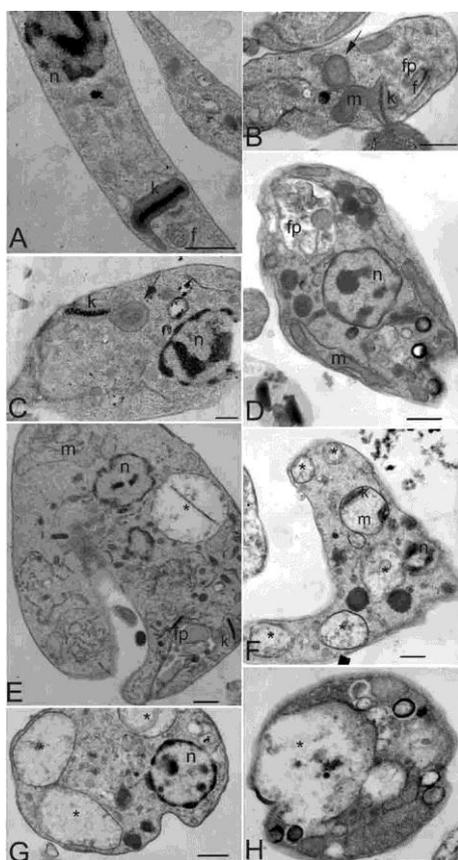
**Figura 1.** Árvore de *Copaifera officinalis* L. ([www.amazoniaorganics.com](http://www.amazoniaorganics.com)<sup>96</sup>)

Dessa forma, foram avaliados óleos de copaíba de 8 espécies do gênero *Copaifera*: *C. multijuga*; *C. martii*; *C. cearensis*; *C. paupera*; *C. langsdorfii*; *C. officinalis*; *C. lucens* e *C. reticulata* provenientes dos Estados do Acre e do Pará. Os óleos de copaíba de diferentes espécies de *Copaifera* apresentaram em formas promastigotas uma atividade antileishmania com IC<sub>50</sub> entre 5 e 20 µg/ml. Analisando o efeito do óleo de copaíba na ultraestrutura das formas promastigotas de *L. amazonensis*, observada por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, foi possível constatar várias alterações em relação ao controle, tais como alterações na membrana plasmática, presença de duplo flagelo, presença de figuras de mielina, estruturas autofágicas e formação de vesículas exocíticas na bolsa flagelar (Figuras 2 e 3).

Os resultados obtidos até o momento atestam que na maioria das vezes, as plantas utilizadas na medicina popular, realmente apresentam atividade terapêutica. Estas são fontes potenciais de novos fármacos seguros e efetivos para o tratamento da leishmaniose. Estudos visando a elucidação dos prováveis mecanismos de ação e testes *in vivo* estão em andamento.



**Figura 2:** Microscopia Eletrônica de Varredura de *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren. Promastigotas não tratadas (A); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 10  $\mu\text{g/ml}$  - IC<sub>50</sub> (B); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 80  $\mu\text{g/ml}$  - IC<sub>90</sub> - (C e D) (Santos <sup>74</sup>).



**Figura 3:** Microscopia Eletrônica de Transmissão *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren. Promastigotas não tratadas (A); Tratadas com *C. reticulata* 10  $\mu\text{g/ml}$  - IC<sub>50</sub> (B,C); Tratadas com *C. reticulata* 80  $\mu\text{g/ml}$  - IC<sub>90</sub> - (D,E,F,G e H). m, mitocôndria; fp, bolsa flagelar; f, flagelo; n, núcleo; k, cinetoplasto; \*, vacúolos (Santos <sup>74</sup>).

#### 4. *Trypanosoma cruzi* – Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma doença endêmica da América Latina. Estimativas da Organização Mundial de Saúde relatam aproximadamente 18 milhões de pessoas infectadas, sendo 2 milhões somente no Brasil <sup>94</sup>.

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, apresenta três tipos morfológicos distintos durante seu ciclo de vida: tripomastigota, amastigota e epimastigota. A forma tripomastigota (infectiva, mas não replicativa) é delgada, alongada medindo cerca de 15  $\mu\text{m}$ , apresenta uma membrana ondulante proeminente, sendo encontrada na porção final do intestino do inseto triatomíneo (tripomastigota metacíclico) e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguíneo). A forma amastigota (replicativa e infectiva) é arredondada, apresentando flagelo curto restrito à bolsa flagelar, mede cerca de 5  $\mu\text{m}$ , sendo encontrada no interior das células dos hospedeiros mamíferos e na circulação sanguínea. A forma epimastigota (replicativa e não infectiva) é alongada, medindo 30  $\mu\text{m}$  de comprimento em média, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, podendo ser cultivada em meios de cultura axênicos. O ciclo biológico de *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, necessitando um vetor invertebrado (inseto) e um hospedeiro vertebrado (mamífero). A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de duas maneiras: naturalmente através de fezes ou urina contaminadas de insetos triatomíneos hematófagos, como descrito acima, via oral e transplacentária; ou pode ocorrer também de maneira artificial em decorrência do próprio avanço da medicina, podendo ser por transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados e por acidentes de laboratório.

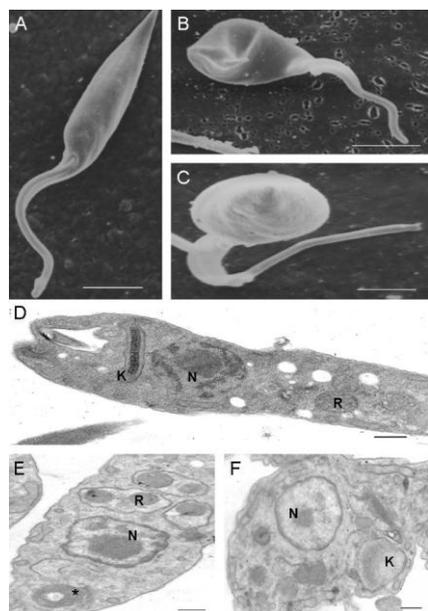
No homem a doença de Chagas apresenta um curso clínico bastante variado apresentando uma fase aguda e crônica. Na fase aguda é comum o paciente apresentar uma lesão inflamatória no local de entrada do parasita chamado chagoma; quando a entrada deste ocorre pela mucosa do olho, pode-se visualizar após pouco tempo o sinal de Romaña, caracterizado pelo inchaço de um dos olhos. Em geral dura poucas semanas, pode apresentar quadro febril discreto, náuseas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia e em casos mais graves podem ocorrer taquicardia, arritmias cardíacas, podendo evoluir a óbito do paciente <sup>83</sup>. A maioria dos casos não é detectada e, portanto não tratada, ocasionando a evolução da doença para forma crônica indeterminada que consiste na presença da infecção comprovada por sorologia e métodos parasitológicos diretos, porém sem apresentar

sintomatologia e sinais clínicos como as alterações cardíacas e digestivas <sup>38</sup>. Do ponto de vista clínico-epidemiológico, as formas mais graves são as formas crônicas sintomáticas, face aos grandes impactos médicos e sociais que causam. Estas se caracterizam por manifestações mórbidas, como a cardiopatia chagásica crônica, aneurismas e as megasíndromes (megaesôfago, megacólon e cardiomegalia).

Os fármacos disponíveis atualmente no mercado mundial para o tratamento da doença de Chagas foram desenvolvidos nos anos setenta, os chamados derivados nitroheterocíclicos; o nifurtimox, do grupo dos nitrofuranos, e o benzonidazol, do grupo dos nitroimidazóis. Ambos os medicamentos são ativos durante a fase aguda da doença e na fase crônica em curto prazo. Tanto testes em laboratório como ensaios clínicos têm revelado que a eficiência destes fármacos varia com a linhagem do parasita <sup>8</sup>. Além destes fatores limitantes, estes medicamentos provocam fortes efeitos colaterais como anorexia, distúrbios gastro-intestinais, neuropatias, erupções cutâneas do tipo eritema polimorfo não-bolhoso, distúrbios da hematopoese (com granulocitopenia ou agranulocitopenia) e dermatotoxicidade, sendo o seu uso parenteral controverso <sup>22, 48</sup>. Devido à alta toxicidade dos fármacos disponíveis e seu baixo efeito, a doença torna-se crônica. Pesquisas realizadas com o intuito de desenvolver novos fármacos capazes de parar a replicação do parasita, aumentando a expectativa de vida dos pacientes, ou ainda levar à cura total. Para isso, é considerado muito relevante o conhecimento popular, em diversas regiões do planeta, sobre a utilização de produtos naturais para tratamento de doenças. As pesquisas de novos fármacos oriundos desse conhecimento ou mesmo de substâncias semissintéticas e sintéticas, trazem novas esperanças para os doentes e conhecimento maior sobre a biologia do parasito.

Estudos com extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais de diversos lugares como América Central e América do Sul, África e Sudeste Asiático são realizados e obtêm-se bons resultados, visto que são plantas oriundas de regiões de alta diversidade, predominantemente zona tropical, que em sua maioria nunca foram estudadas para efeito tripanocida <sup>1, 42, 64, 82</sup>. Entre as pesquisas realizadas recentemente sobre o efeito tripanocida de produtos naturais, encontram-se algumas realizadas por nosso grupo de pesquisa, tais como a atividade de neolignanais isoladas de folhas de *Piper regnellii* <sup>58, 59</sup> e sesquiterpeno lactona partenolideo isolado de *Tanacetum parthenium* <sup>52</sup>. Partenolideo é capaz de causar alterações na morfologia do protozoário, tais como o arredondamento do corpo celular, o aparente encurtamento do flagelo e alterações ultraestruturais, como o aparecimento de figuras de mielina, o cinetoplasto difuso, o aparente

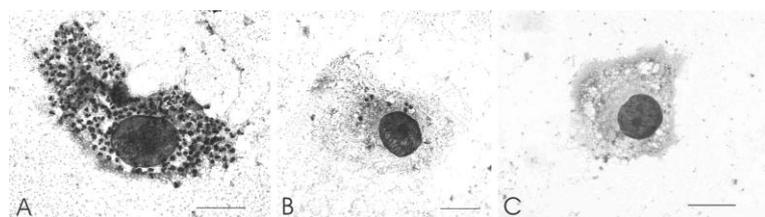
aumento no número de reservosomos e alguma desorganização de membranas internas (Figura 4). Além destas, outras pesquisas realizadas por outros grupos de pesquisa destacam o efeito tripanocida de extrato aquoso de *Camellia sinensis* que parece inibir a enzima arginina quinase do parasito, interferindo assim com seu metabolismo <sup>66</sup>; extrato etanólico obtido de *Populus nigra* <sup>29</sup>; óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* <sup>73</sup>; e ainda isoquinolinas isoladas de *Ocotea lancifolia* que possuem intensa atividade sobre tripomastigotas sanguíneos <sup>41</sup>. Além dos produtos naturais, algumas substâncias sintéticas e semi-sintéticas têm apresentado atividade tripanocida, como mostrado anteriormente com o bisfosfonato risedronato <sup>44</sup>, L-leucina-metil éster que parece ter atividade sobre o crescimento de *T. cruzi* <sup>2</sup> e ainda  $\beta$ -lapachonas semi-sintéticas mostraram ser promissores agentes tripanocidas *in vitro* <sup>61</sup>.



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com partenolídeo. Nota-se alterações celulares tanto na forma do corpo celular quanto na organização de membranas internas. Controle (A, D); IC<sub>50</sub> (B, E); IC<sub>90</sub> (C, F). K, cinetoplasto; N, núcleo; R, reservossomo. A, B e C, Barra 2  $\mu$ m. D, E e F, Barra 1  $\mu$ m. (Izumi *et al.* <sup>52</sup>)

Outros compostos sintéticos conhecidos como WSP<sup>®</sup> apresentam atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas<sup>9</sup>. Derivados triazóis usados no tratamento de micoses, como o protótipo UR-9825<sup>®</sup> e albcazol que são inibidores da biossíntese do ergosterol, têm apresentado resultados interessantes na inibição de *T. cruzi*, sendo que este último mostrou ser eficiente na diminuição da parasitemia em animais infectados <sup>49</sup>. Existe ainda uma classe de compostos sintéticos derivados do triptofano, chamados carbolínicos que possuem uma potente ação contra *T. cruzi in vitro* <sup>69</sup>. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa constataram ação tripanocida de derivado carbolínico sobre as três formas evolutivas do parasito, o qual possui uma atividade antiproliferativa sobre formas

epimastigotas, apresentando uma  $IC_{50}$  de  $14,9 \mu M$ . Em formas tripomastigotas a concentração efetiva 50% ( $EC_{50}$ ) nos parasitos foi de  $45 \mu M$ . Já sobre formas amastigotas extracelulares o resultado foi semelhante, sendo o  $EC_{50}$  de  $33 \mu M$ . O composto carbolínico foi efetivo também sobre as formas amastigotas intracelulares, sendo a substância capaz de agir diretamente sobre o parasito, causando uma considerável diminuição no número de células infectadas ( $EC_{50}$  de  $66 \mu M$ ), como também no número de amastigotas intracelulares ( $EC_{50}$  de  $22 \mu M$ ). Adicionalmente, o composto carbolínico não apresentou efeitos deletérios sobre as células hospedeiras (Figura 5). Outro resultado importante obtido sobre esta substância é a sua baixa toxicidade sobre linhagens celulares *in vitro*, sendo o carbolínico 31 vezes mais tóxico para o parasito do que para a célula do hospedeiro<sup>86</sup>. Todos estes resultados obtidos são animadores, porém não existe até o momento nenhuma substância totalmente eficaz para o tratamento da doença de Chagas, sendo imprescindível ampliar a pesquisa de novas substâncias com potencial atividade tripanocida.



**Figura 5.** Microscopia óptica de formas amastigotas de *T. cruzi* em células LLCMK<sub>2</sub> tratadas com Carbolínico C4 durante 96 h. (A) Células

sem tratamento, (B) Células tratadas com  $32 \mu M$ , (C) Células tratadas com  $128 \mu M$ , Barra =  $10 \mu m$  (Valdez *et al.* <sup>86</sup>).

## 5. Tripanossomatídeos Inferiores como Modelo Biológico

A família *Trypanosomatidae* é amplamente conhecida por seus membros heteroxênicos patogênicos de mamíferos e plantas, mas também incluem vários organismos que são estritamente parasitas de invertebrados. Os tripanossomatídeos de insetos têm sido tradicionalmente alocados em quatro grandes gêneros: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*, e dois gêneros menores, *Rhynchoidomonas* e *Wallaceina* <sup>51, 60, 90</sup>. Estes protozoários monoxênicos junto com o gênero *Phytomonas* (heteroxênico) também são conhecidos como tripanossomatídeos inferiores <sup>91</sup>.

*Phytomonas* estão presentes em plantas e em insetos sob a forma de longos promastigotas com torções ao longo do eixo longitudinal <sup>17</sup>. Este gênero foi proposto por Donovan em 1909, para diferenciar tripanossomatídeos de plantas e animais. São encontrados no látex, floema, sementes, e néctar de muitas famílias de plantas e são inoculados em seus hospedeiros com a saliva de insetos hemípteros fitófagos. Estes parasitos são patogênicos em coqueiros, dendezeiros, e podem causar epidemias letais em mandioca e café, epidemias estas responsáveis pela destruição de muitas plantações na América Central e do Sul <sup>17</sup>.

*Herpetomonas* apresentam em seu ciclo evolutivo as formas promastigota, paramastigota e opistomastigota, sendo que esta última caracteriza o gênero. São parasitos do trato digestivo de insetos, principalmente dípteros, mas também foram descritos em outros como hemípteros e lepidópteros <sup>92</sup>. A espécie *Herpetomonas samuelpeessoai* é facilmente cultivável em meios de cultura complexo e quimicamente definido a 28 °C e 37 °C, correspondendo, respectivamente, à temperatura do hospedeiro invertebrado e vertebrado <sup>72</sup>. Esta espécie também apresenta antígenos semelhantes de *T. cruzi*, podendo induzir resposta imune celular cruzada <sup>80</sup>.

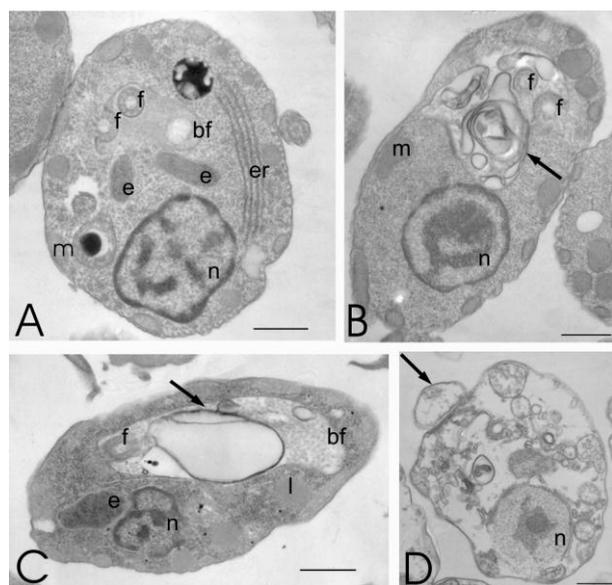
Protozoários do gênero *Crithidia* apresentam a forma coanomastigota no seu ciclo de vida. As espécies *Angomonas deanei* (*previously named as Crithidia deanei*)<sup>84</sup>, *C. desouzai* e *C. oncopelti* possuem um simbionte bacteriano no seu citoplasma (endossimbionte) que interfere em vários aspectos no metabolismo dos protozoários, sugerindo que vários metabólitos importantes para a célula eucariótica são sintetizados pela bactéria <sup>27, 32, 43</sup>. A presença do simbionte também interfere na distribuição espacial dos microtúbulos <sup>32</sup> e modula aspectos na superfície da membrana dos protozoários como a exposição de resíduos de carboidratos <sup>39, 40, 62</sup> e a expressão de glicoproteínas <sup>37</sup>. A possibilidade de eliminação do endossimbionte com o uso de antibióticos tem aumentado o interesse no estudo desta inter-relação na espécie <sup>28</sup>.

Tripanossomatídeos inferiores têm sido rotineiramente usados como modelos de laboratórios para estudos bioquímicos e moleculares devido à facilidade de serem cultivados em condições axênicas, alguns em meio quimicamente definido e também por serem não patogênicos <sup>92</sup>. No entanto, há indícios da presença de tripanossomatídeos inferiores em infecções cutâneas oportunistas em indivíduos imunocomprometidos <sup>7, 33</sup> ou naqueles sem nenhuma história prévia de imunodepressão. Relatos indicando que *Angomonas deanei* e *Herpetomonas roitmani* (ambos com endossimbionte) podem infectar fibroblastos de pele de rato <sup>75</sup>

indicam uma necessidade de novos estudos destes gêneros e favorecem a sua utilização para o estudo de substâncias sintéticas ou provenientes de produtos naturais.

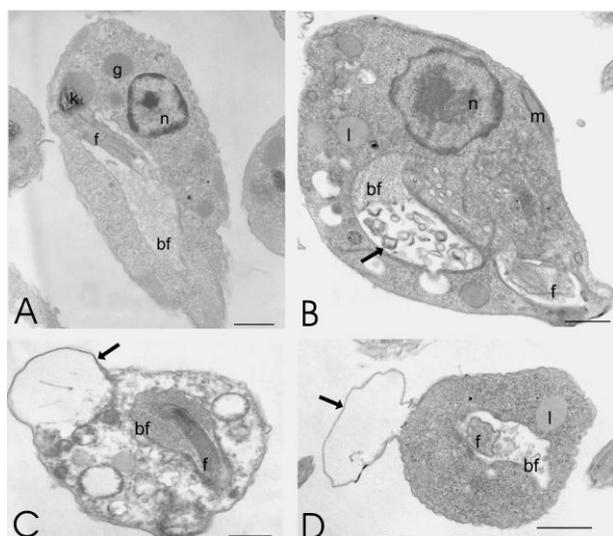
Pesquisadores têm utilizado tripanossomatídeos inferiores para verificar o efeito de substâncias sintéticas ou de produtos naturais e também para estudos filogenéticos. Pedroso e colaboradores <sup>67</sup> verificaram um efeito dose dependente do óleo essencial de “Capim Limão” (*Cymbopogon citratus*) no crescimento de *A. deanei* com e sem endossimbionte, sendo que a cepa sem o endossimbionte é mais sensível à ação do óleo. Vários pesquisadores verificaram que a presença do endossimbionte interfere no metabolismo do protozoário levando a alterações bioquímicas e morfológicas <sup>32, 43</sup>. Benzonidazol apresenta uma IC<sub>50</sub> de 841,7 e 700 µg/ml, respectivamente, para as cepas com e sem endossimbionte. Anfotericina B, amplamente usada para o tratamento de leishmanioses atuando no ergosterol de membrana do protozoário <sup>45</sup>, foi necessária em concentrações menores que 5 µg/ml para inibir o crescimento dessas cepas.

Utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar que *A. deanei* com endossimbionte (Figura 6) e sem endossimbionte (Figura 7), tratados com o óleo essencial de “capim limão” e anfotericina B, mostraram alterações na membrana da bolsa flagelar como invaginações da membrana e presença de material membranoso, além de modificações na membrana citoplasmática como a presença de “blebs”.



**Figura 6.** Microscopia eletrônica de transmissão de *Angomonas deanei* com endossimbionte, cultivado a 28°C por 48 h na ausência (A) e presença de: IC<sub>50</sub> do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (B); IC<sub>50</sub> de Anfotericina B (C); IC<sub>90</sub> do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D). bf, bolsa flagelar; e, endossimbionte; er, retículo endoplasmático; f, flagelo; l, inclusão lipídica; m, mitocôndria; n, núcleo. Setas indicam a presença de material

membranoso na bolsa flagelar (IC<sub>50</sub>) e membranas se destacando da célula (IC<sub>90</sub>). Barra = 1 µm (Pedroso *et al.* <sup>67</sup>).



**Figura 7.** Microscopia eletrônica de transmissão de *Angomonas deanei* sem endossimbionte, cultivado a 28 °C por 48 h na ausência (A) e presença de: IC<sub>50</sub> do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (B); IC<sub>50</sub> de Anfotericina B (D); IC<sub>90</sub> do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (C). k, cinetoplasto; Demais símbolos, vide Figura 6 (Pedroso *et al.*<sup>67</sup>).

## 6. Conclusão

Diante das limitações dos fármacos existentes no tratamento de doenças infecciosas, a utilização dos conhecimentos populares para a obtenção de fármacos derivados de plantas tornou-se uma alternativa promissora. Estudos realizados por vários grupos de pesquisa, realizando testes *in vitro* com os protozoários patogênicos, bem como com protozoários inferiores, atestam que na maioria das vezes, as plantas utilizadas na medicina popular, realmente apresentam atividade terapêutica. Estas podem ser fontes potenciais de novos fármacos seguros e efetivos de inestimável valor no tratamento de doenças infecciosas, tal como as causadas por protozoários patogênicos, agentes de doenças com altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, como a leishmaniose, doença de Chagas e tripanossomíase africana. Os resultados obtidos e as perspectivas futuras são animadores, uma vez que não existe até o momento nenhuma substância totalmente eficaz para o tratamento destas doenças.

## 7. Referências

1. ABE F., NAGAFUJI S., OKAWA M., KINJO J., AKAHANE H., OGURA T., MARTINEZ-ALFARO M.A., REYES-CHILPA R. Trypanocidal Constituents in Plants. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea americana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1314-1317, 2005.
2. ADADE C.M., FIGUEIREDO R.C.B.Q., DE-CASTRO S.L., SOARES M.J. Effect of L-leucine Methyl Ester on Growth and Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v.101, p.69-79, 2007.

3. ANTHONY J.P., FYFE L., SMITH H. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v.21, p.462-468, 2005.
4. ARAÚJO-JÚNIOR F.A., BRAZ M. N., ROCHA-NETO O.G., COSTA F.A., BRITO M.V.H. Copaíba oil effect in rats aminotransferases submitted to hepatic ischemic and reperfusion with and without preconditioning. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, p.93-99, 2005.
5. BARRETO-JÚNIOR A.G., BISCAIA-JÚNIOR E.C., VEIGA-JÚNIOR V.F., PINTO A.C., CARVALHAES S.F., MACIEL M.A.M. Ion exchange chromatography applied to the fractionation of the copaiba oil (*Copaifera multijuga*) and sacaca (*Croton cajucara*) extracts. **Química Nova**, v.28, p.719-722, 2005.
6. BLUMENTHAL M. Herbal industry (?) acquisitions and entry by pharmaceutical giants in 1998. **Herbal Gram**, v.45, p.67-68, 1999.
7. BOISSEAU-GARSAUD A.M., CALES-QUIST D., DESBOIS N., JOUANNELE A., PRATLONG F., DEDET J.P. A new case of cutaneous infection by presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.51-52, 2000.
8. BRAESTRUP C., NIELSEN M., OLSEN C.E. Urinary and Brain  $\beta$ -Carboline-3-carboxylates as Potent Inhibitors of Brain Benzodiazepine Receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, p.2288-2292, 1980.
9. BRAGA M.V., MAGARACI F., LORENTE S.O., GILBERT I., DE SOUZA W. Effects of Inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **Microscopy and Microanalysis**, v.11, p.505-515, 2005.
10. BRAGANÇA L.A.R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: Universidade Federal Fluminense 300 p. 1996.
11. BREVOORT P. The U.S. botanical market. An overview. **HerbalGram**, v.36, p.49-59, 1995.
12. BRITO A.R.M.S., BRITO A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.53-67, 1993.
13. BRITO M.V.H., MOREIRA R.J., TAVARES M.L.C., CARBALLO M.C.S., CARNEIRO T.X., SANTOS A.A.S. Copaíba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, p.243-246, 2005.
14. BROBEY R.K.B., MEI F.C., CHENG X., SOONG L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.01-06, 2006.
15. CALIXTO J.B. Efficacy safety quality control marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.33, p.179-189, 2000.
16. CAMACHO M.D.R., PHILLIPSON J.D., CROFT S.L., SOLIS P.N., MARSHALL S.J., GHAZANFAR S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.185-191, 2003.
17. CAMARGO E.P. *Phytomonas* and other parasites of plant and fruits. **Advances in Parasitology**, v.42, p.29-112, 1999.
18. CARVALHO P.B., FERREIRA E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v.72, p.599-618, 2001.
19. CAVALCANTI B.C., COSTA-LOTUFO L.V., MORAES M.O., BURBANO R.R., SILVEIRA E.R., CUNHA K.M.A., RAO V.S.N., MOURA D.J., ROSA R.M., HENRIQUES J.A.P., PESSOA C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid a bioactive diterpenoid present in Copaíba oil. **Food and Chemistry Toxicology** v.44, p.388-392, 2006.
20. COHEN-FREUE G., HOLZER T.R., FORNEY J.D., MCMASTER W.R. Global gene expression in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.1077-1086, 2007.
21. CRAGG G.M., NEWMAN D.J., SNADER K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Product**, v.60, p.52-60, 1997.
22. CROFT S. L., BARRET M. P., URBINA J. A. Chemotherapy of Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.21, p.508-512, 2005.
23. CROFT S.L. The current status of antiparasitic chemotherapy. **Parasitology**, v.114, p.973-975, 1997.
24. CROFT S.L., COOMBS G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v.19, p.502-508, 2003.
25. CUNHA P., SILVA A. P., ROQUE O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia** – ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, 704p.
26. CUNNINGHAM A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, p.132-141, 2002.
27. D'AVILA-LEVY C.M., MELO A.C.N., VERMELHO A.B., BRANQUINHA M.H. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. **FEMS Microbiological Letters**, v.202, p.73-77, 2001.

28. D'AVILA-LEVY C.M., SOUZA R.F., GOMES R.C., VERMELHO A.B., BRANQUINHA M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.420, p.1-8, 2003.
29. DANTAS A.P., SALOMÃO K., BARBOSA H.S. The effect of bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.207-11, 2006.
30. DE SMET P.A.G.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v.54, p.801-840, 1997.
31. DE SOUZA W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.1, p.1-21, 2002.
32. DE SOUZA W., MOTTA M.C.M. Endossimbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. **FEMS Microbiological Letters**, v.173, p.1-8, 1999.
33. DEDET J.P., ROCHE B., PRATLONG F., CALES-QUIST D., JOUANNELE J., BENICHOU J.C., HUERE M. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p.644-646, 1995.
34. DELORENZI J.C., ATTIAS M., GATTAS C.R., ANDRADE C.R., PINTO A.C., HENRIQUES A.T., BOU-HABIB D.C., SARAIVA E.M.B. Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, p.1349-1354, 2001.
35. DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.27, p.305-318, 2004.
36. DESRIVOT J., WAIKEDRE J., CABALION P., HERRENKNECHT C., BORIES C., HOCQUEMILLER R., FOURNET A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.7-12, 2007.
37. DIAS FILHO B.P., UEDA-NAKAMURA T., LOPES C.H., TSUNETO L.T., ABREU FILHO B.A., NAKAMURA C.V. Cell surface glycoproteins in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. **Acta Protozoologica**, v.44, p.13-17, 2005.
38. DIAS J.C.P., SILVEIRA A.C., SCHOFIELD C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.603-612, 2002.
39. ESTEVES M. J.G., ANDRADE A.F.B., ANGLUSTER J., DE SOUZA W., MUNDIM M.H., ROITMAN I., PERREIRA M.E.A. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. **European Journal of Cell Biology**, v.26, p.244-248, 1982.
40. FARIA-E-SILVA P.M., FIORINI J.E., SOARES M.J., ALVIANO C.S., DE SOUZA W., ANGLUSTER J. Membrane-associated polysaccharides composition nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.41, p.55-59, 1994.
41. FOURNET A., FERREIRA M.E., ROJAS DE ARIAS A., GUY I., GUINAUDEAU H., HEINZEN H. Phytochemical and Antiprotozoal Activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v.78, p.382-384, 2007.
42. FREIBURGHANUS F., KAMINSKY R., NKUNYA M.H.H., BRUN R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.1-11, 1996.
43. FREYMÜLLER E., CAMARGO E.P. Ultrastructure differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. **Journal of Protozoology**, v.28, p.175-182, 1981.
44. GARZONI L.R., CALDERA A., MEIRELLES M.N.L., DE CASTRO S.L., DOCAMPO R., MEINTS G.A., OLDFIELD E., URBINA J.A. Selective effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.273-285, 2004.
45. GOAD L.J., HOLZ G.G., BEACH D.H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.10, p.161-170, 1984.
46. GONTIJO B., CARVALHO M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.71-80, 2003.
47. GONZÁLEZ P., MARÍN C., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ I., HITOS A.B., ROSALES M.J., REINA M., DÍAZ J.G., GONZÁLEZ-COLOMA A., SÁNCHEZ-MORENO M. *In vitro* activity of C<sub>20</sub>-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.136-141, 2005.
48. GORLA N.B., LEDESMA O.S., BARBIERI G.P., LARRIPA I.B. Assessment of cytogenetic damage in chagasic childrens treated with benznidazole. **Mutation Research**, v.206, p.217-220, 1988.
49. GUEDES P.M.M., URBINA J.A., LANA M., AFONSO L.C.C., VELOSO V.M., TAFURI W.L., MACHADO-COELHO G.L.L., CHIARI E., BAHIA T. Activity of the new triazole derivative albacazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, p.4286-4292, 2004.
50. HERNANDES S.E.D. **Estudo da atividade antileishmania de tiossemicarbazonas derivadas do limoneno**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia e Farmacologia Universidade Estadual de Maringá Maringá 2007. 65p.

51. HOARE C.A., WALLACE F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v.212, p.1385-1386, 1966.
52. IZUMI E., MORELLO L.G., UEDA-NAKAMURA T., YAMADA-OGATTA S.F., DIAS-FILHO B.P., CORTEZ D.A.G., FERREIRA I.C.P., MORGADO-DIAZ J.A., NAKAMURA C. V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae Compositae) against epimastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, v.118, p.324-330, 2008.
53. JOSEPH M., KURIAKOSE M., KURUP M.R.P., SURESH E., KISHORE A., BHAT S.G. Structural antimicrobial and spectral studies of copper (II) complexes of 2-benzoylpyridine N(4)-phenyl thiosemicarbazone. **Polyhedron**, v.25, p.61-70, 2006.
54. KASUGA N.C., ONODERA K., NAKANO S., HAYASHI K., NOMIYA K. Syntheses cristal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony (III) complexes with tridentate 2-acetylpyridine thiosemicarbazone bis(thiosemicarbazone) and semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.100, p.1176-1186, 2006.
55. LEROUX A., FLEMING-CANEPA X., ARANDA A., MAUGERI D., CAZZULO J.J., SÁNCHEZ M.A., NOWICKI C. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.149, p.74-85, 2006.
56. LEVINE N.D., CORLISS J.O., COZ F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIBERG B.M., LEEDADE G.F., LOEBLICH A.R., LOM F., LYNN D., MERIFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G. SPRAGUE V., VAURA J., WALLACE F.G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-38, 1980.
57. LIMA S.R.M., VEIGA-JUNIOR V.F., CHRISTO H.B., PINTO A.C., FERNANDES P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1048-1053, 2003.
58. LUIZE P.S., UEDA-NAKAMURA T., DIAS-FILHO B.P., CORTEZ D.A.G., NAKAMURA C.V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological Pharmaceutical Bulletin** v.29, p.2126-2130. 2006a.
59. LUIZE P.S., UEDA-NAKAMURA T., DIAS-FILHO B.P., CORTEZ D.A.G., NAKAMURA C.V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoide-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitological Research**, v.100, p.31-37, 2006b.
60. MCGHEE B., COSGROVE B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological Review**, v.44, p.140-165, 1980.
61. MENNA-BARRETO R.F.S., HENRIQUES P.O.N.S., PINTO A.V., MORGADO-DÍAZ J.A., SOARES M.J., CASTRO S.L. Effect of a  $\beta$ -Lapachone - Derived Naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: Identification of Target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.1034-1041, 2005.
62. ODA L.M., ALVIANO C.S., SILVA-FILHO F.C., ANGLUSTER J., ROITMAN I., DE SOUZA W. Surface anionic groups in symbiont-bearing and symbiont-free strains of *Crithidia deanei*. **Journal of Protozoology**, v.31, p.131-134, 1984.
63. OKPEKON T., YOLOU S., GLEYE C., ROBLOT F., LOISEAU P., BORIES C., GRELLIER P., FRAPPIER F., LAURENS A., HOCQUEMILLER R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.91-97. 2003.
64. OSORIO E., ARANGO G. J., JIMÉNEZ N., ALZATE F., RUIZ G., GUTIÉRREZ D., PACO M. A., GIMÉNEZ A., ROBLEDO S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.630-635, 2007.
65. PAIVA L.A.F., GURGEL L.A., SOUZA E.T., SILVEIRA E.R., SILVA R.M., SANTOS F.A., RAO V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffi* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.51-56, 2004.
66. PAVETO C., GÜIDA M.C., ESTEVA M.I., MARTINO V., COUSSIO J., FLAWIÁ M.M., TORRES H.N. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, p.69-74, 2004.
67. PEDROSO R.B., UEDA-NAKAMURA T., DIAS FILHO B.P., CORTEZ D.A.G., CORTEZ L.E.R., MORGADO-DÍAZ J.A., NAKAMURA C.V. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. **Acta Protozoologica** v.45, p.231-240, 2006.
68. RATES S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-316, 2001.
69. RIVAS P., CASSELS B.K., MORELLO A., REPETTO Y. Effects of Some beta-Carboline Alkaloids on Intact *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122, p.27-31, 1999.
70. RIZZINI C.T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil**. São Paulo: EDUSP, v.2, 374 p., 1979.
71. RODRIGUES J.C.F., ATTIAS M., RODRIGUEZ C., URBINA J.A., SOUZA W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol a  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, p.487-499, 2002.
72. ROITMAN C., ROITMAN I., AZEVEDO H.P. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in a defined medium. **Journal of Protozoology**, v.19, p.346- 349, 1972.

73. SANTORO G.F., CARDOSO M.G., GUIMARÃES L.G.L. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L. *Syzygium aromaticum* L. *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v.116, p.283-290, 2007.
74. SANTOS A.O. **Investigação da Atividade Biológica do Óleo de Copaíba Obtido de Diferentes Espécies de *Copaifera* sp.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2008, 94p.
75. SANTOS D.O., BOURGUIGNON S.C., CASTRO H.C., SILVA J.S., FRANCO L.S., HESPANHOL R., SOARES M.J., CORTE-REAL S. Infection of Mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.51, p.570-574, 2004.
76. SCHENKEL E. P., GOSMANN G., PETROVICK P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R. (Orgs.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC 2000. p. 291-320.
77. SHU Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1053-1071, 1998.
78. SILVEIRA T.G.V., TEODORO U., LONARDONI M.V.C., GUILHERME A.L.F., TOLEDO M.J.O., RAMOS M., ARRAES S.M.A., BERTOLINE D.A., SPINOZA R.O., BARBOSA O.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, p.141-147, 1996.
79. SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFRGS e da UFSC, 2004, 1102p.
80. SOUZA M.C., REIS A.P., SILVA W.D., BRENER Z. Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Protozoology**, v.21, p.579-584, 1974.
81. SOUZA-BRITO A.R.M., SOUZA BRITO A.A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.53-67, 1992.
82. SÛLSEN V., GÛIDA C., COUSSIO J., PAVETO C., MUSCHIETTI L., MARTINO V. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology Research**, v.98, p.370-374, 2006.
83. TANOWITZ H.B., KIRCHHOFF L.V., SIMON D., MORRIS S.A., WEISS L.M., WITTNER M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p.400-419, 1992.
84. TEIXEIRA M.M., BORGESAN T.C., FERREIRA R.C., SANTOS M.A., TAKATA C.S., CAMPANER M., NUNES V.L., Milder R.V., DE SOUZA W., CAMARGO E.P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protists** v.162, p.503-524, 2011.
85. TIUMAN T.S., UEDA-NAKAMURA T., CORTEZ D.A.G., DIAS FILHO B.P., MORGADO-DÍAZ J.A., SOUZA W., NAKAMURA C.V. Antileishmanial activity of parthenolide a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, p.176-182, 2005.
86. VALDEZ R.V. **Investigação de atividade biológica de composto carbolínico sobre *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2007. 72p.
87. VEIGA-JÚNIOR V.F., ZUNINO L., CALIXTO J.B., PATITUCCI M.L., PINTO A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v.15, p.476-480, 2001.
88. VENAZZI E.A.S., ROBERTO A.C.B.S., BARBOSA-TESSMANN I.P., ZANZARINI P.D., LONARDONI M.V.C., SILVEIRA T.G.V. Detection of *Leishmania* (Viannia) DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.115, p.399-402, 2007.
89. VENDRAMETTO M.C. **Atividade antileishmaniana do eupomatênóide-5 substância isolada de folhas de *Piper regnellii* var. *pallascens***. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia e Farmacologia Universidade Estadual de Maringá Maringá 2006. 91p
90. VICKERMAN K. **The diversity of the kinetoplastid flagellates**. In: LUMSDEN W.H.R., EVANS D.A. (Eds.). *Biology of the kinetoplastida*. Vol. I. London: Academic Press, p. 1-30, 1976.
91. VICKERMAN K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International of Journal Parasitology**, v.24, p.1317-1331, 1994.
92. WALLACE F.G. The trypanosomatids parasite of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v.18, p.124-193, 1966.
93. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. 2002a. Disponível em :<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2006.
94. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on the Control of Chagas Disease. **Control of Chagas Disease** p. 1-95. 2002b.

95. WRIGHT C.W., PHILLIPSON J.D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. **Phytotherapy Research**, v.4, p.127-139, 1990.
96. YUNES R.A., PEDROSA R.C., FILHO V.C. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-152, 2001.
97. [www.amazoniaorganics.com](http://www.amazoniaorganics.com). Acesso em: 22 de maio de 2008.

## Capítulo 16

### Introdução, Estabelecimento e Adaptação de Bradirrizóbios Simbiontes da Soja em Solos Brasileiros

---

Mariangela Hungria <sup>1,2</sup>  
Fernando Gomes Barcellos <sup>3</sup>  
Iêda Carvalho Mendes <sup>4</sup>  
Ligia Maria de Oliveira Chueire<sup>1</sup>  
Renan Augusto Ribeiro <sup>1</sup>  
Jesiane Stefânia da Silva Batista <sup>1</sup>  
Pâmela Menna <sup>1</sup>  
Jakeline Renata Marçon Delamuta <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR. E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia/CCB/UEL, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina PR

<sup>3</sup> Depto de Biologia Geral/CCB/UEL

<sup>4</sup>Embrapa Cerrados, Cx. Postal 8223, 73301-970, Planaltina DF

---

#### 1. Introdução

O processo conhecido como fixação biológica do N<sub>2</sub> é realizado por alguns microrganismos cujo principal hábitat é o solo. Embora o nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) constitua, aproximadamente, 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N<sub>2</sub>, uma das mais fortes na natureza. Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo, onde o N<sub>2</sub> consegue ser aproveitado por alguns procariotos (arqueobactérias e, principalmente, bactérias) que ali habitam, graças à ação de um complexo enzimático denominado nitrogenase, responsável pela redução do N<sub>2</sub> a amônia (NH<sub>3</sub>) (pela reação: N<sub>2</sub> + 8H<sup>+</sup> + 8e<sup>-</sup> + 16ATP.Mg → 2NH<sub>3</sub> + 16ADP.Mg + 16 PO<sub>4</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>). Esse complexo é formado por duas proteínas, a dinitrogenase ou molibdênio-ferro-proteína, um tetrâmero com subunidades α e β, codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente, e a dinitrogenaseredutase ou ferro-proteína, um homodímero com motivo estrutural do tipo α/β, codificado pelo gene *nifH*.

As bactérias que realizam o processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de N<sub>2</sub>, se associam a diversas espécies de plantas, com diferentes graus de especificidade. A maior contribuição e, por isso,

a mais estudada, ocorre com alpha-proteobactérias pertencentes às famílias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hiphomicrobiaceae*, da ordem *Rhizobiales*. Mais recentemente, também houve a descoberta de que beta-proteobactérias podem estabelecer simbioses, particularmente com plantas da subfamília Mimosoideae. Já foram isoladas beta-proteobactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* (= *Ralstonia*), cujo principais centros de origem são o Brasil Central e a África do Sul. Todas essas bactérias são chamadas coletivamente de rizóbiose se associam simbioticamente com plantas da família Leguminosae, conhecidas como leguminosas.

O estabelecimento da simbiose, compreendendo tanto a nodulação como a fixação do  $N_2$ , entre as leguminosas e os rizóbios é um processo extremamente complexo, envolvendo várias etapas de sinalização molecular e expressão de genes, tanto no microsimbionte, como na planta hospedeira. Essas etapas, que resultam em mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas pelo ajuste entre os parceiros simbióticos visam, basicamente, no microsimbionte, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira para prover ATP e poder redutor e, na planta hospedeira, a assimilação do N produzido pelas bactérias. Nos últimos anos, novas técnicas de análise molecular, bem como avanços nos estudos de genômica e proteômica dos rizóbios e dos hospedeiros têm permitido um conhecimento mais profundo sobre os processos de nodulação e fixação do  $N_2$ <sup>10, 55</sup>. Deve-se considerar, porém, que ainda pairam inúmeras dúvidas sobre os processos evolutivos que conduzem, ou não, à simbiose efetiva entre rizóbios e leguminosas<sup>64,95</sup>.

A soja [*Glycinemax*(L.) Merrill] é originária do Oriente e foi introduzida no Brasil no final do século XIX. A expansão comercial da cultura ocorreu a partir da década de 1960, de tal forma que, hoje, o Brasil é o segundo maior produtor mundial dessa leguminosa, que ocupa cerca de 45% de toda a área cultivada no País. A soja pode se beneficiar pela associação simbiótica com rizóbios pertencentes, principalmente, às espécies *Bradyrhizobiumjaponicum*, *B. elkanii* e *B. diazoefficiens* e, graças à pesquisa desenvolvida no País, as necessidades da planta em N podem ser supridas completamente pela simbiose<sup>45, 48, 49</sup>. As estimativas atuais são de que, para atender às necessidades em N da cultura da soja, considerando um rendimento médio de 3.000 kg ha<sup>-1</sup>, as taxas de fixação do  $N_2$  devem ser superiores a 300 kg de N ha<sup>-1</sup>, o que, nos 27 milhões de ha cultivados no País, a um custo de US\$ 1 por kg de N, resultam em uma economia estimada em US\$ 8 bilhões por safra.

Apesar do cenário atual favorável, no futuro as demandas da soja por N serão muito mais elevadas, pelo constante aprimoramento das práticas agrícolas, pelo

lançamento de cultivares mais produtivas e adaptadas às diferentes condições ambientais, pelo estabelecimento, no solo, de estirpes de *Bradyrhizobium* que nem sempre são as mais eficientes, pela necessidade de fornecer 1.000 kg de N ha<sup>-1</sup> para garantir os 8.000 kg ha<sup>-1</sup> estimados como potencial genético da cultura e já ultrapassados em ensaios de competitividade, entre outros <sup>43, 44, 45</sup>. Consequentemente, para atender a essa maior demanda de N, é fundamental adotar estratégias inovadoras, tanto nos programas de seleção de estirpes, como nos de melhoramento da planta hospedeira, visando acelerar a identificação e/ou obtenção de simbioses com maior capacidade de fixação do N<sub>2</sub>. Contudo é necessário, também, conduzir estudos de ecologia de *Bradyrhizobium*, pois é fundamental conhecer e acompanhar as bactérias estabelecidas, ou que venham a se estabelecer, nos solos brasileiros, para que seja possível entender e prever respostas à inoculação.

Desde 1991 nosso grupo trabalha com várias linhas de pesquisa envolvendo a simbiose *Bradyrhizobium*-soja. Na planta hospedeira, foram conseguidos avanços no conhecimento da genética da nodulação e da fixação do N<sub>2</sub><sup>9, 42, 73, 86</sup>, que estão permitindo a seleção de marcadores moleculares para essas características <sup>74, 84, 85</sup>. Foram conduzidos, também, estudos de seleção de estirpes <sup>45, 51</sup>, de validação da tecnologia de inoculação <sup>13, 14, 15,48</sup>, de desenvolvimento tecnológico e de suporte à legislação de inoculantes<sup>43, 44</sup>, de diversidade <sup>38, 71</sup>, taxonomia e filogenia <sup>23, 24, 70, 71</sup>, de ecologia de *Bradyrhizobium*<sup>6, 7, 67, 69</sup>, entre outros. Neste capítulo, serão revisados os avanços conseguidos em relação à introdução e ecologia dos rizóbiosmicrossimbiontes da soja após a sua adaptação aos solos brasileiros, conhecimento fundamental para garantir a maximização da contribuição do processo biológico com a cultura da soja nas próximas décadas, portanto, com impactos econômicos, sociais e ecológicos relevantes para o País.

## **2. Rizóbios microssimbiontes da soja**

Há descrições do gênero *Rhizobium* por Kirchner, em 1896, e Frank, em 1889 e, em 1932, as bactérias responsáveis pela nodulação da soja foram classificadas como *Rhizobiumjaponicum*, em um critério baseado, principalmente, nos grupos de inoculação cruzada entre o microssimbionte e a planta hospedeira <sup>31</sup>. Outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e do crescimento lento com produção de álcali em meio de cultura contendo manitol

como fonte de carbono, passaram a ser consideradas nas décadas seguintes, permitindo a divisão de *Rhizobium* em dois grupos, de crescimento rápido e lento, mas as bactérias que nodulam a soja continuaram a ser classificadas como *Rhizobium japonicum*<sup>58</sup>, sendo confirmado por Buchanan<sup>11</sup>. Posteriormente, em 1982, as bactérias da espécie *R. japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium*, nome alusivo à taxa de crescimento (*bradus*, do grego, significando lento). Nesse gênero está a espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que inclui várias estirpes relevantes que nodulam a soja; a estirpe-tipo (*type strain*) da espécie é a USDA 6 (=ATCC 10324)<sup>56, 57</sup>.

Na década de 1980 e início da década de 1990, porém, vários trabalhos demonstraram que existia grande variabilidade morfológica, genética, fisiológica e simbiótica entre as estirpes de *B. japonicum*. Esses estudos levaram Kuykendall et al.<sup>62</sup> a sugerirem a subdivisão do gênero *Bradyrhizobium* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II. Essa nomenclatura foi confirmada, posteriormente, pelo comitê internacional de taxonomia<sup>2</sup> e a USDA 76 (=ATCC 49852) foi definida como a estirpe-tipo. Recentemente, diferenças entre dois grupos claramente distintos dentro de *B. japonicum* conduziram à descrição de uma nova espécie por nosso grupo de pesquisa, *B. diazoefficiens*, para abrigar as bactérias antes posicionadas no grupo Ia de *B. japonicum*<sup>24</sup>.

Já foram relatadas várias diferenças entre *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. diazoefficiens*, várias compiladas por Hungria et al.<sup>53</sup> e Vargas & Hungria<sup>102</sup> e Delamuta et al.<sup>24</sup>, podendo-se citar diferenças na morfologia das colônias, na composição dos ácidos graxos e polissacarídeos extracelulares, na enzima utilizada para a assimilação de N *in vitro*, na nodulação de algumas cultivares específicas de soja e de outras leguminosas, bem como nos genes ribossomais e outros genes *housekeeping*. Além disso, *B. elkanii*, mas não *B. japonicum* e *B. diazoefficiens* apresenta resistência a níveis elevados de antibióticos, sintetiza rizobiotoxina e apresenta o fenótipo radicular OCS (*outer cortical swelling*), enquanto que *B. diazoefficiens* é capaz de sintetizar a enzima hidrogenase, que pode incrementar a eficiência do processo de fixação de N<sub>2</sub>.

Ainda na década de 1980, houve o relato de isolamento de algumas bactérias de crescimento rápido a partir de solos e nódulos de soja coletados na China<sup>60</sup>, mas essas bactérias seriam capazes de nodular exclusivamente cultivares primitivas de soja, como a Peking (PI17852.B) e a Malaya, além de *Glycine soja*, a provável ancestral-genitora da soja moderna<sup>12, 60</sup>. Scholla & Elkan<sup>89</sup> realizaram, então, estudos

de taxonomia, que conduziram à classificação dessas estirpes em uma nova espécie, *Rhizobium fredii*<sup>11, 89</sup> (em homenagem ao Dr. E. B. Fred) e a USDA 205 (=ATCC 35423) foi definida como estirpe-tipo. Com o isolamento e estudo mais detalhado de novas bactérias de solos e nódulos da China, foi proposto um novo gênero, *Sinorhizobium* gen. nov. (do latim *sinae*, significando China), com duas espécies, *S. fredii* e *S. xinjiangensis* (de Xinjiang, região da China), sendo a estirpe-tipo de *S. fredii* a USDA 205 e a da espécie *S. xinjiangensis* a CCBAU 110 (=RX 42)<sup>16</sup>. A nomenclatura de *Sinorhizobium* foi confirmada<sup>22</sup>, contudo, posteriormente, foi proposta a reclassificação de *Sinorhizobium* no gênero *Ensifer*<sup>111</sup>. É interessante salientar, ainda, que estudos posteriores indicaram que, de 194 genótipos de soja norte-americanos, 17% eram capazes de nodular efetivamente com a estirpe USDA 257 (=PCR 257)<sup>3</sup>. Do mesmo modo, no Brasil, de 80 cultivares comerciais, 67% foram capazes de nodular com as estirpes USDA 205 e CCBAU 105 de *S. fredii* (=RT15) e com a estirpe CCBAU 144 (=RX22) de *S. xinjiangensis*, o que foi atribuído à grande participação, nos cruzamentos brasileiros, de genes das cultivares Davis e Paraná, ambas capazes de nodular com essas estirpes<sup>19</sup>.

Também foram isoladas, também na China, bactérias caracterizadas pelo crescimento extremamente lento em meio de cultura e que nodulam soja e *Glycine soja*, que foram classificadas como *Bradyrhizobium liaoningense*<sup>110</sup>, enquanto que outras bactérias, com taxas intermediárias de crescimento entre *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*, foram classificadas como *Mesorhizobium tianshanense*<sup>54</sup>.

### 3. Introdução de estirpes nos solos brasileiros

A soja não é nativa do Brasil, portanto, os solos brasileiros eram, originalmente, isentos de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> capazes de formar nódulos efetivos com essa leguminosa, o que gerou a necessidade de importar estirpes, principalmente de universidades norte-americanas e australianas<sup>30, 33, 35, 65, 66, 78, 93, 97, 106, 107</sup>. A primeira produção nacional de inoculantes (à base de ágar) foi realizada pela Secretaria do Estado do Rio Grande do Sul, em 1949, alterando para veículo turfoso em 1955, também no RS, e adquirindo maior impulso com a iniciativa privada, a partir de 1960<sup>26, 43</sup>.

Testes de seleção de estirpes mais eficientes no processo de fixação do N<sub>2</sub> e adaptadas às condições e cultivares brasileiras tiveram início concomitantemente com a expansão da cultura no País<sup>25, 27, 66</sup>. Na década de 1960, como vários

inoculantes norte-americanos não se mostraram eficientes, foi realizado o isolamento da estirpe "adaptada" SEMIA 566 (= BR 40) (SEMIA, "Seção de Microbiologia Agrícola", da FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS), a partir de um nódulo da cultivar Hardee, em vaso de Leonard que havia recebido inoculante comercial norte-americano, quando se buscava superar problemas de nodulação a campo com essa cultivar; essa pode, portanto, ser considerada como uma das primeiras "estirpes brasileiras" <sup>45</sup>. A estirpe SEMIA 566 foi recomendada para o uso em inoculantes comerciais no período de 1966 a 1978.

Outra estirpe, a SEMIA 587 (= BR 96) foi isolada em 1967, a partir de uma planta de soja em Santa Rosa, RS e provou ser eficiente em diversos ensaios a campo <sup>34, 35</sup>, desse modo, foi recomendada comercialmente no período de 1968 a 1975, juntamente com a SEMIA 566 e a SEMIA 543, essa última também isolada no Brasil.

Döbereiner e colaboradores <sup>27</sup> conduziram trabalhos de avaliação de estirpes, com destaque para a CB 1809 (=SEMIA 586, =USDA 136, =3I1b136, =TAL 379, sorogruppo 122), originária dos E.U.A., mas que chegou ao Brasil via Austrália, onde era classificada como excepcional. A CB 1809 é considerada uma subcultura de USDA 136, que é derivada da USDA 122 <sup>87</sup> e, como a alta eficiência no processo de fixação do N<sub>2</sub> foi confirmada no Brasil <sup>27</sup>, a estirpe foi recomendada para o uso em inoculantes comerciais em 1977. Contudo, por apresentar baixa nodulação com a cultivar IAC-2 <sup>78</sup>, importante para os Cerrados nas décadas de 1970 e 1980, a estirpe deixou de ser recomendada a partir do ano seguinte.

Ainda na década de 1970, os rizobiólogos tiveram de solucionar o desafio de estabelecer estirpes em solos dos Cerrados, recém abertos para a cultura da soja. Foram recomendadas várias estirpes no período de 1976 a 1978, incluindo as SEMIA 566, SEMIA 527 e SEMIA 532, mas os resultados não foram satisfatórios. Foi, inclusive, sugerido que isso se devia à multiplicação de actinomicetos produtores de antibióticos após a adubação e calagem, resultando em inibição do *Bradyrhizobium*<sup>21, 91</sup>. Foi selecionada, então, a "super estirpe" 29W (=SEMIA 5019, =BR 29), isolada a partir de um nódulo de soja da linhagem IAC-70-559, que havia sido inoculada, embora não haja informação sobre o inoculante usado <sup>78, 81</sup>. O desempenho superior da 29W foi atribuído à tolerância elevada a antibióticos, particularmente à estreptomicina <sup>91</sup>. Posteriormente, porém, foi sugerido que as principais causas para aquele insucesso seriam a especificidade hospedeira da variedade IAC-2 <sup>81, 107</sup> e o uso de baixas doses de inoculante, que não era de boa

qualidade <sup>102, 107</sup>. Nessa época, ensaios conduzidos em casa de vegetação e a campo conduziram à recomendação, em 1979, da estirpe 29W e, novamente, da SEMIA 587<sup>78, 81, 107</sup>. O bom desempenho dessas estirpes resulta em que sejam recomendadas para o uso em inoculantes comerciais até hoje.

Os trabalhos de seleção de estirpes continuaram e, na Embrapa Cerrados, tomaram maior impulso pela utilização do método de avaliação da atividade de nódulos individuais por cromatografia gasosa (atividade da redução do acetileno, ARA) <sup>80</sup>. Essa metodologia permite a análise de um grande número de nódulos em um único dia (200 a 300 nódulos). Contudo, como foram levantadas, posteriormente, várias limitações à metodologia de ARA<sup>72</sup>, a variabilidade entre isolados pode ser verificada, também, pelo crescimento e/ou acúmulo de N total nas plantas <sup>51</sup>. Os estudos conduzidos na Embrapa Cerrados se concentraram em populações de dois sorogrupos, da CB 1809 e da SEMIA 566 e, após vários anos de pesquisa, foram obtidas duas variantes dessas estirpes, a CPAC 7 (=SEMIA 5080) e a CPAC 15 (=SEMIA 5079), respectivamente.

A estirpe CPAC 7 foi obtida a partir de uma subcultura da CB 1809, adotando uma estratégia em que dezenas de colônias individuais, obtidas em meio de cultura sólido, são testadas em plantas, em casa de vegetação e a campo, para a busca de estirpes mais eficientes e competitivas <sup>51, 52</sup>. No caso da CPAC 7, as características buscadas foram maior capacidade competitiva, bem como de nodular a cultivar IAC-2 <sup>79, 103, 104, 108</sup>. Para a obtenção da estirpe CPAC 15 (= SEMIA 5079, =566a, =DF 24), a qual pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566, foi utilizada uma segunda estratégia, que consistiu na obtenção de isolados, em solos do DF, vários anos após a última inoculação, buscando aqueles adaptados, mas com elevada capacidade de fixação de N<sub>2</sub> e competitividade <sup>79, 103, 104, 108</sup>. A CPAC 7 e a CPAC 15 foram testadas por sete anos nos Cerrados e promoveram ganhos elevados no rendimento de grãos, levando à sua recomendação para a fabricação de inoculantes comerciais, a partir de 1992 <sup>103</sup>.

Desde 1992 são recomendadas, portanto, quatro estirpes para o uso de inoculantes comerciais para a cultura da soja, a SEMIA 587, a 29W (=SEMIA 5019), a CPAC 15 (=SEMIA 5079) e a CPAC 7 (=SEMIA 5080). A avaliação de algumas propriedades genéticas dessas estirpes indicou que as SEMIA 587 e 5019 pertencem à espécie *B. elkanii*<sup>4,17,18,20,63,83,87</sup>, a SEMIA 5079 pertence à espécie *B. japonicum*<sup>4,17,18,20,24,63,68,87</sup>, e a SEMIA 5080 à espécie *B. diazoefficiens* <sup>24</sup>. Essa classificação foi confirmada pelo sequenciamento completo do gene ribossomal 16S<sup>18, 24, 71</sup>, referência atual para a taxonomia de procariotos <sup>37</sup>. Na prática, para a

fabricação de inoculantes, essas quatro estirpes podem ser utilizadas em combinações de duas a duas, ou isoladamente, e são capazes de fornecer N para as cultivares mais produtivas que estão disponíveis, com rendimentos superiores a 4.000 kg ha<sup>-1</sup> 43,44,45.

#### **4. Adaptação das estirpes de *B. japonicum*/*B.elkanii* aos solos brasileiros**

Hoje, mais de 90% da área cultivada com soja já recebeu inoculantes anteriormente e apresenta populações estabelecidas e estimadas, em geral, em no mínimo 10<sup>3</sup> células de *Bradyrhizobium* g<sup>-1</sup> de solo, com predominância dos sorogrupos das SEMIA 566, SEMIA 587 e 29W<sup>44, 45, 53</sup>. É de extrema importância, portanto, estudar o comportamento dessas estirpes naturalizadas.

##### **4.1. Competitividade das estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e 29W**

Os estudos iniciais da SEMIA 587 já constataram a sua capacidade competitiva elevada, ocupando a maior porcentagem dos nódulos em áreas com populações estabelecidas <sup>32, 34, 35</sup>; a capacidade saprofítica elevada dessa estirpe é confirmada até hoje <sup>53, 69, 76, 102</sup>. Alguns ensaios indicam, ainda, que a 29W, em geral, é menos competitiva do que a SEMIA 587 <sup>45, 69, 102</sup>.

##### **4.2. Competitividade das estirpes do sorogrupo SEMIA 566 de *B. japonicum***

A estirpe SEMIA 566, bem como sua variante CPAC 15 são, sem dúvida, as mais competitivas nos solos brasileiros. Essas estirpes pertencem ao mesmo sorogrupo da USDA 123 (=3I1b123, =TAL 376, =ACCC15036)<sup>69</sup>, que por sua vez foi isolada em 1960 de um nódulo de soja em Iowa, nos E.U.A., sendo considerada indígena naquele País <sup>61</sup>. Schmidt et al. <sup>88</sup> propuseram o termo sorogrupo 123 porque, na verdade, ele consiste de três grupos sorologicamente relacionados, 123, 127 e 129. As estirpes desse sorogrupo são consideradas as mais competitivas da região do meio-oeste dos E.U.A., ocupando, caracteristicamente, de 60 a 80% dos nódulos, sendo muito difícil introduzir novas estirpes em solos com dominância desse sorogrupo, independentemente da prática de inoculação ou da cultivar utilizada <sup>82, 109</sup>. Esse sorogrupo também ocorre em solos do Canadá <sup>92</sup> e da Coreia <sup>59</sup>.

No Brasil, há relatos de que, nos primeiros dois anos, o sorogrupo SEMIA 566

apresenta baixa capacidade de sobreviver e colonizar o solo, contudo, logo depois se estabelece fortemente <sup>34, 69, 102</sup>. Relatos semelhantes foram feitos para a USDA 123 nos E.U.A., sugerindo que essas estirpes devem residir no solo por um determinado período antes de expressar sua dominância <sup>96</sup>. Ainda no Brasil, estirpes desse sorogrupo foram recuperadas mesmo em áreas nunca cultivadas anteriormente, no RS, AM, nos Cerrados, confirmando que a dispersão (por vento, implentos agrícolas, sementes), associada à alta capacidade saprofítica e competitividade, facilitam o estabelecimento generalizado desse sorogrupo <sup>29, 102, 105</sup>. Como exemplo, Mendes e colaboradores<sup>69</sup> demonstraram, em um ensaio de longa duração conduzido nos Cerrados, que, após seis anos, o sorogrupo SEMIA 566 foi encontrado em todas as parcelas e ocupou, em média, 50% dos nódulos da soja, mesmo nas parcelas que haviam sido inoculadas com outras estirpes. Esses resultados também evidenciam a importância da inoculação anual, caso contrário um único sorogrupo pode predominar em todo o território nacional.

#### **4.3. Variabilidade nas estirpes de *Bradyrhizobium* após a introdução nos solos brasileiros**

Nosso grupo de pesquisa conduziu uma série de avaliações comparativas entre as estirpes comerciais antes e após alguns anos de adaptação aos solos brasileiros. Com a parental SEMIA 566 e sua variante CPAC 15, adaptada aos solos dos Cerrados, foram constatadas diferenças em diversas características, tais como: *in vitro*, morfologia das colônias, resistência intrínseca a antibióticos, síntese de ácido indol acético, expressão da hidrogenase e, *in vivo*, toxidez causada em soja e alfafa pela produção de rizobiotoxina, restrição à nodulação em soja contendo o alelo *Rj4c* desempenho simbiótico <sup>8, 75, 101</sup>. A análise dos fenótipos radiculares constatou diferenças em relação ao número de pelos radiculares (Hai, *hair induction*) em resposta aos oligossacarídeos lipo-quitínicos (fatores Nod) <sup>50, 75</sup>. Também foram constatadas diferenças genéticas, detectadas pela amplificação do DNA com *primers* aleatórios (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*) <sup>28, 75</sup>, ou específicos (REP, ERIC, BOX, que amplificam regiões repetidas e conservadas do DNA) <sup>1,6, 7, 29, 41</sup>, além de diferenças em diversos outros genes <sup>5</sup>. Em relação às propriedades simbióticas, diferenças marcantes na capacidade e na eficiência do processo de fixação do N<sub>2</sub> foram relatadas <sup>6, 41, 75</sup>. A capacidade competitiva das estirpes também pode ser alterada com a adaptação aos solos, inclusive, algumas estirpes passaram a ser extremamente competitivas, ocupando até 100% dos nódulos em estudos de

coinoculação<sup>41</sup>. Em outro estudo conduzido com variantes do sorogrupo SEMIA 566 adaptadas aos solos de Cerrados, Scotti e colaboradores <sup>90</sup> relacionaram essa capacidade competitiva com a habilidade de alterar as proteínas da membrana em resposta ao estímulo das raízes.

Em relação ao par de estirpes CB 1809 e CPAC 7, esta última produz maior quantidade de polissacarídeos extra-celulares<sup>75</sup>, maior número de pelos radiculares (Hai), e diferenças no perfil de fatores Nod em relação à parental <sup>50, 75</sup>. O desempenho simbiótico e a capacidade competitiva também diferem entre a parental e a CPAC 7 e outras variantes pertencentes ao mesmo sorogrupo <sup>76, 85</sup>.

Em estudos com populações estabelecidas, diferenças marcantes nas estirpes inoculantes após a adaptação aos solos foram observadas na análise de 263 isolados<sup>7</sup> provenientes de um solo dos Cerrados que havia sido inoculado com as estirpes CPAC 15 e CPAC 7. No sétimo ano, a alta capacidade competitiva do sorogrupo SEMIA 566 foi evidenciada, com a estirpe ocupando, em média, 70% dos nódulos. A variabilidade genética dos isolados, avaliada por rep-PCR (*polymorphism chain reaction*) com o *primer* BOX, em comparação com as estirpes inoculantes, foi bastante elevada e ocorreu não só dentro dos sorogrupos das duas estirpes inoculantes, como também houve a formação de um agrupamento de *B. elkanii*, provavelmente resultante da dispersão de outras áreas, seguida pela adaptação ao solo <sup>7</sup>. Quando todos os parâmetros estudados (caracterização morfofisiológica, reação sorológica, perfil de rep-PCR, RFLP-PCR —*restriction fragmente length polymorphism* - ou sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nodC* e *nifH*) foram avaliados, a variabilidade identificada foi tão elevada que, mesmo em um grupo com maior estabilidade genética, como o da CPAC 15, somente 6,4% dos isolados mostraram semelhança em todos os parâmetros com a estirpe parental, enquanto que nenhum isolado apresentou semelhança em todas as propriedades com a CPAC 7 <sup>7</sup>. Conforme comentado por Streeter<sup>96</sup>, provavelmente ocorre um ajuste substancial na diversidade genética da população no processo de estabelecimento nos solos; além disso, resultados obtidos no Brasil indicam que a variabilidade genética parece incrementar com o tempo de cultivo <sup>67</sup>.

Cabe comentar que a variabilidade genética elevada detectada nesses estudos, bem como em outros estudos conduzidos com variantes naturais 5, 101 pode estar relacionada a diversos eventos, incluindo mutações, recombinação gênica e transferência horizontal de genes e as condições tropicais, com frequentes estresses ambientais, certamente aceleram os processos que conduzem à variabilidade genética. Isso fica evidenciado quando são comparados tratamentos distintos em

uma mesma área e um exemplo é o do sistema de semeadura conhecido como plantio direto, em relação ao plantio convencional. No sistema de plantio direto, o revolvimento do solo na colheita e na semeadura é mínimo e os restos culturais são deixados no solo. Isso resulta em maior disponibilidade de água, de energia (matéria orgânica e restos culturais) e de nutrientes, menores oscilações de temperatura, decréscimo nas temperaturas máximas e médias, entre outros, em comparação com o sistema convencional, onde são utilizadas as práticas de aração e gradagem<sup>51</sup>. Em ensaios conduzidos no Paraná, as populações de rizóbios simbiotes de soja não só apresentaram diferenças morfofisiológicas e genéticas<sup>28, 46, 47</sup>, como também os isolados do plantio direto foram mais eficientes no processo de fixação do N<sub>2</sub><sup>28,77</sup>. Além disso, foi interessante verificar que, em um estudo de metagenômica, a ordem Rhizobiales foi superior no plantio direto em comparação com o plantio convencional<sup>94</sup>.

Na tabela 1 estão compiladas algumas diferenças morfofisiológicas, genéticas e simbióticas detectadas, por nosso grupo de pesquisa, entre estirpes parentais e variantes adaptadas aos solos brasileiros, pertencentes aos sorogrupos SEMIA 566 e CB 1809.

#### **4.4. Transferência horizontal de genes entre estirpes inoculantes e rizóbios indígenas ou naturalizados nos solos brasileiros**

Com base nas observações de que várias estirpes reisoladas de solos previamente inoculados não reagem com nenhum sorogrupo conhecido, ou apresentavam grande variabilidade em relação às estirpes inoculantes<sup>8, 28, 29, 34, 36,41, 50, 76, 85, 105</sup>, foi levantada a hipótese de que poderia estar ocorrendo transferência horizontal de genes da estirpe inoculante para rizóbios não-simbióticos indígenas. Transferência horizontal de genes foi relatada, a campo, na Nova Zelândia, em um solo isento de *Mesorhizobium loti* capaz de nodular e fixar N<sub>2</sub> com *Lotus corniculatus*. Sullivan e colaboradores<sup>99</sup> introduziram, nesse solo, a estirpe ICMP3153 e, após sete anos, a análise molecular dos isolados indicou que apenas 19% apresentavam o mesmo perfil da estirpe inoculada. Contudo, quando hibridizados com os genes de nodulação, os isolados apresentavam perfis idênticos ao da estirpe inoculante, sendo constatado que toda a região do DNA simbiótico, conhecida como ilha simbiótica, havia sido cromossomalmente integrada aos isolados<sup>99</sup>. Estudos posteriores confirmaram que rizóbios não-simbióticos persistiram no solo na ausência de leguminosa e adquiriram genes simbióticos da estirpe inoculante<sup>98, 100</sup>. De fato, o

sequenciamento de genomas de bactérias tem demonstrado que eventos de transferência horizontal são muito mais frequentes do que se imaginava, inclusive, levantando dúvidas sobre a definição de espécies de procariotos <sup>39, 40</sup>.

**Tabela 1.** Diferenças entre estirpes de *Bradyrhizobium* parentais e suas respectivas variantes obtidas após a adaptação aos solos.

<b>Característica</b>	<b>Metodologia de análise</b>	<b>Referência</b>
Morfologia de colônia	Produção de mucus, forma e diâmetro das colônias	Boddey e Hungria <sup>8</sup> ; Nishi et al. <sup>76</sup>
Características fisiológicas <i>in vitro</i>	Resistência intrínseca a antibióticos; síntese de ácido indol acético em meio enriquecido com triptofano; crescimento em meio enriquecido com asparagina	Boddey e Hungria <sup>8</sup> Delamutaetal. <sup>24</sup>
Genotipagem	RAPD <sup>1</sup> rep-PCR (ERIC, REP, BOX)  RFLP <sup>2</sup> -PCR do gene ribossomal 16S, 23S e o espaço intergênico entre os genes 16S e o 23S Sequenciamento do gene 16S rRNA e genes <i>housekeeping</i> (MLSA) <sup>3</sup> Diferenças em genes avaliados por RDA <sup>4</sup>	Nishi et al. <sup>76</sup> Alberton et al. <sup>1</sup> ; Barcellos et al. <sup>6</sup> ; Batista et al. <sup>7</sup> ;Ferreira e Hungria <sup>29</sup> ; Hungria et al. <sup>41</sup> ; Hungria et al. <sup>52</sup> ; Santos et al. <sup>85</sup> ; Torres et al. <sup>101</sup>  Alberton et al. <sup>1</sup> ; Barcellos et al. <sup>6</sup> ;Germano et al. <sup>38</sup> Chueireet al. <sup>18</sup> Menna et al. <sup>70</sup> Barcelloset al. <sup>5</sup>
Simbióticas	Perfil de fatores de nodulação (Nod) após a indução com flavonóides FenótiposradicularesTsr(thick and short root), Had (hair deformation), Hai (hair induction) Nodulação da cultivar Hill (alelo <i>Rj4</i> ) Sintomas de clorose (pela rizobiotoxina) nas cultivares BR 16 e Lee Nodulação, taxa de fixação do N <sub>2</sub> , eficiência de fixação do N <sub>2</sub>  capacidade competitiva  Rendimento e N total dos grãos	Hungria et al. <sup>50</sup>  Hungria et al. <sup>50</sup>  Boddey e Hungria <sup>8</sup> Boddey e Hungria <sup>8</sup>  Hungria et al. <sup>41</sup> ;Hungria et al. <sup>50</sup> ; Hungria et al. <sup>52</sup> ; Nishi et al. <sup>75</sup> ; Nishi&Hungria <sup>76</sup> ; Santos et al. <sup>85</sup> Hungria et al. <sup>41</sup> ; Hungria et al. <sup>50</sup> ; Hungria et al. <sup>52</sup> ; Nishi et al. <sup>75</sup> ; Santos et al. <sup>85</sup> Nishi et al. <sup>75</sup> ; Nishi &Hungria <sup>76</sup>

<sup>1</sup>Random amplified polymorphic DNA.

<sup>2</sup>Restriction fragment length polymorphism.

<sup>3</sup>Multilocus Sequencing Analysis.

<sup>4</sup>Representational Difference Analysis

As evidências de que estaria ocorrendo transferência horizontal de genes em populações de rizóbios associados à soja se tornaram mais fortes com os resultados de um estudo conduzido com 100 isolados adaptados aos Cerrados: não mais do que cinco isolados compartilhavam propriedades semelhantes às das estirpes inoculantes e 13% não reagiram com nenhum sorogrupo conhecido<sup>36</sup>. Além disso, os isolados ocuparam posições distintas nos agrupamentos formados com base nos perfis de DNA amplificados com os *primers* BOX, ou RPO1 (genes *nif*)<sup>36</sup> situação semelhante foi constatada na análise dos genes 16S rRNA, *nod* e *nif* do estudo de Batista e colaboradores<sup>7</sup>.

A confirmação de que o processo de transferência horizontal ocorre naturalmente em solos brasileiros veio pela caracterização genética detalhada de isolados previamente estudados por nosso grupo de pesquisa<sup>8, 41, 85</sup>. Pela análise de RFLP-PCR e pelo sequenciamento das regiões do DNA que codificam os genes 16S rRNA, *nodY*, *nodA*, *nodC* e *nifH*, Barcellos e colaboradores<sup>6</sup> verificaram que duas estirpes, a CPAC 402 (sorogrupo CB 1809) e a S 127 (sorogrupo SEMIA 566), foram bastante distintas em relação às parentais putativas. A estirpe S 127 foi identificada como um *B. elkanii* indígena que recebeu o gene *nodC* da estirpe inoculante de *B. japonicum*. A estirpe CPAC 402, por sua vez, foi identificada como um *S. fredii* indígena dos Cerrados, que recebeu toda a ilha simbiótica da estirpe inoculante de *B. japonicum* e, além disso, manteve uma cópia endógena do gene *nifH* de *S. fredii*. Esse é um forte indicativo de que os genes simbióticos foram transferidos horizontalmente das estirpes inoculantes de *B. japonicum* para duas outras espécies de rizóbios nativos dos solos dos Cerrados<sup>6</sup>.

## 5. Considerações finais

Diversos avanços biotecnológicos contribuíram para a expansão da cultura da soja no Brasil, podendo-se citar, como exemplo, o desenvolvimento de novas cultivares com resistência a doenças e tecnologias apropriadas às regiões tropicais; dentre as tecnologias, deve-se enfatizar a fixação biológica do N<sub>2</sub>. Nesse contexto, a partir da década de 1960, várias linhas de pesquisa em fixação biológica do N<sub>2</sub> foram implementadas, abrangendo desde programas de seleção de estirpes de *Bradyrhizobium*, até a compatibilização com as tecnologias recomendadas para a cultura. Contudo, novos desafios devem ser vencidos nas próximas décadas, para que o processo biológico consiga suprir as necessidades crescentes da cultura em

N. É necessário garantir que as novas cultivares e estirpes estabeleçam simbioses altamente eficazes em relação ao processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>. Para tanto, estudos de ecologia dos rizóbios devem ser conduzidos, uma vez que taxas elevadas de mutação, recombinação gênica e de transferência horizontal de genes entre estirpes inoculantes e rizóbios nativos foram observadas nos solos brasileiros, o que pode afetar as respostas à inoculação.

## 6. Referências

1. ALBERTON O., KASCHUK G., HUNGRIA M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.
2. ANÔNIMO. International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.622, 1993.
3. BALATTI P.A., PUEPPKE S.G. Identification of North American soybean lines that form nitrogen-fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA 257. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v.72, p.49-55, 1992.
4. BANGEL E.V. Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul. 2000. Dissertação (Mestrado em Microbiologia do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
5. BARCELLOS F.G., BATISTA J.S.S., MENNA P., HUNGRIA M. Genetic differences between *Bradyrhizobium japonicum* variant strains contrasting in N<sub>2</sub>-fixation efficiency revealed by representational difference analysis. **Archives of Microbiology**, v.191, p.113-122, 2009.
6. BARCELLOS F.G., MENNA P., BATISTA J.S.S., HUNGRIA M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2635-2643, 2007.
7. BATISTA J.S.S., HUNGRIA M., BARCELLOS F.G., FERREIRA M.C., MENDES I.C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v.53, p.270-284, 2007.
8. BODDEY L.H., HUNGRIA M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.407-415, 1997.
9. BOHRER T.R.J., HUNGRIA M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.937-952, 1998.
10. BRENCIC A., WINANS S.C. Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.155-194, 2005.
11. BUCHANAN R.E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN V.B.D., MCGOWAN V., SNEATH P.H.A., eds. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, p.225-240, 1980.
12. BUENDÍA-CLAVERÍA A.M., TEMPRANO-VERA F., ECHEVARRIETA R.O., RUIZ-SAINZ J.E. **Rhizobiumfredii: las bacterias de crecimiento rápido que forman nódulos fijadores de nitrógeno en la soja**. Sevilla: Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias, Centro de Información y Documentación Agraria, 1989. 48p. (Comunicaciones Agrarias. Producción Vegetal, 6/89).
13. CAMPO R.J., ARAUJO R.S., HUNGRIA M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. **Field Crops Research**, v.110, p.219-224, 2009.
14. CAMPO R.J., ARAUJO R.S., HUNGRIA M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v.48, p.154-163, 2009.
15. CAMPO R.J., ARAUJO R.S., MOSTASSO F.L., HUNGRIA M. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1103-1112, 2010.
16. CHEN W.X., YAN G.H., LI J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.393-397, 1988.
17. CHUEIRE L.M.O., BANGEL E., FERREIRA M.C., GRANGE L., CAMPO R.J., MOSTASSO F.L., ANDRADE D.S., PEDROSA F.O., HUNGRIA M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro. Londrina: Embrapa Soja, 2000a. 32p. (Embrapa Soja. Boletim Técnico, 3).

18. CHUEIRE L.M.O., BANGEL E.V., MOSTASSO F.L., CAMPO R.J., PEDROSA F.O., HUNGRIA M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.
19. CHUEIRE L.M.O., HUNGRIA M. N<sub>2</sub>-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. **Plant and Soil**, v.196, p.1-5, 1997.
20. CHUEIRE L.M.O., NISHI C.Y.M., LOUREIRO M.F., HUNGRIA M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v.4, p.80-95, 2000b.
21. COELHO R.R.R., DROZDOWICZ A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Revue D'Ecologie et Biologie du Sol**, v.15, p.459-473, 1978.
22. DE LAJUDIE P., WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLINS M.D., DREYFUS B., KERSTERS K., GILLIS M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994.
23. DELAMUTA J.R.M., RIBEIRO R.A., MENNA P., BANGEL E.V., HUNGRIA M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.698-710, 2012.
24. DELAMUTA J.R.R., RIBEIRO R.A., ORMEÑO-ORRILHO E., MELO I.S., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.3342-3351, 2013.
25. DÖBEREINER J., ARRUDA N.B. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycinemax* (L.) Merrill). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.2, p.475-487, 1967.
26. DÖBEREINER J., FRANCO A.A. Breve histórico da microbiologia do solo no Brasil. In: HUNGRIA M., BALOTA E. L., COLOZZI-FILHO E., ANDRADE D.S., eds. Microbiologia do solo: desafios para o século XXI. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.279-281.
27. DÖBEREINER J., FRANCO A.A., GUZMÁN I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.155-161, 1970.
28. FERREIRA M.C., ANDRADE D.S., CHUEIRE L.M.O., TAKEMURA S.M., HUNGRIA M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.627-637, 2000.
29. FERREIRA M.C., HUNGRIA M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p.139-152, 2002.
30. FRANCO A.A. **Rizobiologia. Estudos no Estado do Rio de Janeiro**. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C., eds. A soja no Brasil. Campinas: ITAL, 1981. p.436-442.
31. FRED E.B., BALDWIN I.L., McCOY E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
32. FREIRE J.R.J. **Inoculation of soybeans**. In: VINCENT J.M., WHITNEY A.S., BOSE J., eds. In: VINCENT J.M., WHITNEY A.S., BOSE J., eds. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. Maui: Nifal, 1977. p.335-379. (College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication, 145).
33. FREIRE J.R.J. Research into the *Rhizobium*/Leguminosae symbiosis in Latin America. **Plant and Soil**, v.67, p.227-239, 1982.
34. FREIRE J.R.J., KOLLING J., VIDOR C., PEREIRA J.S., KOLLING I.G., MENDES N.G. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p.47-53, 1983.
35. FREIRE J.R.J., VIDOR C. Rizobiologia. **Estudos no Estado do Rio Grande do Sul**. In: MIYASAKA S., MEDINA J.C., eds. A soja no Brasil. Campinas: ITAL, 1981. p.417-425.
36. GALLI-TERASWA L., GLIENKE-BLANCO G., HUNGRIA M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.933-939, 2003.
37. GARRITY G.M., HOLT J.G. **The road map to the Manual**. In: GARRITY G.M., BOONE D.R., CASTENHOLZ R.W., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9<sup>th</sup> ed., v.1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria 2nd ed. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, 2001. p.119-154.
38. GERMANO M.G., MENNA P., MOSTASSO F.L., HUNGRIA M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.217-229, 2006.
39. GEVERS D., COHAN F.M., LAWRENCE J.G., SPRATT B.G., COENYE T., FEIL E.J., STACKEBRANDT E., PEER Y.V., VANDAMME P., THOMPSON F.L., SWINGS J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews**, v.3, p.733-739, 2005.
40. GODOY L.P., VASCONCELOS A.T.R., CHUEIRE L.M.O., SOUZA R.C., NICOLÁS M.F., BARCELLOS F.G., HUNGRIA M. Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely

- established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.2742-2753, 2008.
41. HUNGRIA M., BODDEY L.H., SANTOS M.G., VARGAS M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, p.393-399, 1998.
  42. HUNGRIA M., BOHRER T.R.J. Variability among soybean cultivars for N<sub>2</sub> fixation capacity. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.
  43. HUNGRIA M., CAMPO R.J. **Inoculantes microbianos: situação no Brasil**. In: BIOFAG, org. Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Montevideo: BIOFAG, 2007. p.1-16.
  44. HUNGRIA M., CAMPO R.J., MENDES I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
  45. HUNGRIA M., CAMPO R.J., MENDES I.C., GRAHAM P.H. **Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America**. In: SINGH R.P., SHANKAR N., JAIWAL P.K., eds. Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006a. p.43-93.
  46. HUNGRIA M., CHUEIRE L.M.O., COCA R.G., MEGÍAS M. Preliminary characterization of fast growing strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1349-1361, 2001.
  47. HUNGRIA M., CHUEIRE L.M.O., MEGÍAS M., LAMRABET Y., PROBENZA A., GUTTIERREZ-MANERO F.J., CAMPO R.J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v.288, p.343-356, 2006b.
  48. HUNGRIA M., FRANCHINI J.C., CAMPO R.J., CRISPINO C.C., MORAES J.Z., SIBALDELLI R.N.R., MENDES I.C., ARIHARA J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v.86, n.4, p.927-939, 2006c.
  49. HUNGRIA M., FRANCHINI J.C., CAMPO R.J., GRAHAM P.H. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: NEWTON W.E., ed. Nitrogen fixation: origins, applications and research progress, v.4, WERNER W., NEWTON W.E., eds. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. p.25-42.
  50. HUNGRIA M., NISHI C.Y.M., COHN J., STACEY G. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin modulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N<sub>2</sub> fixation. **Plant and Soil**, v.186, p. 331-341, 1996.
  51. HUNGRIA M., VARGAS M.A.T. Environmental factors impacting N<sub>2</sub> fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
  52. HUNGRIA M., VARGAS M.A.T., ANDRADE D.S., CAMPO R.J., CHUEIRE L.M.O., FERREIRA M.C., MENDES I.C. **Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos**. In: SIQUEIRA J.O., MOREIRA F.M.S., LOPES A.S., GUILHERME L.R.G., FAQUIN V., FURTINNI NETO A.E., CARVALHO J.G., eds. Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p.597-620.
  53. HUNGRIA M., VARGAS M.A.T., SUHET A.R., PERES J.R.R. **Fixação biológica do nitrogênio em soja**. In: ARAUJO R.S., HUNGRIA M., eds. Microrganismos de importância agrícola. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.9-89.
  54. JARVIS B.D.W., VAN BERKUM P., CHEN W.X., NOUR S.M., FERNANDEZ M.P., CLEYET-MAREL J.C., GILLIS M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.
  55. JONES K.M., KOBAYASHI H., DAVIES B.W., TAGA M.E., WALKER G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews (Microbiology)**, v.5, p.619-633, 2007.
  56. JORDAN D.C. **Rhizobiaceae Conn 1938**. In: KRIEG N.R., HOLT J.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology, v.1. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1984. p.235-244.
  57. JORDAN D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.
  58. JORDAN D.C., ALLEN N.O. **Family III. Rhizobiaceae Conn 1938**. In: BUCHNAN R.E., GIBBONS N.E., eds. Bergey's manual of determinative bacteriology, v.1. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1974. p.235-244.
  59. KANG U.G., SOMASEGARAN P., HOBEN H.J., BOHLOOL B.B. Symbiotic potential, competitiveness, and serological properties of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to Korean soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1038-1045, 1991.
  60. KEYSER, H.H., BOHLOOL, B.B., HU, T.S., WEBER, D.F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. **Science**, v.215, p.1631-1632, 1982.

61. KEYSER H.H., CREGAN P.B. Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.2631-2635, 1987.
62. KUYKENDALL L.D., SAXENA B., DEVINE T.E., UDELL S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p. 501-505, 1992.
63. LEMOS E.G.M. Classificação e identificação de bradirrízobios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase. 1994. 108f. Tese (Livre Docência em Bioquímica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.
64. LLORET L., MARTÍNEZ-ROMERO E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.47, n.1-2, p.43-60, 2005.
65. LOPES E.S., GIARDINI A.R. **Rizobiologia. Estudos no Estado de São Paulo**. In: MIYASAKA S., MEDINA J.C., eds. A soja no Brasil. Campinas: ITAL, Campinas, 1981. p. 425-436.
66. LOPES E.S., GIARDINI A.R., KIIHL R.A.S., IGUE T. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja. **Bragantia**, v.35, p.1-11, 1976.
67. LOUREIRO M.F., KASCHUK G., ALBERTON O., HUNGRIA M. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping and inoculation managements. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.665-674, 2007.
68. LUNGE V.R., IKUTA N., FONSECA A.S.K., HIRIGOYEN D., STOLL M., BONATTO S., OZAKI L.S. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.648-652, 1994.
69. MENDES I.C., HUNGRIA M., VARGAS M.A.T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.28-35, 2004.
70. MENNA P., BARCELLOS F.G., HUNGRIA M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of 16S rRNA, ITS, *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.2934-2950, 2009.
71. MENNA P., HUNGRIA M., BARCELLOS F.G., BANGEL E.V., HESS P.N., MARTÍNEZ-ROMERO E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-32, 2006.
72. MINCHIN F.R., SHEEHY J.E., WITTY J.F. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. **Journal of Experimental Botany**, v.37, p.1581-1591, 1986.
73. NICOLÁS M.F., ARIAS C.A.A., HUNGRIA M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.109-117, 2002.
74. NICOLÁS M.F., HUNGRIA M., ARIAS C.A.A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, v.95, p.355-366, 2006.
75. NISHI C.Y.M., BODDEY L.H., VARGAS M.A.T., HUNGRIA M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, v.20, p.147-162, 1996.
76. NISHI C.Y.M., HUNGRIA M. Efeito da reinoculação na soja [*Glycinemax* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, 359-368, 1996.
77. PEREIRA A.A., HUNGRIA M., FRANCHINI J.C., KASCHUK G., CHUEIRE L.M.O., CAMPO R.J., TORRES E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p.1397-1412, 2007.
78. PERES J.R.R. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycinemax* (L.) Merrill. 1979. 81f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
79. PERES J.R.R., MENDES I.C., SUHET A.R., VARGAS M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para a soja em solos de Cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, p.357-363, 1993.
80. PERES J.R.R., VARGAS M.A.T., SUHET A.R. Variabilidade na eficiência de fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.193-196, 1984.
81. PERES J.R.R., VIDOR C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. **Agronomia Sul Riograndense**, v.16, p.205-219, 1980.
82. REYES V.G., SCHMIDT E.L. Population densities of *Rhizobium japonicum* strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.854-858, 1979.
83. RUMJANEK N.G., DOBERT R.C., VAN BERKUM P., TRIPLETT E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4371-4373, 1993.

84. SANTOS M.A., GERALDI I.O., GARCIA A.A.F., BORTOLATTO N., SCHIAVON A., HUNGRIA M. Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in soybean. **Hereditas**, v.150, p.17-25, 2013.
85. SANTOS M.A., NICOLÁS M.F., HUNGRIA M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e a soja [*Glycinemax* (L.) Merr.]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 67-75, 2006.
86. SANTOS M.A., VARGAS M.A.T., HUNGRIA M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.261-272, 1999.
87. SATO M.L., GARCÍA-BLÁSQUEZ C., VAN BERKUM P. Verification of strain identity in Brazilian soybean inoculants by using the polymerase chain reaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.387-391, 1999.
88. SCHMIDT E.L., ZIDWICK M.J., ABEBE H. *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.1212-1215, 1986.
89. SCHOLLA M.H., ELKAN G.H. *Rhizobium fredii* sp nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.484-486, 1984.
90. SCOTTI M.R.M.M.L., NEVES M.C.P., DÖBEREINER J., PAIVA E. Competitive and proteic alterations in *Bradyrhizobium japonicum* strains after contact with soybean root (*Glycine max* (L.) Merrill). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.65, p.427-438, 1993.
91. SCOTTI M.R.M.M.L., SÁ N.M.H., VARGAS M.A.T., DÖBEREINER J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 54, p.733-738, 1982.
92. SEMU E., HUME D.J. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N<sub>2</sub> fixation and yields of soybeans. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v.59, p.1129-1137, 1979.
93. SILVA J.G. Estudos sobre a inoculação da soja. **Revista de Agricultura**, v.23, p.365-378, 1948.
94. SOUZA R.C., CANTÃO M.E., VASCONCELOS A.T.R., NOGUEIRA M.A., HUNGRIA, M. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v.72, p.49-61, 2013.
95. SPRENT J.I., JAMES E.K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? **Plant Physiology**, v. 144, p.575-581, 2007.
96. STREETER J.G. Failure in inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.513-522, 1994.
97. SUHET A.R., PERES J.R.R., VARGAS M.A.T. **Rizobiologia. Estudos nos Cerrados do Distrito Federal**. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C., eds. A soja no Brasil. Campinas: ITAL, 1981. p.443-447.
98. SULLIVAN J.T., EARDLY B.D., VAN BERKUM P., RONSON C.W. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2818-2825, 1996.
99. SULLIVAN J.T., PATRICK H.N., LOWTHER W.L., SCOTT D.B., RONSON C.W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.92, p.8985-8989, 1995.
100. SULLIVAN J.T., RONSON C.W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.95, p.5145-5149, 1995.
101. TORRES A.R., KASCHUK G., SARIDAKIS G.P., HUNGRIA, M. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [*Glycine max*( L.) Merrill]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1831-1835, 2012.
102. VARGAS M.A.T., HUNGRIA M. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M., eds. Biologia dos solos dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.
103. VARGAS M.A.T., MENDES I.C., SUHET A.R., PERES J.R.R. **Dois novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62).
104. VARGAS M.A.T., MENDES I.C., SUHET A.R., PERES J.R.R. **Fixação biológica do nitrogênio**. In: ARANTES N.E., SOUZA P.I.M., eds. Cultura da soja nos Cerrados. Piracicaba: POTAFOS, 1993a. p.159-182.
105. VARGAS M.A.T., MENDES I.C., SUHET A.R., PERES J.R.R. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from Brazilian "Cerrados" areas under soybean cultivation. **Revista de Microbiologia**, v.24, p.239-243, 1993b.
106. VARGAS M.A.T., PERES J.R.R., SUHET A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1127-1132, 1982.
107. VARGAS M.A.T., SUHET A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.15, p.343-347, 1980.
108. VARGAS M.A.T., SUHET, A.R. MENDES, I.C. PERES, J.R.R. **Fixação biológica do nitrogênio em solos de Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 83p.

109. WEBER D.F., KEYSER H.H., URATSU S.L. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas. **Agronomy Journal**, v.81, p.786-789, 1989.
110. XU L.M., GE C., CUI Z., LI J., FAN H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.706-711, 1995.
111. YOUNG J.M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a junior synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2002 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.2107-2110, 2003.

## Capítulo 17

### **Microrganismos e Processos Microbianos como Bioindicadores de Qualidade Ambiental**

---

Marco Antonio Nogueira<sup>1</sup>  
Marina Yumi Horta Miyauchi<sup>1</sup>  
Daniel Bini<sup>1</sup>  
Galdino Andrade<sup>1</sup>

Universidade Estadual de Londrina - UEL, Centro de Ciências Biológicas – CCB, Depto. de Microbiologia,  
Laboratório de Ecologia Microbiana

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Depto. de Microbiologia/CCB/UEL

---

#### **1. Introdução**

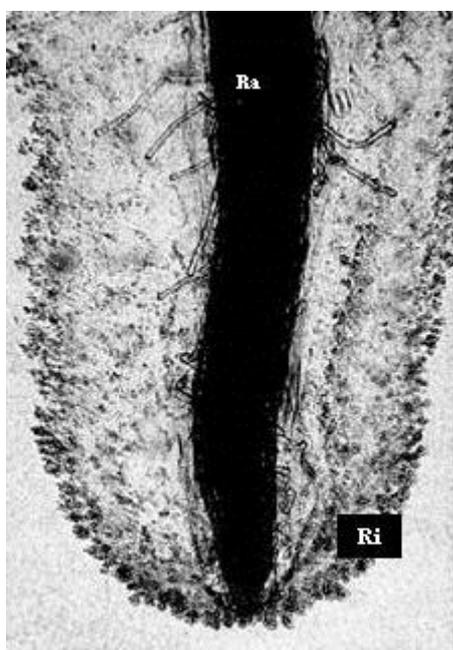
Diferentemente do que pode parecer para o público leigo, a grande maioria dos microrganismos existentes no ambiente é benéfica. Aqueles conhecidos (e temidos) por causarem patologias em animais e plantas são exceção. O solo, por exemplo, apresenta uma grande diversidade microbiana, representada por protozoários, algas, fungos e bactérias, que desempenham papéis fundamentais para manutenção da vida na terra. Muitos destes microrganismos participam dos chamados ciclos biogeoquímicos, dentre os quais se destacam os ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, metais, etc. Estes microrganismos são sensíveis a alterações no ambiente causadas pela ação antrópica, como o desmatamento para a conversão de solos florestais para agrícolas, queimada, mineração, poluição, urbanização, etc. Isso faz dos microrganismos do solo e das propriedades bioquímicas a eles relacionadas, bons bioindicadores de qualidade do solo, que podem ser utilizados não apenas na avaliação da dimensão das alterações causadas pelo homem no ambiente, mas também para mensurar a eficiência dos processos de recuperação de áreas degradadas.

#### **2. Microrganismos do solo e ciclos biogeoquímicos**

##### **2.1. Carbono**

O carbono que compõe as estruturas vivas é proveniente do CO<sub>2</sub> captado da atmosfera via fotossíntese. Por este processo, o carbono é fixado e passa a integrar

as moléculas de carboidratos, lignina, proteínas, lipídeos, dentre outras. Quando a matéria vegetal, juntamente com restos animais, morre e entra em contato com o solo, começa a decomposição, processo realizado principalmente por microrganismos, como bactérias e fungos, que oxidam a matéria orgânica, dando origem aos colóides húmicos, ou mineralizando nutrientes que posteriormente podem ser utilizados por plantas e microrganismos. Não se pode esquecer outra importante fonte de carbono para os microrganismos do solo, chamada rizodeposição, que corresponde aos exsudatos liberados no solo pelas raízes das plantas, numa região denominada rizosfera. A presença de material orgânico de fácil degradação estimula a atividade microbiana, da ordem de até 30 vezes mais em relação ao solo não rizosférico.



**Figura 1.** A Rizosfera. Intensa proliferação de microrganismos ao redor da raiz (Ra) estimulada pela exsudação radicular, formando a rizosfera (Ri)<sup>6</sup>.

A matéria orgânica decomposta pela atividade microbiana pode ter três destinos: a imobilização, a mineralização e a humificação. A imobilização ocorre quando o carbono resultante da decomposição é incorporado à célula microbiana. A mineralização se dá com a liberação de carbono na forma de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, retornando ao início do ciclo. A humificação ocorre quando o carbono se acumula e se estabiliza na forma de substâncias húmicas, cuja estrutura e bioquímica ainda são pouco compreendidas. O armazenamento e dinâmica do carbono do solo têm recebido atenção substancial devido às mudanças climáticas <sup>4</sup>. A principal forma de carbono encontrada no solo é a matéria orgânica, que é a fração humificada,

originada de processos microbianos de degradação e síntese a partir de material orgânico de origem vegetal, animal e microbiana <sup>18</sup>. Dessa forma, é importante destacar que as substâncias húmicas são de fundamental importância para a fertilidade do solo em ecossistemas naturais e agrícolas, principalmente nas regiões tropicais, em que os solos são altamente intemperizados.

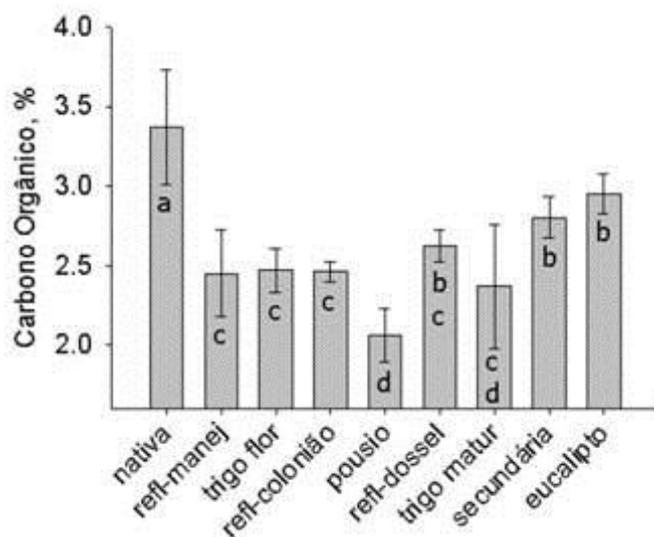
A matéria orgânica do solo é a principal fonte de carbono e energia para os microrganismos e também é fonte de nutrientes para as plantas. É responsável por significativa porção da capacidade de troca de cátions (CTC) do solo, ou seja, as cargas negativas que retêm os cátions como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , principalmente nos solos tropicais altamente intemperizados, além de aumentar a capacidade de retenção de água e a estabilidade de agregados do solo, o que torna o solo mais resistente a processos erosivos. A incorporação de matéria orgânica ao solo reduz sua densidade global e, conseqüentemente aumenta a porosidade total, o que tem um efeito positivo no crescimento vegetal <sup>18</sup>. Alterações causadas pelo manejo inadequado do solo causam declínio significativo no seu teor de matéria orgânica ao longo do tempo <sup>30</sup>, o que leva à degradação das suas propriedades físicas, químicas e (micro)biológicas <sup>22, 21</sup>.

A conversão de florestas em áreas agrícolas é geralmente acompanhada por um declínio no conteúdo de carbono orgânico do solo <sup>21</sup>. Em estudo em áreas florestais e agrícolas, os valores de carbono orgânico total foram 50% a 75% menores nas áreas agrícolas em comparação com áreas sob floresta <sup>33</sup>.

Se por um lado a perda de carbono orgânico do solo é relativamente fácil, em contrapartida sua recuperação é difícil, principalmente no ambiente tropical. Em solo coberto por floresta secundária em regeneração há vinte anos, os níveis de matéria orgânica encontrados ainda foram inferiores aos encontrados na floresta nativa adjacente <sup>27</sup> (Figura 2). Acredita-se que a recuperação dos teores de matéria orgânica em solo degradado a níveis correspondentes aos de uma floresta madura pode levar de 60 a 100 anos.

Como visto anteriormente, os grandes responsáveis pela formação de matéria orgânica humificada são os microrganismos do solo. Sua atividade e biomassa total podem ser grandemente influenciadas pelas diferentes formas de manejo e uso do solo. Esses efeitos serão mais pronunciados na comunidade microbiana e seus processos devido à sua maior sensibilidade em relação a outras variáveis do ambiente como o próprio teor de C orgânico total. Isso torna essas informações importantes e sensíveis indicadores de perturbações do ambiente.

Existe uma relação direta entre teor de matéria orgânica no solo e diversidade e atividade microbiana. Portanto, práticas que levem à diminuição dos teores de matéria orgânica do solo, como a queima, revolvimento excessivo do solo, exportação dos resíduos vegetais pelas colheitas podem contribuir para a diminuição dos teores de carbono orgânico no solo, com conseqüências negativas para a diversidade e atividade microbiana.



**Figura 2.** Teores de carbono orgânico em solo sob Floresta nativa, reflorestamento com sub-bosque manejado, trigo em florescimento, reflorestamento dominado por capim-colonião, pousio de inverno, reflorestamento com dossel aberto, trigo em maturação, floresta secundária há 20 anos e reflorestamento com eucalipto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Duncan  $P < 0,05$ ). Adaptado de Nogueira et al. <sup>27</sup>.

## 2.2. Nitrogênio

Embora a atmosfera seja composta por 78% de nitrogênio ( $N_2$ ), a grande maioria dos seres vivos não é capaz de utilizar diretamente essa forma de N para biossíntese de aminoácidos e outras substâncias orgânicas e por isso são dependentes de compostos mais reativos, como o amônio e o nitrato, para a realização desses processos.

Uma das principais formas de entradas de N nos sistemas biológicos ocorre por meio da fixação biológica de nitrogênio, realizada exclusivamente por algumas bactérias, que podem ser simbióticas, como é o caso de bactérias genericamente denominadas rizóbios, ou associativa, como bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, etc. Estas bactérias são capazes de transformar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em  $NH_3$  que pode então ser utilizado por microrganismos e vegetais. A assimilação de nitrogênio inorgânico pela planta ou microrganismos é um processo muito importante na biosfera, pois estas

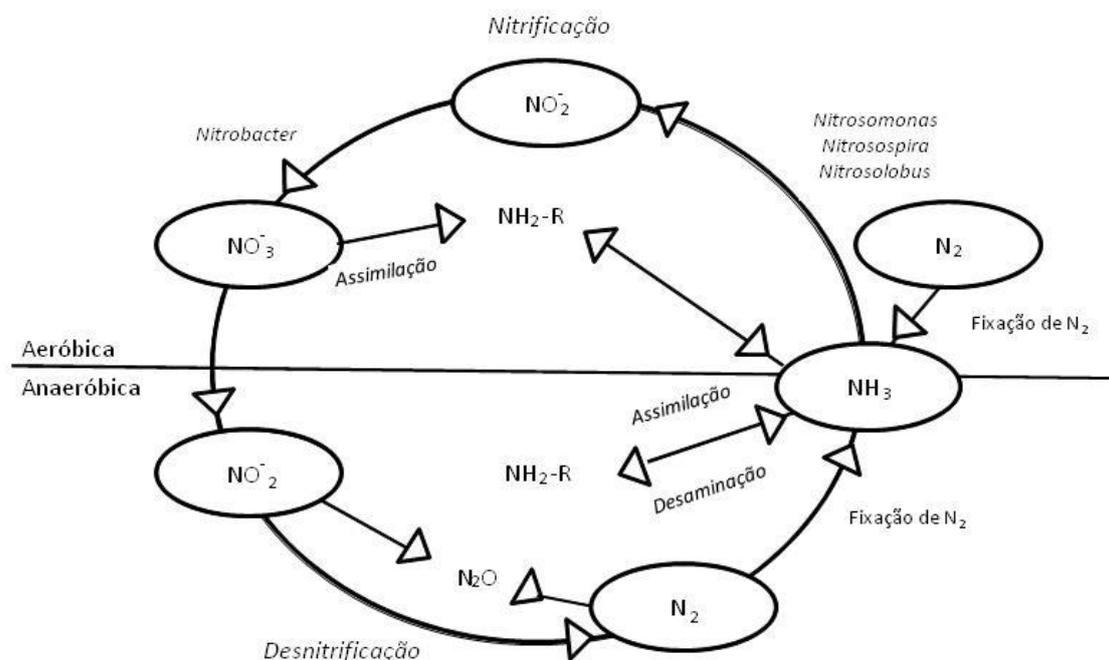
substâncias estão diretamente ligadas à síntese de compostos orgânicos nas células.

Dentre os nutrientes de plantas, o nitrogênio é o mais dependente da atividade biológica, sobretudo a microbiana, sofrendo vários processos de oxidação-redução. Boa parte das transformações microbianas do N ocorre no solo e na água, compreendendo os processos de assimilação, fixação biológica, amonificação, nitrificação e desnitrificação (Figura 3). As entradas de N atmosférico no solo ocorrem pela fixação biológica, pela fixação industrial (fertilizantes nitrogenados), e, embora em menor quantidade, também pela conversão de  $N_2$  a  $NO_3^-$  por descargas elétricas durante tempestades. Outra forma do N chegar ao solo ocorre quando resíduos vegetais e animais contendo N orgânico entram em contato com a comunidade microbiana do solo, a qual realizará a mineralização do N orgânico, num processo denominado amonificação, o qual é precedido da desaminação. A mineralização do nitrogênio envolve principalmente fungos e bactérias, sendo denominados genericamente de microrganismos amonificadores. Como se pode perceber, esse grupo de microrganismos tem um papel fundamental no ciclo do N, sendo sua atuação bastante relevante na disponibilização do N presente no estoque orgânico do solo à comunidade microbiana e vegetal.

Após a mineralização, o  $NH_4^+$  pode ser absorvido por microrganismos e plantas, num processo chamado imobilização ou assimilação, ou sofrer nitrificação. A nitrificação é realizada em condições aeróbicas por bactérias quimiolitotróficas da família Nitrobacteriaceae que utilizam a forma reduzida de N para obtenção de energia para o seu metabolismo, também conhecido como quimioautotrófico. Primeiramente o  $NH_4^+$  é oxidado a  $NO_2^-$  por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* e *Nitrospira*, e na seqüência esse  $NO_2^-$  é oxidado por bactérias do gênero *Nitrobacter* a  $NO_3^-$ . O  $NO_3^-$  é o íon preferencialmente absorvido pelas plantas e também ser utilizado por microrganismos. É a forma de N mais sujeita a perdas por lixiviação, pois seu caráter aniônico sofre repulsão pelo complexo de cargas do solo, predominantemente negativo, mantendo-o em solução, o que favorece seu arraste quando a água se desloca no perfil do solo pela força gravitacional. Esse processo é uma das principais formas de contaminação de águas subterrâneas por nitrato, o que pode levar ao comprometimento da qualidade dessas fontes d'água para consumo humano.

A taxa de nitrificação, ou seja, a velocidade com que o amônio é convertido em nitrato, é um bom indicador do potencial de perdas de N por lixiviação no solo. É um processo sensível às alterações impostas ao ambiente, e pode ser medido com

razoável precisão. Deve-se salientar, porém, que uma redução na nitrificação não é indesejável, por permitir maior manutenção do nitrogênio na superfície do solo, já que o íon amônio pode ser adsorvido às cargas negativas do solo, evitando que seja perdido por lixiviação.



**Figura 3.** Etapas e interfaces do ciclo do nitrogênio. Os níveis de oxidação do N são bastante variáveis, indo de +5 no  $\text{NO}_3^-$ , 0 no  $\text{N}_2$  e -3 no  $\text{NH}_3$ . Ilustração: Daniel Bini.

A perda do nitrogênio do solo também pode ocorrer pela desnitrificação, que é um processo realizado por microrganismos heterotróficos como as pseudomonas e outros anaeróbios facultativos, que utilizam o  $\text{NO}_3^-$  comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória, no caso de restrição de  $\text{O}_2$ , num processo chamado respiração anaeróbica. Neste processo, o nitrato e o nitrito são convertidos a NO (óxido nítrico),  $\text{N}_2\text{O}$  (óxido nitroso) e  $\text{N}_2$ , resultando em perdas gasosas de nitrogênio<sup>10,37,39</sup>. Não bastassem os custos econômicos decorrentes da desnitrificação, os custos ambientais também são elevados, visto que esses gases, exceto  $\text{N}_2$ , estão envolvidos na destruição da camada de ozônio<sup>12</sup>. Por exemplo, o  $\text{N}_2\text{O}$  tem um potencial de efeito estufa 296 vezes superior ao  $\text{CO}_2$ .

### 2.3. Fósforo

O ciclo do fósforo difere do ciclo do nitrogênio pelo fato de que a crosta terrestre (solo, rochas), em vez da atmosfera, é o grande reservatório primário de

fósforo. O fósforo encontrado nos solos das regiões tropicais e subtropicais está em sua maior parte pouco disponível às plantas. É encontrado principalmente na forma de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, no caso de fósforo inorgânico, ou então na forma de fósforo orgânico, como fosfatos de inositol, ácidos nucleicos e fosfolípidos.

É um elemento de fundamental importância para os organismos vivos por integrar moléculas como o ATP e ácidos nucleicos. Nos diferentes organismos estão em diferentes proporções, por exemplo, bactérias e actinomicetos possuem 1,5 a 2,5% de sua matéria seca constituída pelo fósforo, enquanto que fungos possuem 0,5 a 1% e vegetais de 0,05 a 0,5%.

O fósforo circula, basicamente, das plantas para os animais, e destes para o solo em formas orgânicas de resíduos e dejetos. Pela ação dos microrganismos, o fósforo orgânico é mineralizado a fosfato inorgânico, tornando-se disponível às plantas novamente, mas também é imobilizado em parte na biomassa microbiana.

A mineralização do fósforo orgânico é realizada por microrganismos pela produção de enzimas conhecidas como fosfatases, que abrangem fitases (degrada hexafosfatos de inositol), nucleases (RNA e DNA) e fosfolipases (fosfolípidos). As fosfatases podem também ser de origem vegetal, mas em sua maioria são de origem microbiana. A fosfatase ácida, cujo pH ótimo é 6,5, tem origem tanto microbiana quanto vegetal, enquanto a fosfatase alcalina, cujo pH ótimo é 11, tem origem microbiana. A ação das fosfatases mineraliza o fósforo contido na matéria orgânica tornando-o disponível para a utilização de plantas e microrganismos na forma de fosfato inorgânico <sup>1,2</sup>.

O fósforo inorgânico também é solubilizado por microrganismos, dentre os quais alguns dos gêneros mais encontrados entre bactérias (Figura 4) são: *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, enquanto que entre os fungos os gêneros mais comuns são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, dentre outros. O mecanismo pelo qual o fosfato inorgânico é solubilizado pelos microrganismos é a produção de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, láctico, succínico e oxálico.

Dentre os fatores que influenciam a solubilização de fosfatos, a cobertura vegetal apresenta papel importante, pois as raízes das plantas, através da exsudação, estimulam a multiplicação dos microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera.



**Figura 4.** Aspecto de placa de cultura contendo fosfato insolúvel ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) após espalhamento de uma suspensão de solo ( $10^{-4}$ ) e incubação. Os halos ao redor de algumas colônias indicam que o fosfato precipitado no meio foi solubilizado. Note que nem todas as colônias apresentam capacidade de solubilização <sup>24</sup>.

Outro grupo de microrganismos de importância no ciclo do fósforo é o dos fungos micorrízicos. São de ampla disseminação na natureza e formam simbiose com a maioria das espécies vegetais. São poucas as famílias botânicas que não formam micorrizas. Dependem de um hospedeiro vivo para cumprir seu ciclo, ou seja, a produção de esporos, e por isso são denominados biotróficos obrigatórios, não sendo possível cultivá-los em meio artificial. Dentre os benefícios que trazem às culturas, os mais evidentes são o aumento da absorção de nutrientes, sobretudo os de baixa mobilidade no solo como o fósforo e o zinco. Isso acontece porque suas hifas permitem a exploração de um maior volume de solo em relação à raiz da planta não micorrizada. Enquanto as hifas do fungo micorrízico podem explorar o solo a uma distância até 10 cm da superfície da raiz, o sistema radicular de uma planta não micorrizada restringe-se a explorar o solo da região rizosférica, cerca de 3 mm da sua superfície. Sendo assim, a hifa do fungo micorrízico permite melhor exploração do solo, encurtando o caminho entre os íons fosfato no solo e as raízes das plantas, sendo esse grupo de microrganismos de grande importância no ciclo do fósforo no solo, sobretudo naqueles de baixa fertilidade.

### 3. Biomassa e atividade microbianas no solo

Uma parte do carbono orgânico total do solo está na forma de células microbianas ativas, composta por fungos, bactérias, actinomicetos, protozoários e

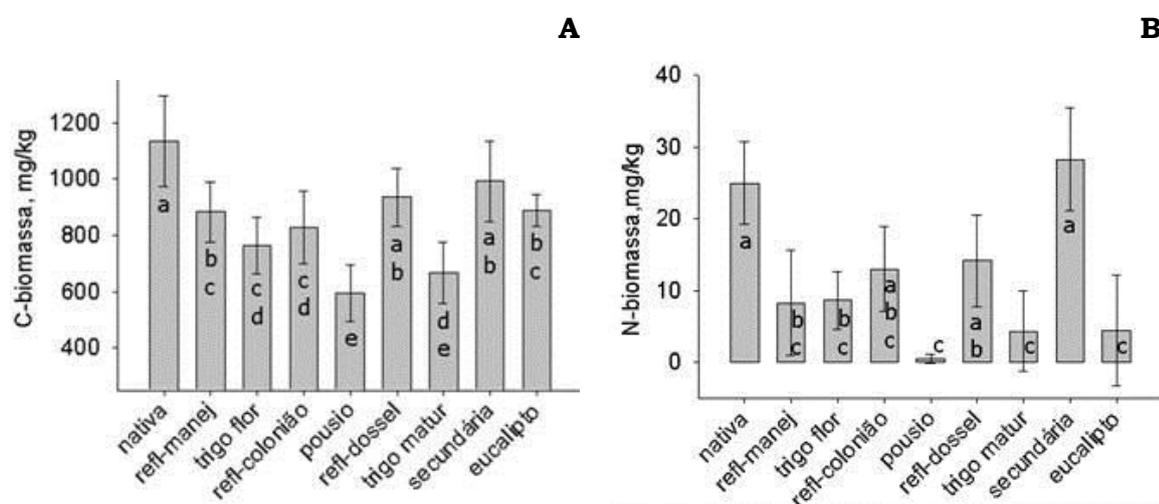
algas, denominada biomassa microbiana de carbono. Essa forma de carbono vivo pode variar de 1 a 5% do carbono orgânico total do solo e desempenha papel fundamental na ciclagem e armazenamento de nutrientes como o nitrogênio, fósforo e enxofre, que estarão imobilizados em suas células, ou mesmo servir como fonte, pela mineralização destes nutrientes após a morte celular, participando ativamente dos ciclos biogeoquímicos.

A biomassa microbiana, tanto de carbono quanto de nitrogênio, tem sido utilizada amplamente como indicador imediato de qualidade do solo. Enquanto a variação nos teores de carbono orgânico total no solo pode levar meses para ser notada, a variação na biomassa microbiana pode ser notada em dias após a ocorrência de um determinado distúrbio no ambiente. Assim, o uso de um indicador mais sensível pode ser mais interessante por permitir tomada de decisões quanto à estratégia de uso e manejo do solo antes que os eventuais efeitos negativos possam ter ocorrido de forma irreversível ou de difícil reversão. Caso chegue a tal ponto, poderá haver comprometimento da capacidade do solo daquele ambiente em cumprir seu papel prover recursos à comunidade vegetal, animal, microbiana e regular o ciclo hidrológico, com conseqüências ambientais severas, como processos erosivos, assoreamento de recursos hídricos, desertificação, perda de biodiversidade, etc.

A biomassa microbiana sofre influência direta da cobertura vegetal. A remoção da vegetação natural ou o uso de práticas que reduzam a entrada de carbono orgânico no solo causam drástica diminuição da biomassa microbiana. A retirada da cobertura vegetal também expõe o solo ao ressecamento, provoca maior perda de água, altera o seu pH, e expõe o solo à erosão, fatores que alteram o crescimento microbiano e conseqüentemente a biomassa microbiana. Nogueira et al.<sup>27</sup> encontraram mais biomassa microbiana nas áreas sob floresta nativa em comparação a áreas agrícolas, sobretudo aquelas que resultam em menor aporte de carbono orgânico ao solo, como o pousio (Figura 5). Observou-se ainda, que o reflorestamento com espécies nativas possibilitou maior restabelecimento da biomassa microbiana, tanto de C quanto de N, quando comparadas ao reflorestamento com Eucalipto, uma espécie exótica. Resultado semelhante foi encontrado por Dinesh et al.<sup>14</sup> que avaliaram a influência do uso do solo em florestas decíduas, semi-perenes e plantações comerciais de espécies arbóreas e encontraram níveis de biomassa microbiana de C e N sempre mais altos nas áreas florestais nativas do que nos reflorestamentos. Este declínio dos valores das biomassas de C e N foi atribuído ao menor aporte de resíduos vegetais ao solo,

somado à diminuição dos teores de matéria orgânica e conseqüente diminuição da atividade microbiana.

Rutigliano et al. <sup>31</sup> avaliaram solos sob diferentes coberturas vegetais em diferentes estágios sucessionais, com e sem introdução de espécie exótica (*Pinus pinea*), e observaram que a introdução da espécie exótica diminuiu a biomassa e a atividade microbiana, o que foi atribuído à qualidade dos resíduos orgânicos da planta, com alta relação C/N e altos teores de lignina. As características biológicas e químicas do solo da área com pinus foram semelhantes às da área no início da sucessão vegetal, sugerindo um retardamento na recuperação da área pela introdução da espécie exótica.



**Figura 5.** Biomassa microbiana de carbono (A) e nitrogênio (B) em solo sob diferentes formas de uso: Floresta nativa, reflorestamento com sub-bosque manejado, trigo em florescimento, reflorestamento dominado por capim-colonião, pousio de inverno, reflorestamento com dossel aberto, trigo em maturação, floresta secundária há 20 anos e reflorestamento com eucalipto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Duncan  $P < 0,05$ ). Adaptado de Nogueira et al. <sup>27</sup>.

A respirometria ou respiração basal representa a taxa de mineralização do carbono orgânico, ou seja, a transformação do carbono existente no solo nas formas orgânicas para  $\text{CO}_2$  por meio da ação microbiana. A respirometria apresenta grande potencial como indicador de qualidade do solo, relacionando-se com os teores de C orgânico do solo, reciclagem de nutrientes, respondendo prontamente às diferentes estratégias de manejo do solo <sup>32</sup>. Andersson et al. <sup>4</sup> afirmam que a respirometria está relacionada com a biomassa microbiana de C e com o teor de matéria orgânica no solo e em seu estudo encontrou correlações entre a respiração e atividades

enzimáticas. Em avaliação de solo desmatado há 15 anos, os valores de respiração microbiana em área desmatada foi significativamente menor que em área com vegetação nativa <sup>9</sup>.

O quociente metabólico ( $qCO_2$ ) é um índice que expressa a quantidade de  $CO_2$  produzida por unidade de biomassa microbiana por tempo, servindo como indicador do estado metabólico dos microrganismos do solo <sup>3</sup>. Um alto valor de  $qCO_2$  pode indicar um estado de estresse na comunidade microbiana do solo. Esse índice também é usado como um indicador do estado bioenergético da comunidade microbiana frente a alterações no ecossistema.

Dinesh et al. <sup>14</sup> encontraram maiores valores de  $qCO_2$  em solos florestais em relação a solos agrícolas, o que foi atribuído à maior quantidade de substrato orgânico que retorna ao solo florestal e é ativamente degradado pela comunidade microbiana, demonstrando uma maior demanda energética em comparação às áreas cultivadas. Neste contexto, o quociente metabólico foi considerado como indicador da maturidade do ecossistema, sendo maior em comunidades microbianas de solos mais jovens, com a comunidade microbiana ainda não estável. Altos valores de  $qCO_2$  podem indicar duas situações: uma em que há grande quantidade de substratos orgânicos de fácil degradação, e outra em que a comunidade microbiana se encontra em condição de estresse metabólico e apresenta baixa eficiência no processo de obtenção de energia para a manutenção celular, precisando respirar mais para manter a mesma unidade de biomassa <sup>3</sup>. De acordo com Insam <sup>17</sup>, solos que recentemente receberam substratos orgânicos de fácil degradação apresentam predomínio de ecotipos microbianos estrategistas *r*, compreendendo poucas espécies, porém com altas taxas de crescimento. Esses microrganismos apresentam maior produção de  $CO_2$  por unidade de biomassa que os denominados estrategistas *K*, que compreendem mais espécies, porém com menores taxas de crescimento, que acabam prevalecendo nos solos de ambientes estáveis.

De acordo com Harris <sup>16</sup>, o  $qCO_2$  diminui com o estágio sucessional de vegetação de uma área, sendo maior nos estágios primários e decresce quando se tende à condição clímax. Entretanto, nem sempre o  $qCO_2$  segue esse modelo, e ao mesmo tempo em que fornece um índice de eficiência metabólica microbiana, também possui limitações em se tratando dos efeitos causados por estresse e distúrbio em solos degradados e em recuperação. Dessa maneira, sua interpretação deve ser cautelosa e integrada com os dados de biomassa microbiana de C,

respirometria e também com análises de enzimas que refletem o estado metabólico dos microrganismos do solo como a desidrogenase.

#### **4. Grupos funcionais de microrganismos do solo**

Os microrganismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com os processos biológicos que realizam no ecossistema. Microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, nitrificantes, desnitrificantes, amonificadores) e os envolvidos no ciclo do carbono (degradadores de polímeros de carbono), como a celulose (celulolíticos), degradadores de amido (amilolíticos), de proteínas (proteolíticos), além dos solubilizadores de fosfato, etc. são exemplos de grupos funcionais <sup>34,5</sup>. Os grupos funcionais de microrganismos do solo estão presentes em diversos ambientes e interagem diretamente com as raízes das plantas, participando de seu crescimento e nutrição <sup>24</sup>.

A grande diversidade de espécies em um grupo funcional pode ser interpretada como um mecanismo para assegurar a continuidade dos processos biológicos, onde a perda de uma espécie seria compensada pela presença de outras, que desempenhariam a mesma “função” no sistema <sup>20</sup>. Isso ocorre porque organismos funcionalmente semelhantes têm várias estratégias de sobrevivência, adaptando-se às diferentes condições de crescimento e suportando as adversidades de diferentes ambientes, habitats e nichos <sup>29</sup>. Um solo que apresenta alta diversidade de organismos apresenta maior capacidade de manter os processos ecológicos em equilíbrio após um distúrbio. Essa capacidade é definida como resiliência e refere-se ao tamponamento biológico aos efeitos de perturbações no ecossistema.

A relação entre a redundância funcional, isto é, diferentes funções exercidas por um mesmo grupo microbiano, e a degradação do solo foi abordada por Harris <sup>16</sup> em sua revisão. Com base em estudos sobre a capacidade de utilização de diferentes fontes de C como substrato, observou-se que a redundância funcional bacteriana aumentava conforme o nível de recuperação do solo passava de degradado a não degradado. Isso foi relacionado com o restabelecimento e diversidade das espécies vegetais nas áreas, enfatizando a importância da diversidade vegetal sobre a diversidade funcional microbiana.

Matsumoto et al. <sup>24</sup> avaliaram a interação de grupos funcionais na rizosfera de espécies arbóreas representativas de diferentes estágios sucessionais (pioneiras, secundárias iniciais, secundárias tardias e clímax) e verificaram que enquanto os

microrganismos amilolíticos não sofreram alterações nos diferentes grupos sucessionais, os celulolíticos apresentaram maior ocorrência na rizosfera de espécies secundárias iniciais. Isso indica que a composição da comunidade vegetal pode influenciar na prevalência ou supressão de determinados grupos funcionais de microrganismos no solo.

## 5. Enzimas do solo

As enzimas do solo desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes. Elas podem estar no solo em forma livre (exoenzimas produzidas e excretadas por microrganismos), ligadas a estruturas celulares ou mesmo endoenzimas, que foram liberadas no solo após a morte e ruptura da célula <sup>8</sup>. Em se tratando de exoenzimas, elas são liberadas no solo com o intuito de aumentar a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos. Uma vez liberadas, podem permanecer na solução do solo ou se ligar a colóides do solo ou substâncias húmicas, permanecendo ativas por anos <sup>25</sup>.

As enzimas do solo ou exoenzimas têm origem principalmente microbiana, mas também podem ser provenientes de plantas e animais <sup>38</sup>. Assim, quando a população e a dinâmica microbiana do solo são afetadas devido às práticas de manejo e uso do solo, também se espera que haja reflexos nas atividades enzimáticas <sup>13,26</sup>. São mediadoras de importantes processos bioquímicos como mineralização e ciclagem de carbono e nutrientes, formação e decomposição da matéria orgânica do solo, além de degradação substâncias xenobióticas como os pesticidas. A atividade enzimática também é sensível a mudanças no manejo dos solos e com isso podem antecipar mudanças na qualidade do solo <sup>1</sup> e por isso pode ser utilizada como índice de diversidade funcional microbiana <sup>26</sup>.

Várias enzimas têm suas atividades detectadas no solo, participando ativamente dos ciclos biogeoquímicos, como a asparaginase, celulase, deaminase, desidrogenase, glucosidase, lipase, nucleotidase, fenoloxidase, fosfatase, fitase, protease, pirofosfatase e urease (Tabela 1). Dentre elas, podemos destacar a celulase, fosfatase, urease e desidrogenase, que são freqüentemente utilizadas na avaliação de qualidade do solo. A celulase é a enzima que degrada a celulose, molécula mais abundante nos resíduos vegetais, liberando açúcares de baixo peso molecular, que servem de fonte de energia para os microrganismos do solo <sup>30</sup>. A fosfatase é uma enzima que hidrolisa ésteres de fosfato, liberando o fósforo que se encontra na forma orgânica de forma que possa ser utilizado por plantas e

microrganismos <sup>7</sup>. A urease hidrolisa a uréia liberando amônia. A desidrogenase, ao contrário das anteriores, é uma enzima intracelular envolvida nos processos celulares de síntese energética, atuando na cadeia de transporte de elétrons <sup>9</sup>, refletindo assim a atividade oxidativa da biomassa microbiana. Por permanecer ativa apenas em células viáveis <sup>35</sup>, serve como indicadora de atividade microbiana <sup>23</sup> e é considerada como sensível indicadora de qualidade de solo, além de ser proposta como biomarcador para indicar mudanças na atividade microbiana total causada pelo manejo do solo <sup>28</sup>.

**Tabela 1.** Principais enzimas do solo e os ciclos biogeoquímicos que estão inseridas. Adaptado de Araújo e Monteiro <sup>7</sup>.

<b>Atividade indicadora</b>	<b>Enzimas do solo</b>	<b>Reação enzimática</b>
Atividade microbiana	Desidrogenase	Sistema de transporte de elétrons.
Ciclagem de carbono	$\beta$ -glucosidase, Celulase, Amilase, Lipase, Fenoxidase	Hidrólise da celobiose, celulose, ácidos graxos.
Ciclagem de nitrogênio	Urease, Amidase, Asparaginase, Glutaminase, Protease, Nucleotidase, Deaminase	Hidrólise da uréia, mineralização do nitrogênio.
Ciclagem do fósforo	Fosfatase Pirofosfatase Fitase	Liberação de $PO_4^{-3}$ pela hidrólise de ésteres e anidros fosfatados.
Ciclagem de enxofre	Arisulfatase	Liberação de $SO_4^{-2}$
Atividade enzimática	FDA	Hidrólise

Pascual et al. <sup>28</sup> avaliaram atividade da desidrogenase em solos intensamente cultivados e abandonados há diferentes períodos. As maiores atividades foram encontradas em solos abandonados há maior tempo, comparadas às encontradas em solos abandonados há menos de 10 anos. A menor atividade nas áreas abandonadas há menos tempo foi atribuída à sua maior degradação, decorrente da erosão propiciada pela falta de cobertura vegetal, incapaz de se restabelecer num solo intensamente degradado. Lizarazo et al. <sup>23</sup> observaram que a adição de húmus

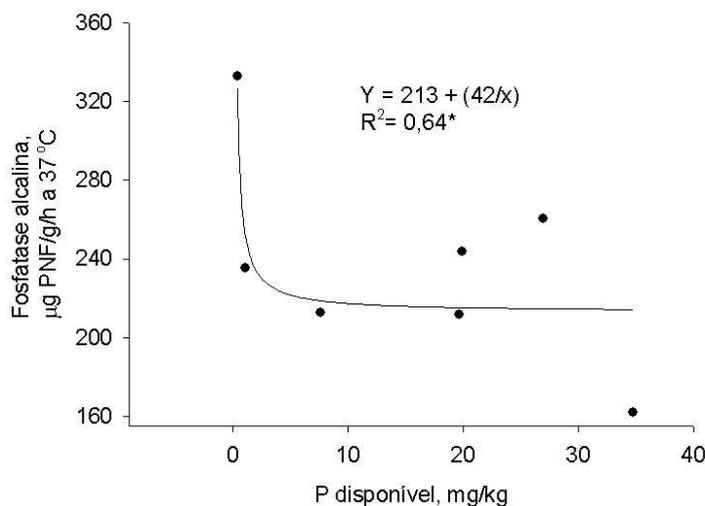
ao solo aumentou a atividade da desidrogenase pelo estímulo à comunidade microbiana. Por sua vez, Riffaldi et al. <sup>30</sup> observaram diminuição na atividade de desidrogenase em solos cultivados intensamente, em comparação com área de pasto não degradado. Bastida et al. <sup>9</sup> avaliaram a atividade microbiológica em solos desflorestados e constataram um efeito negativo na atividade da desidrogenase no solo cuja vegetação nativa tinha sido removida há 15 anos em relação ao solo que teve mantida a sua vegetação natural.

Doyle et al. <sup>15</sup>, em experimento utilizando duas fontes de celulose, verificaram que a concentração da enzima excretada variava tanto com a época do ano quanto com a qualidade da fonte de celulose. Isso indica que a atividade dessa enzima depende da qualidade do substrato sobre o qual atua. Dessa forma, diferentes coberturas vegetais, com resíduos qualitativamente distintos (e.g., relação C/N, teor de celulose, teor de lignina, presença de resinas, monoterpenos, taninos, etc.), podem influenciar distintamente na atividade de celulases no solo.

Acosta-Martínez et al. <sup>1</sup> encontraram menor atividade de enzimas relacionadas ao ciclo do carbono em área agrícola em relação à área de pasto. Já Nayak et al. <sup>26</sup> encontraram alterações nos valores das enzimas desidrogenase, urease e celulase em função de adubações em plantações de arroz, sendo as maiores atividades enzimáticas encontradas nos tratamentos adubados, possivelmente devido ao estímulo que a adubação pode causar à atividade microbiana.

A atividade da fosfatase alcalina avaliada por Riffaldi et al. <sup>30</sup> foi menor nas áreas de plantio convencional e com adição de fertilizantes, mostrando que solos menos perturbados possuíam maior atividade enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos por Knob et al. <sup>19</sup> os quais observaram uma relação inversa entre atividade da fosfatase alcalina e teor de fósforo disponível no solo (Figura 6).

Estes estudos e muitos outros têm demonstrado que a interferência do homem no ambiente causa alterações nas características biológicas e bioquímicas do solo, que por sua vez podem ser utilizadas como indicadores na avaliação dos efeitos na ciclagem de carbono e nutrientes.



**Figura 6.** Relação entre atividade de fosfatase alcalina e disponibilidade de P no solo. Os maiores teores de P são encontrados em solo agrícola, enquanto que os menores são encontrados em solo sob vegetação nativa <sup>19</sup>.

## 6. Potencial de uso de bioindicadores na avaliação da ação antrópica no ambiente

Atualmente, os efeitos da ação do homem no ambiente têm recebido especial atenção vista a degradação por ela causada. Uma floresta nativa madura em um ecossistema é considerada auto-sustentável e geralmente se encontra em equilíbrio. Com a retirada da cobertura vegetal nativa, este equilíbrio é perturbado e alguns processos microbianos relacionados ao fluxo de nutrientes podem ser afetados <sup>18,22</sup>. A cobertura vegetal original contribui para manter uma comunidade biológica estável no solo, além de fornecer carbono e energia através dos exsudatos das raízes e restos vegetais <sup>28</sup>. A sua retirada pelo desmatamento resulta em maior flutuação de temperatura do solo, erosão eólica e hídrica, ressecamento, compactação, dentre outros fatores que alteram o teor de matéria orgânica do solo e a atividade microbiana.

Para avaliar os efeitos da ação humana sobre os componentes biológicos nesses ambientes, várias estratégias têm sido adotadas, dentre elas o uso de índices de qualidade de solo baseados em indicadores biológicos <sup>36</sup>. Uma das finalidades destes indicadores é de identificar melhores estratégias de manejo e uso do solo, importantes principalmente em áreas tropicais, onde as taxas de desmatamento são alarmantes, a fertilidade natural do solo é menor, com maior susceptibilidade à degradação <sup>33</sup>.

O principal desafio na interpretação dos índices biológicos e bioquímicos de qualidade de solo é saber os seus significados, visto que não existem parâmetros previamente estabelecidos. Uma alternativa seria a comparação dos índices e/ou valores com aqueles obtidos de áreas adotadas como referência. Uma floresta nativa madura é considerada um sistema em equilíbrio e auto-sustentável, onde a ciclagem do carbono e dos nutrientes encontra-se num estado de equilíbrio, que poderia ser adotado como referência. Dentre os indicadores de qualidade do solo, destacam-se os baseados em processos microbiológicos, densidade de grupos funcionais de microrganismos, biomassa e diversidade microbianas, atividades enzimáticas, ferramentas úteis na determinação da resposta de um ambiente a um determinado manejo ou estratégia de uso do solo <sup>27</sup>.

Diversos trabalhos têm utilizado as propriedades biológicas e bioquímicas do solo como maneira de avaliar o impacto da atividade humana no solo. Dinesh et al.<sup>14</sup>, analisaram florestas decíduas, semi-perenes e plantações de *Pterocarpus dalbergioides* e *Tectona grandis*, duas espécies arbóreas comerciais, obtendo maiores valores de atividade microbiana nas áreas naturais, o que foi atribuído à maior quantidade de matéria orgânica disponível. Bastida et al. <sup>9</sup> avaliaram atividade microbiológica em solos 15 anos após seu desmatamento, verificando que houve efeitos negativos na qualidade do solo, o que foi mostrado pela diminuição dos teores de matéria orgânica e atividade microbiana em relação à área natural. Velasquez et al. <sup>36</sup> estabeleceram índices de qualidade de solo em oito diferentes manejos e verificaram que a plantação de café apresentou os melhores índices, enquanto que a floresta secundária apresentou piores. Isso foi atribuído ao fato de que o solo sob floresta secundária havia sido muito degradado previamente pelo uso intensivo, prejudicando a sua recuperação. Entretanto, a plantação de café teria recebido manejo adequado, o que favoreceu a melhora da qualidade do solo.

Solos submetidos a intenso cultivo apresentaram baixa capacidade de restabelecimento da vegetação, sendo assim considerados degradados. Caso não sejam adotadas estratégias para sua recuperação, a degradação desses solos poderá ser ainda mais intensa, como por exemplo, a ocorrência de processos erosivos mais intensos, agravados pela dificuldade do restabelecimento da cobertura vegetal natural <sup>28</sup>. Entretanto, deve se levar em consideração que a avaliação da recuperação de solo degradado por meio da porcentagem de cobertura vegetal, diversidade florística e fauna silvestre, não refletem a condição microbiológica e a funcionalidade dos solos em recuperação e evidenciam a grande

discrepância existente entre atributos microbiológicos e bioquímicos das áreas em recuperação em relação àquelas consideradas naturais <sup>32</sup>.

## 7. Conclusões

Como pôde ser visto, as ações antrópicas podem causar impacto na comunidade de microrganismos do solo o que por sua vez pode comprometer a sustentabilidade dos ecossistemas. O entendimento de como a ação humana interfere nos microrganismos do solo e nos processos por eles realizados pode auxiliar na adoção de estratégias menos agressivas de uso do solo, bem como aquelas destinadas à recuperação de áreas degradadas, recuperando assim sua fertilidade e suas propriedades físico-químicas, tornando a atividade humana menos impactante ao ambiente. Em suma, avaliações realizadas com base nos bioindicadores microbiológicos e bioquímicos têm potencial para avaliar o impacto que a atividade antrópica pode causar à funcionalidade de um determinado ambiente e com isso adotar medidas para mitigar o impacto ou implementar medidas de recuperação.

## 8. Referências

1. ACOSTA-MARTÍNEZ V., CRUZ L., SOTOMAYOR-RAMÍREZ D., PÉREZ-ALEGRÍA L. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. **Applied Soil Ecology**, v.35, p.35-45, 2007.
2. AMADOR J.A., GLUKSMAN A.M., LYONS J.B., GORRES J.H. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. **Soil Science**, v.162, p.808-825, 1997.
3. ANDERSON T.H., DOMSCH K.H. The metabolic quotient form CO<sub>2</sub> (*q*CO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.393-395, 1993.
4. ANDERSSON M., KJØLLER A., STRUWE S. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1527-1537, 2004.
5. ANDRADE G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: VARMA A., ABBOTT L., WERNER, D., HAMPP, R. (Eds.), **Plant Surface Microbiology**. Springer-Verlag, Berlin, p.51-69, 2004.
6. ANDRADE G., NOGUEIRA M.A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental. **Biociência & Desenvolvimento**, n.34, p.11-19, 2005.
7. ARAÚJO A.S.F., MONTEIRO R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do Solo. **Bioscience Journal**, v.23, p.66-75, 2007.
8. BADIANE N.N.Y., CHOTTE J.L., PATE E., MASSE D., ROULAND C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.229-238, 2001.
9. BASTIDA F., MORENO J.L., HERNÁNDEZ T., GARCÍA C. Microbiological activity in a soil 15 years after its revegetation. **Soil Biology and Biochemistry**. v.38, p.2503-2507, 2006.
10. BOUWMAN A.F., FUNG I., MATTHEWS E., JOHN J. Global analysis of the potential for N<sub>2</sub>O production in natural soils. **Global Biogeochemical Cycles**, v.7, p.557-597, 1993.
11. CHEN G., ZHU H., ZHANG Y. Soil activities and carbon and nitrogen fixation. **Research in Microbiology**, v.154, p.393-398, 2003.

12. CRUTZEN P.J. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: Delwiche, C.C. (ed.). **Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide**. New York, John Wiley. p.17-44, 1981.
13. DENG S.P., TABATABAI M.A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.141-146, 1997.
14. DINESH R., GHOSHAL CHAUDHURI S., GANESHAMURTHY A.N., CHANCHAL D. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation en wet tropical forests. **Applied Soil Ecology**, v.24, p.12-26, 2003.
15. DOYLE J., PAVEL R., BARNES G., STEINBERGER Y. Cellulase dynamics in a desert soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.371-376, 2006.
16. HARRIS J.A. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.801-808, 2003.
17. INSAM H. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.525-532, 1990.
18. IZQUIERDO I., CARAVACA F.C., ALGUACIL M.M., HERNÁNDEZ G., ROLDÁN A. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration alter revegetation of a mining area under subtropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v.30, p.3-10, 2005.
19. KNOB A., NOGUEIRA M.A., LOVATO G.M., LIMA D.S., SCOARIS D., PINTO F.G.S, CAMARGO F.R.S., BATISTA J.S.S., MIYAUCHI M.Y.H., ANDRADE G Propriedades microbiológicas e bioquímicas em solos submetidos a diferentes sistemas de uso. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos, 2005.
20. KENNEDY A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.65-76, 1999.
21. LEMENITH M., KARLTUN E., OLSSON M. Assessing soil chemical and physical property responses to deforestation and subsequent cultivation in small holders farming system in Ethiopia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.105, p.373-386, 2005.
22. LI Q., ALLEN H.L., II A.G.W. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forrest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.571-579, 2004.
23. LIZARAZO L.M., JORDÁ J.D., JUAREZ M. Effect of humic amendments on inorganic N, dehydrogenase and alkaline phosphatase activities of a mediterranean soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.172-177, 2005.
24. MATSUMOTO L.S., MARTINES A.M., AVANZI M.A., ALBINO U.B., BRASIL C.B., SARIDAKIS D.P., RAMPAZO L.G.L., ZANGARO W., ANDRADE G. Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. **Applied Soil Ecology**, v.28, p.57-65, 2005.
25. NADEAU J.A., QUALLS R.G., NOWAK R.S., BLANK R.R. The potential bioavailability of organic C, N, and P through enzyme hydrolysis in soils of the Mojave Desert. **Biogeochemistry**, v.82, p.305-320, 2007.
26. NAYAK D.R., BABU Y.J., ADHYA T.K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeric Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1897-1906, 2007.
27. NOGUEIRA M.A., ALBINO U.B., BRANDÃO-JÚNIOR O., BRAUN G., CRUZ M.F., DIAS B.A., DUARTE R.T.D., GIOPPO N.M.R., MENNA P., ORLANDI J.M., RAIMAN M.P., RAMPAZO L.G.L., SANTOS M.A., SILVA M.E.Z., VIEIRA F.P., TOREZAN J.M.D., HUNGRIA M., ANDRADE G. Promissing indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brasil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.115, p.237-247, 2006.
28. PASCUAL J.A., GARCIA G., HERNANDEZ T., MORENO J.L., ROS M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1877-1883, 2000.
29. PERRY D.A., AMARANTHUS M.P., BORCHERS J.G., BORCHERS S.L., BRAINERD R.E. Bootstrapping in ecosystems. **BioScience**, v.39, n.4, p.230-237, 1989.
30. RIFFALDI R., SAVIOZZI A., LEVI-MINZI R., CARDELLI R. Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. **Soil and Tillage Research**, v.67, p.109-114, 2002.
31. RUTIGLIANO F.A., D'ASCOLI R., VIRZO DE SANTO A. Soil metabolism and nutrient status in Mediterranean area as affected by plant cover. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.1719-1729, 2004.
32. SILVEIRA R.B., MELLONI R., PEREIRA E.G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v.2, p.21-29, 2004.
33. SPACCINI R., ZENA A., IGWE C.A., MBAGWU J.S.C., PICCOLO A. Carbohydrates in water-stable aggregates and particle size fractions of forested and cultivated soils in two contrasting tropical ecosystems. **Biogeochemistry**, v.22, p.1-22, 2001.
34. TORSVIK V., ØVREÅS L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.240-245, 2002.

35. TRIPATHI S., CHAKRABORTY A., CHAKRABARTI K., BANDYOPADHYAY B.K. Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.2840-2848, 2007.
36. VELASQUEZ E., LAVELLE P., ANDRADE M. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.3066-3080, 2007.
37. WALLENSTEIN M.D., MYROLD D.D., FIRESTONEAND M., VOYTEK M. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. **Ecological Applications**, v.16, p.2143-2152, 2006.
38. WEAVER R.W., AUGLE S., BOTTOMLY P.J., BEZDICEK D., SMITH S., TABATABAI A., WOLLUM A. Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. **Soil Science Society of America**, v.25, p.775-833, 1994.
39. WILLIAMS E.J., HUTCHINSON G.L., FEHSENFELD F.C. NO<sub>x</sub> and N<sub>2</sub>O Emissions from soil. **Global Biogeochemical Cycles**, v.6, p.351-388, 1992.