

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Michele Cristine Ribeiro De Freitas

**Aspectos biológicos da interação Bactéria-droga-Hospedeiro em
modelo de Infecção por *Bacteroides fragilis* e tratamento com
metronidazol em concentração subinibitória**

Juiz de Fora
2015

MICHELE CRISTINE RIBEIRO DE FREITAS

Aspectos biológicos da interação Bactéria-droga-Hospedeiro em modelo de Infecção por *Bacteroides fragilis* e tratamento com metronidazol em concentração subinibitória

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientação:

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (orientador)

Dra. Alessandra Barbosa Ferreira-Machado (co-orientadora)

Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva (co-orientadora)

Juiz de Fora
2015

MICHELE CRISTINE RIBEIRO DE FREITAS

Aspectos biológicos da interação Bactéria-droga-Hospedeiro em modelo de Infecção por *Bacteroides fragilis* e tratamento com metronidazol em concentração subinibitória

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

_____ em: 10/04/2015

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dra. Juliana Alves Resende
FAMINAS

Prof. Dra. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora
2015

*As pessoas essenciais em minha vida,
Leandro, Geovanna e Isabella*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora pela acolhida.

Ao Professor Dr. Cláudio Galuppo Diniz, pela orientação, paciência, oportunidade, ensinamento, pela amizade e confiança – Muito obrigada!

À Professora Dra. Vânia Lúcia da Silva, pela orientação, por todos os ensinamentos, pela amizade e carinho – Muito obrigada!

À Dra. Alessandra pela enorme contribuição neste projeto, pelos ensinamentos, pela amizade, pelos conselhos nas horas difíceis, enfim por tudo! – Muito obrigada!

À Professora Dra. Alice pelo excelente trabalho, pela compreensão, dedicação e pela enorme contribuição em nosso projeto.

À Professora Dra. Patrícia Elaine muito obrigada pela colaboração, ensinamentos, pelo tempo dedicado aos nossos experimentos e análises.

Ao ICB pelo suporte na utilização dos laboratórios necessários em nosso projeto.

Ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia pela acolhida, compreensão, ensinamentos e incentivo acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por todo o aprendizado concedido nestes anos.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Aline, Betânia, Luzia, Márcio, Rosângela, Francis e Ana Carolina pelos conselhos, ensinamentos e bons momentos vividos...

A todos os professores que colaboraram de alguma forma, - Jacy e Dionéia – Obrigada!

Ao Laboratório - Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia pela acolhida e ensinamentos. Obrigada Professora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Aos pos-doc e amigos do Laboratório Juliana e Thiago pelo suporte, ajuda e conhecimento, Obrigada!

Às microamigas, Ale, Carol, Claudinha, Laura, Ju e Aline pela contribuição e também pelos conselhos, as conversas em momentos difíceis, e é claro aos muitos momentos de alegria que passamos juntas!

Às amigas Marjorie, Dani, Thaís e Vanessa pelas conversas, conselhos e pelos bons momentos juntas!

Aos colegas e amigos que me ajudaram no início do projeto, de alguma forma contribuindo para que o nosso modelo fosse implantado, obrigada Job, Pedro, Thiago e Nayana! Aos alunos de iniciação científica que fizeram parte desta equipe: Juliana, Lílian, Ariana, Douglas, Karine, Angélica e Fábio, sem vocês seria muito difícil tudo acontecer! Obrigada!

A todos os ICs que trabalharam aos sábados, domingos enfim todos os dias que precisamos de ajuda... Pedro, Susan, Marina, Márcia, Patrícia, Anselmo, Aline, Guilherme, Fábio e Priscila.

À minha família pelo apoio, incentivo e compreensão pelos momentos de ausência. Peço desculpas

DESENVOLVIMENTO

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

COLABORAÇÃO

Profa. Dra. Jacy Gameiro
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – ICB/UFJF

Profa. Dra. Alice Belleigoli Rezende
Departamento de Morfologia – ICB/UFJF

Profa. Dra. Patrícia Elaine de Almeida
Departamento de Biologia – ICB/UFJF

Profa. Dra. Marisa Fabiana Nicolás
Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ

Laboratório Côrtes Vilella
Medicina Laboratorial, Juiz de Fora, MG

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

RESUMO

Bastonetes Gram negativos anaeróbicos da espécie *Bacteroides fragilis* são membros da microbiota residente intestinal, e frequentemente associados a infecções endógenas. Para o tratamento destas infecções, o metronidazol persiste como um dos principais fármacos disponíveis. Como outros microrganismos, *B. fragilis* são susceptíveis a perturbações ecológicas, muitas vezes resultantes de concentrações subinibitórias de antimicrobianos, que podem desencadear alterações na biologia bacteriana com reflexo no seu potencial agressor. Considerando-se que, geralmente, os estudos de interação droga-bactéria utilizam ensaios *in vitro*, permanecem, assim, questionamentos sobre a real extensão do fenômeno considerando-se uma situação real de infecção e exposição a antimicrobianos em concentração subinibitória. Neste sentido, foi proposto o estudo de um modelo experimental de interação droga-bactéria-hospedeiro. Ratos Wistar foram submetidos à laparotomia para inserção de um corpo de prova na cavidade peritoneal, e posterior desafio percutâneo com *B. fragilis* ATCC 43859. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle negativo (CN) (n=18) sem inoculação bacteriana, apenas com o veículo; grupo controle positivo (CP) (n=30) animais infectados com a linhagem bacteriana parental; grupo experimental (GE) (n=24) animais infectados com a linhagem bacteriana parental, tratados com concentração subinibitória de metronidazol (1µg/mL - via percutânea) por um período de oito dias em intervalos de 48 horas. Foram avaliados em dois momentos durante o processo infeccioso: Após 8 dias o tratamento com o MTZ e 8 dias após o término do tratamento (16 dias). Experimentos com cultura bacteriana *in vitro* foram realizados considerando-se o mesmo desenho experimental para comparação. A dinâmica da colonização microbiana nos corpos de prova foi avaliada por cultura microbiana, PCR simples, PCR quantitativo e coloração de Gram. No hospedeiro, foram avaliados parâmetros histológicos e imunológicos, pela avaliação transcricional da expressão de citocinas. Características morfo-fisiológicas, bioquímicas e moleculares de bactérias selecionadas *in vivo* e *in vitro* foram avaliadas, ainda, pela coloração de Gram, Kit API20, formação de biofilme experimental, tolerância ao estresse oxidativo (H₂O₂), e genotipagem por AP-PCR. Os resultados mostram que a infecção *in vivo* por *Bacteroides fragilis* se manteve como monoinfecção durante todo o período experimental avaliado, com viabilidade bacteriana mesmo após tratamento com concentração subinibitória de metronidazol. Análise histológica do tecido formado no corpo de prova mostrou um infiltrado inflamatório exacerbado após os 8 dias de tratamento em ambos os grupos infectados. No entanto, após 16 dias o infiltrado inflamatório diminuiu no GE. Os níveis de expressão de citocinas mostraram-se alterados quando os grupos infectados foram comparados, principalmente relacionados aos níveis de IL-10. Embora alterações no perfil bioquímico bacteriano não tenham sido observadas, morfologia aberrante, aumento na formação de biofilme e diminuição da sensibilidade ao estresse oxidativo foram observadas nas linhagens selecionadas *in vitro*. Polimorfismo genético não foi detectado por AP-PCR. Nossos resultados sugerem que metronidazol em baixas concentrações interfere na relação bactéria-hospedeiro, o que pode ter implicações no processo infeccioso, sem, no entanto, resultar em alterações evidentes nas células bacterianas, como observado *in vitro*. Percebe-se, assim, a complexidade das interações droga-bactéria-hospedeiro em situação real de infecção e suas implicações na biologia microbiana e na patogênese.

ABSTRACT

Bacteroides fragilis, a member of the resident intestinal microbiota is the most important pathogen associated to endogenous infections. Meanwhile, metronidazole persists as the main drug available for treating these diseases. As other resident microorganisms, these bacteria are exposed to ecological disturbances, often resulting from subinhibitory concentrations of antimicrobial agents that can trigger changes in microbial biology and which may affect potential aggressor. Considering that the studies of drug-bacteria interactions usually uses *in vitro* assays, questions about the true extension of the phenomenon in a real situation of microbial infection and exposure to antimicrobials in subinhibitory concentrations remains. Thus, for a better understanding of drug-bacteria-host relationship in real situation of infection, an *in vivo* model of interaction has been proposed. Wistar rats were subjected to laparotomy to insert a perforated table tennis ball into the peritoneal cavity, followed by percutaneous challenge with *B. fragilis* ATCC 43859. The animals were divided into three experimental groups: negative control (NC) (n = 18) animals without bacterial inoculation using the vehicle only; positive control (PC) (n = 30) animals infected with the parental bacterial strain; experimental group (EG) (n = 24) animals infected with the parental bacterial strain, treated with subinhibitory concentration of metronidazole (1µg/mL percutaneous) for a period of eight days in 48 hour intervals. To evaluate the impact of metronidazole in the bacteria-host relationship the experimental infections were evaluated two times during the infectious process; first, 8 days after the treatment with MTZ and 8 days after the end of the treatment (16 days). The dynamics of the microbial colonization into the tissue cage was evaluated by conventional PCR, real time PCR and Gram stain. In the host, histological and transcriptional analysis of cytokine expression was performed. Morpho-physiological, biochemical and molecular characteristics of bacteria selected *in vivo* and *in vitro* were evaluated by Gram stain, kit API20, experimental biofilm formation, tolerance to oxidative stress (H₂O₂), and genotyping by AP-PCR. The results show that *in vivo* infection by *Bacteroides fragilis* remained as monoinfection throughout the experimental period with bacterial viability even after the treatment with sub inhibitory concentration of metronidazole. Histological analysis of the tissue formed into the tissue cage showed exacerbated inflammatory infiltrate after 8 days of treatment in both infected groups. However, after 16 days the inflammatory infiltrate decreased in the EG group. Increased cytokine expression was observed when infected groups were compared, mainly related to interleukin 10. Although changes in the bacterial biochemical profile were not observed, aberrant morphology, increased biofilm formation and decreased sensitivity to oxidative stress were observed in the *in vitro* selected strains. Genetic polymorphism was not detected by AP-PCR. Our results suggest that low concentrations of metronidazole interfere in the bacteria-host relationship, which could have implications in the infection process even without showing obvious alterations in the bacterial cells as demonstrated *in vitro*. Therefore, the complexity of drug-bacteria-host interactions in real infection situations and its consequences in microbial biology and pathogenesis is clear.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Desenho experimental envolvendo as etapas *in vivo* e as etapas comparativas *in vitro*40

Esquema 2. Protocolo experimental para a realização e acompanhamento da infecção experimental em ratos Wistar e tratamento com concentração subinibitória de metronidazol41

Quadro 1. Designação das linhagens de *Bacteroides fragilis* utilizadas neste estudo.....43

Figura 1. Modelo experimental de infecção. Técnica cirúrgica utilizada para introduzir os corpos de prova na cavidade peritoneal dos animais. A e B - incisão, C – Corpo de prova perfurado estéril implantado na cavidade peritoneal de ratos. D - sutura cirúrgica após a implantação do corpo de prova.....59

Figura 2. Fotografia representativa do corpo de prova após 21 dias da implantação (A e B); imagem representativa da coleta de exsudado (C).....60

Figura 3. A) Fotomicrografia de esfregaço a partir do exsudato presente no interior do corpo de prova corado pelo método de Gram. Aumento 1000 x. B) Eletroforegrama representativo da avaliação dos produtos formados a partir do PCR direcionado para amplificação de fragmento do gene *bft*, após eletroforese em gel de agarose. M – padrão de peso molecular, 1 - ETBF, 2 - BfMTZa+, 3 - BfMTZa+, 4 - BfMTZa-, 5 - BfMTZa-, 6 - BfCTa+, 7 - BfCTa+, 8 - BfCTa-, 9 - BfCTa-, 10 - CN, 11 - branco. Tamanho do fragmento esperado, 294 pb.....61

Figura 4. Quantificação da carga bacteriana presente no exsudato do corpo de prova, por PCR quantitativo e plaqueamento. 8 dias: após tratamento com MTZ; 16 dias: após tratamento com MTZ e 8 dias adicionais sem tratamento. CP: Controle positivo; GE: Grupo Experimental. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas abordagens experimentais em um mesmo momento ($p < 0,05$).....63

Figura 5: Análise histológica do corpo de prova após tratamento com concentração subinibitória de metronidazol (8 dias) e 8 dias consecutivos sem metronidazol (16

dias). A - CN – controle negativo (8 dias); B - CN - controle negativo (16 dias); C - CP - controle positivo (8 dias); D - CP - controle positivo (16 dias); E - GE - grupo experimental (8 dias); F - GE - grupo experimental (16 dias). Aumento 400x.....64

Figura 6. Avaliação da ocorrência de células bacterianas internalizadas em leucócitos após permeabilização e cultivo do sobrenadante do lisado celular. A e B: fotomicrografia representativa de leucócitos corados com May-Grünwald-Giemsa – grupo controle negativo e controle positivo, respectivamente. C e D: fotografia de placas de ágar BHI representativas da cultura de sobrenadante dos lisados celulares - grupos controle negativo e controle positivo, respectivamente. As setas brancas evidenciam leucócitos com células bacterianas internalizadas.....66

Figura 7. Contagem do número de células bacterianas viáveis após a lise dos leucócitos, ao longo do tempo nos animais desafiados com *B. fragilis* após tratamento ou não com metronidazol. CP – grupo controle positivo. GE – grupo experimental com oito dias de tratamento com metronidazol e mais 8 dias sem tratamento com a droga. 8 dias: após tratamento com MTZ; 16 dias: após tratamento com MTZ e 8 dias adicionais sem tratamento ($p < 0,05$).....67

Figura 8. Avaliação dos parâmetros sanguíneos em modelo de infecção circunscrita com *Bacteroides fragilis*. A - Leucócitos. B – neutrófilos. Após tratamento com metronidazol (8 dias) e 8 dias consecutivos sem metronidazol (16 dias). CP - controle positivo; GE - grupo experimental; CN - controle negativo. a e A indica estatisticamente diferente ($p < 0.05$).....68

Figura 9. Níveis de expressão de citocinas, 8 dias após o tratamento concentração subinibitória de metronidazol (8 dias) e os 8 dias consecutivos sem metronidazol (16 dias) a partir de exsudados de ratos infectados. CP - Controle positivo; GE - Grupo Experimental. a, b e c indica estatisticamente diferente ($p < 0.05$).....70

Figura 10. A – Fotomicrografias representativas do aspecto de células de *Bacteroides fragilis* após crescimento *in vivo* em corpos de prova implantados na cavidade peritoneal de ratos Wistar, e cultivados em caldo BHI, expostos ou não a concentração subinibitória de metronidazol ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Linhagens *in vivo*: BfCTa+ (A), BfCTa- (C), BfMTZa+ (E), BfMTZa- (G); Linhagens *in vitro*: BfCT+ (B), BfCT- (D), BfMTZ+ (F), BfMTZ- (H). Aumento 1000x.....72

Figura 11. Efeito de concentração subinibitória de metronidazol na formação de biofilme de *Bacteroides fragilis*. A - Experimento *in vivo*; B – Experimento *in vitro*. * indica estatisticamente significativo ($p < 0.05$).....74

Figura 12: Efeito da concentração subinibitória de metronidazol na tolerância ao estresse oxidativo de *Bacteroides fragilis*. A - Experimento *in vivo*; B – Experimento *in vitro*. * indica estatisticamente significativo ($p < 0.05$).....75

Figura 13. Perfil de bandejamento por AP-PCR das linhagens selecionadas. A – Perfil de bandejamento formado pela utilização do oligoiniciador OPA18. B – Perfil de bandejamento formado pela utilização do oligoiniciador OPA16. PM (padrão de peso molecular); 1 - ETBF; 2 - BfMTZ + ; 3 - BfMTZ- ; 4 e 5 - BfMTZa + ; 6 e 7 - BfCTa+; 8 e 9 - BfMTZa - ; BfCTa-; 10 e 11 - BfCTa-; 12 – Branco.....78

Figura 14. Fotomicrografias representativas dos três tratamentos diferentes avaliados neste estudo para aumentar o rendimento das células procarióticas após a técnica de FISH: centrifugação (A), sonicação (B), ambos centrifugação e sonicação (C). Ampliação original, 1000x.....79

Figura 15. Eletroferograma representativo da avaliação da integridade de amostras de RNA extraídas em experimentos *in vivo* (A) e *in vitro* (B) através de eletroforese em chip de microfluidos.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores *forward* e *reverse* referente aos genes avaliados, tamanho do produto gerado.....52

Tabela 2. Características bioquímicas da linhagem parental *Bacteroides fragilis* ATCC 43859 (ETBF) e linhagens selecionadas após exposição a concentrações subinibitórias.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ARA – “ L-arabinose” – L-arabinose

ATCC – “American Type Culture Collection” – Coleção de cultura tipo Americana.

ATP – “Adenosine triphosphate” – Trifosfato de adenosina

ETBF – “Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*” *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico

BHI-S – “ Brain Heart Infusion agar – Supplement ” – Agar infusão de cérebro e coração suplementado

BFT – “*Bacteroides fragilis* Toxin” – Toxina *Bacteroides fragilis*

CEL - “D-cellobiose” – D-celobiose

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CO₂ – Gás carbônico

CSI - concentrações subinibitórias

DNA - “deoxyribonucleic acid” - Ácido Desoxirribonucléico

ESC - “esculin” - esculina;

GALT – “Gut-Associated Lymphoid Tissue” (Tecido Linfóide Associado ao Intestino)

GEL – “gelatina” - gelatina;

GLU – “D-glucose” – D-glucose;

GLY - “glycerol” - glicerol;

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HE – Hematoxilina - Eosina

HPRT – “Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase” - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

IL-1b – Interleucina - 1b

IL-6 – Interleucina - 6

IL-8 – Interleucina - 8

IL-10 – Interleucina – 10

IL-17 – Interleucina – 17

IFN- γ – Interferon - gama

IND - “indole” - indol;

LAC - “D-lactose” – D-lactose

LPS – Lipopolissacarídeo

MAL – “D-maltose” – D-maltose

MAN - D-mannitol – D-manitol

MCP-1 – “Monocyte chemoattractant protein-1” proteína quimiotática de monócitos-1

MLZ – “ D-melezitose” - D-melezitose

MNE – “ D-mannose” – D-manose

MTZ - Metronidazol

N₂ – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

Pb – Pares de base

PBPs – “Protein binding penicilina” - proteínas ligadoras de penicilina (PBPs)

PCR – “Polimerase chain reaction”- Reação em Cadeia da Polimerase

PRR – “Pattern recognition receptor” - receptores de reconhecimento padrão

PSA - Polissacarídeo A

RAF – “D-raffinose” D-rafinose

RHA – “L-rhamnose” - L-ramnose;

RIN - “RNA Integrity Number” - Número de Integridade do RNA

RNA – “ribonucleic acid” - Ácido ribonucléico

SAL – “salicin” - salicina

SOR – “D-sorbitol” - D-sorbitol

TBE – Tris Borato EDTA

TER – “D-trehalose” - D-trehalose

TGF- β – “Transforming Growth Factor-Beta”- Fator de Transformação do Crescimento - Beta

TNF- α – “Tumoral necrosis factor – alpha” – Fator de necrose tumoral - alpha

URE – “urease” - urease

XYL – “D xylose” - D xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 MICROBIOTA RESIDENTE INTESTINAL	20
2.2 <i>Bacteroides fragilis</i>	22
2.3 VIRULÊNCIA DE <i>Bacteroides fragilis</i> E PATOGÊNESE	24
2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA Á COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>B. fragilis</i>	26
2.5 ANTIBIOTICOTERAPIA E <i>Bacteroides fragilis</i>	28
2.6 METRONIDAZOL	30
2.7 INTERAÇÕES ANTIMICROBIANO-BACTÉRIA	33
2.8 MODELO CIRCUNSCRITO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	40
4.1.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	44
4.2 AVALIAÇÃO DO STATUS MONOMICROBIANO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL	45
4.3 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA.....	46
4.3.1 QUANTIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO	46
4.3.2 QUANTIFICAÇÃO POR PLAQUEAMENTO.....	47
4.4 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO E RESPOSTA DO HOSPEDEIRO	47
4.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DOS CORPOS DE PROVA.....	48
4.4.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM LEUCÓCITOS	48
4.4.3 HEMOGRAMA.....	49
4.4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS	49
4.5 AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS.....	53
4.5.1 MORFOLOGIA CELULAR	53
4.5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	53

4.5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO	54
4.5.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	55
4.6 GENOTIPAGEM BACTERIANA AP-PCR.....	55
4.7 OBTENÇÃO DE RNA PARA ESTUDOS DE TRANSCRIPTÔMICA.....	56
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 MODELO EXPERIMENTAL E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA	59
5.2 INTERFERÊNCIA DO METRONIDAZOL NA INTERAÇÃO BACTÉRIA- HOSPEDEIRO	63
5.2.1 HISTOLOGIA E INTERAÇÃO BACTERIANA	63
5.2.2 PARÂMETROS SANGUÍNEOS	67
5.2.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EXPRESSAS	69
5.3 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA, PADRÕES BIOQUÍMICOS E FISIOLOGIA BACTERIANA.....	71
5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS	77
5.5 OBTENÇÃO DE RNA PROCARIOTO PARA ESTUDOS DE ANÁLISE TRANSCRICIONAL.....	79
6 DISCUSSÃO	81
6.1 MODELO EXPERIMENTAL E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA	81
6.2 INTERFERÊNCIA DO METRONIDAZOL NA INTERAÇÃO BACTÉRIA- HOSPEDEIRO	84
6.3 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA, PADRÕES BIOQUÍMICOS E FISIOLOGIA BACTERIANA.....	88
6.4 ESTABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	92
6.5 ISOLAMENTO DO RNA PROCARIOTO NO EXSUDATO.....	93
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	96
8 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICES	115
ANEXO	152

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos são colonizados por microrganismos denominados microbiota residente que compõem ecossistemas complexos. Estes microrganismos apresentam funções importantes na manutenção da saúde do hospedeiro, como modulação do sistema imunológico, atuação como barreira na instalação de microrganismos patogênicos, além da produção de substâncias utilizadas pelo hospedeiro e detoxificação do organismo.

Entre os microrganismos da microbiota residente, destacam-se representantes do gênero *Bacteroides*, bastonetes Gram negativos pleomórficos, anaeróbios, que normalmente colonizam as porções distais do trato gastrointestinal. Entretanto, estes microrganismos podem comportar-se como patógenos oportunistas, sendo *B. fragilis* a principal espécie do gênero relacionada à etiologia de infecções anaeróbicas polimicrobianas na cavidade abdominal, podendo ainda estar relacionadas a infecções com a formação de abscessos em outras partes do corpo.

Um dos fatores que associam a participação de *B. fragilis* em infecções que envolvem anaeróbios é a presença de determinantes de virulência, como o polissacarídeo capsular que está diretamente associado à formação de abscessos, e a produção de enzimas hidrolíticas e ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, linhagens de *B. fragilis* que secretam uma enterotoxina de 20 kDa denominada fragilisina têm sido associadas à doença diarreica aguda, principalmente em crianças, além de doenças inflamatórias intestinais e, mais recentemente, na etiologia multifatorial do câncer colorretal.

Para o tratamento de infecções causadas por *B. fragilis* são frequentemente prescritos antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos (com ou sem inibidores de β -lactamases), lincosamidas (clindamicina) e nitroimidazóis, sendo metronidazol considerado uma droga de reserva. O grupo das quinolonas (fluoroquinolonas) tem sido utilizado no tratamento de infecções anaeróbias ou mistas, muitas vezes em combinação com clindamicina e metronidazol.

Embora a microbiota residente seja relativamente estável, está sujeita a perturbação pelo uso de antimicrobianos. Além da exposição a drogas direcionadas para o tratamento de infeções potencialmente relacionadas a esses microrganismos no trato gastrointestinal ou em outros sítios anatômicos, é aceito que quantidades residuais ou subinibitórias de antimicrobianos sistêmicos têm capacidade de interferir com o balanço ecológico do intestino.

O contato dos microrganismos com concentrações subinibitórias de drogas tem sido apontado como uma das consequências associadas ao uso não racional de antimicrobianos, podendo interferir na biologia e fisiologia dos microrganismos, com potencial reflexo na sua capacidade de agressão e no diagnóstico microbiológico. Entretanto, os avanços científicos nesta área do conhecimento tem se baseado em modelos *in vitro* de seleção microbiana e posteriores desafios em diferentes formas de infecção experimental.

Assim, dando continuidade à linha de pesquisa “Alterações fisiológicas e moleculares induzidas por adversidades ambientais em bactérias com reflexo no potencial agressor microbiano” em desenvolvimento no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF, foi proposta a utilização de um modelo de infecção experimental circunscrita, para avaliação *in vivo* de aspectos da relação Metronidazol-*Bacteroides*-hospedeiro, gerando de informação científica que poderá contribuir na elucidação dos impactos da antibioticoterapia na evolução das doenças infecciosas, em situação real de infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA RESIDENTE INTESTINAL

Todos os animais tornam-se colonizados desde o momento do nascimento e, tanto o homem como outros seres vivos, albergam uma variedade de espécies bacterianas (ROSEBURY, 1962; SALYERS, 1984; REID, 2004). Estes microrganismos são encontrados com regularidade numa determinada área, em uma determinada condição fisiológica, com diversificada capacidade metabólica, que inclui a sensibilidade ao oxigênio e outros fatores que permitem sua colonização em sítios específicos (ROSEBURY, 1962; HENTGES, 1993).

O trato gastrointestinal abriga o mais complexo ecossistema do corpo humano com cerca de 10^{14} bactérias, sendo o cólon um dos locais mais densamente colonizados. Sendo assim, os mamíferos são considerados “organismos complexos”, em que grande parte dos genes relacionados ao seu metabolismo está no intestino (JARCHUM E PAMER, 2011). Os microrganismos que habitam o intestino dos mamíferos mantêm uma relação simbiótica com seu hospedeiro e compõem a microbiota residente intestinal, dominada por quatro filos (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*), responsáveis por diversas funções (JARCHUM E PAMER, 2011; KINROSS, DARZI E NICHOLSON, 2011).

As bactérias anaeróbias representam um grupo ecologicamente significativo da microbiota intestinal, principalmente por apresentarem versatilidade metabólica, utilizando vários tipos de nutrientes como fonte de energia, permitindo, assim, a sua sobrevivência e coexistência. No trato gastrointestinal, estes microrganismos chegam a atingir, especialmente no cólon, a proporção de 1000 anaeróbios para cada aeróbio (FINEGOLD, 1995).

Espécies de *Clostridium* e *B. fragilis* são os principais contribuintes para a homeostase imunológica no intestino. No entanto, quando ocorre algum desequilíbrio ou perturbação que comprometa as defesas naturais do hospedeiro,

infecções graves podem acontecer, caracterizando assim, o caráter anfibiótico da microbiota residente (ROSEBURY, 1962; HENTGES, 1993; JARCHUM E PAMER, 2011).

Os microrganismos auxiliam na produção de enzimas responsáveis pela degradação de nutrientes complexos em troca de um ambiente com fluxo constante de substâncias necessárias para sua sobrevivência. Além disso, exercem um papel na síntese de produtos utilizados pelo hospedeiro, como as vitaminas, e ocupam sítios que poderiam ser utilizados por microrganismos patogênicos, desempenhando um papel crítico na prevenção de infecções. Assim, as bactérias são essenciais na promoção e preservação da saúde humana (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

O intestino é um sítio primário de colonização e diretamente ligado ao desenvolvimento do sistema imune, principalmente dos tecidos linfóides associados ao trato gastrintestinal (SHARMA, YOUNG e NEU et al., 2010). Além do desenvolvimento do sistema imune, a microbiota intestinal tem mostrado uma ligação importante com o desenvolvimento cerebral. Pesquisas futuras servirão para elucidar a conexão entre microbiota, sistema imune e nervoso, e poderão contribuir para o tratamento de diversos problemas neurocomportamentais (DOUGLAS-ESCOBAR, ELLIOTT e NEU, 2013).

Diversos estudos têm abordado questões referentes à saúde do hospedeiro à composição e atividade da microbiota intestinal, mostrando sua influência na expressão de genes, cujos produtos influenciam o funcionamento do organismo. Além de a doença inflamatória intestinal e a síndrome do cólon irritável estarem associadas à microbiota, doenças como diabetes tipo II, obesidade, esquizofrenia e autismo têm sido associadas à sua composição e diversidade (DUNCAN et al., 2008; FINEGOLD, 2008; FINEGOLD et al., 2010; ÖHMAN e SIMRÉN, 2010; KHOR, GARDET e XAVIER, 2011; KINROSS, DARZI E NICHOLSON, 2011; NEMANI et al., 2015).

Os ácidos graxos de cadeia curta, produzidos por microrganismos anaeróbios presentes na microbiota intestinal, tais como butirato e ácido propiônico, têm sido associados a doenças como autismo e diabetes. Muitos pacientes com autismo têm uma história de exposição prévia aos antimicrobianos ou de hospitalização, sintomas gastrintestinais, compulsões alimentares anormais e populações bacterianas

intestinais únicas, que têm sido associadas com os vários sintomas (FINEGOLD et al., 2010; TILG e MOSCHEN, 2014)

Variações funcionais podem acontecer devido à alteração na composição da microbiota por extinção ou aumento da população de determinados grupos frente a interferências ambientais, tais como alteração na dieta ou a utilização de antimicrobianos. O crescimento demasiado de determinado microrganismo em detrimento de outros pode favorecer, por exemplo, a produção de substâncias tóxicas, que podem ocasionar doenças (FINEGOLD, 2008; NEMANI et al., 2015).

Assim, com o avanço das metodologias independentes de cultura, uma vez que o método tradicional de cultura de microrganismos permite a recuperação de somente 20 a 30% da diversidade da microbiota intestinal, a correlação entre doença e microbiota torna-se mais precisa e fornece perspectivas para novas estratégias terapêuticas (FINEGOLD et al., 2010; MACCAFERRI, BIAGI e BRIGIDI, 2011).

2.2 *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis são bactérias Gram negativas, anaeróbias estritas, não formadoras de esporos, bile resistentes e membros da microbiota residente. A espécie *B. fragilis* foi descrita como *Bacillus fragilis* em 1898 por Veillon e Zuber e em 1919, foi renomeada *Bacteroides fragilis* por Castellani e Chalmers. Na década de 70, havia uma subclassificação para esta espécie em várias subespécies, até que análises fisiológicas revelaram considerável heterogeneidade com relação às suas propriedades bioquímicas, indicando que essas bactérias não representavam um verdadeiro grupo filogenético (CATO e JOHNSON, 1976).

Até o início dos anos 2000, dez espécies filogeneticamente relacionadas do gênero *Bacteroides* eram agrupadas no chamado grupo *Bacteroides fragilis*, sendo a espécie tipo o *B. fragilis*, dada a sua importância clínica e microbiológica. Entretanto, este grupo está constantemente sofrendo mudanças, seja com a inclusão ou

exclusão de espécies, principalmente com o avanço das técnicas independentes de cultura (LIU et al., 2003, SEARS, 2012).

Com a análise do rDNA 16S das espécies *B. goldsteinii*, *B. distasonis* e *B. merdae*, foi proposto um novo gênero, o *Parabacteroides*, para o agrupamento dessas espécies (SAKAMOTO e BENNO, 2006). Segundo Sears (2012), é preferível, quando possível, referenciar as espécies individualmente, uma vez que o termo “grupo *Bacteroides fragilis*” é menos informativo, pela quantidade de mudanças entre as classificações de espécies que surgem através de técnicas de sequenciamento.

Considerando os microrganismos anaeróbios, estas alterações são de importância tanto para os médicos como para microbiologistas clínicos, uma vez que a correta localização taxonômica é uma ferramenta útil, que pode indicar o potencial de virulência ou resistência a antimicrobianos de uma amostra clínica (WEXLER, 2007).

O ambiente intestinal contenha uma ampla diversidade de nutrientes, o que favorece o grupo *B. fragilis* cujos requerimentos nutricionais são complexos, pois crescem em meio contendo carboidratos, hemina, amônia, vitamina B12, sais inorgânicos, agentes redutores, peptonas e outros intermediários metabólicos (SALYERS, 1984; WEXLER, 2007). Seu metabolismo é quimioheterotrófico e sacarolítico, sendo os principais produtos de fermentação o acetato, succinato, propionato e lactato. Nos sítios de infecção, *B. fragilis* pode utilizar glicoproteínas e glicolípideos da superfície celular como fonte de nutrientes, além de açúcares simples, como galactose e manose (SALYERS, 1984; WEXLER, 2007).

Bacteroides podem ser transmitidos de mãe para filho durante o parto vaginal e, assim, tornar-se parte da microbiota humana nas primeiras fases da vida. As bactérias mantêm um relacionamento complexo e, geralmente, benéfico com o hospedeiro quando retidos no intestino. Entretanto, quando escapam do sítio, seja por ruptura da parede intestinal, por trauma ou cirurgia, comportam-se como microrganismos patogênicos (REID, 2004; WEXLER, 2007).

Bacteroides fragilis destaca-se entre as bactérias de espécimes clínicos, sendo o anaeróbio mais comumente encontrado em infecções mono e polimicrobianas, embora não seja a espécie anaeróbia mais prevalente no trato

intestinal. Isto tem sido correlacionado ao seu potencial agressor, embora estes fatores ainda não estejam esclarecidos (GIBSON et al., 1998; LOBO et al., 2013).

Bacteroides fragilis possui como característica importante a aerotolerância, fundamental para a colonização em alguns sítios mais oxigenados do corpo humano, e capacidade de consumir oxigênio quando presente em concentrações nanomolares, beneficiando-se deste gás nestas concentrações, o que o faz ser considerado por alguns autores como nanaeróbios. Entretanto, ainda não se sabe o quanto de oxigênio pode ser utilizado para o seu crescimento. Assim, estes microrganismos podem sobreviver e proliferar em tecidos mais oxigenados, antes mesmo que um abscesso anaeróbio seja formado (BAUGHN e MALAMY, 2004).

2.3 VIRULÊNCIA DE *Bacteroides fragilis* E PATOGÊNESE

O sucesso de colonização é altamente dependente da forma como a bactéria interage com seu hospedeiro. Quando ocorre o escape do microrganismo do intestino, geralmente como resultado de doenças induzidas por perturbações da mucosa intestinal ou processos cirúrgicos, alterações patológicas significativas podem ocorrer, incluindo formação de abscessos, em locais como cavidade abdominal, cérebro, fígado, pelve e pulmões (PUMBWE et al., 2007; WEXLER, 2007).

A persistência de *B. fragilis* nos sítios de infecção tem sido relacionada à presença de fímbrias, adesinas e cápsula, sendo a cápsula frequentemente associada à formação de abscessos, que podem levar a complicações, como formação de fístulas e bacteremia (KATO et al., 1996; GIBSON et al., 1998).

B. fragilis pode produzir, pelo menos, oito polissacarídeos capsulares estruturalmente distintos (PSA a PSH), dos quais o polissacarídeo A (PSA) é o mais expresso (KRINOS et al., 2001). Além disso, os polissacarídeos contribuem para a virulência através de outros mecanismos, incluindo a atividade antifagocitária, modulação imunológica e produção de biofilme. Um biofilme é uma comunidade

estruturada de células bacterianas envoltas em uma matriz polimérica aderente a uma superfície inerte ou biológica. Nesta situação, os microrganismos se mostram altamente resistentes aos antimicrobianos e ao sistema imune, fator fundamental para a colonização e sobrevivência nas diversas superfícies (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999; COMSTOCK e KASPER, 2006; PUMBWE et al., 2007).

O alto potencial de colonização e, por vezes, conseqüente patogenicidade de *B. fragilis* está também relacionado à alta tolerância a bile, uma vez que os sais biliares têm uma atividade detergente, o que pode permeabilizar as membranas bacterianas e pode, eventualmente, levar ao colapso da membrana e dano celular. Por isso, a tolerância aos sais biliares é importante para a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro (PUMBWE et al., 2007).

Acredita-se que esta tolerância à bile esteja relacionada com a co-agregação destas bactérias e sua aderência às paredes intestinais para a formação do biofilme. Fisiologicamente, as fímbrias e aglutininas de *B. fragilis* funcionam como adesinas, como em outras bactérias, permitindo-lhes o estabelecimento nos tecidos do hospedeiro. Vários estudos *in vivo* mostraram que 99,9% das espécies bacterianas, incluindo *B. fragilis*, podem naturalmente colonizar superfícies, formando biofilmes (PUMBWE et al., 2007; PUMBWE, SKILBECK e WEXLER, 2008).

Adicionalmente, *B. fragilis* é altamente resistente ao estresse oxidativo, o que é fundamental para o início do processo infeccioso, principalmente para adaptação em sítios extras intestinais (TALLY et al., 1975). Acredita-se que, para algumas bactérias anaeróbias, a presença de concentrações basais de superóxido dismutase e catalase desempenhe um papel fundamental, atuando de forma a eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROCHA et al., 1996).

Enzimas extracelulares têm sido relatadas em linhagens de *B. fragilis*, como DNAses, sulfatases, hemolisinas, neuraminidases, lipases e hialuronidases, capazes de promover hidrólise no tecido dos hospedeiros, sendo os seus produtos muitas vezes aproveitados para a nutrição bacteriana, evasão do sistema imune e disseminação (RUDEK e HAQUE, 1976; LOBO et al., 2013).

Outra enzima relacionada à virulência de algumas linhagens da espécie é a enterotoxina produzida por *B. fragilis*, conhecida como fragilisina, relacionada a

inflamação e diarreia, pois atua na barreira intercelular por degradação proteica, favorecendo o dano tecidual e acúmulo de fluidos (SEARS, 2009).

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *B. fragilis*

Bacteroides fragilis são membros da microbiota residente e, como outros microrganismos, fornecem benefícios ao hospedeiro, como nutrientes, modulação do sistema imune e barreira de proteção. *B. fragilis*, por intermédio do polissacarídeo A (PSA), uma molécula imunomoduladora que medeia a resposta dependente das células T do sistema imunológico através das mesmas vias utilizadas por antígenos proteicos, ativa a interleucina 10 (IL-10), uma das citocinas anti-inflamatórias mais potentes no sistema imune. A IL-10 desempenha um papel crítico na proteção contra a inflamação em vários modelos animais (WEXLER, 2007; COHEN-PARADOSU et al., 2011). O polissacarídeo A existente em *Bacteroides* pode levar também à formação de abscessos. Portanto, o PSA pode tanto ter efeito benéfico quanto maléfico, dependendo, principalmente, da localização do microrganismo (WEXLER, 2007).

Os benefícios da colonização bacteriana no intestino dos mamíferos se estendem também a sítios extra-intestinais, atuando de forma sistêmica, na regulação imunológica. As células epiteliais são capazes de reconhecer o microambiente intestinal por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que incluem os receptores toll-like (TLRs). Esses PRRs reconhecem fatores presentes nas bactérias, tais como o lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, flagelina e uma série de outros componentes específicos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a discriminação entre as bactérias residentes e patogênicas pelas células epiteliais intestinais, incluindo a distribuição seletiva de receptores TLRs. Desta forma, o reconhecimento de bactérias pelas células intestinais epiteliais ocorre, sendo essencial para a homeostase intestinal (ARTIS, 2008).

Defeitos na barreira epitelial podem permitir que o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) seja exposto a uma variedade de antígenos nocivos do lúmen intestinal, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e interleucina-6 (IL-6), podendo gerar inflamação da mucosa e causar doença (SHIH e TARGAN, 2008).

As citocinas são proteínas produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam as reações imunes e inflamatórias, além de favorecer a comunicação entre leucócitos e entre leucócitos e outras células (KANNOURAKIS E ABBAS, 1994).

TNF- α é considerado o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas, tendo como importante papel ativar neutrófilos e monócitos para os locais infectados. Além disso, induz apoptose em alguns tipos celulares (MATHISON, WOLFSON e ULEVITCH, 1988).

Existem evidências de que a produção de TNF- α por macrófagos tem um importante papel na formação de abscessos (GIBSON et al., 1998). Além disso, estudos mostraram o envolvimento de células T CD4 na formação de abscesso associada à sepse intra-abdominal por um mecanismo dependente de IL-17 (CHUNG et al., 2003).

Outra citocina é a IL-6, sintetizada por fagócitos mononucleares e células do endotélio vascular, em resposta aos microrganismos. É uma citocina pleiotrópica, comumente produzida no nível local no tecido e liberada na circulação em quase todas as situações de perturbação homeostática, incluindo endotoxemia, trauma e infecções agudas. Esta citocina possui diferentes funções. Na imunidade inata, está diretamente relacionada à produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Já na imunidade adaptativa, está ligada ao crescimento de linfócitos B que se diferenciaram em produtores de anticorpos (HEINRICH, CASTELL e ANDUS, 1990).

Além da formação de abscessos, *B. fragilis* enterotoxigênico está associado a processos infecciosos e inflamatórios intestinais, nas quais a participação de IL-8 tem sido relatada juntamente com TGF- β , em linhagens de células epiteliais intestinais (SANFILLIPO et al., 2000; WU et al., 2004).

IL-8 é um potente quimioatraente de neutrófilos, e sua expressão tem sido relacionada à toxina BFT, sendo considerada dose dependente. Estudos têm mostrado que a expressão de BFT induz a produção de interleucina-8 (IL-8) no

epitélio intestinal humano, enquanto que a TGF- β tem sido relacionada a mecanismos de reparo dos tecidos danificados. Existe uma associação significativa entre a presença do gene *bft* em amostras de fezes de pacientes com a doença inflamatória intestinal e a síntese aumentada de IL-8, na mucosa de pacientes com colite ulcerativa e Doença de Crohn. Estes dados sugerem que a colonização com *B. fragilis* enterotoxigênico pode promover inflamação intestinal aguda ou crônica em seres humanos (SANFILLIPO et al., 2000; BANKS et al., 2003; WU et al., 2004).

2.5 ANTIBIOTICOTERAPIA E *Bacteroides fragilis*

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

Para o tratamento de infecções causadas por *B. fragilis*, geralmente, são prescritos β -lactâmicos, muitas vezes associados a inibidores de β -lactamase (ampicilina), lincosamidas (clindamicina) e nitroimidazóis (metronidazol). Devido à resistência de *B. fragilis* à ampicilina e a penicilina pela produção de β -lactamases, recomenda-se o uso de inibidores destas enzimas, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam, para o tratamento dessas infecções (NWAOKORIE, OGUNSOLA e COKER, 2010).

Fluoroquinolonas podem ser também utilizadas em combinação com clindamicina e metronidazol. Além disso, o tratamento empírico com cefoxitina e piperacilina também é indicado, embora casos de resistência na América do Norte e do Sul, Europa, África do Sul e Ásia já tenham sido relatados (CANIGIA et al., 2007).

Uma das drogas de escolha para o tratamento de infecções que envolvem *B. fragilis* é o metronidazol, que é considerado uma droga com boa relação custo-benefício, devido ao seu baixo custo, boa atividade contra bactérias anaeróbias patogênicas, além de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas favoráveis. Metronidazol ainda é a droga de escolha utilizada na terapia de infecções por microrganismos anaeróbios (TALLY, 1978; LÖFMARK, EDLUND e NORD, 2010).

Testes de susceptibilidade a drogas de amostras clínicas anaeróbias muitas vezes não são obrigatórios na prática clínica, e os tratamentos são empiricamente estabelecidos. Assim, estudos de susceptibilidade a drogas são importantes para direcionar a terapêutica adequada (SCHUETZ, 2014). No Brasil, existem poucos estudos do monitoramento de resistência de bactérias anaeróbias e isto é uma preocupação, diante da resistência e possível disseminação de genes.

Os antimicrobianos têm reduzido a mortalidade, mas não a persistência de doenças infecciosas. Com o uso abusivo e às vezes indiscriminado, as drogas antimicrobianas induzem aparecimento e acúmulo de linhagens bacterianas resistentes. Isto se deve aos novos mecanismos de adaptação bacteriana e transmissão dessa resistência para as novas gerações (BOHNEN, 1998; MINDLIN et al., 2006; NWAOKORIE, OGUNSOLA e COKER, 2010).

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

2.6 METRONIDAZOL

O metronidazol é um antimicrobiano do grupo dos nitroimidazóis, não ionizado em pH fisiológico, solúvel em água a 20°C até 1% p/v, e rapidamente difundido em membranas celulares. Foi descoberto no final dos anos 50, na França, quando pesquisadores tentavam sintetizar um composto derivado da azomicina, que apresentava notável atividade contra *Trichomonas vaginalis*, sendo introduzido na quimioterapia em 1960, como agente antimicrobiano sistêmico (FREEMAN, KLUTMAN e LAMP, 1997).

O metronidazol é reconhecidamente eficaz no tratamento de infecções envolvendo protozoários como *Trichomonas*, *Giardia* e *Entamoeba*, dentre outros, e recomendado para o tratamento de infecções polimicrobianas ou não, como profilaxia contra a infecção anaeróbia do intestino após cirurgia, como agente terapêutico único ou associado, em processos nos quais bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Actinobacillus*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Leptotrichia* e *Treponema* estejam envolvidas. É, ainda, prescrito em associação com drogas antifúngicas para o tratamento de micoses. Além disso, é considerado antimicrobiano de escolha em infecções nas quais o grupo *B. fragilis* esteja envolvido (FREEMAN, KLUTMAN e LAMP, 1997; MENDZ e MÉRGRAUD, 2002; VOORSPOELS et al., 2002).

O grupo nitro do metronidazol é facilmente reduzido por células e extratos celulares de microrganismos anaeróbios sensíveis. Os elétrons necessários para a redução têm origem metabólica, sendo que uma supressão do metabolismo resulta em diminuição da atividade do metronidazol. Os doadores de elétrons são proteínas transportadoras de elétrons de baixo potencial redox, flavodoxina e ferredoxina, que recebem elétrons do complexo piruvato-ferredoxina oxirredutase (RASMUSSEN, BUSH e TALLY, 1997).

Embora outras enzimas e componentes de transferência de elétrons possam funcionar como doadores de elétrons, nos anaeróbios, a redução ocorre pelo complexo piruvato-ferredoxina-oxirredutase. Neste evento, os nitroimidazóis agem captando elétrons das ferredoxinas reduzidas, os quais normalmente seriam dados

aos íons hidrogênio para formar o gás hidrogênio. Entretanto, esta interrupção no fluxo normal de elétrons não é um evento letal ao metabolismo celular (CASTELLI et al., 1997).

Em estudos de redução eletrolítica *in vitro* foi verificado que o metronidazol, na sua forma reduzida, diminui a viscosidade das moléculas de DNA, inibe sua renaturação e causa um aumento de oligonucleotídeos, produzidos pela ação de DNAses. Estes resultados indicam que formas reduzidas do metronidazol induzem a degradação de fitas de DNA e uma diminuição concomitante da sua função, pela presença de bases alteradas ou um complexo formado pela interação da droga com as bases, devido à reação de oxidação entre o grupo nitro reduzido e a molécula de DNA (DINIZ et al., 2000a).

O metronidazol entra na célula como um pró-fármaco por difusão passiva, e é ativado no citoplasma da bactéria, enquanto que as células resistentes a este antimicrobiano são deficientes na ativação da droga. Em células aeróbias, a entrada da droga é observada até se estabelecer um equilíbrio entre a concentração intra e extracelular e, em meio onde a concentração de droga é menor extracelularmente, a droga sai livremente e inalterada das células. No caso das células anaeróbias, a redução da droga e a liberação dos produtos finais inativos favorecem o gradiente de concentração transmembrana (RASMUSSEN, BUSH e TALLY, 1997; LÖFMARK, EDLUND e NORD, 2010).

Linhagens resistentes ao metronidazol mostraram uma diminuição da atividade da piruvato-ferredoxina-oxireductase, sugerindo que o mecanismo de resistência seria devido a esta redução da atividade enzimática. Como esta enzima é indispensável para a geração de ATPs nas reações fosforoclásticas, dependentes de ferredoxina em anaeróbios, o crescimento destes microrganismos na presença da droga sem esta enzima sugere outro processo de obtenção de energia, como a fermentação. A atividade aumentada da enzima lactato-desidrogenase nas células resistentes poderia ser compensadora para a diminuição ou ausência de atividade da piruvato-ferredoxina-oxireductase, em resposta à pressão do metronidazol no meio (DINIZ et al., 2004).

Mecanismos alternativos de resistência aos nitroimidazóis podem estar associados a plasmídeos conjugativos ou a genes cromossomais. Breuil et al. (1989) descreveram um plasmídeo de 7.7 kb (pIP417) responsável pela resistência aos

nitroimidazóis, e que poderia ser transferido por conjugação. Nestes genomas, destacam-se a ocorrência de genes de resistência específicos aos nitroimidazóis, chamados de genes *nim*. Estes genes codificam a enzima nitroreductase, que converte nitroimidazóis em um composto inócuo às células microbianas, evitando a formação dos radicais tóxicos, que são essenciais para sua ação antimicrobiana. Tem sido discutido, mais recentemente, o real envolvimento dos genes *nim* e a resistência ao metronidazol, visto que existem trabalhos que não mostraram correlação entre a expressão de genes *nim* e a resistência ao metronidazol, sugerindo que estudos adicionais são necessários para elucidação do seu real envolvimento no fenômeno (LEITSCH et al., 2014).

Outros mecanismos de resistência incluem efluxo ativo, inativação da droga, e aumento no reparo de danos ao DNA. A mutação em uma proteína de transporte de ferro, *feoAB*, tem sido sugerida como responsável pelo aumento da resistência ao metronidazol (LÖFMARK, EDLUND e NORD, 2010; STEFFENS et al., 2010; VEERANAGOUDA et al., 2014). Os níveis de resistência bacteriana ao metronidazol têm permanecido baixos. Entretanto, uma tendência ao aumento dessa resistência ocorre, principalmente, pela ampla utilização desta droga em outras infecções, como as que envolvem *Clostridium difficile* e *Helicobacter pylori* (JOHNSON et al., 2014; NISHIZAWA et al., 2015).

Alterações na composição bacteriana da microbiota, bem como a seleção de linhagens resistentes têm sido associadas com a administração de metronidazol, sozinho ou em combinação com outros agentes. O impacto do metronidazol na microbiota residente varia, dependendo do sítio e da via de administração; altas concentrações são encontradas na saliva, enquanto nas fezes a concentração é menor (ADAMSSON et al., 1999; LÖFMARK, EDLUND e NORD, 2010).

2.7 INTERAÇÕES ANTIMICROBIANO-BACTÉRIA

Os antimicrobianos têm sido empregados com sucesso no tratamento de doenças infecciosas desde a década de 50. Estudos têm abordado ao longo do tempo várias características importantes destas substâncias, como modo de ação, farmacologia, dosagem, efeitos colaterais, e, também os efeitos causados aos microrganismos com a utilização das drogas em baixas ou altas concentrações (DAVIES, SPIEGELMAN e YIM, 2006).

Observa-se a necessidade de conhecimento sobre as alterações dirigidas por estes agentes antimicrobianos em populações de microrganismos e sua interação com o ambiente. Esta preocupação se evidencia à medida que as drogas são utilizadas, seja por uso abusivo, imperícia ou mesmo durante o tratamento ou pós tratamento, na medicina humana e veterinária, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (ASM, 2000; WITTE, 2000; O'BRIEN, 2002; LIVERMORE, 2003).

De maneira geral, há vários anos muitos autores vêm observando que bactérias Gram positivas e Gram negativas expostas a baixas concentrações de antimicrobianos apresentavam alterações morfológicas, resultando em células alongadas e filamentosas. Além disso, outros aspectos também já foram observados, como mudanças ultraestruturais e alterações na capacidade de adesão. Sabe-se que baixas concentrações de antimicrobianos provocam considerável ativação na transcrição, e estudos revelaram que as alterações no perfil de expressão induzidas por diferentes antibióticos são muito diversas, e essas mudanças podem ser detectadas em genes não relacionados à função alvo (DAVIES, SPIEGELMAN e YIM, 2006; SILVESTRO et al., 2006).

Alterações morfológicas têm sido descritas desde 1948, quando Tulasne e Vendrely relataram a observação de formas aberrantes de *Staphylococcus aureus* na presença de penicilina. Desde então, vários estudos têm mostrado sob alterações morfológicas, moleculares, fisiológicas e no perfil de virulência frente a várias condições de estresse (LORIAN e GEMMEL, 1994; DINIZ et al., 2000b; CHEN et al., 2005; SILVESTRO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007; DE CASTRO VELOSO et al., 2013; HUA et al., 2014; FREITAS et al., 2015).

Lorian e Atkinson (1978) também relataram alterações em células de *S. aureus* expostas a diferentes concentrações de penicilina. A clindamicina pode exercer influência positiva na adesão de *Streptococcus pyogenes* às células epiteliais, em cultura (BEACHEY, EISENSTEIN e OFEK, 1982). O ácido nalidíxico pode estimular a adesão de células de *E. coli* a linhagens de células intestinais, *in vitro* (VOSBECK et al., 1982). Os beta-lactâmicos vancomicina e gentamicina podem estimular a produção de hemolisinas por *Streptococcus pneumoniae* (LORIAN, WALUSCHKA e KIM, 1982) e *S. aureus* pode produzir penicilinases, após exposição à eritromicina, à clindamicina e à pristinomicina (LORIAN, 1971; MICHEL, STESSMAN e STESSMAN, 1980; STESSMAN e MICHEL, 1983).

Já foi demonstrado, também, que diferentes agentes antimicrobianos podem favorecer a adesão e a produção de enzimas e exotoxinas em diferentes grupos microbianos, cocos ou bastonetes, Gram-positivo ou Gram negativo. β -lactâmicos podem estimular a interação entre *S. aureus* e a fibronectina do hospedeiro, favorecendo sua adesão (PROCTOR et al., 1983).

Células de *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*, expostas a diferentes concentrações de tetraciclina e lincomicina, produziram altos níveis de enterotoxinas (GEMMELL, 1988; LEVNER, WEINER e RUBIN, 1977; SCHLIEVERT e KELLY, 1984; YOH et al., 1983). A penicilina em diferentes concentrações é capaz de interferir na atividade de neuroaminidases de *B. fragilis* (FERREIRA, DOMINGUES e UZEDA, 1989).

Estudos têm relatado a formação de filamentos em células de *E. coli* expostas à ampicilina e mezlocilina, e o alongamento de *Pseudomonas aeruginosa*, após exposição à azlocilina e cefsulodina (LORIAN e GEMMEL, 1994).

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

Fang et al. (2002) analisaram os efeitos da cefoxitina em concentrações sub-inibitórias (CSI) sobre a morfologia da espécie *Bacteroides thetaiotaomicron*, e observaram filamentação e a presença de vesículas nessas espécies. Ainda

segundo esses autores, os padrões de crescimento e as alterações morfológicas induzidas pela cefoxitina em *B. thetaiotaomicron* estariam associadas com as propriedades das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs).

A filamentação da espécie *Burkholderia pseudomallei* foi observada quando as células foram expostas a CSI de ceftazidima, ofloxacina e trimetoprim. Entretanto, quando o agente de pressão foi retirado, a morfologia foi revertida. Além disso, constatou-se que as bactérias filamentosas eram menos virulentas, por apresentarem motilidade diminuída quando comparadas às não filamentosas, e que esta característica era recuperada quando o agente antimicrobiano era retirado (CHEN et al., 2005).

Em outro estudo, clindamicina em CSI provocou o alongamento celular, em *Bacteroides fragilis*, além da formação de vesículas extracelulares; desta forma, áreas limpas dentro do citoplasma foram observadas, sugerindo degradação citoplasmática (SILVESTRO et al., 2006).

Na presença de diferentes antimicrobianos em CSI, a espécie *Clostridium difficile* modulou a transcrição dos genes das toxinas A e B e estas foram liberadas mais precocemente do que nas células controle, sem adição de antimicrobianos (GERBER et al., 2008).

A utilização de CSI de antimicrobianos também afetou a expressão de genes envolvidos no estresse e na virulência de *Listeria monocytogenes*, mas não afetou a propriedade invasiva das células *in vitro* (KNUDSEN, HOLCH e GRAM, 2012).

Em estudos anteriores do nosso grupo, Souza Filho et al. (2012) observaram filamentações na morfologia de *Fusobacterium nucleatum* após exposição à drogas em CSI, principalmente β -lactâmicos, enquanto que alterações no perfil proteico e polimorfismos no DNA foram detectados com todas as drogas antimicrobianas testadas, dentre elas o metronidazol e o cloranfenicol. Além disso, também em nosso grupo, Freitas et al. (2015) observaram alterações na morfologia e nos padrões bioquímico-fisiológicos em *B. fragilis* quando expostos principalmente a CSI de ampicilina e ampicilina sulbactam.

Diante dos dados então disponíveis, Gerber et al. (2008) questionaram e sugeriram que as alterações encontradas *in vitro* não poderiam ser consideradas em estudos *in vivo*. Por outro lado, acredita-se que a exposição a antimicrobianos acima

da concentração inibitória mínima (CIM) será sempre seguido por CSIs e, desta forma, o estudo em modelos experimentais seria o ideal para melhores inferências.

2.8 MODELO CIRCUNSCRITO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Modelos de infecção experimental têm sido propostos para estudos de microrganismos de interesse clínico. Entretanto, o controle sobre as condições e permanência nos sítios estudados é complexo; assim, modelos circunscritos são necessários para tais avaliações (O'KEEFE et al., 1979; MYERS et al., 1984; LOBO et al., 2013).

Corpos de prova implantados via subcutânea e na cavidade retroperitoneal foram utilizadas pela primeira vez por Guyton (1963) para estudar a fisiologia do líquido intersticial e sua composição. Esses corpos de prova consistem em dispositivos ocos perfurados que, após a implantação no hospedeiro, geralmente em cobaias, tornam-se rodeados e parcialmente preenchidos por tecido de granulação altamente vascularizado. O restante do corpo de prova torna-se preenchido com um líquido semelhante ao fluido intersticial. Vários modelos de corpos de provas perfurados podem ser implantados em regiões diferentes do organismo, como tecidos subcutâneos, região escrotal e região peritoneal (GUYTON, 1963; XUAN et al., 2001; BAMBERGER et al., 2002; CUI et al., 2006).

Este modelo tem sido utilizado para avaliação de parâmetros clínicos, principalmente para estudos de farmacocinética e farmacodinâmica. GREKO et al. (2003) estabeleceram que a injeção da dose do medicamento nos corpos de prova deve ser feita diretamente, por via subcutânea. Além disso, o modelo tem a vantagem de permitir uma amostragem repetida, permitindo, assim, a medição do tempo da concentração da droga no local de infecção e do efeito antibacteriano, na presença de células de defesa do hospedeiro. Entretanto, a principal limitação do modelo seria a presença de um corpo estranho, onde, possivelmente, as bactérias

formariam biofilme (BAMBERGER et al., 2002; KADURUGAMUWA et al., 2003; CUI et al., 2006).

Uma variedade de espécies animais, como ratos, coelhos, cachorros, cavalos e camundongos pode ser utilizada para este tipo de estudo. Além disso, a composição do corpo de prova também é variável, sendo o mais utilizado as bolas de tênis de mesa (O'KEEFE et al., 1979; XUAN et al., 2001; BAMBERGER et al., 2002; CUI et al., 2006).

O'keefe et al. (1979) utilizaram bolas de tênis de mesa perfuradas como corpos de provas, que foram inseridas na cavidade peritoneal de coelhos para o cultivo de *B. fragilis* e avaliação do tratamento com cefalotina e cefoxitina. Lobo et al. (2013) utilizaram o modelo para estudo da expressão de hemolisinas por linhagens de *B. fragilis* em infecção extra intestinal, utilizando bolas de tênis de mesa.

Modelos de infecção experimental têm sido propostos para o estudo da resposta *in vivo* a determinadas condições, pois se mostram adequados para o cultivo de bactérias de interesse clínico (O'KEEFE et al., 1978; O'KEEFE e t al., 1979; XUAN et al., 2001; BAMBERGER et al., 2002; CUI et al., 2006).

Diante dos achados dos experimentos *in vitro* com o *B. fragilis*, que revelam fenômenos relevantes na biologia dessa bactéria em resposta à presença de antimicrobianos, principalmente em CSI, é de extrema importância que se estabeleça uma situação real de infecção para o tratamento com antimicrobiano em CSI, o que permitirá avanço no conhecimento e na interpretação destes fenômenos, tendo em vista sua interferência nas relações bactéria-hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar, *in vivo*, a interferência de antimicrobiano em concentração subinibitória na relação bactéria-hospedeiro, em modelo de infecção circunscrita por *Bacteroides fragilis*.

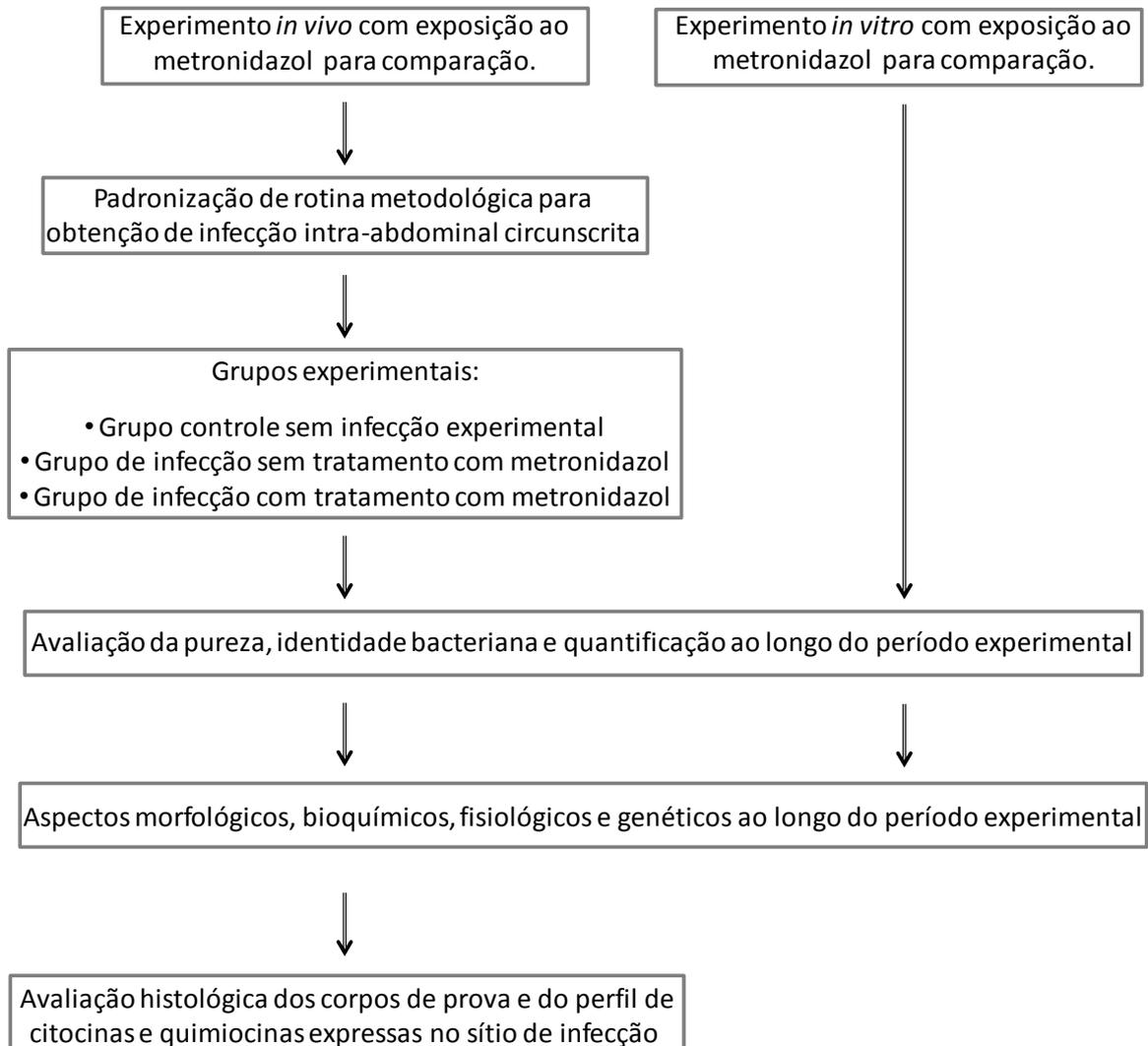
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar rotina metodológica para obtenção de infecção intra-abdominal circunscrita em ratos Wistar, como modelo experimental para estudo *in vivo* do comportamento bacteriano e do hospedeiro em resposta a diferentes estímulos;
- Avaliar o *status* monomicrobiano do processo e determinar a carga de *B. fragilis* em diferentes momentos durante a infecção experimental em animais tratados ou não com metronidazol;
- Avaliar, comparativamente, *in vitro* e durante infecção experimental a ocorrência de alterações na morfologia, nos padrões bioquímicos e fisiológicos de *B. fragilis* antes e após exposição a concentração subinibitória de metronidazol;

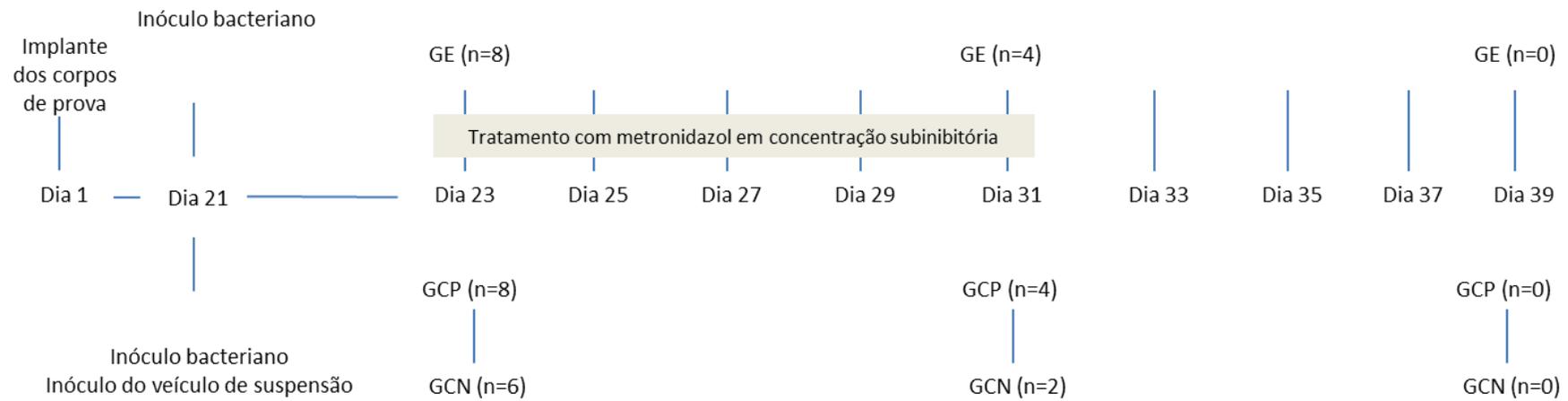
- Avaliar a estabilidade genética de amostras de *B. fragilis* recuperadas após seleção *in vitro* e *in vivo* pela exposição a concentrações subinibitórias de metronidazol, ao longo do período experimental;
- Analisar histologicamente os corpos de prova utilizados no modelo de infecção e avaliar o perfil de citocinas expressas no sítio de infecção (análise transcricional) pelos animais experimentais;
- Estabelecer condições ideais para obtenção de RNA de boa qualidade para estudos de análise transcricional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL



Esquema 1. Desenho experimental envolvendo as etapas *in vivo* e as etapas comparativas *in vitro*.



Esquema 2. Protocolo para a realização e acompanhamento da infecção experimental em ratos Wistar e tratamento com concentração subinibitória de metronidazol ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.1.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo estão descritas no quadro 1 e foram obtidas a partir de linhagem de *Bacteroides fragilis* ATCC43859 após seleção *in vitro* ou *in vivo* por exposição a concentração subinibitória de metronidazol ($1\mu\text{g mL}^{-1}$). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita previamente pelo método de diluição em caldo segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute*. A concentração subinibitória (CSI) considerada foi $\frac{1}{2}$ CIM, que é a maior concentração das drogas antimicrobianas abaixo da CIM na qual ocorre o crescimento bacteriano (CLSI, 2007).

Rotineiramente, as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (HIMEDIA, Mumbai, Índia) suplementado com hemina (5mg mL^{-1}), menadiona (1 mg mL^{-1}) e L-cisteína 0,1% w/v (BHI-S), em atmosfera anaeróbica (90% de N_2 , 10% de CO_2), a 37°C .

Para os experimentos de seleção bacteriana *in vitro*, subcultivos foram realizados em intervalos de 48h, na presença de metronidazol, por oito dias. Adicionalmente, as linhagens bacterianas isoladas após subcultivos na presença da droga foram cultivadas seguindo-se o mesmo esquema, na ausência de pressão seletiva, por mais oito dias.

A linhagem parental *B. fragilis* ATCC 43859 compõe a coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, e foi originalmente obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz - INCQS/FIOCRUZ.

Linhagem	Fenótipo	Referência
ETBF	Amostra parental: <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC43859	Myers et al., 1987
BfMTZ+	Linhagem derivada selecionada <i>in vitro</i> por 4 subcultivos na presença de metronidazol.	Este estudo
BfMTZ-	Linhagem derivada selecionada <i>in vitro</i> por 4 subcultivos na presença de metronidazol e 4 subcultivos na ausência da droga.	Este estudo
BfMTZa+	Linhagem derivada selecionada <i>in vivo</i> após 8 dias de exposição ao metronidazol.	Este estudo
BfMTZa-	Linhagem derivada selecionada <i>in vivo</i> após 8 dias de exposição ao metronidazol e 8 dias adicionais sem exposição à droga.	Este estudo
BfCTa+	Linhagem derivada selecionada <i>in vivo</i> após 8 dias da infecção experimental sem exposição ao metronidazol.	Este estudo
BfCTa-	Linhagem derivada de ETBF selecionada <i>in vivo</i> após 16 dias de infecção experimental na ausência de droga.	Este estudo

Quadro 1: Designação das linhagens de *Bacteroides fragilis* utilizadas neste estudo.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, e encontra-se aprovado de acordo com protocolo Comitê Ética Experimentação Animal - CEEA 035/2010.

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando, aproximadamente 300g. Bolas de tênis de mesa foram utilizadas como corpos de prova. Aproximadamente, 250-300 pequenos orifícios de 01 milímetro de diâmetro foram perfurados nas bolas, com auxílio de agulhas 25x10 mm. Os corpos de prova foram, posteriormente, embebidos em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 16h, e lavados com água destilada. Após embalagem, os corpos de prova foram submetidos à esterilização por óxido de etileno (Oxetil-FGF, Maripá de Minas, MG). Os corpos de prova foram inseridos por laparotomia, na cavidade peritoneal dos animais, sob anestesia intraperitoneal de quetamina/xilazina. Um período de três semanas foi permitido para recuperação dos animais, cicatrização e vascularização e acúmulo de fluido nos corpos de prova, tal como descrito anteriormente na literatura (O'KEEFE et al., 1979).

Para infecção experimental dos corpos de prova, suspensões bacterianas da amostra parental em NaCl 0,85%, previamente cultivadas em ágar BHI-S por 24h, foram inoculadas via percutânea ($1 \text{ mL} \sim 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$), com seringas descartáveis de 1 mL 13x0,45mm (Descarpack, SP, Brasil). Além disso, animais do grupo controle negativo receberam apenas o veículo de suspensão, no mesmo volume (NaCl 0,85%).

No total, os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle negativo (CN; n=18) sem inoculação bacteriana, apenas com o veículo da suspensão; grupo controle positivo (CP; n=30), animais infectados com a linhagem bacteriana parental; e grupo experimental (GE; n=24), animais infectados com a linhagem bacteriana parental e, posteriormente, tratados com concentração subinibitória de metronidazol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), via percutânea, por um período de oito dias, em intervalos de 48 horas. Pela dificuldade de se trabalhar com grande quantidade de animais, de maneira simultânea, neste experimento, a rotina experimental foi desenvolvida como triplicata biológica, sendo cada experimento composto de CN=6 animais, CP=10 animais e GE=8 animais.

Os animais foram eutanasiados em três momentos, de acordo com o desenho experimental:

- 8 dias após o término do tratamento com metronidazol (CN=2 animais, CP=4 animais, GE=4 animais), para avaliação do comportamento bacteriano e resposta do hospedeiro;
- 16 dias, sendo 8 dias adicionais após o tratamento com metronidazol (CN=2 animais, CP=4 animais, GE=4 animais), para avaliação do comportamento bacteriano e resposta do hospedeiro.

Experimentos *in vitro* foram executados em paralelo, seguindo-se o mesmo delineamento experimental, para controle de alterações na morfologia, nos padrões bioquímicos e fisiológicos e estabilidade genética.

4.2 AVALIAÇÃO DO STATUS MONOMICROBIANO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Para confirmação da ausência de contaminação no processo de obtenção da infecção experimental, foram obtidos esfregaços em lâmina a partir do exsudato obtido na necropsia dos animais, e posterior coloração pelo método de Gram. O exudato foi obtido pela aspiração do corpo de prova, utilizando seringa com agulha 25 x 10 mm.

A identidade microbiana foi confirmada no exsudato após extração de DNA total e reação de PCR específico, dirigido para amplificação do gene *bft*, codificador para enterotoxina de *B. fragilis*. Os oligoiniciadores utilizados foram BF1 (5'-GACGGTGTATGTGATTTGTCTGAGAGA-3') e BF2 (5'-ATCCCTAAGATTTTATTATCCCAAGTA-3'), conforme descrito por Pantosti et al. (1997). Para extração do DNA, foi utilizado o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, CA, USA), segundo protocolo do fabricante.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25µL, contendo 0,5 µM de cada primer, 1,0µL do DNA molde (100ng) e 12,5µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI, USA). A amplificação foi realizada em termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Lower Saxony, Germany), com as seguintes condições: desnaturação inicial, 5min, 94°C; 35 ciclos de desnaturação 1min, 94°C; 1min para

anelamento a 52°C, e 1min de extensão a 72°C. O último ciclo foi seguido de 5 minutos de extensão final a 72°C. Controle negativo sem adição de DNA e um controle positivo (contendo DNA da amostra parental ETBF) foram utilizados em cada experimento de PCR.

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, juntamente com padrão de peso molecular de 100pb. O amplicon esperado (294pb) foi visualizado e documentado após coloração do gel com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, em transluminador (Vilber Loumart, Germany).

4.3 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA

Após confirmação da condição monomicrobiana do exsudato obtido dos corpos de prova após necropsia dos animais, a quantificação de *B. fragilis* foi realizada por diferentes abordagens metodológicas: reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas de meio de cultura.

4.3.1 QUANTIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO

As reações de quantificação da carga bacteriana por qPCR foram feitas utilizando-se os iniciadores específicos para *B. fragilis* Bfr-F 5'-CTGAACCAGCCAAGTAGCG-3' e Bfr-R 5'-CCGCAAACCTTTCACAACTGACTTA-3' (IDT Integrated DNA Technologies) (LIU et al., 2003). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen biotecnologia, CA, USA) utilizando-se o kit SYBER Green PCR Master Mix (Qiagen biotecnologia, CA, USA) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. O DNA foi quantificado utilizando

kit Qubit® dsDNA BR Assay (Invitrogen, CA, USA), no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram montadas em volume final de 25µL, conforme instruções do fabricante. Cada experimento incluiu uma curva padrão em duplicata e cada amostra foi realizada também em duplicata. A curva padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de DNA de *B. fragilis* ATCC 43859 em 7 diluições seriadas, seguida da interpolação dos dados gerados pelo *software* do equipamento. As amostras foram submetidas à ativação de 5min a 95°C, e 35 ciclos de 94°C por 5seg, 60°C por 10seg, e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO POR PLAQUEAMENTO

Foi realizada a contagem direta de células viáveis em placas de meio seletivo para *Bacteroides* pela determinação das UFC/mL. A partir de 1mL do exsudato, foi feita a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-7} em solução salina (NaCl 0,85%). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio *Bacteroides* Bile Esculina (BBE) (Himedia, Mumbai, India) com auxílio de alças de Drigalsky para o espalhamento.

As placas foram incubadas em anaerobiose por 48 – 72h e então foi realizada a contagem nas placas referentes às diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias. Considerando-se a diluição do material inoculado, foi determinada a carga bacteriana pela relação:

$$\text{UFC/mL} = \text{n}^\circ \text{ de colônias} \times \text{diluição}^{-1} \times 10.$$

4.4 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO E RESPOSTA DO HOSPEDEIRO

4.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DOS CORPOS DE PROVA

Amostras de tecido do corpo de prova foram coletadas após a eutanásia dos animais, imersas por 24 horas em solução de formaldeído e, posteriormente, em solução alcoólica até o momento do emblocamento. O emblocamento foi realizado pelo método da HistoResin (Leica, Heidelberg, Germany), de acordo com as orientações do fabricante, e o corte em micrótomo, na espessura de, aproximadamente, três micrometros, para posterior coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE).

4.4.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM LEUCÓCITOS

Para análise quantitativa de *B. fragilis* internalizados em leucócitos, amostras de exsudado foram recuperadas, conforme descrito anteriormente. Células totais foram contadas em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Turk (cristal violeta a 0,01% em solução de ácido acético a 2%), para lise das células vermelhas do sangue.

Para avaliar a concentração de bactérias internalizadas, 10^6 células/mL foram centrifugadas a 1500rpm (centrífuga sorológica de mesa), por duas vezes, em solução de antibiótico (ampicilina/sulbactam 1 mg mL^{-1}) durante 10min. Em seguida, as células foram lisadas com 1mL de saponina 0,1% e $10\mu\text{L}$ de suspensão bacteriana foram incubadas por 48h em placas de BHI-S, em anaerobiose.

Adicionalmente, uma suspensão de, aproximadamente, 10^5 células do exsudato foi sedimentada por centrifugação a $140 \times g$ (Cytospin, Thermo Scientific) e

depois corada com May-Grünwald-Giemsa, para análise dos tipos celulares onde houve internalização de células bacterianas.

4.4.3 HEMOGRAMA

Os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina e a sangria total foi realizada pelo plexo braquial, no momento da remoção dos corpos de prova. O sangue foi inoculado em tubos heparinizados e enviados ao Laboratório de análises clínicas Côrtes Vilela, para realização de rotina hematológica em contador de células automático, utilizando impedância e laser na contagem e classificação das células.

4.4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS

4.4.4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

Para extração do RNA total, foi utilizado 1mL da amostra de exsudato coletado nos pontos analisados de todos os animais. As amostras foram centrifugadas a 9000 x g por três minutos, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos formados foram ressuspensos em 1mL de Qiazol (Qiagen Biotecnologia, CA, USA), homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente, por 5min. Aos tubos contendo o homogeneizado, foram então adicionados 0,2mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, MO, USA) para cada 1,0mL de Qiazol. Em seguida foram fechados e agitados vigorosamente por 15seg e incubados por 3min a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15min,

a 12000 x g em microcentrífuga, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL, seguindo-se a adição de 0,5mL de isopropanol (Sigma-Aldrich, MO, USA), homogeneização em vórtex e manutenção a temperatura ambiente por 10min.

Para purificação do RNA total contido na amostra, utilizou-se o kit de extração Rneasy (Qiagen Biotecnologia, CA, USA). O RNA obtido como descrito acima foi transferido para uma coluna acoplada a um tubo coletor de 2mL e centrifugado a 8000 x g por 30seg. O líquido residual no tubo coletor foi descartado após as centrifugações.

A esta fração coletada foram, então, adicionados 500µL de solução de lavagem, seguindo-se centrifugação a 8000 x g, por 30seg, e por mais um ciclo de lavagem e centrifugação a 8000 x g, por 2min. O RNA total foi eluído em 30µL de água livre de RNase. As amostras foram quantificadas utilizando o kit Qubit® RNA Assay (Invitrogen, CA, USA), no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer, seguindo-se as instruções do fabricante.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Promega, WI - USA), para assegurar a ausência de contaminação por DNA genômico. Para isso, aproximadamente 380ng de RNA foram adicionados a 1µL DNase, 1µL de tampão e completando-se o volume para 10µL com água, e mantido por 30min, a 37°C. Uma solução de parada da reação (fornecida com a enzima) foi adicionada e mantida, por 5 min, a 65°C, para inibição da atividade enzimática da DNase. Em seguida, as amostras foram armazenadas a – 80 °C, até o momento do uso.

4.4.4.2 INTEGRIDADE DO RNA EXTRAÍDO

A qualidade do RNA extraído foi avaliada utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, com o Pico LabChip Kit (Agilent Technologies, CA, USA), conforme instruções do fabricante. O resultado é exibido na forma de um gráfico, através do qual é possível calcular a razão 28S/18S com maior precisão a partir de seus respectivos picos, gerando, desta forma, o que se denomina RIN (RNA Integrity

Number). Os valores de RIN estão numa escala de 1 a 10, sendo que quanto mais alto seu valor maior a sua integridade.

4.4.4.3 SÍNTESE DE cDNA

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese do cDNA, utilizando o kit comercial Improm II (Promega, WI - USA), segundo as recomendações do fabricante. Uma mistura de 4 μ L do RNA tratado com DNase e 1 μ L de oligo(dT) iniciador foi submetida a 70°C por 5min e posteriormente mantido no gelo por 5min. Posteriormente, foram adicionados a esta mistura 4 μ L de tampão, 2 μ L de cloreto de magnésio, 1 μ L de dNTPs, 0,5 μ L de inibidor Rneasin, 1 μ L da enzima transcriptase reversa e 6,5 μ L água livre de RNase.

O volume final (20 μ L) da reação (15 μ L mistura e 5 μ L RNA com iniciador) foi submetido ao seguinte protocolo experimental em termociclador: 25°C por 5min, 42°C por 1h e 70°C por 15min.

Os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C até o momento da amplificação da etapa de PCR quantitativo em tempo real.

4.4.4.4 INICIADORES UTILIZADOS PARA ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS

As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados nesse estudo foram analisadas no *software* *OligoAnalyzer* 3.1, disponível em <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>, para verificação dos parâmetros como especificidade, tamanho do produto gerado, formação de estruturas secundárias, conteúdo GC e temperatura de fusão, para a sua posterior seleção.

Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1, assim como a sequência de nucleotídeos e o tamanho do produto.

Tabela 1: Sequência de iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) referente aos genes avaliados e tamanho do produto gerado

Alvo	5'-3' sequência do iniciador	Amplicon
HPRT	F: CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R:GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	122
IL-10	F: GAGAGA AGCTGA AGACCCTCTG R: TCATTCATGGCCTTGTAGACAC	120
IL-8	F: GCACCCAAACCGAAGTCA R: AAGCCAGCGTTCACCAGA	168
IL-6	F: TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC R: TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	79
IL-1b	F: CACCTCTCAAGCAGAGCACAG R: GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	79
MCP-1	F: GCTGCTACTCATTCTGGCAAG R: GGTCAAGTTCACATTCAAAGGTGC	112
TNF- α	F: AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC R: TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	111

pb: pares de base; F, *Forward*; R, *Reverse*.

4.5 AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS

4.5.1 MORFOLOGIA CELULAR

As amostras de exsudado obtidas nos pontos avaliados foram submetidas à coloração pelo método de Gram, para a observação de alterações morfológicas, após exposição da bactéria a concentrações subinibitórias de metronidazol e para a observação da morfologia bacteriana após a suspensão do uso do antimicrobiano.

As amostras de *B. fragilis* obtidas *in vitro* foram submetidas à coloração pelo método de Gram a cada subcultivo em caldo BHI-S, tanto durante o tratamento com metronidazol, quanto após sua retirada.

A morfologia foi registrada por fotografias de esfregaços corados, pela utilização de uma câmera digital (Sony, DCS-W35) acoplada a um microscópio óptico (Coleman), em aumento de 1000X.

4.5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A partir do exsudato retirado dos animais, foi feita a recuperação de todas as linhagens utilizadas no estudo. Foi avaliada a interferência da exposição ao metronidazol na formação de biofilme, de acordo com a metodologia já estabelecida em nosso laboratório (SOUZA FILHO et al. 2012; FREITAS et al. 2015).

A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em caldo BHI, foram diluídos 400µL em 4mL de meio, seguindo-se homogeneização e aplicação de 200µL em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. A linhagem parental foi utilizada como controle. As placas foram incubadas em anaerobiose por 24h, a 37°C. Após o período de crescimento, o caldo foi retirado e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%). Foram adicionados 300µL de metanol e as placas

foram incubadas à temperatura ambiente, por 15min. Logo após, foi retirado o metanol e as placas foram deixadas destampadas à temperatura ambiente por 5min para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250µL de cristal violeta (0,1%) e as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente, por 15min. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada.

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

4.5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO

Para a avaliação da tolerância ao estresse oxidativo foram utilizadas suspensões bacterianas de culturas crescidas em anaerobiose, por 24h a 37°C, ajustadas em solução salina (NaCl 0,85%) ao valor correspondente a 1,0 na escala Mcfarland. Com o auxílio de um *swab* estéril, alíquotas da suspensão foram inoculadas por esgotamento em placas de ágar BHI-S, a fim de se obter crescimento bacteriano confluyente.

Discos de papel filtro de 0,5mm de diâmetro foram distribuídos pelas placas (quatro por placa) e impregnados com 5µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 20% v/v – Sigma-Aldrich, MO, USA). Após o crescimento bacteriano por 48 horas, foram medidos os halos de inibição, e os resultados plotados como tamanho médio dos quatro halos de cada placa. O experimento foi executado utilizando-se duas réplicas biológicas.

4.5.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

As características bioquímicas das linhagens bacterianas foram avaliadas comparativamente às da linhagem parental de *B. fragilis* ATCC 43859, utilizando-se o kit semi-automatizado Api20A (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, France), específico para identificação de anaeróbios.

O sistema consiste de painéis com os substratos desidratados, e os inóculos bacterianos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. Os painéis foram preenchidos em câmara anaeróbica e incubados a 37°C por 24h, seguindo-se leitura visual das colorações apresentadas.

Foram avaliadas as características de produção de enzimas: urease; utilização de carboidratos: D-glicose; D-manitol; D-lactose; D-maltose; salicilina; D xilose; L-arabinose; hidrólise: gelatina; esculina e produção de outros compostos: indol e glicerol.

4.6 GENOTIPAGEM BACTERIANA AP-PCR

A técnica de PCR com oligoiniciadores aleatórios (AP-PCR) foi utilizada para genotipagem bacteriana das linhagens isoladas nos diferentes momentos de eutanásia dos animais, além das linhagens cultivadas *in vitro*, de acordo com metodologia já estabelecida em nosso laboratório (FREITAS et al, 2015).

Após o isolamento das linhagens a partir do exsudato retirado dos corpos de prova, ou dos subcultivos durante o protocolo de seleção bacteriana *in vitro*, e após tratamento com concentração subinibitória de metronidazol, foi feita a extração de DNA de cada linhagem com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, WI - USA). O DNA foi quantificado utilizando-se kit Qubit® dsDNA BR Assay (Invitrogen, CA, USA), no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer, segundo as instruções do

fabricante. As amostras de DNA foram diluídas para a utilização de, aproximadamente, 100ng por reação.

Os iniciadores aleatórios utilizados foram OPA 16 5'-AGCCAGCGAA-3' e OPA 18 5'-AGGTGACCGT-3 (ERIBE e OLSEN, 2000). As reações foram feitas em volumes de 25µL, utilizando-se 12,5µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI - USA), 1,25µL de cada iniciador e 1µL de DNA molde bacteriano, em termociclador T1 Termocycler (Biometra, Lower Saxony, Germany). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 94°C por 1min, seguido por 45 ciclos de 94°C por 5seg, 36°C por 1min e 72°C por 2min, e extensão final 72°C por 1seg para os oligoiniciadores OPA16 e OPA18.

As reações foram feitas em triplicata, para avaliação da reprodutibilidade dos amplicons gerados. Os amplicons obtidos em cada reação foram separados em gel de agarose a 1,5%, em TBE 0,5X. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta (Vilber Loumart), após tratamento com brometo de etídio. Após documentação, os perfis de amplificação foram comparados entre a amostra parental e as linhagens bacterianas crescidas na presença e na ausência de antimicrobianos.

4.7 OBTENÇÃO DE RNA PARA ESTUDOS DE TRANSCRIPTÔMICA

Embora o RNA tenha sido extraído com sucesso a partir do exsudato dos corpos de prova, os estudos mais amplos de transcriptômica requerem que essas substâncias tenham alta concentração no início dos ensaios com um alto grau de pureza e integridade. Assim, para otimizar sua obtenção, considerando-se a agregação bacteriana já observada nos ensaios anteriores, foram utilizadas alternativas metodológicas para aumentar o número de células bacterianas livres presentes no exsudato. Três tratamentos diferentes foram avaliados: (i) centrifugação a 500 x g, durante 10min; (ii) tratamento ultrassônico com três pulsos de 110,7µm / 60s em banho de gelo (Vibra celular VCX 130PB, Sonics @ Materials

Inc.); e (iii) tratamento ultrassônico com três pulsos de 110,7µm / 60s em banho de gelo, seguido por centrifugação a 500 x g durante 10min.

Posteriormente, foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), para verificar o melhor tratamento que conduzisse ao aumento do rendimento de células procarióticas. A contagem e a determinação da concentração de *B. fragilis* depois de cada tratamento por FISH, foram realizadas utilizando-se a sonda Bac 303 (5' CCAATGTGGGGGACCTT 3 '), com o fluorocromo Cy3. Assim, alíquotas de 0,3mL para cada tratamento foram filtradas através de filtros de policarbonato de 0,22µm (Nuclepore Whatman, GE Healthcare) e armazenadas a 4°C até o procedimento de hibridização, conforme metodologia já estabelecida (CESAR, 2002).

Os filtros hibridizados foram submetidos à microscopia de fluorescência, após ampliação de 1000x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX-60), equipado com os seguintes filtros: Chroma U-N41007, U148 MWU2, U-MWB2 e U-MWG2. As medições foram realizadas em triplicata.

O RNA total dos exsudados foi extraído a partir de 1,0mL utilizando-se o kit RNeasy Mini (Qiagen, CA, USA), de acordo com os protocolos do fabricante. Além disso, o kit MicrobEnrich (Ambion, CA, USA) foi utilizado para a depleção do RNA ribossomal eucariótico e procariótico. A qualidade do RNA extraído foi avaliada utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, com o kit Pico LabChip (Agilent Technologies, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Os extratos de RNA com Integridade (RIN) > 8 foram considerados de qualidade.

Para o controle do processo de extração e manipulação laboratorial de RNA, foram realizados experimentos *in vitro*. A partir da mesma suspensão bacteriana utilizada na infecção experimental, 0,1mL de *B. fragilis* ATCC 43859 ($\approx 10^8$ UFC. ml⁻¹) em 0,85% de NaCl foi inoculado em 5,0mL de caldo BHI-s (Himedia), e incubado anaerobicamente (90% de N₂, 10% de CO₂) durante 16h, a 37°C. O controle de qualidade experimental foi realizado para cada tentativa de extração de RNA de cada repetição biológica *in vivo*.

O RNA total foi extraído a partir de 1,0ml da cultura bacteriana utilizando-se o kit RNeasy mini (Qiagen, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O kit MicrobEnrich (Ambion, CA, USA) foi, também, utilizado, para garantir reprodutibilidade dos mesmos passos experimentais durante os experimentos *in vivo*. A qualidade do RNA extraído foi avaliada utilizando-se o equipamento Agilent

2100 Bioanalyzer, com o kit Pico LabChip (Agilent Technologies, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Os extratos de RNA com Integridade (RIN) > 8 foram considerados de qualidade.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos empregados, quando necessário, foram realizados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, CA - USA). O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado, quando necessário, o Teste t de Student, para comparação de médias, ou a análise de variância com Teste de Tukey, para comparação entre médias.

5 RESULTADOS

5.1 MODELO EXPERIMENTAL E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

O procedimento experimental mostrou-se adequado ao cultivo de *B. fragilis* na cavidade peritoneal de ratos Wistar. A técnica cirúrgica envolveu a indução anestésica, raspagem de pelos abdominais, seguida de incisão na cavidade peritoneal para implantação dos corpos de prova e sutura, como mostrado na figura 1. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas, na capela de fluxo laminar.

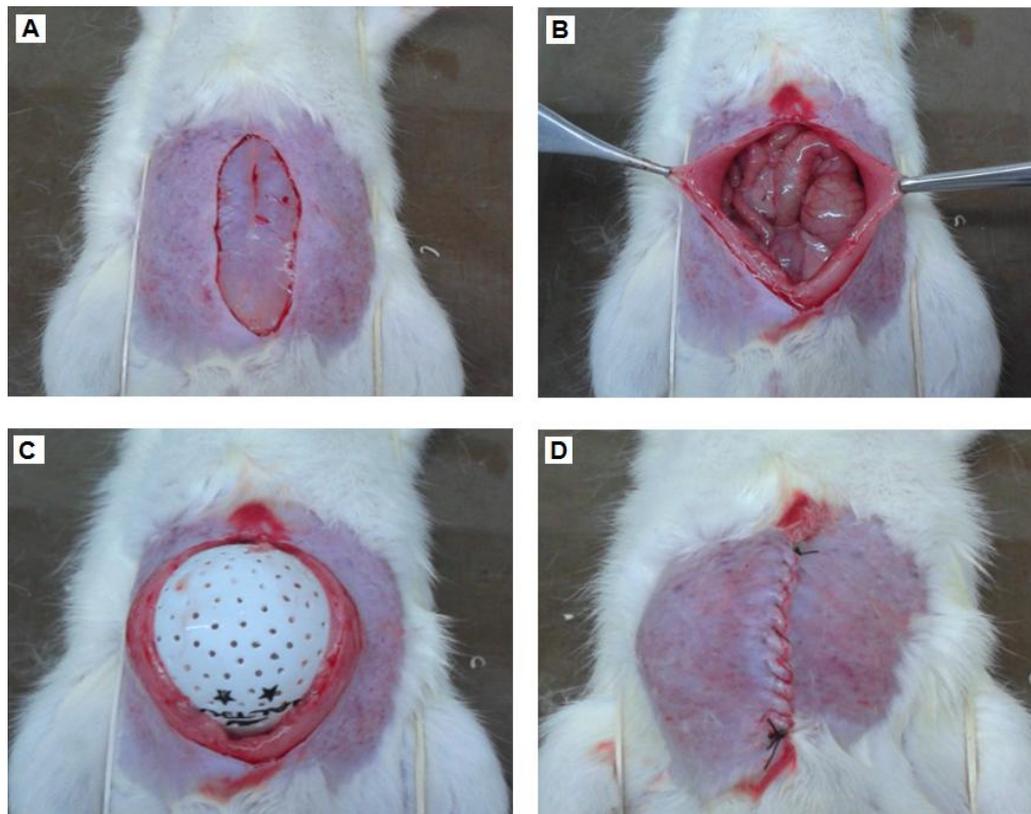


Figura 1. Modelo experimental de infecção. Técnica cirúrgica utilizada para introduzir os corpos de prova na cavidade peritoneal dos animais. A e B - incisão, C – Corpo de prova perfurado estéril implantado na cavidade peritoneal de ratos. D - sutura cirúrgica após a implantação do corpo de prova.

Após 21 dias do procedimento cirúrgico, os corpos de prova estavam totalmente envolvidos por tecido, tanto no interior quanto no exterior, com média de 14mL de exsudato acumulado no interior (Figura 2).

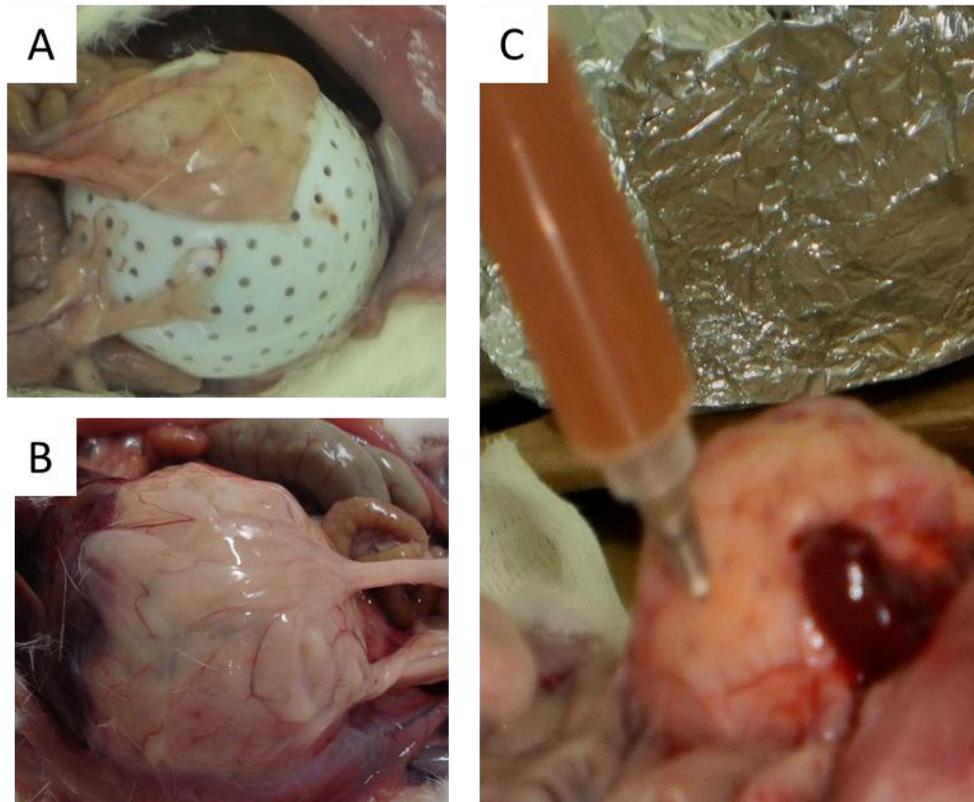


Figura 2. Fotografia representativa do corpo de prova após 21 dias da implantação (A e B); imagem representativa da coleta de exsudado (C).

Após o procedimento cirúrgico e a infecção experimental com amostras de *B. fragilis*, os animais foram monitorados clinicamente e, no momento da eutanásia, não demonstraram quaisquer sinais ou sintomas de infecção sistêmica ou localizada fora do corpo de prova.

A presença bacteriana e ausência de contaminação no exsudato do corpo de prova após infecção foi confirmada pela coloração de Gram, pela qual foram visualizados bastonetes Gram-negativos pleomórficos, com a presença de células inflamatórias (Figura 3A). A identificação molecular da espécie *B. fragilis* por PCR a

partir do DNA extraído do exsudato recuperado do corpo de prova foi confirmada pela amplificação de fragmento do gene *bft*, de 294 pares de bases (Figura 3B).

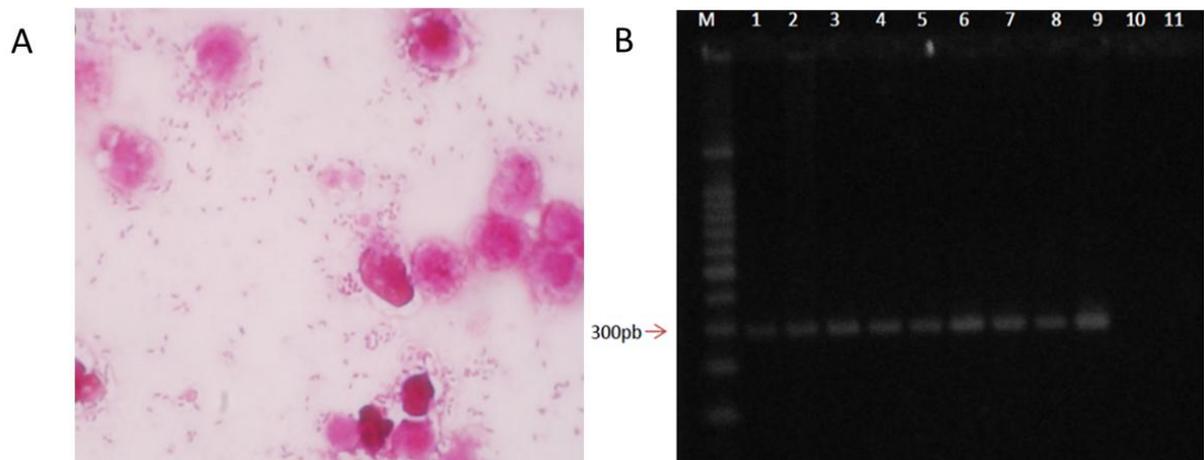


Figura 3. A) Fotomicrografia de esfregaço a partir do exsudato presente no interior do corpo de prova corado pelo método de Gram. Aumento 1000 x. B) Eletroforegrama representativo da avaliação dos produtos formados a partir do PCR direcionado para amplificação de fragmento do gene *bft*, após eletroforese em gel de agarose. M – padrão de peso molecular, 1 - ETBF, 2 - BfMTZa+, 3 - BfMTZa+, 4 - BfMTZa-, 5 - BfMTZa-, 6 - BfCTa+, 7 - BfCTa+, 8 - BfCTa-, 9 - BfCTa-, 10 - CN, 11 - branco. Tamanho do fragmento esperado: 294 pb.

A avaliação do crescimento bacteriano no corpo de prova durante a infecção experimental foi feita tomando-se como parâmetro para comparação o cultivo bacteriano *in vitro*, seguindo-se o mesmo desenho experimental. Para a quantificação bacteriana *in vivo*, foram utilizadas duas abordagens metodológicas (cultivo com contagem de UFC.mL⁻¹ e biologia molecular, qPCR) enquanto que a avaliação do crescimento bacteriano em cultura na presença e ausência do metronidazol foi utilizada apenas por biologia molecular (qPCR). Foi definida como concentração subinibitória, a concentração final de 1 µg.mL⁻¹ da droga, tomando-se como base o valor da concentração inibitória mínima de metronidazol para a *B. fragilis* ATCC 43859, de 2µg.mL⁻¹.

Nos experimentos de quantificação, os dados mostraram, pela contagem de unidades formadoras de colônia em placa, que a população bacteriana alcançou níveis médios de 9,16 log₁₀ UFC.ml⁻¹ (DP= 0,25) nos primeiros oito dias de avaliação e 9,25 log₁₀ UFC.ml⁻¹ (DP= 0,20), ao final de 8 dias adicionais (16 dias da infecção

experimental – grupo CP). Considerando-se o grupo de animais tratados com metronizadol em concentração subinibitória, a população bacteriana alcançou níveis médios de $8,81 \log_{10} \text{ UFC.ml}^{-1}$ (DP= 0,23), ao final de 8 dias de tratamento, e níveis de $9,19 \log_{10} \text{ UFC.ml}^{-1}$ (DP= 0,66), ao final dos 8 dias subsequentes, na ausência da droga.

Considerando-se a avaliação da carga bacteriana por metodologia molecular, os dados, expressos em \log_{10} cópias do gene codificador para a rRNA 16S bacteriano. mL^{-1} de cultura ou exsudato, mostraram que a população alcançou níveis médios representados por $8,72 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,40), nos primeiros oito dias de avaliação e $8,73 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,66), ao final de 8 dias adicionais (16 dias da infecção experimental – grupo CP). Considerando-se o grupo de animais tratados com metronizadol em concentração subinibitória, a população bacteriana alcançou níveis médios representados por $8,67 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,16), ao final de 8 dias de tratamento, e níveis de $9,60 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,59), ao final dos 8 dias subsequentes, na ausência da droga (Figura 4).

Os resultados obtidos por qPCR para os experimentos de quantificação *in vivo* mostraram um alto grau de concordância com os resultados da quantificação por plaqueamento e contagem das UFCs, não tendo sido detectada alteração estatística significativa entre os dois métodos nos diferentes momentos (Figura 4).

Na avaliação do crescimento bacteriano em condições *in vitro* de cultivo na presença e ausência do metronidazol, os dados mostram que a população alcançou níveis médios representados por $8,40 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,21), nos primeiros oito dias de cultivo e $8,70 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,11), ao final de 8 dias de manutenção em cultura, adicionais. Considerando-se as culturas tratadas com metronizadol em concentração subinibitória, a população bacteriana alcançou níveis médios representados por $8,57 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,22), ao final de 8 dias de tratamento, e níveis de $8,55 \log_{10} \text{ cópias.ml}^{-1}$ (DP= 0,06), ao final dos 8 dias posteriores, sem droga.

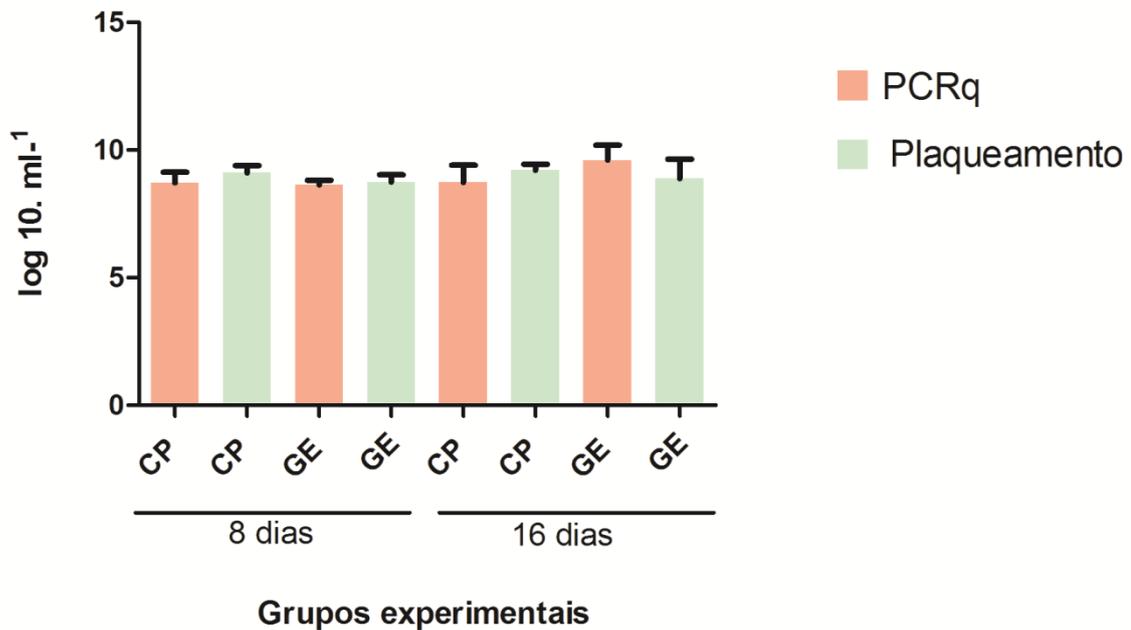


Figura 4. Quantificação da carga bacteriana presente no exsudato do corpo de prova, por PCR quantitativo e plaqueamento. 8 dias: após tratamento com MTZ; 16 dias: após tratamento com MTZ e 8 dias adicionais sem tratamento. CP: Controle positivo; GE: Grupo Experimental. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas abordagens experimentais, em um mesmo momento ($p < 0,05$).

5.2 INTERFERÊNCIA DO METRONIDAZOL NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-HOSPEDEIRO

5.2.1 HISTOLOGIA E INTERAÇÃO BACTERIANA

Na avaliação histológica do corpo de prova removido dos diferentes grupos de animais desafiados com a amostra parental de *B. fragilis* e submetidos ou não ao tratamento com metronidazol em concentração subinibitória, observou-se a ocorrência de infiltrado inflamatório nos grupos CP e GE, sendo este infiltrado inflamatório exacerbado no oitavo dia, tanto no GE, composto por animais cujas

bactérias inoculadas no corpo de prova foram expostas ao antimicrobiano, quanto no grupo CP (figura 5E e 5C). Entretanto, após a suspensão do tratamento com metronidazol, o infiltrado inflamatório diminuiu no grupo GE (Figura 5F), o que não foi verificado no grupo CP (Figura 5D). Entre os animais do grupo CN, não foi observado infiltrado inflamatório significativo nos dois momentos avaliados (Figura 5A e 5B).

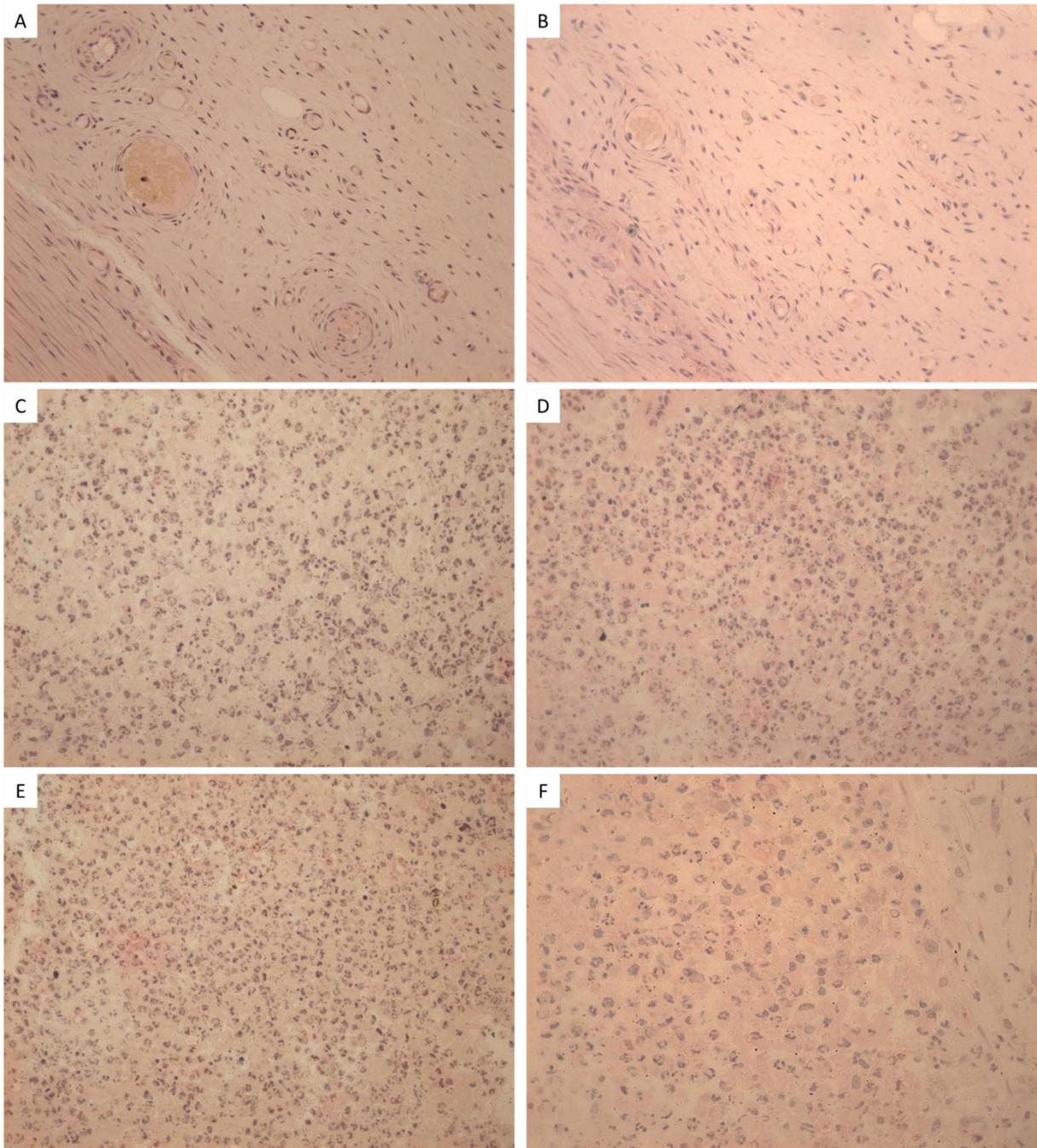


Figura 5: Análise histológica do corpo de prova após tratamento com concentração subinibitória de metronidazol (8 dias) e 8 dias consecutivos sem metronidazol (16 dias). A - CN – controle negativo (8 dias); B - CN - controle negativo (16 dias); C - CP - controle positivo (8 dias); D - CP - controle positivo (16 dias); E - GE - grupo experimental (8 dias); F - GE - grupo experimental (16 dias). Aumento 400x

Nos infiltrados inflamatórios obtidos a partir dos corpos de prova dos animais que compunham os grupos CP e GE, grande quantidade de células bacterianas estavam internalizadas nos leucócitos, o que inviabilizou a identificação de subpopulações linfocitárias presentes nos exsudatos (Figura 6B). Embora a presença de células inflamatórias tenha sido verificada no exsudato do grupo controle negativo, cujos animais não foram desafiados com *B. fragilis* (CN), não foram observadas células bacterianas, garantindo, assim, a ausência de contaminação no interior do corpo de prova desses animais (Figura 6A).

Após procedimento de permeabilização dos leucócitos com a utilização de saponina, o sobrenadante foi inoculado em meio de cultura para recuperação e enumeração de células bacterianas internalizadas. Houve crescimento bacteriano a partir dos sobrenadantes de tratamento de permeabilização leucocitária apenas nos exsudatos obtidos a partir dos animais que compunham os grupos desafiados com *B. fragilis* (Figura 6D). Não foi observado crescimento bacteriano a partir do exsudato dos animais do grupo controle negativo (CN) (Figuras 6C). Não foram detectadas diferenças significativas na contagem de células bacterianas internalizadas (Figura 7).

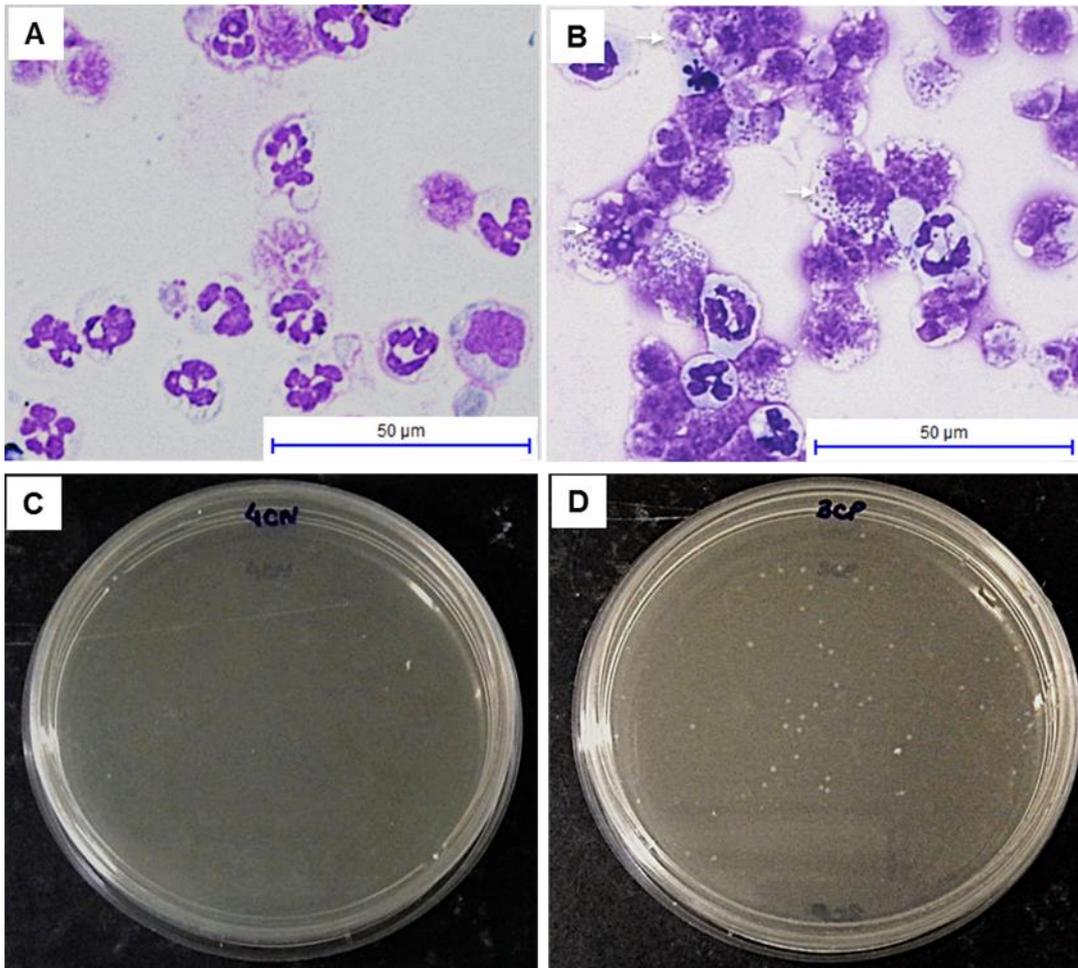


Figura 6. Avaliação da ocorrência de células bacterianas internalizadas em leucócitos após permeabilização e cultivo do sobrenadante do lisado celular. A e B: fotomicrografia representativa de leucócitos corados com May-Grünwald-Giemsa – grupo controle negativo e controle positivo, respectivamente. C e D: fotografia de placas de ágar BHI representativas da cultura de sobrenadante dos lisados celulares - grupos controle negativo e controle positivo, respectivamente. As setas brancas evidenciam leucócitos com células bacterianas internalizadas.

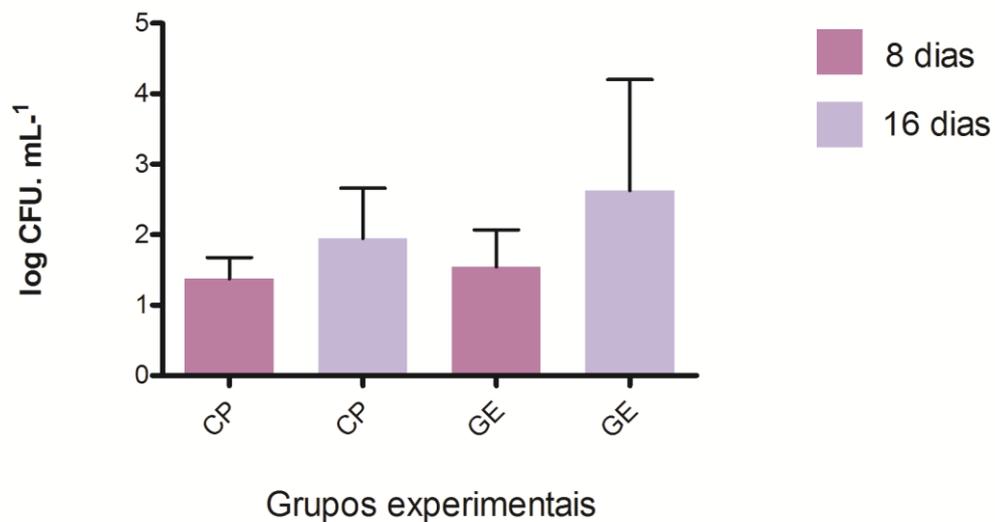


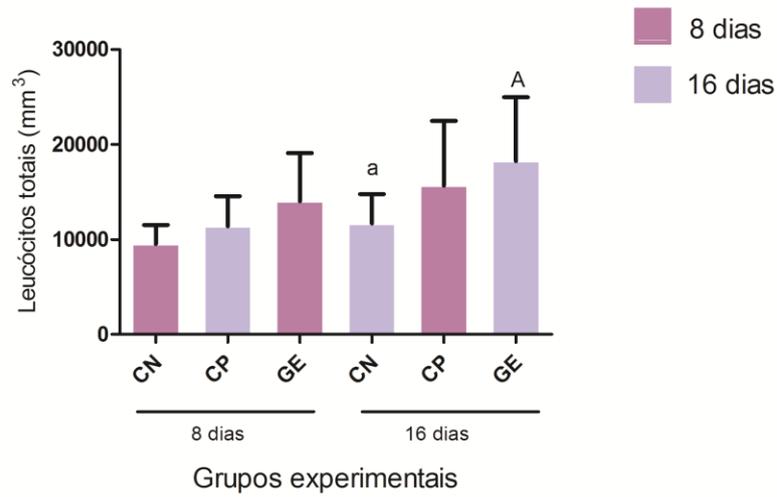
Figura 7. Contagem do número de células bacterianas viáveis após a lise dos leucócitos, ao longo do tempo nos animais desafiados com *B. fragilis* após tratamento ou não com metronidazol. CP – grupo controle positivo. GE – grupo experimental com oito dias de tratamento com metronidazol (1 μ g.mL⁻¹) e mais 8 dias sem tratamento com a droga. 8 dias: após tratamento com MTZ; 16 dias: após tratamento com MTZ e 8 dias adicionais sem tratamento (p< 0,05).

5.2.2 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

A partir do exame de sangue, obtido do plexo braquial dos diferentes animais desafiados ou não com *B. fragilis* no interior do corpo de prova, não foram observadas alterações significativas na contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, VCM, HCM, CHCM, RDW e alterações relacionadas à morfologia dos leucócitos, ao considerar-se tanto os grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP) e grupo experimental tratado com metronidazol (GE). Entretanto, alterações relacionadas à contagem de leucócitos totais e neutrófilos foram observadas, sobretudo nos grupos CP e GE. Em relação ao número total de leucócitos, embora a contagem tenha sido maior nos grupos desafiados com *B. fragilis*, estas contagens foram maiores ao final dos 16 dias principalmente no grupo experimental, quando comparado ao grupo CN (Figura 8A). Com relação à subpopulação de neutrófilos sistêmicos, observou-se número aumentado após 16

dias nos grupos CP e GE, sem, no entanto, essa alteração ser um dado estatisticamente significativo (Figura 8B).

A



B

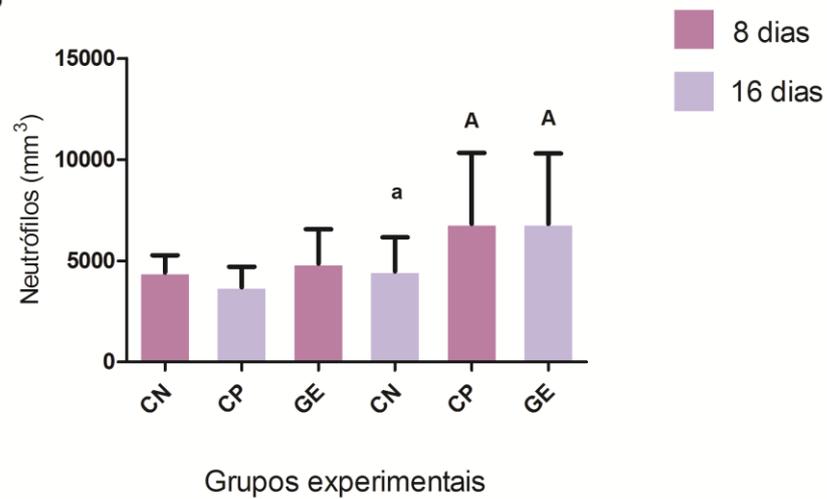


Figura 8. Avaliação dos parâmetros sanguíneos em modelo de infecção circunscrita com *Bacteroides fragilis*. A - Leucócitos. B - neutrófilos. Após tratamento com metronidazol (8 dias) e 8 dias consecutivos sem metronidazol (16 dias). CP - controle positivo; GE - grupo experimental; CN - controle negativo. a e A indicam estatisticamente diferente ($p < 0.05$).

5.2.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EXPRESSAS

Para avaliação transcricional da expressão de citocinas pelas células do hospedeiro no exsudato obtido do interior dos corpos de prova, no momento da necropsia, os dados obtidos dos animais do grupo controle negativo (CN – animais sem desafio experimental com *B. fragilis*) foram considerados para o cálculo da curva de quantificação pelo método $\Delta\Delta C_t$, como valores basais.

Após 8 dias, a expressão do mRNA de TNF- α foi significativamente aumentada pela infecção com *B. fragilis* no grupo controle positivo (CP - 10 vezes), enquanto no grupo GE o aumento foi de 4 vezes (Figura 9).

Em 16 dias, os níveis de expressão de IL-8 foram aumentados tanto no grupo CP (6,5 vezes) quanto no grupo GE (14,7 vezes). Um nível significativo da expressão de IL-6 foi encontrado no grupo CP, sendo de 94,6 vezes, enquanto no GE foi de 56,5. A expressão de IL-1 α também foi aumentada, principalmente em CP, da ordem de 20,3 vezes, enquanto que no grupo experimental foi de 7 vezes. Os níveis de MCP-1 foram reprimidos em, praticamente, todos os momentos da análise, com exceção em 16 dias, no grupo controle (2,2 vezes) (Figura 9).

A expressão relativa de IL-10 foi exacerbada no GE, quando comparada ao grupo CP (30.0 vezes mais expressa no GE e 3.0 vezes no grupo CP) (Figura 9).

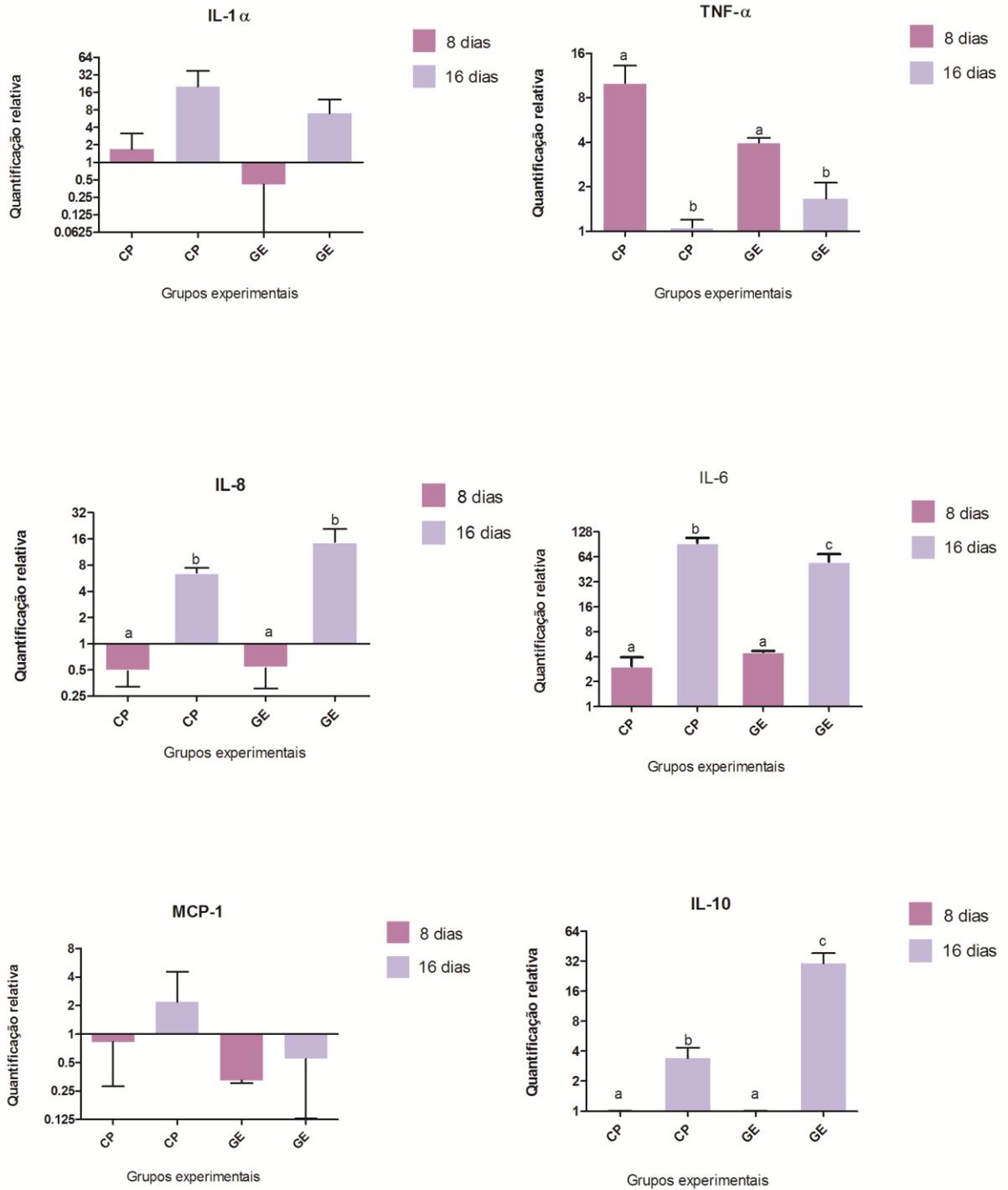


Figura 9. Níveis de expressão de citocinas, 8 dias após o tratamento concentração subinibitória de metronidazol (8 dias) e os 8 dias consecutivos sem metronidazol (16 dias) a partir de exsudados de ratos infectados. CP - Controle positivo; GE - Grupo Experimental. a, b e c indicam estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.3 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA, PADRÕES BIOQUÍMICOS E FISIOLOGIA BACTERIANA

A morfologia bacteriana foi avaliada nas populações celulares de *B. fragilis* presentes no exsudato obtido do interior dos corpos de prova, no momento da necropsia dos animais pertencentes aos grupos controle positivo (CP) e grupo experimental (GE), pela coloração de Gram. Paralelamente, a morfologia bacteriana foi avaliada em experimento *in vitro*, seguindo-se o mesmo desenho experimental (Figura 10).

Quando o metronidazol foi utilizado *in vivo* nenhuma alteração morfológica celular foi observada pela microscopia óptica, tanto em oito dias de exposição à droga em concentração subinibitória (BfMTZa+) quanto após oito dias subsequentes sem tratamento com o antimicrobiano (BfMTZa-). A morfologia bacteriana observada nos exsudatos dos animais do grupo experimental foi semelhante àquela observada nos exsudatos dos animais do grupo controle positivo (CP - BfCTa+ e BfCTa-). Como já relatado, nestes esfregaços, células inflamatórias também foram observadas.

Por outro lado, alterações morfológicas foram evidentes nas células de *B. fragilis* quando cultivadas em meio de cultura seguindo-se o mesmo esquema de exposição ao metronidazol, isto é, oito dias de exposição em subcultivos de 48h, seguido de mais oito dias de subcultivos na ausência da droga. Na presença de metronidazol ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$), observou-se a filamentação celular e, ainda, a formação de pequenas vesículas ou vacúolos intracitoplasmáticos (BfMTZ+), em comparação aos esfregaços provenientes das culturas sem droga. O retorno à morfologia original foi observado, após os subcultivos na ausência da droga (BfMTZ-).

A observação de alteração na morfologia celular durante a exposição *in vitro* de *B. fragilis* à concentração subinibitória de metronidazol foi evidente já no primeiro subcultivo na presença de droga, enquanto que o retorno aos padrões morfológicos originais foram também observados já no primeiro subcultivo na ausência de metronidazol.

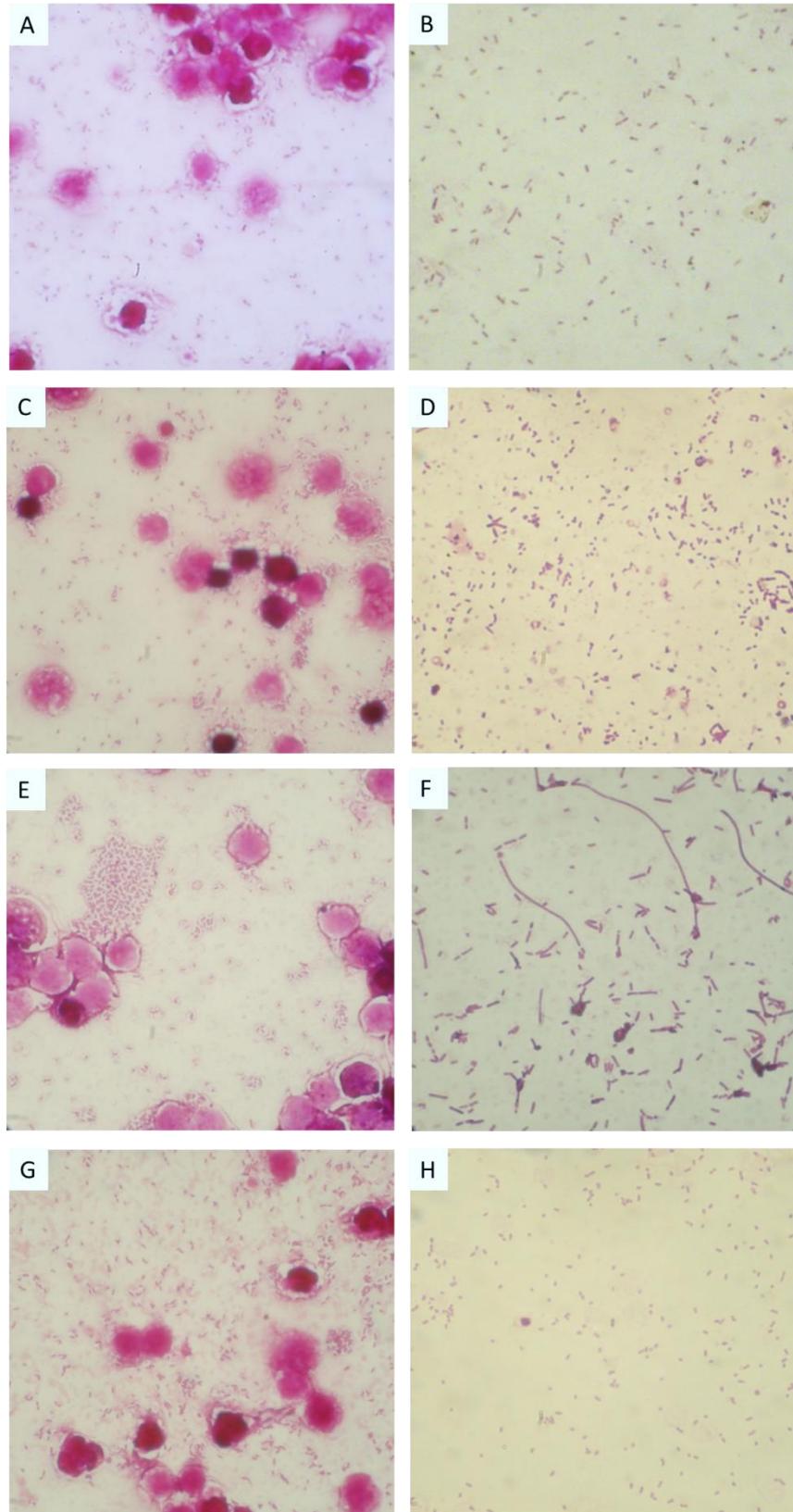


Figura 10. A – Fotomicrografias representativas do aspecto de células de *Bacteroides fragilis* após crescimento *in vivo* em corpos de prova implantados na cavidade peritoneal de ratos Wistar, e cultivados em caldo BHI, expostos ou não a concentração subinibitória de metronidazol ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Linhagens *in vivo*: BfCTa+ (A), BfCTa- (C), BfMTZa+ (E), BfMTZa- (G); Linhagens *in vitro*: BfCT+ (B), BfCT- (D), BfMTZ+ (F), BfMTZ- (H). Aumento 1000x

Os experimentos para avaliação da interferência do metronidazol na capacidade de formação de biofilme experimental por *B. fragilis* recuperados do exsudato no interior dos corpos de prova implantados nos animais dos grupos CP e GE, bem como cultivados *in vitro* na presença ou ausência da droga mostraram que, em condições de infecção experimental, o metronidazol não interferiu nos padrões de adesão das bactérias expostas *in vivo* quando comparadas ao controle; entretanto, quando comparadas as linhagens BfMTZa+ e BfMTZa-, houve diminuição no padrão de adesão .

As propriedades de adesão bacteriana mostraram-se alteradas nas células cuja exposição ao metronidazol ocorreu *in vitro*, e essa alteração foi reversível, após cultivo bacteriano na ausência do antimicrobiano (Figura 11).

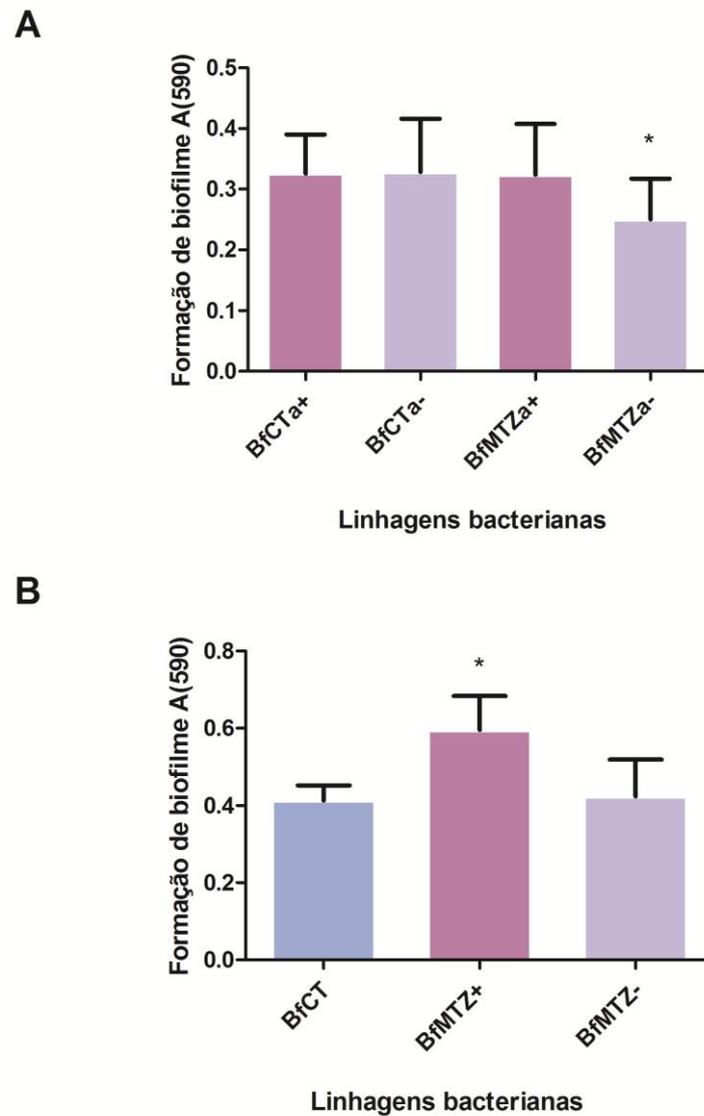


Figura 11. Efeito de concentração subinibitória de metronidazol na formação de biofilme de *Bacteroides fragilis*. A - Experimento *in vivo*; B – Experimento *in vitro*. * estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

Considerando-se a tolerância ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, o mesmo comportamento bacteriano foi observado em relação à produção de biofilme experimental. Em condições de infecção experimental, o metronidazol não interferiu nos padrões tolerância ao estresse oxidativo. Entretanto, essa característica mostrou-se alterada nas células cuja exposição ao metronidazol

ocorreu *in vitro*, e essa alteração foi reversível após cultivo bacteriano na ausência do antimicrobiano (Figura 12).

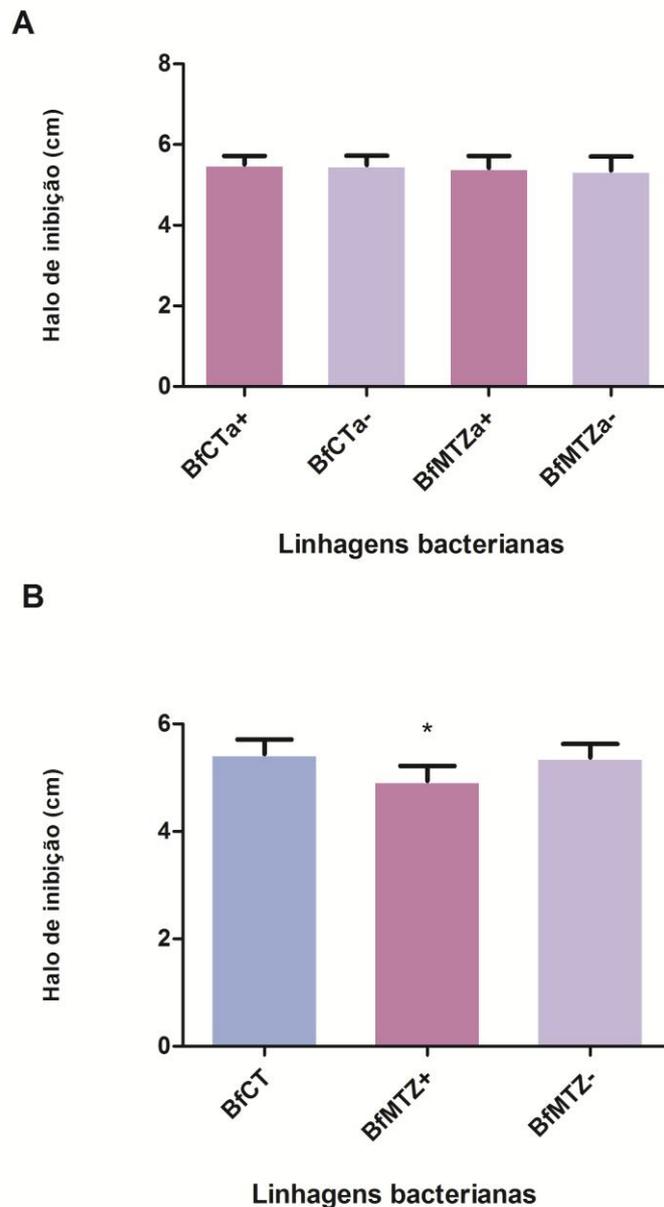


Figura 12: Efeito da concentração subinibitória de metronidazol na tolerância ao estresse oxidativo de *Bacteroides fragilis*. A - Experimento *in vivo*; B – Experimento *in vitro*. * indica estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

Considerando-se as linhagens de *B. fragilis* recuperadas do exsudato no interior dos corpos de prova implantados nos animais dos grupos CP e GE, bem como cultivados *in vitro* na presença ou ausência da droga, não foram observadas alterações nos perfis bioquímicos, em nenhuma condição, após utilização do kit de

identificação bacteriana Api20A, para avaliação da interferência do metronidazol em habilidades bioquímicas bacterianas (Tabela 2).

Tabela 2 – Características bioquímicas da linhagem parental *Bacteroides fragilis* ATCC 43859 (ETBF) e linhagens selecionadas após exposição a concentrações subinibitórias.

Reações ^a																			
	I	U	G	M	L	M	S	X	A	G	E	G	C	M	M	R	S	R	T
Linhagens	N	R	L	A	A	A	A	Y	R	E	S	L	E	N	L	A	O	H	E
	D	E	U	N	C	L	L	L	A	L	C	Y	L	E	Z	F	R	A	R
ETBF	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZ+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZ-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-

IND: indol; URE: urease; GLU: D-glucose; MAN: D-manitol; LAC:D-lactose; MAL: D-maltose; SAL: salicina; XYL: D xilose; ARA: L-arabinose; GEL: gelatina; ESC: esculina; GLY:glicerol; CEL:D-celobiose; MNE: D-manose; MLZ:D-melezitose; RAF:D-rafinose; SOR:D-sorbitol; RHA:L-ramnose; TER: D-trehalose. + :Reações positivas; -: reações negativas.

5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Pela abordagem metodológica utilizada (genotipagem por AP-PCR com oligoiniciadores aleatórios OPA16 e OPA18), não foram observadas bandas de DNA polimórficos entre as diferentes linhagens de *B. fragilis* recuperadas tanto do exsudato no interior dos corpos de prova implantados nos animais dos grupos CP e GE, bem como cultivados *in vitro*, na presença ou ausência da droga (Figura 13).

Embora com a utilização do oligoiniciador OPA16 tenha sido possível a observação da presença de bandas diferenciais (Figura 13B), sugerindo DNA polimórfico, este perfil de bandeamento não foi reprodutível nas três réplicas técnicas dos experimentos de AP-PCR executados. Tais variações não foram observadas pela utilização do oligoiniciador OPA18 (Figura 13A), que resultou em perfil de bandeamento altamente reprodutível nas diferentes reações.

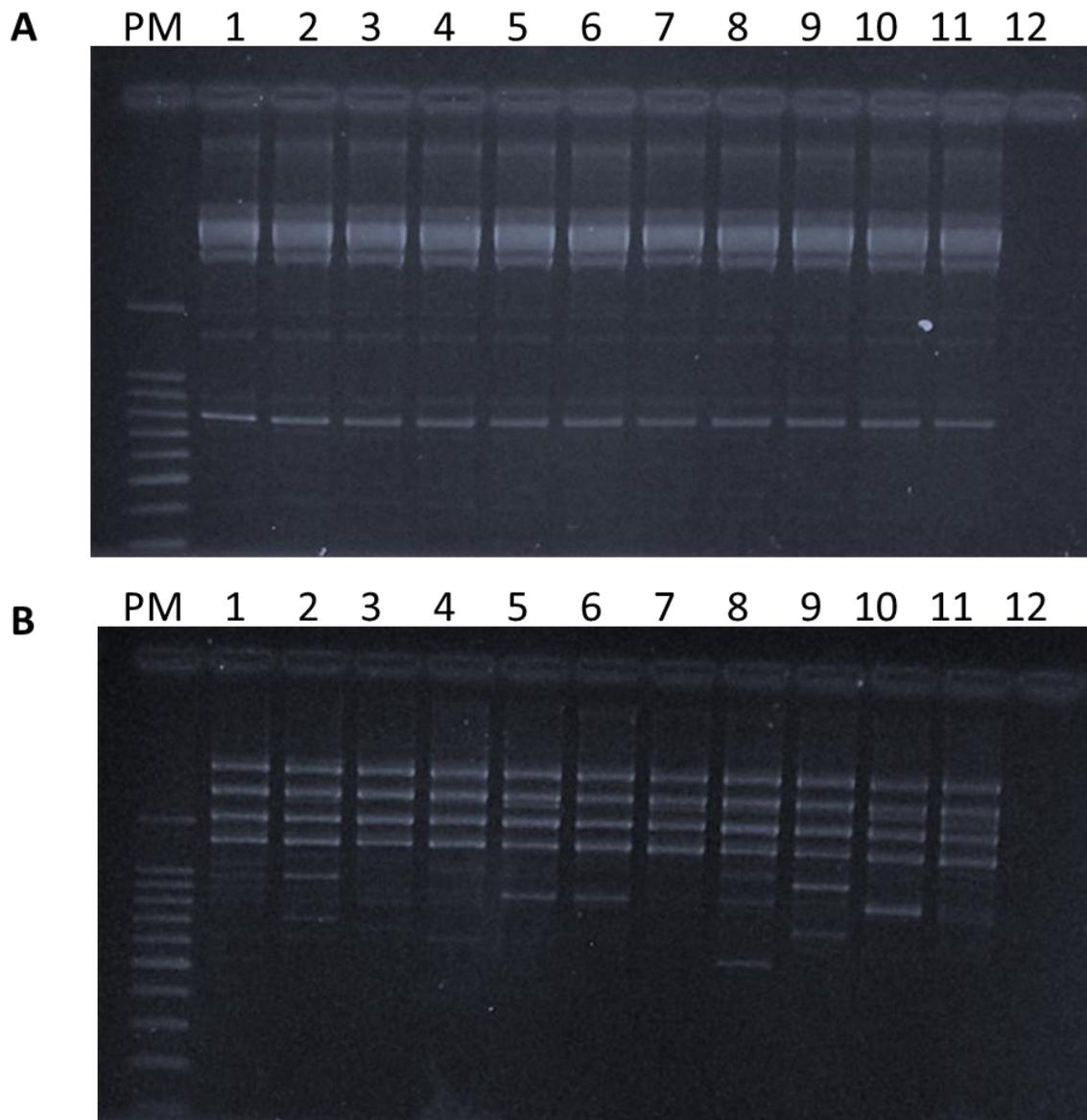


Figura 13. Perfil de bandejamento por AP-PCR das linhagens selecionadas. A – Perfil de bandejamento formado pela utilização do oligoiniciador OPA18. B – Perfil de bandejamento formado pela utilização do oligoiniciador OPA16. PM (padrão de peso molecular); 1 - ETBF; 2 - BfMTZ + ; 3 - BfMTZ- ; 4 e 5 - BfMTZa + ; 6 e 7 - BfCTa+; 8 e 9 - BfMTZa - ; BfCTa-; 10 e 11 - BfCTa-; 12 – Branco.

5.5 OBTENÇÃO DE RNA PROCARIOTO PARA ESTUDOS DE ANÁLISE TRANSCRICIONAL

A fim de obter RNA procarioto em altas concentrações e grau de pureza para estudos de transcriptômica, a partir do exsudato dos animais infectados, o procedimento experimental consistiu no teste de diferentes tratamentos para otimização do processo de extração. Entre os protocolos testados, a utilização de tratamento ultrassônico e subsequente centrifugação foi considerado o mais eficaz, como observado na figura 14. Considerando-se os agregados bacterianos formados antes do tratamento, observou-se a separação dos agregados com aumento do número de células individuais.

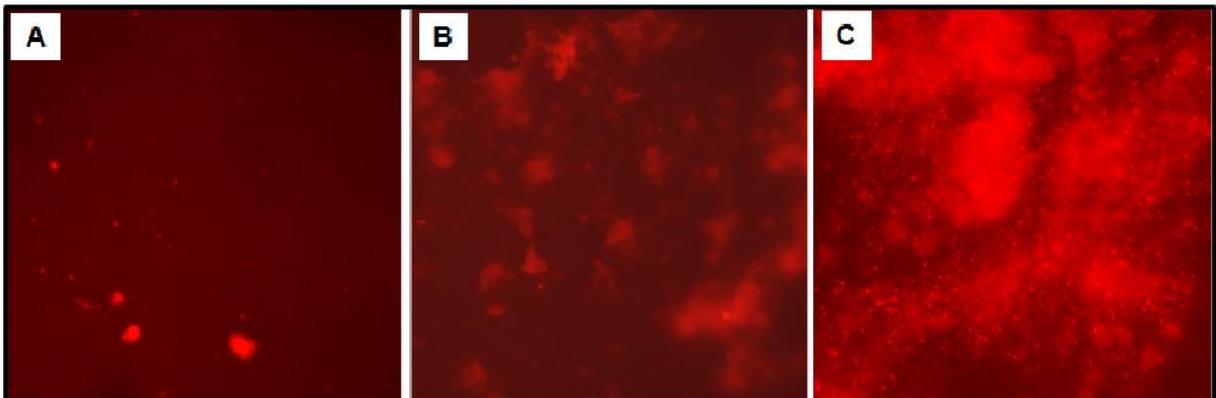


Figura 14. Fotomicrografias representativas dos três tratamentos diferentes avaliados neste estudo para aumentar o rendimento das células procarióticas após a técnica de FISH: centrifugação (A), sonicação (B), ambos centrifugação e sonicação (C). Ampliação original, 1000x.

O tratamento no exsudado não foi adequado para se obter o RNA de boa qualidade (RIN < 5.0) (Figura 15A). Em contraste, o eletroforegrama de extratos *in vitro* considerados controle positivo para a purificação de RNA mostrou alta integridade do ácido nucleico (RIN = 8.1) (Figura 15B).

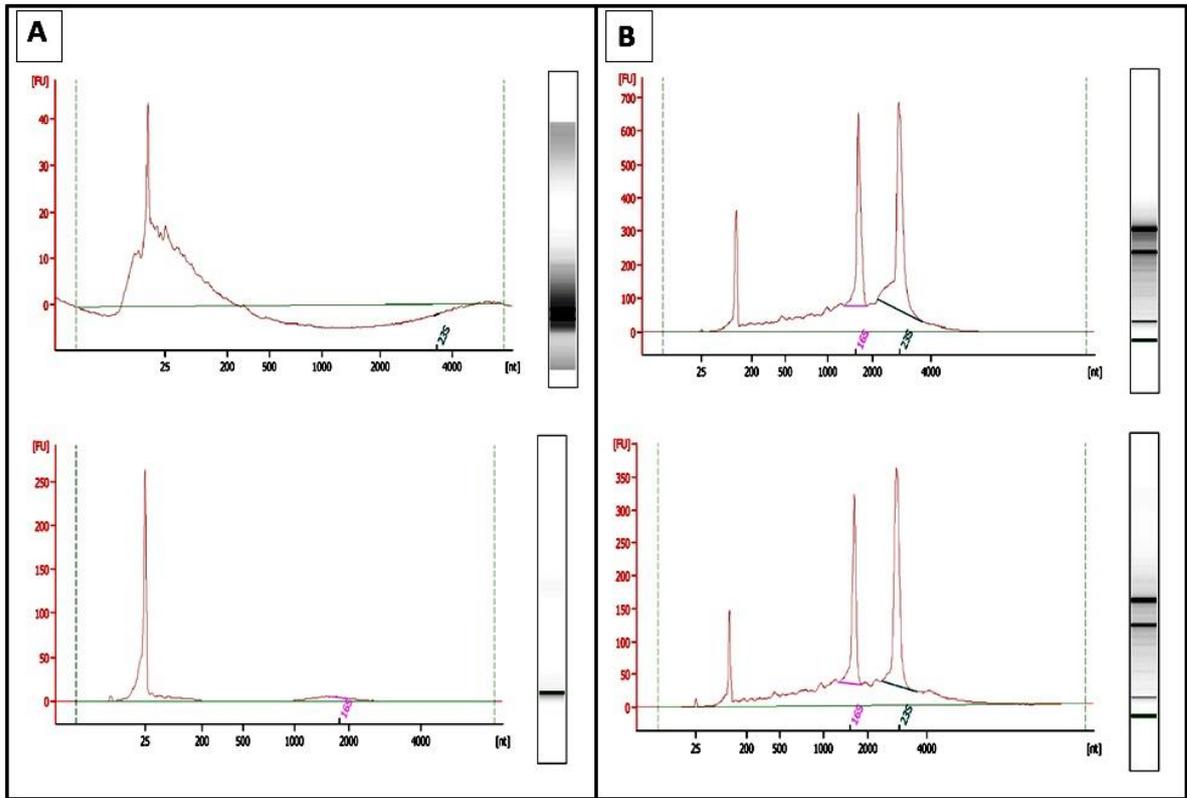


Figura 15. Eletroferograma representativo da avaliação da integridade de amostras de RNA extraídas em experimentos *in vivo* (A) e *in vitro* (B) através de eletroforese em chip de microfluidos.

6 DISCUSSÃO

6.1 MODELO EXPERIMENTAL E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

De maneira geral, os ensaios que envolvem a manipulação microbiana em condições de laboratório (*in vitro*) e que se baseiam na busca de características e comportamento frente a diferentes estímulos, tanto biológicos, quanto químicos e físicos, têm sido extremamente úteis e proporcionam informações relevantes sobre os mecanismos da patogênese bacteriana, embora não reproduzam de fato muitos dos aspectos das interações patógeno-hospedeiro. Estes modelos laboratoriais de estudo são flexíveis e exigem infraestrutura material, na maioria das vezes, de custo mais baixo ou mais simples, ao se comparar com os modelos animais. Contudo, não permitem avaliar a evolução e variáveis envolvidas nos processos em condições reais das interações patógeno-hospedeiro (CHIANG, MEKALANOS e HOLDEN, 1999; GREKO et al., 2003).

Em estudos *in vivo* de interação, o patógeno encontra no hospedeiro um ambiente real, muitas vezes completamente diferente daquelas condições laboratoriais controladas dos ensaios em cultura. Nestas situações, bactérias exibem um comportamento variado nos pontos da infecção, particularmente no contexto de uma resposta imune em desenvolvimento, quando as pressões são diferenciadas e o microrganismo pode alterar seu comportamento (CHIANG, MEKALANOS e HOLDEN, 1999).

Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo mostram a importância dos estudos *in vivo* para entendimento da real extensão dos fenômenos envolvidos na resposta bacteriana às drogas e a outras condições de estresse. Considerando-se a problemática da resistência bacteriana e da amplitude dos temas a ele relacionados, os pesquisadores vêm demonstrando alterações nos perfis morfológicos e fisiológicos de microrganismos quando em contato com drogas antimicrobianas, muitas vezes postulando as consequências deste fenômeno para a

relação bactéria-droga-hospedeiro (LORIAN e GEMMEL, 1994; CHEN et al., 2005; DINIZ et al., 2000b; DINIZ et al., 2004; SILVESTRO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SANTOS et al., 2007; SANTOS, et al., 2010; SOUZA-FILHO et al., 2012; FREITAS et al., 2015)

É aceito que durante a terapia antimicrobiana, concentrações residuais, entre as quais subinibitórias de drogas sejam detectáveis em diferentes sítios anatômicos, sobretudo na luz intestinal (DAVIES e DAVIES, 2010). Esta exposição microbiana, especialmente da microbiota residente, aos antimicrobianos durante as diferentes etapas da vida dos hospedeiros são inevitáveis, principalmente ao considerar-se automedicação e prescrição de terapias inadequadas (DAVIES e DAVIES, 2010). Dessa forma, acredita-se que concentrações subinibitórias de drogas antimicrobianas possam provocar alterações globais na morfologia, fisiologia e, eventualmente, genética (regulação e aquisição de novas informações) de microrganismos. Entre as abordagens metodológicas para estudo destas alterações microbianas às pressões seletivas impostas pelos antimicrobianos, seja em concentrações terapêuticas ou residuais, a literatura enumera o emprego da microbiologia clássica baseada em técnicas dependentes de cultivo e técnicas moleculares independentes de cultivo, como análise de expressão gênica ou proteômica, dentre outras (DAVIES, SPIEGELMAN e YIM, 2006).

Em nosso estudo, o modelo proposto para avaliação do comportamento bacteriano após exposição à concentração subinibitória de antimicrobianos, mostrou-se adequado para o cultivo de *B. fragilis* e avaliação da resposta à pressão seletiva imposta pelo metronidazol. O metronidazol é considerado um antimicrobiano que possui alta toxicidade seletiva em terapia antianaeróbica, por ser inócuo e sem atividade no hospedeiro, apresentando-se ativo apenas no interior de células que desenvolvem metabolismo em condições de baixo potencial redox (RASMUSSEN BUSH e TALLY, 1997; DINIZ et al., 2004). Neste modelo, não foram observados sinais de extravasamento do exsudato acumulado no corpo de prova que serviu de substrato para desenvolvimento dos *B. fragilis* inoculados, durante todo o período experimental. Apesar disso, foi observada a presença de infiltrado inflamatório, provavelmente inerente à aos antígenos bacterianos inoculados na nova cavidade formada nos hospedeiros (corpo de prova), inicialmente isenta de contaminação. No exsudato acumulado no interior dos corpos de provas dos animais do grupo controle negativo, sem inoculação bacteriana, foi observado pequeno infiltrado inflamatório.

O modelo utilizado neste estudo já foi descrito para o estudo de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* em coelhos, para avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica de antimicrobianos e avaliação da concentração inibitória mínima (XUAN et al., 2001; BAMBERGER et al., 2002; CUI et al., 2006). Lobo et al. (2013) também utilizaram o modelo para avaliação da expressão de genes de *B. fragilis* durante infecção extraintestinal. Estes modelos são dependentes de procedimento cirúrgico experimental dispendioso, têm fornecido informações vitais sobre o progresso de infecção, farmacodinâmica de antibióticos e comportamento bacteriano frente à xenobióticos. Em nosso estudo, este modelo foi proposto, ainda, para o estudo da patogênese bacteriana, pela avaliação de aspectos da biologia microbiana após seu reisolamento, bem como parâmetros histológicos e da resposta do hospedeiro durante a infecção experimental.

Ao se avaliar o padrão de crescimento bacteriano no corpo de prova, observou-se que *B. fragilis* alcançou níveis populacionais ascendentes desde o momento do inóculo por até 16 dias. Duas abordagens metodológicas foram utilizadas, contagem de unidades formadoras de colônia em placas e reação de PCR quantitativo (qPCR). A utilização dessas duas abordagens metodológicas justifica-se pela sua complementariedade, ao se considerar a especificidade da técnica de PCR e a demonstração de que os microrganismos permaneceram viáveis durante todo o período experimental, pela sua recuperação em cultura.

Nos animais tratados com metronidazol, os resultados mostraram que, em concentração subinibitória, o metronidazol não foi capaz de interromper a multiplicação bacteriana, especialmente após o término do tratamento com o antimicrobiano. Acredita-se que este dado seja altamente relevante e suscita discussão ampla sobre alterações na estrutura da comunidade microbiana de diferentes ecossistemas impactados com concentrações subinibitórias de antimicrobianos, o que pode resultar em desequilíbrio populacional ou de grupos bacterianos.

Apesar da inexistência de dados da literatura que possam alimentar a discussão acerca desse tema, é aceito que diferentes doenças sistêmicas estão relacionadas com alteração na estrutura da comunidade bacteriana em ecossistemas, como o intestinal. Entre essas doenças citam-se doença inflamatória intestinal, diabetes tipo II, síndrome do cólon irritável, neoplasias do trato gastrointestinal, alergias respiratórias, autismo e obesidade (DUNCAN et al., 2008;

FINEGOLD, 2008; FINEGOLD et al., 2010; ÖHMAN e SIMRÉN, 2010; KHOR, GARDET e XAVIER, 2011; KINROSS, DARZI E NICHOLSON, 2011).

6.2 INTERFERÊNCIA DO METRONIDAZOL NA INTERAÇÃO BACTÉRIA-HOSPEDEIRO

É bem estabelecido que as interações patógeno-hospedeiro podem ou não resultar em dano ao hospedeiro. Neste sentido, a citotoxicidade ou dano aos tecidos do hospedeiro são componentes da virulência microbiana (CASADEVALL E PIROFSKI, 1999, LEDERBERG, 1999). Neste estudo, para avaliação da interferência de concentrações subinibitórias de metronidazol nas interações bactéria-hospedeiro, parâmetros como alterações sanguíneas, teciduais e a modulação do sistema imunológico, pela avaliação transcricional da expressão de citocinas no exsudato obtido a partir dos corpos de prova, foram utilizados como marcadores inflamatórios em resposta a *B. fragilis*.

Estudos anteriores têm sugerido que diferentes linhagens bacterianas, incluindo *B. fragilis* selecionadas pela exposição *in vitro* a diferentes concentrações de antimicrobianos, como beta-lactâmicos, clindamicina, cloranfenicol, quinolonas e ainda metronidazol, incluindo concentrações subinibitórias, estão associadas a alterações qualitativas e quantitativas de diferentes intensidades no hospedeiro, após avaliação por desafios experimentais (DINIZ *et al.*, 2000; DINIZ et al. 2003, SANTOS et al., 2007b, SOUZA-FILHO et al., 2012; FREITAS et al., 2015). Entretanto, estes dados suscitam reflexões sobre as reais implicações do fenômeno quando os microrganismos são expostos às diferentes concentrações de drogas antimicrobianas em situações reais de infecção.

Neste estudo, os dados obtidos demonstraram que, de fato, os padrões de resposta bacteriana às diferentes formas de pressão seletiva imposta por antimicrobianos, neste caso metronidazol, podem resultar em diferentes alterações na biologia microbiana. Embora as espécies de *Bacteroides* sejam da microbiota residente, estes microrganismos estão frequentemente associados a infecções de alta morbidade e mortalidade. No grupo, vários fatores de virulência têm sido

descritos, além dos componentes relacionados à interferência direta com o sistema imunológico, como a produção de fatores de invasão como proteases e outras enzimas hidrolíticas; fatores de proteção, como a produção de catalases, peroxidases, superóxido-dismutase; fatores de modulação da população microbiana como as bacteriocinas; além de estruturas de aderência para colonização de superfícies (PETERSON, 1996; DONLAN, 2001; WEXLER, 2007; WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010; WILSON, ANDERSON, e BERNSTEIN, 2015).

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

Considerando-se a resposta do hospedeiro, no modelo experimental proposto, os resultados obtidos mostraram que o processo infeccioso extra intestinal resultante da inoculação de *B. fragilis* nos corpos de prova permaneceu localizado. Entretanto, alterações evidentes foram observadas, sobretudo na qualidade dos exsudatos. Um grande infiltrado inflamatório foi observado nos tecidos formados no corpo de prova, em ambos os grupos de animais desafiados com *B. fragilis*, particularmente após os oito dias de tratamento.

Uma resposta inflamatória rápida com a produção de IL-1- α , IL-6 e IL-8 local foi observada no exsudato antes do tratamento com metronidazol. Estas citocinas estão envolvidas principalmente na quimiotaxia, sendo a produção de TNF- α e IL-8 as principais citocinas relacionadas com a migração de neutrófilos, como observado nos tecidos presentes no corpo de prova. Além disso, estas citocinas são relacionadas, ainda, a fagocitose e produção de proteínas de fase aguda, produzidas principalmente por macrófagos e monócitos, conduzindo a uma resposta inflamatória (KIM et al., 2002).

Foram observados, ainda, níveis aumentados de TNF- α principalmente no exsudato dos animais do grupo CP. Essa citocina tem ação pro-inflamatória pleiotrópica, envolvida na migração de leucócitos e indução da produção de outras citocinas. As citocinas pró-inflamatórias são necessárias e muitas vezes benéficas

para o hospedeiro durante um processo infeccioso, entretanto, aumento nos seus níveis de expressão pode estar diretamente relacionado às manifestações de doença como choque e lesão tecidual (TRACEY E CERAMI, 1994).

Em outros estudos, infiltrado inflamatório produzido durante infecção por *B. fragilis* tem sido observado, principalmente em infecções no trato gastrointestinal, assim como a simples exposição de células intestinais à toxina purificada das linhagens enterotoxigênicas, como a *B. fragilis* ATCC 43859, induz a produção de IL-8 (SANFILIPPO et al., 2000).

Além disso, observou-se altos níveis de IL-6 tanto no GE quanto no CP 16 dias após o desafio bacteriano. Embora essa citocina tenha sido caracterizada principalmente como pró-inflamatória, ela pode exercer atividade anti-inflamatória em alguns processos, incluindo a redução da produção de TNF, o que realmente foi observado. Ainda, de acordo com o sugerido na literatura, níveis aumentados de IL-1 α , como observado em 16 dias no CP, podem estar relacionados, também a um aumento da migração de células inflamatórias (TILG, DINARELLO e MIER, 1997; FUSTER e WALSH, 2014).

Por outro lado, aumento dos níveis de expressão de IL-10, como observado, especialmente no GE após 16 dias de infecção, pode ser benéfico tanto para o hospedeiro quanto para o patógeno, uma vez que a citocina anti-inflamatória limita os danos causados ao tecido do hospedeiro, e o patógeno pode favorecer-se pela atenuação da resposta imune do hospedeiro, assim facilitando a infecção persistente (COHEN-PORADOSU et al., 2011). Coincidentemente ao aumento dos níveis de expressão de IL-10 no GE, observou-se uma diminuição da inflamação no tecido analisado do corpo de prova, o que pode ter favorecido o aumento da população bacteriana no interior da cápsula.

Alguns patógenos são capazes de interferir na resposta imune do hospedeiro, mediando a produção de citocinas anti-inflamatórias. Por exemplo, micobactérias induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β , as quais atenuam a resposta imune do hospedeiro através de mecanismos como indução de células T regulatórias e inibição da ativação de macrófagos (HORNEF et al., 2002; MEGE et al., 2006; RAHMAN e MCFADDEN, 2006). *B. fragilis* induz a produção de IL-10 durante a colonização intestinal principalmente pelas células T regulatórias, entretanto, durante o processo infeccioso, a produção tem sido relacionada aos macrófagos para diminuição do processo inflamatório, sobrevivência

do hospedeiro e contenção da infecção (COHEN-PORADOSU et al., 2011; BAJPAI et al. 2014)

Nesse estudo, foi observado ainda, no exsudato obtido a partir do corpo de prova dos animais do GE, um maior número de células bacterianas associadas a leucócitos, assim como uma maior carga bacteriana total. Esses dados poderiam sugerir, tal como já relatado para *B. fragilis*, uma modulação da resposta imunológica, neste modelo, para que não ocorressem danos exacerbados ao hospedeiro, com consequente manutenção do processo infeccioso, visto que a morte do hospedeiro já foi relatada devido a resposta pró-inflamatória contra *B. fragilis* (COHEN-PORADOSU et al., 2011).

Como reflexo, na avaliação sanguínea, embora alterações no número de neutrófilos e dos leucócitos totais tenham sido identificadas, não foram verificadas grandes alterações entre os grupos, o que poderia sugerir uma infecção com padrões alterados a nível local. Bajpai et al. (2014) descreveram uma resposta imune local exacerbada, quando comparada ao soro, ao estudarem diferentes microrganismos em abscesso cerebral. Assim como o abscesso, o modelo experimental consiste em uma lesão supurativa fechada por uma cápsula com tecido fibroso bem vascularizado, e a resposta inflamatória mais intensa foi detectada em seu exsudato.

Os parâmetros analisados no hemograma, como hematócrito, contagem de hemácias, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, RDW geralmente são associados com infecções relacionadas a hemorragia, à destruição dos glóbulos vermelhos ou então resultar da depressão da medula óssea, características que não estão presentes em infecções causadas por *B. fragilis*, no que se refere ao modelo de infecção (JOSEPH et al., 2012). Ainda, outro parâmetro analisado, as alterações no número de plaquetas, pode estar associado a infecções que envolvem principalmente sepse (SEELEY, MATTHAY E WOLTERS, 2012). Entretanto, o número de plaquetas não foi alterado nos grupos estudados, o que pode ainda confirmar a contenção do processo infeccioso, uma vez que o extravasamento do corpo de prova poderia levar a um quadro mais grave da infecção.

6.3 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA, PADRÕES BIOQUÍMICOS E FISIOLOGIA BACTERIANA

Com uma abordagem contemporânea relacionada às alterações ecológicas induzidas por drogas antimicrobianas, questões relacionadas ao fenômeno da resistência envolvem a discussão sobre a ocorrência de possíveis variações celulares na resposta, com reflexo nos padrões morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (DINIZ et al., 2000; FREITAS et al., 2015). Em nosso estudo, o experimento *in vitro* seguindo o mesmo desenho experimental foi proposto como controle para o estudo de parâmetros celulares das amostras selecionadas nos diferentes momentos da infecção experimental. De maneira geral, comparando-se as duas situações, observou-se que as linhagens de *B. fragilis* não apresentaram alterações quando expostas *in vivo* a concentrações subinibitórias de metronidazol. Esses dados permitem reafirmar o sugerido anteriormente sobre a extensão dos fenômenos observados *in vitro*, quando em condições reais de infecção (GERBER et al., 2008).

Entre as diferentes alterações celulares associadas ao fenômeno da resistência, mudanças estruturais como alterações morfológicas são descritas, sendo a filimentação bacteriana a mais evidenciada. Acredita-se que o fenômeno seja decorrente de um processo de reprodução continuado na ausência de divisão celular, o que resulta em bactérias alongadas e com múltiplas cópias do cromossomo. A filimentação pode ser acompanhada por alterações metabólicas, danos no DNA e mutações (JUSTICE et al., 2008; BOS et al., 2015).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado a filimentação nas células bacterianas quando expostas a drogas antimicrobianas *in vitro* (DINIZ ET AL., 2000; SOUZA FILHO ET AL., 2012; FREITAS ET al., 2015). Diniz et al. (2000) observaram a filimentação de *Bacteroides distasonis* quando expostos a altas concentrações de metronidazol. Souza Filho et al. (2012) também relataram filimentações em células de *Fusobacterium* quando expostas a CSI de metronidazol, β -lactâmicos e clindamicina, sendo que os β -lactâmicos foram as drogas que mais provocaram alteração celular. Freitas et al. (2015) demonstraram filimentação de *B. fragilis* quando expostos principalmente aos β -lactâmicos.

Jacques et al. (1991) mostraram que linhagens de *Pasteurella multocida* quando expostas a concentrações subinibitórias de penicilina apresentaram alterações morfológicas e de crescimento. Por outro lado, linhagens de *Bordetella bronchiseptica* não apresentaram mudanças significativas quando submetidas à mesma droga. Os autores sugerem que o fenômeno depende não só do tipo da droga utilizada, mas também do microrganismo, e principalmente da interação droga-microrganismo.

Fang et al. (2002) relacionaram as mudanças morfológicas encontradas em *Bacteroides thetaiotaomicron* expostas a cefoxitina e relacionaram estas alterações às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). As PBPs são os alvos da ligação dos agentes β -lactâmicos e são essenciais para o crescimento das bactérias. A inativação de PBP-3 tem, como resultado, o crescimento com longos filamentos não septados. Entretanto, ainda não se conhece a extensão e consequências destas formas aberrantes de microrganismos, bem como fatores relacionados à sua virulência.

Um estudo com *E. coli* revelou a capacidade de evasão do sistema imunológico frente a alongação das células bacterianas, e relacionou a filamentação à presença de proteínas inibidoras da divisão celular sulA, sendo que sua ausência atenuou a virulência do microrganismo (JUSTICE, 2008).

Prashar et al. (2013) demonstraram alteração no tempo de fagocitose de linhagens filamentadas, o que aumentou a capacidade de *Legionella pneumophila* de replicar no interior de macrófagos, pois houve um atraso na atividade microbicida até o completo engolfamento do microrganismo.

Outros autores também evidenciaram formas aberrantes de linhagens bacterianas incluindo *Bacteroides* spp. e outros gêneros, tanto Gram negativos quanto Gram positivos, quando em contato com drogas antimicrobianas. De maneira geral, as alterações incluem a filamentação celular e podem ser reversíveis quando os microrganismos são cultivados na ausência de drogas. Estas alterações tem sido relacionadas a alteração nos padrões de degradação e reciclagem de proteínas, mudanças nas características bioquímicas e fisiológicas dos microrganismos e inibição de enzimas autolíticas, que atuam no início da separação celular, causando o alongamento (KLEIN e LUGINBUHL, 1977; GUSS e BAWDON, 1984; CAVALCANTI et al., 1991; LORIAN E GEMEL, 1994; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2003; FONSECA et al., 2004; SANTOS et al., 2007 ; FREITAS et al., 2015).

Outro fator considerado recentemente é que as bactérias filamentosas podem interferir no processo de resistência aos antibióticos através da resposta SOS, um estado de alta atividade de reparo de DNA e mutagênese, quando em contato com CSI de antimicrobiano. Dessa forma, filamentos com múltiplas cópias de DNA criariam um ambiente onde a evolução pode prosseguir através da formação de cromossomos mutantes, devido à resposta mutagênica SOS e possível recombinação (BOS et al., 2015).

É de se considerar, ainda, que a exposição de organismos unicelulares de ciclo de vida curto a condições ambientais de estresse pode, por muitas vezes, resultar em alterações no comportamento fisiológico, com reflexos nos resultados dos testes convencionais de avaliação bioquímica e fisiológica. Em relação aos parâmetros relacionados ao metabolismo bacteriano, estudos têm demonstrado que a presença de CSI de antimicrobianos ou outros fatores de estresse, como o oxidativo, podem alterar características bioquímicas dos microrganismos que podem até mesmo conduzir a erros de identificação utilizando métodos convencionais. Considerando o significado clínico da bactéria, a sua identificação precisa é de grande importância não só para fins taxonômicos, mas também para a escolha de um regime de tratamento adequado (SILVA et al., 2007; SOUZA FILHO et al., 2012). Contudo, com a utilização do kit API 20^a, não foram verificadas alterações nas linhagens *in vitro* e nas linhagens *in vivo*.

Silvestro et al. (2006) também não encontraram alteração em relação ao metabolismo de *B. fragilis* quando em contato com CSI de clindamicina. Entretanto, Souza Filho et al. (2012) relataram que *F. nucleatum*, quando em contato com metronidazol em CSI, apresentou alterações em suas características bioquímicas, sugerindo que essas alterações poderiam ter reflexo no potencial patogênico e interferir com a relação bactéria-hospedeiro. Freitas et al. (2015) também observaram alterações relacionadas ao metabolismo de *B. fragilis* quando expostos a CSI de antimicrobianos e sugeriram que estes resultados estariam relacionados a regulação da expressão de genes.

Os microrganismos muitas vezes crescem na presença de CSI de antimicrobianos, que embora não sejam capazes de inativá-los, são potencialmente capazes de alterar as características químicas e físicas da superfície celular e, conseqüentemente, a funcionalidade e a expressão de algumas propriedades de virulência, como a adesão, formação de biofilme, hidrofobia e motilidade (MAJTÁN

et al., 2008). Nos experimentos *in vivo*, observou-se que *B. fragilis* não apresentou alteração na habilidade de formação de biofilme após exposição ao metronidazol, porém, quando a droga foi retirada, houve uma redução significativa na sua formação.

Por outro lado, nos experimentos *in vitro*, observou-se um aumento significativo na formação de biofilme pelas linhagens expostas ao antimicrobiano. Freitas et al. (2015) relataram diminuição nas propriedades agregativas bacterianas quando expostas aos antimicrobianos, principalmente a clindamicina. Segundo Souza Filho et al. (2012), linhagens de *Fusobacterium nucleatum* expostas à CSI de clindamicina apresentaram aumento na formação de biofilme, o que sugere que a clindamicina induz a expressão de fatores de aderência na superfície das bactérias, além de secreção de poli- γ -glutamato. Por outro lado, linhagens expostas a β -lactâmicos apresentaram redução significativa na formação de biofilme, sugerindo diminuição na concentração de moléculas de aderência à superfície e secreção de poli- γ -glutamato devido à ação desses fármacos.

Silva et al. (2014) observaram que linhagens de *B. fragilis* isoladas de cães apresentaram redução na habilidade de formação do biofilme na presença de CSI de imipenem, e na presença de clindamicina, identificaram aproximadamente 50% de inibição nesta habilidade. Em contrapartida, esses mesmo autores observaram uma capacidade de indução da formação de biofilme em duas linhagens de *B. fragilis* na presença de enrofloxacina.

Embora neste estudo alterações significativas não tenham sido relatadas para as linhagens de *B. fragilis* isoladas nos diferentes momentos da infecção experimental, notou-se um padrão de agregação celular tanto no exsudato obtido dos corpos de provas dos animais do grupo CP, quanto do GE. Considerando-se o GE, esse padrão de agregação foi também observado após a retirada da droga. A presença destes agregados bacterianos poderia favorecer a bactéria na manutenção do processo infeccioso sem a necessidade de filamentação ou regulação positiva da sua habilidade de formação de biofilme. Assim, a capacidade de *B. fragilis* agregar tem sido relacionada à infecção, embora esse perfil de agregação não ter sido evidenciado no teste *in vivo*. Blake et al (1989) demonstraram agregação celular em seu estudo sobre perfil de agregação de linhagens de *B. fragilis in vitro*.

Outra característica avaliada, relacionada à virulência bacteriana, principalmente em anaeróbios, é a capacidade de sobreviver na presença de

espécies reativas de oxigênio e do próprio oxigênio. Isto se deve a produção de enzimas como catalase, peroxidases e superóxido dismutase. *B. fragilis* parece produzir um único tipo de catalase, que é expresso em situações de estresse, mas outras enzimas também são produzidas nestas condições. A aerotolerância é uma adaptação de *B. fragilis* que favorece infecções extra-intestinais e promove infecções oportunistas. As enzimas catalase e superóxido dismutase, presentes em *B. fragilis*, estão associados à proteção contra a toxicidade das formas reativas do oxigênio (BAUGHN e MALAMY, 2004).

Nesse estudo, as linhagens recuperadas *in vivo* não apresentaram alterações nos padrões de tolerância ao estresse oxidativo. Entretanto, as linhagens expostas ao metronidazol em condições laboratoriais *in vitro*, mostraram aumento na tolerância ao estresse, e com a retirada da droga a tolerância diminuiu. O antimicrobiano além de interferir em sua morfologia, que pode contribuir para maior tolerância ao peróxido, pode também influenciar no metabolismo bacteriano, levando a uma maior produção de enzimas capazes de degradarem estes compostos tóxicos. Em um estudo *in vitro* com *P. aeruginosa* e concentração subinibitória da associação de piperacilina / tazobactam foi relatada uma diminuição na susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio (ROCHA et al., 1996; FONSECA et al.2004).

6.4 ESTABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS

A técnica de AP-PCR é utilizada na bacteriologia de anaeróbios para estudos relacionados à detecção de polimorfismos no genoma celular e para avaliação de semelhança entre organismos relacionados taxonomicamente (CAMARENA et al.,1995; GEORGE et al., 1997; SONG, 2005; SANTOS et al., 2007).

Neste estudo, a combinação de dois oligoiniciadores inespecíficos e aleatórios permitiu a verificação de grande proximidade clonal entre as diferentes linhagens bacterianas avaliadas nas duas diferentes condições de cultivo, se

comparada à linhagem parental. A sensibilidade desta técnica pode estar relacionada a sutis alterações no DNA de várias espécies de seres vivos, incluindo as bactérias. A detecção destas alterações pode contribuir para o entendimento da resposta bacteriana frente à pressão exercida pelas drogas antimicrobianas, como o surgimento de linhagens resistentes e alterações decorrentes deste fenômeno (WELSH e MCCLELLAND, 1990). Assim, de acordo com Eribe e Oslen (2000), os oligoiniciadores iniciadores OPA 16 e OPA 18 seriam suficientes para avaliação clonal de populações de *B. fragilis*.

Estudos têm demonstrado que embora possa haver alterações morfológicas, fisiológicas e nos padrões de virulência bacterianos após exposição a antimicrobianos, ou a algum tipo de estresse ambiental, polimorfismos no DNA não são necessariamente detectados (FANG et al., 2002; SILVA et al., 2007). Por outro lado, Santos et al. (2007) detectaram variações nos padrões de bandas gerados por AP-PCR após a exposição de *Prevotella intermedia* ao oxigênio molecular, assim como Souza Filho et al (2012) encontraram alterações genotípicas em *F. nucleatum* quando expostos a diferentes drogas antimicrobianas, e estes dados sugerem a ocorrência não apenas de uma resposta fenotípica adaptativa.

Mais recentemente, em estudos *in vitro* de exposição de *B. fragilis* a concentrações subinibitórias de diferentes drogas antimicrobianas com a utilização da técnica de AP-PCR, o perfil de bandeamento de DNA foi semelhante e reprodutível entre as linhagens bacterianas selecionadas (FREITAS et al. 2015).

6.5 ISOLAMENTO DO RNA PROCARIOTO NO EXSUDATO

No mundo bacteriano, a plasticidade metabólica e adaptativa a alterações ambientais pode estar relacionada com a diversidade genética encontrada. Esta diversidade genética esta associada à regulação da expressão gênica ou ainda ao ganho de novas informações, que podem ser oriundas de eventos mutacionais ou de recombinação genética, sobretudo durante a detecção de linhagens resistentes as drogas antimicrobianas.

Técnicas contemporâneas, como o estudo de proteomas, transcriptomas ou genomas funcionais podem indicar, de forma sensível e reprodutível, que genes são diferencialmente expressos em uma determinada fase ou condição de crescimento (DANCHIN E SEKOWSKA, 2000; CAIN, SOLIS, CORDWELL, 2014).

Azhikina et al. (2010) propuseram uma nova abordagem experimental para estudos sobre a interação bactéria intracelulares baseado no processo de clonagem. No entanto, este método é muito trabalhoso, dispendioso e pode proporcionar enviesamento da expressão diferencial de genes. Outra abordagem que pode ser utilizada é a dupla RNA-seq, que permite avaliar mudanças na expressão gênica do patógeno e do hospedeiro simultaneamente (WESTERMANN, GORSKI E VOGEL, 2012). Uma vez que esta estratégia é dispendiosa, diferentes tratamentos foram usados para reduzir o número de células eucarióticas e, portanto, aumentar o rendimento de RNA procariótico.

O procedimento experimental, que consistiu no tratamento ultrassônico e subsequente centrifugação, foi considerado o mais eficaz. As células bacterianas inicialmente agregadas mostraram-se mais dispersas. Assim, este tratamento resultou num aumento do número de células individuais de *Bacteroides* quando comparado com os outros tratamentos, centrifugação e tratamento ultrassônico, isoladamente.

Conforme observado neste estudo, a diminuição na densidade de células eucarióticas foi requerida para permitir um rendimento de RNA procariótico. Sabe-se que a manipulação do extrato de DNA/RNA é desaconselhável para evitar a fragmentação mecânica ou a degradação.

No que diz respeito às amostras complexas, tais como os fluidos biológicos e os fragmentos de tecido, a pré-separação dos agregados procarióticos/eucarióticos esperados irá assegurar solubilização bacteriana e uma baixa contaminação eucariótica. Estes passos metodológicos são de extrema importância, especialmente considerando os custos das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento que estão disponíveis e são fundamentais para utilização em estudos prospectivos sobre a relação bactéria-hospedeiro.

No entanto, o tratamento do exsudado (tratamento ultrassônico e subsequente centrifugação) não foi adequado para a obtenção de RNA de boa qualidade (RIN <5.0) para estudos de sequenciamento massivo, como RNA-seq, sugerindo assim que a extração de RNA total em amostras complexas seria

prejudicada na presença de exsudato (MUELLER, LIGHTFOOT, SCHROEDER, 2004).

Assim, sugere-se como alternativa para que a avaliação de genes transcritos de agentes patogênicos bacterianos em situação real de infecção, que as análises transcriptômicas sejam conduzidas com abordagens Dual RNA-*seq* (transcriptoma simultâneo entre patógeno e hospedeiro), com aumento da profundidade de cobertura. Com esta abordagem, seria possível obter um número suficiente de leituras de transcritos bacterianos. Apesar do custo alto, esta estratégia é sugerida para permitir os estudos *in vivo* de interação bactéria-hospedeiro por métodos independentes de cultivo sejam viáveis.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

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

Apesar dos avanços, os mecanismos moleculares e regulatórios envolvidos na resposta bacteriana a alterações ambientais como à presença de drogas antimicrobianas, diretamente relacionadas com a virulência bacteriana e com reflexo imediato para os seus hospedeiros humanos e animais, não são, ainda, bem compreendidos. Desta forma, investigações científicas direcionadas ao esclarecimento desses mecanismos são necessárias, sobretudo em modelos próximos às situações reais de exposição microbiana, para que se possa extrapolar com mais realismo os resultados obtidos.

Neste estudo observou-se comportamento diferenciado de microrganismo representativo da microbiota residente de seres humanos e outros animais (*B. fragilis*), frente à pressão seletiva imposta pelo metronidazol, se considerados experimentos *in vitro* e modelo experimental *in vivo*. Na primeira abordagem, os microrganismos mostraram maior plasticidade biológica, entretanto, os dados obtidos sugerem que em situação de infecção, essa plasticidade não evidente traz implicações para patogênese.

Em termos populacionais, é válido supor que a sobrevivência destes microrganismos nestes ambientes esteja relacionada à sua capacidade de adaptação, bem como resposta global ao ambiente encontrado no hospedeiro. Este ambiente inclui variáveis físicas químicas e biológicas inerentes dos diferentes hospedeiro, que seriam impossíveis de serem retratadas *in vitro*, considerando-se a limitação das técnicas laboratoriais.

Por outro lado, os estudos *in vitro* evidenciam e reforçam pelo observado neste estudo e pelo relatado na literatura, que qualquer agente ou condição que possa alterar os padrões bioquímicos, fisiológicos e genéticos de indivíduos de uma população poderia alterar os padrões de virulência dessa população. Espera-se, assim, que os dados obtidos neste estudo possam contribuir para diminuição das lacunas existentes sobre as reais implicações da resposta bacteriana às drogas na biologia bacteriana e seu impacto na interação bactéria-hospedeiro.

8 CONCLUSÕES

- O modelo de infecção experimental mostrou-se adequado para o cultivo de *B. fragilis* e avaliação de suas características morfológicas, dinâmica de crescimento e dos padrões celulares e imunológicos do hospedeiro;
- Durante o período de infecção experimental, *B. fragilis* permaneceu viável e em altos níveis, satisfatoriamente adequado a estudos tanto de microbiologia clássica baseada em cultivo microbiano, quanto de biologia molecular;
- Em situação real de infecção, a exposição a concentrações subinibitórias de metronidazol foi capaz de interferir com diferentes aspectos da biologia do *B. fragilis* suficientes para direcionar uma resposta específica do hospedeiro, evidenciadas pelos padrões celulares e histológicos, e pela expressão diferencial de citocinas, no modelo experimental proposto;
- A resposta de *B. fragilis* à pressão seletiva imposta pelo metronidazol se mostrou diferenciada ao considerar-se as duas condições experimentais;
- O metronidazol, em concentrações sub-inibitórias, não interfere com a integridade do genoma de *B. fragilis*, independente da condição de exposição bacteriana;
- Considerando o exudato produzido no modelo experimental como uma amostra biológica complexa, e a fragilidade das moléculas de RNA, pré-tratamentos para enriquecimento de células procariotas pode resultar na obtenção de grandes quantidades de RNA de baixa qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSSON, I.; NORD, C. E.; LUNDQUIST, P.; SJÖSTEDT, S.; EDLUND, C. 1999. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **44**(5), 629-640.
- American Society for Microbiology. 2000. Antimicrobial resistance: an ecological perspective. Report from the American Academy of Microbiology. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.
- ARTIS, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews Immunology**, **8**(6), 411-420.
- AZHIKINA, T. L.; SKVORTSOV, T. A.; RADAIEVA, T. V.; MARDANOV, A. V.; RAVIN, N. V.; APT, A. S.; SVERDLOV, E. D. 2010. A new technique for obtaining whole pathogen transcriptomes from infected host tissues. *Biotechniques*, **48**(2), 139.
- BAMBERGER, D. M.; HERNDON, B. L.; FITCH, J.; FLORKOWSKI, A.; PARKHURST, V. 2002. Effects of neutrophils on cefazolin activity and penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* abscesses. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **46**(9), 2878-2884.
- BANKS, C.; BATEMAN, A.; PAYNE, R.; JOHNSON, P.; SHERON, N. 2003. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. **The Journal of pathology**, **199**(1), 28-35.
- BAJPAI, A.; PRASAD, K. N.; MISHRA, P.; SINGH, A. K.; GUPTA, R. K.; OJHA, B. K. 2014. Distinct cytokine pattern in response to different bacterial pathogens in human brain abscess. **Journal of Neuroimmunology**, **273**(1), 96-102.
- BAUGHN, A. D.; MALAMY, M. H. 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. **Nature**, **427** : 441-444.
- BEACHEY, E. H.; EISENSTEIN; B. I. OFEK, I. 1982. Prevention of the adhesion of bacteria to mucosal surfaces influence of antimicrobial agents, In H. Eickenberg, H. Halm, and W. Opferkuch, **Influence of antibiotics on the host-parasite relationship**. Springer Verlag KG, Munich. 171-182.

BLAKE, M.; LLANO, M.; GIROTTI, M. J.; REID, G. 1989. Aggregation by fragilis and non-fragilis *Bacteroides* strains in vitro. **Journal of medical microbiology**, **28** (1), 9-14.

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

BOS, J.; ZHANG, Q.; VYAWAHARE, S.; ROGERS, E.; ROSENBERG, S. M.; AUSTIN, R. H. 2015. Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **112**(1), 178-183.

BREUIL, J.; DUBLANCHET, A.; TRUFFAUT, N.; SEBALD, M. 1989. Transferable 5-Nitroimidazole resistance in the *Bacteroides fragilis* group. **Plasmid**, **21**(2), 151-154.

CAIN, J.; SOLIS, N.; CORDWELL, S. 2014. Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. **Journal of Proteomics**, **97**, 265-286.

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

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

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

CASTELLI, M.; MALAGOLI, M.; RUBERTO, A. I.; BAGGIO, A.; CASOLARI, C., CERPELLI, C., ROFFIA, S. 1997. In-vitro studies of two 5-nitroimidazole derivatives. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **40**(1), 19-25.

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. 1976. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* and *B. vulgatus*: designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber). **International Journal of Systematic Bacteriology**, **26**: 230-237.

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

CESAR, D.E, 2002, Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação no estuário da Lagoa dos Patos/RS. Tese de Doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

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

CHIANG, S. L.; MEKALANOS, J. J.; HOLDEN, D. W. 1999. *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. **Annual Reviews in Microbiology**, **53**(1), 129-154.

CHUNG, D. R.; KASPER, D. L.; PANZO, R. J.; CHTINIS, T.; GRUSBY, M. J.; SAYEGH M. H.; TZIANABOS, A. O. 2003. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, **170**(4), 1958-1963.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for Antimicrobial Susceptibility Tests for Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Seventh Edition. **CLSI document M11-A7**, Wayne, Pennsylvania, USA.

COHEN-PORADOSU, R.; MCLOUGHLIN, R. M.; LEE, J. C.; KASPER, D. L. 2011. *Bacteroides fragilis*–stimulated interleukin-10 contains expanding disease. **Journal of Infectious Diseases**, **204**(3), 363-371.

COMSTOCK, L. E.; KASPER, D. L. 2006. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. **Cell**, **126**(5), 847-850.

COSTERTON J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, **284**:1318–22.

CUI, J.; LIU, Y.; WANG, R.; TONG, W.; DRLICA, K.; ZHAO, X. 2006. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, **194** (11), 1601-1608.

DANCHIN A.; SEKOWSKA A. 2000. Expression profiling in reference bacteria: dreams and reality. **Genome Biology** 1 (4):1024.1-1024.5.

DAVIES J.; SPIEGELMAN G. B.; YIM G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion Microbiology**, 9:445–453.

DAVIES, J.; DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 74(3), 417-433.

DE SOUZA FILHO, J. A.; DINIZ, C. G.; BARBOSA, N. B.; DE FREITAS, M. C. R.; LOPES NEVES, M. S.; MAZZEI, R. N., DA SILVA, V. L. 2012. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Anaerobe**. 18: 566–575.

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

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

DINIZ, C.G.; SANTOS, S.G.; PESTANA, A.C.N.R.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. 2000b Chromosomal breakage in *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment. **Anaerobe**, 6: 149-153.

DINIZ C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L., NICOLI J.R.; CARVALHO MAR, FARIAS, L.M. 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbe and Infection**, 5: 19-26.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; ROCHA, E.R.; SMITH, C.J. 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 54:100-108.

DONLAN, R.M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, **Clinical Infection Disease**, 33: 1387–1392.

DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, **32**(11), 1720-1724.

ERIBE, E. R.; OLSEN, I. 2000. Strain differentiation in *Bacteroides fragilis* by RAPD and Dendron computer-assisted gel analysis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, **108**:676–684.

DOUGLAS-ESCOBAR, M.; ELLIOTT, E.; NEU, J. 2013. Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. **JAMA pediatrics**, **167**(4), 374-379.

FANG, H.; EDLUND, C.; HEDBERG, M.; NORD, C.E. 2002. New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **19**:361-370.

FERREIRA, M. C.; DOMINGUES R. M. C. P. ; UZEDA, M. de. 1989. Influence of metronidazole, chloramphenicol, clindamycin and penicillin G on growth and neuraminidase activity of *Bacteroides fragilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **24**:157-164

FINEGOLD, S. M. 1995. Anaerobic infections in humans: an overview **Anaerobe**, **1**(1), 3-9.

FINEGOLD, S. M. 2008. Therapy and epidemiology of autism–clostridial spores as key elements. **Medical hypotheses**, **70**(3), 508-511.

FINEGOLD, S. M.; DOWD, S. E.; GONTCHAROVA, V.; LIU, C., HENLEY, K. E.; WOLCOTT, R. D.; GREEN III, J. A. 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. **Anaerobe**, **16**(4), 444-453.

FONSECA, A. P.; EXTREMINA, C.; FONSECA, A. F.; SOUSA, J. C. 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, **53**(9), 903-910.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. 1997. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, **54**: 679-708.

FREITAS, M. C., SILVA, V. L., GAMEIRO, J., FERREIRA-MACHADO, A. B., COELHO, C. M., CARA, D. C., DINIZ, C. G. 2015. *Bacteroides fragilis* response to subinhibitory concentrations of antimicrobials includes different morphological,

physiological and virulence patterns after in vitro selection. **Microbial pathogenesis**, **78**, 103-113.

FUSTER, J. J.; WALSH, K. 2014. The Good, the Bad, and the Ugly of interleukin-6 signaling. **The EMBO journal**, **33**(13), 1425-1427.

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

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

GERBER, M.; WALCH, C.; LÖFFLER, B.; TISCHENDORF, K.; REISCHL, U.; ACKERMANN, G. 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. **Journal of medical microbiology**, **57**(6), 776-783.

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

GREKO, C.; FINN, M.; ÖHAGEN, P.; FRANKLIN, A.; BENGTSSON, B. 2003. A tissue cage model in calves for studies on pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions of antimicrobials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **22**(4), 429-438.

GUARNER, F; MALAGELADA, J. 2003. Gut flora in health and disease. **Lancet**, **361**: 512–19

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

GUYTON, A. C., FRANK, M., & ABERNATHY, B. 1963. A concept of negative interstitial pressure based on pressures in implanted perforated capsules. **Circulation Research**, **12**(4), 399-414.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, **265**(3), 621.

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

HORNEF, M. W.; WICK, M. J.; RHEN, M.; NORMARK, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. **Nature immunology**, **3**(11), 1033-1040.

HUA, X.; CHEN, Q.; LI, X.; YU, Y. 2014. Global transcriptional response of *Acinetobacter baumannii* to a subinhibitory concentration of tigecycline. **International journal of antimicrobial agents**, **44**(4), 337-344.

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

JARCHUM, I.; PAMER, E.G. 2011. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. **Current Opinion Immunology**, **23**:353–360.

JOHNSON, S.; LOUIE, T. J.; GERDING, D. N.; CORNELLY, O. A.; CHASAN-TABER, S.; FITTS, D.; DAVIDSON, D. M. 2014. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for *Clostridium difficile* infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, **59**(3), 345-354.

JOSEPH, J. T., PURTILL, K., WONG, S. J., MUNOZ, J., TEAL, A., MADISON-ANTENUCCI, S., WORMSER, G. P. 2012. Vertical transmission of *Babesia microti*, United States. **Emerging infectious diseases**, **18**(8), 1318.

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

KADURUGAMUWA, J. L.; SIN, L.; ALBERT, E.; YU, J.; FRANCIS, K.; DEBOER, M. CONTAG, P. R. 2003. Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. **Infection and immunity**, **71**(2), 882-890.

KANNOURAKIS, G.; ABBAS, A. 1994. The role of cytokines in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. **The British Journal of Cancer**, **23**, S37–S40.

KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K.; UENO, K. 1996. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, **23**, S83-S86.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, **474**(7351), 307-317.

KIM, J. M., CHO, S. J., OH, Y. K., JUNG, H. Y., KIM, Y. J. 2002. Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin. **Clinical & Experimental Immunology**, **130**(1), 59-66.

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

KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J. K. 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Medicine**, **3**(3), 14.

KNUDSEN, G. M.; HOLCH, A.; GRAM, L. 2012. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect stress and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* and cause enhanced stress sensitivity but do not affect Caco-2 cell invasion. **Journal of applied microbiology**, **113**:1273-1286.

KRINOS, C. M.; COYNE, M.J.; WEINACHT, K.G.; TZIANABOS, A.O.; KASPER, D.L.; COMSTOCK, L.E. 2001. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. **Nature** **414**: 555-558

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

LEITSCH, D.; SÓKI, J.; KOLARICH, D., URBÁN, E.; NAGY, E. 2014. A study on Nim expression in *Bacteroides fragilis*. **Microbiology**, **160**(Pt 3), 616-622.

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

LIU, C.; SONG, Y.; MCTEAGUE, M.; VU, A.W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S.M. 2003. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex

PCR assays using group - and species-specific primers. **FEMS Microbiological Letters**, **222** : 9-16.

LIVERMORE, D. M. 2003. Overstretching the mutant prevention concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**, 732.

LOBO, L. A.; JENKINS, A. L.; SMITH, J. C.; ROCHA, E. R. 2013. Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model. **MicrobiologyOpen**, **2**(2), 326-337.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. 2010. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical infectious diseases**, **50**(1), S16-S23.

LORIAN, V. 1971. Effect of antibiotics on staphylococcal hemolysin production. **Applied Microbiology**, **22**:106.

LORIAN V.; ATKINSON, B. 1978. Effect of serum on gram-positive cocci grown in the presence of penicillin. **Journal Infection Disease**, **6**: 865-871.

LORIAN, V.; GEMMELL, C. 1994. Effect of low antibiotic concentrations on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefences. In **Antibiotics and Laboratory Medicine**, 3rd edn, pp. 493–555. Edited by V. Lorian. Baltimore: Williams & Wilkins.

LORIAN, V.; WALUSCHKA, A.; KIM, Y. 1982. Abnormal morphology of bacteria in the sputa of patients treated with antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**. **16**: 382–386.

MACCAFERRI, S.; BIAGI, E.; BRIGIDI, P. 2011. Metagenomics: key to human gut microbiota. **Digestive Diseases**, **29**:525–530.

MAJTAN, J., MAJTÁNOVÁ, Ľ., XU, M., & MAJTÁN, V. 2008. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. **Journal of applied microbiology**, **104**(5), 1294-1301.

MATHISON, J. C.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R. J. 1988. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. **Journal of Clinical Investigation**, **81**(6), 19-25.

MEGE, J.L.; MEGHARI, S.; HONSTETTRE, A.; CAPO, C.; RAOULT, D. 2006. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. **Lancet Infection Disease** **6**: 557–569.

MENDZ, G. L.; MÉGRAUD, F. 2002. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood?. **Trends in microbiology**,**10**(8), 370-375.

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

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

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. 2004. RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. Agilent Application Note, Publication, 1-8.

MYERS, L. L.; FIREHAMMER, B. D.; SHOOP, D. S.; BORDER, M. M. 1984. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infection and Immunity**, **44**:241–244.

MYERS, L. L., SHOOP, D. S., STACKHOUSE, L. L., NEWMAN, F. S., FLAHERTY, R. J., LETSON, G. W., & SACK, R. B. 1987. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, **25**(12), 2330-2333.

NEMANI, K.; GHOMI, R. H.; MCCORMICK, B.; FAN, X. 2015. Schizophrenia and the gut–brain axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, **56**, 155-160.

NISHIZAWA, T.; MAEKAWA, T.; WATANABE, N.; HARADA, N.; HOSODA, Y.; YOSHINAGA, M.; SUZUKI, H. 2015. Clarithromycin Versus Metronidazole as First-line *Helicobacter pylori* Eradication: A Multicenter, Prospective, Randomized Controlled Study in Japan. **Journal of clinical gastroenterology**.

NWAOKORIE, F. O.; OGUNSOLA, F. T.; COKER, A. O. 2010. Beta-lactamase production in anaerobic bacteria. **Reviews in infection**, **1**(3), 172-179.

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

ÖHMAN, L.; SIMRÉN, M. 2010. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, **7**(3), 163-173.

O'KEEFE, J. P., TALLY, F. P., BARZA, M., GORBACH, S. L. 1978. Inactivation of penicillin G during experimental infection with *Bacteroides fragilis*. **Journal of Infectious Diseases**, **137**(4), 437-442.

O'KEEFE, J. P., TALLY, F. P., BARZA, M., GORBACH, S. L. 1979. Penetration of cephalothin and cefoxitin into experimental infections with *Bacteroides fragilis*. **Review of Infectious Diseases**, **1**(1), 106-111.

PANTOSTI, A.; MENOZZI, M. G.; FRATE, A.; SANFILIPPO, L.; D'AMBROSIO, F.; MALPELI, M. 1997. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and its toxin in stool samples from adults and children in Italy. **Clinical infectious diseases**, **24**(1), 12-16.

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

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

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

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

RAHMAN, M. M.; MCFADDEN, G. 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. **Plos Pathogens**, **2**(2), e4.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K.; TALLY, F. B. 1997. Antimicrobial resistance in anaerobes. **Clinical infectious diseases**, **24**(1), S110-S120.

REID, G.; BRUCE, A. W.; LLANO, M.; MCGROARTY, J. A.; BLAKE, M. 1990. Bacterial aggregation in sepsis. **Current Microbiology**, **20**(3), 185-190.

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

ROCHA, E. R.; SELBY, T.; COLEMAN, J. P.; SMITH, C.J. 1996. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. **Journal of bacteriology**, **178**(23), 6895-6903.

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

RUDEK, W.; HAQUE, R. U. 1976. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. **Journal Clinical Microbiology**, **4**:458–460.

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

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

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

SANFILLIPO, L., LI, C. K. F., SETH, R., BALWIN, T. J., MENOZZI, M. G., & MAHIDA, Y. R. 2000. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF- β) by human colonic epithelial cells. **Clinical & Experimental Immunology**, **119**(3), 456-463.

SANTOS, S. G., DINIZ, C. G., SILVA, V. L., MARTINS, W. A., CARA, D. C., SOUZA, N. C.; FARIAS, L. M. 2007. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection in gnotobiotic mice. **Journal of medical microbiology**, **56**(3), 289-297.

SANTOS, K. V. D ; De Carvalho, M. R., Amancio Martins, W., Coutinho, S. C., Bahia, J. L., Lopes de Andrade, J. P., De Macêdo Farias, L. 2010. In Vitro Selection of Ertapenem and Piperacillin/Tazobactam-Resistant strains of *Bacteroides fragilis* and analysis of their virulence in gnotobiotic mice. **Journal of Chemotherapy**, **22**(4), 259-263.

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

SEARS C. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiontes. 2009. **Clinical Microbiology Review**, **22**:349–369.

SEARS, C. L. In celebration of Sydney M. Finegold, MD. *Bacteroides fragilis* in the colon: The good & the bad. 2012. **Anaerobe**, **18**(2), 192-196.

SEELEY, E. J., MATTHAY, M. A., WOLTERS, P. J. 2012. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **303**(5), L355-L363.

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

SHIH, D. Q.; TARGAN, S. R. 2008. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**: **14**(3), 390.

SCHUETZ, A. N. 2014. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, **59**:698-705.

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

SILVA, V. O., SOARES, L. O., JÚNIOR, A. S., MANTOVANI, H. C., CHANG, Y. F., & MOREIRA, M. A. S. 2014. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by escherichia coli isolates from cases of bovine mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, **80**(19), 6136-6145.

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

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

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

STEFFENS, L. S.; NICHOLSON, S.; PAUL, L. V.; NORD, C. E.; PATRICK, S.; ABRATT, V. R. 2010. *Bacteroides fragilis* RecA protein overexpression causes resistance to metronidazole. **Research in microbiology**, **161**(5), 346-354.

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

TALLY F. P.; STEWART P. R.; SUTTER V. L.; ROSENBLATT, J. E. 1975. Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, **1**:161–164.

TALLY, F. P.; GOLDIN, B. R.; SULLIVAN, N.; JOHNSTON, J. U.; GORBACH, S. L. 1978. Antimicrobial activity of metronidazole in anaerobic bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **13**(3), 460-465.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. 2014. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. **Gut**, **63**(9), 1513-1521.

TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. 1997. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunology today**, **18**(9), 428-432.

TRACEY, M.D.; K. J., CERAMI.1994. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annual review of medicine**, **45**(1), 491-503.

TULASNE, R.; VENDRELY, R. 1948. Cytology of staphylococci before and after treatment with penicillin. **Nature**, **161**(4087), 316-316.

VEERANAGOUDA, Y.; HUSAIN, F.; BOENTE, R.; MOORE, J.; SMITH, C. J., ROCHA, E. R; WEXLER, H. M. 2014. Deficiency of the ferrous iron transporter FeoAB is linked with metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **69**(10), 2634-2643.

DE CASTRO VELOSO, L.; DOS SANTOS, K. V.; DE ANDRADE, H. M.; DA FONSECA PIRES, S.; DOS SANTOS, S. G.; TRINDADE, M. J. V.; DE CARVALHO, M. A. R. 2013. Proteomic changes in *Bacteroides fragilis* exposed to subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam. **Anaerobe**, **22**, 69-76.

VOORSPOELS, J.; CASTEELS, M.; REMON, J. P.; TEMMERMAN, M. 2002. Local treatment of bacterial vaginosis with a bioadhesive metronidazole tablet. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, **105**(1), 64-66.

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

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**, **10**(9), 618-630.

WEXLER, H. M. 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, **20**: 593–621.

WILSON, M. M.; ANDERSON, D. E.; BERNSTEIN, H. D. 2015. Analysis of the outer membrane proteome and secretome of *Bacteroides fragilis* reveals a multiplicity of secretion mechanisms. **PMC biophysics**, **10**(2), e0117732.

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

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

WU, S.; POWELL, J.; MATHIOUDAKIS, N., KANE; S., FERNANDEZ, E.; SEARS, C. L. 2004. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor- κ B pathway. **Infection and immunity**, **72**(10), 5832-5839.

XUAN, D.; ZHONG, M.; MATTOES, H.; BUI, K. Q.; MCNABB, J.; NICOLAU, D. P.; NIGHTINGALE, C. H. 2001. *Streptococcus pneumoniae* response to repeated moxifloxacin or levofloxacin exposure in a rabbit tissue cage model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **45**(3), 794-799.

YOH, M.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T.; TAKEDA Y.; MIWATANI, T. 1983. Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, **42**: 778-782.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo aceito para publicação

Genetics and Molecular Research

Contamination with rRNA and degradation of mRNA constitutes major problems in isolating prokaryotic RNA for in vivo bacterial transcriptome analysis in complex samples

Alessandra Barbosa Ferreira-Machado¹, Michele Cristine Ribeiro de Freitas¹, Guadalupe del Rosario Quispe Saji², Alice Belleigoli Rezende³, Patrícia Elaine de Almeida⁴, Dionéia Evangelista Cesar⁴, Juliana Alves Resende¹, Marisa Fabiana Nicolás², Vânia Lúcia da Silva¹, Cláudio Galuppo Diniz^{1*}

¹ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

² Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

*Correspondence: Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. Phone/Fax: + 55 32 2102-3213. E-mail address: claudio.diniz@ufjf.edu.br

Abstract

Background: Even though several *in vitro* studies have focused on bacteria biology, the extent of such knowledge is not completely understood if considering an actual infection. As culture-independent microbiology methods became available, like high-throughput sequencing, important aspects of host-bacteria interaction are to be elucidated. As a model of study, based on microbiological relevance, *Bacteroides fragilis* was considered in a murine experimental infection to evaluate *in vivo* bacterial transcriptome in host's exudates.

Findings: A high number of reads belonging to the host genome was retrieved in the first round of pyrosequencing, overcoming the *B. fragilis* genome, even after depletion of eukaryotic RNA (average number of reads related to eukaryotic genome was 71.924 - 67.7%, and the respective prokaryotic genome reads were 34.338 - 32.3%) in host's exudates. Thus, different treatments were used in attempt to improve prokaryotic RNA yield: (i) centrifugation (ii) ultrasonic treatment (iii) ultrasonic treatment followed by centrifugation. The last treatment was found to be the most efficient in bacteria yielding, once it resulted in a higher number of individual *Bacteroides* cells. However, the extracted RNA after this treatment had no quality to be used in cDNA synthesis.

Conclusions: Our results suggest that the methodology routinely used for RNA extraction in transcriptional analysis is not appropriate for *in vivo* studies. Furthermore, the most efficient treatment to yield bacterial cells was not suitable to retrieve good quality RNA. New strategies must be addressed to enable *in vivo* studies of host-bacteria interaction by culture-independent methods.

Keywords: *Bacteroides fragilis*, experimental infection, *in vivo* studies, host-bacteria interaction, RNA extraction

Findings

Introduction

Historically, clinical and scientific microbiology are based on methodological approaches to understand phenomena related to bacteria biology and host-bacteria interaction. Classically culture-dependent microscopy-based methods are widely employed to access bacteria morphology, biochemical and physiological characteristics [1]. However these culture-dependent approaches do not allow directly microbe evaluation in actual infections [2]. In this regard, the extent of our knowledge on microbes' biology during infections in course remains unclear, leading to the need for prospective *in vivo* studies to elucidate *in vivo* aspects of the host-bacteria interaction. Recently, as culture-independent methods became available, molecular tools have been

applied to clinical and scientific microbiology, such as high-throughput sequencing [1,2]. In this context, high-throughput sequencing is thought to be useful to evaluate bacteria transcriptome during an actual infection as a new generation of genome-wide gene expression measurements based on mRNA sequencing (RNA-seq) [3]. These approaches are especially useful if considering resident microbiota once these bacteria may be modulated by host's physiology and xenobiotics, such as antimicrobial drugs [4-7].

The Gram-negative anaerobic rod *Bacteroides fragilis*, which is member of the gut microbiota, remains one of the most important putative pathogens associated with endogenous infections [8,9]. Since 1984, *B. fragilis* strains associated with diarrheal disease in animals and young children were recognized through their secretion of a 20-kDa enterotoxin named fragilisin [10,11]. Furthermore, enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) has been associated with inflammatory bowel disease and the promotion of colon tumorigenesis [12,13]. This study focused on the evaluation of a murine model for *in vivo* transcriptional analysis of *B. fragilis*. The rat tissue cage model [14], which consists of intraperitoneal implantation of a perforated table tennis "ping-pong" ball, was used to establish intraperitoneal abscess infection and bacteria was recovered from exudative secretion drained, for RNA-seq.

Methods

Infection model and *in vitro* experiments

In parallel, *in vitro* and *in vivo* experiments were performed to evaluate the bacterial transcriptome. Male Wistar rats (n=24) weighing approximately 300g were used in the experiments. Four groups of 12 rats were considered for technical and biological replicates. To proceed the infection model, approximately 250-300 small holes of 1.5-mm diameter were drilled in 24 table tennis balls, and these were then soaked for 16 hours in 2% hypochlorite, washed with distilled water, and sterilized by ethylene oxide. Each one table tennis ball was surgically placed into the intraperitoneal cavity of the animals under anesthesia with ketamine/xylazine. A period of three weeks was allowed for animal recovery, vascularization, and fluid accumulation in the tissue cage balls. After the healing period, the balls became encapsulated in connective tissue, develop blood supply, and were filled with sterile exudate with the appearance of serum with characteristics similar to those already described [14,15]. Further, the encapsulated tissue cages balls were inoculated with 1.0 mL of *B. fragilis* ATCC 43859 ($\approx 10^8$ CFU ml⁻¹) in 0.85% NaCl. The *B. fragilis* cells used for inoculation were anaerobically grown in Brain Heart Infusion broth (Himedia) supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% L-cysteine, 0.5% hemin, and 0.1% menadione (BHI-S), for 16 h, at 37°C. The experimental infection model described in this study is shown in

Figure 1. All of the procedures involving the use of animals were in agreement with the Ethical Principles in Animal Research and were approved by the Institutional Ethical Committee for Animal Research of Federal University of Juiz de Fora.

For *in vitro* experiments, the strains were anaerobically grown in the same conditions of *in vivo* experiments to mid-exponential phase (O.D. ≈ 0.7).

Bacterial viable count in the exudate

To evaluate the bacterial survival and persistence inside the tissue cage balls, 8.0 mL of the exudate was removed from the tissue cage balls 8 days post infection (the animals were killed prior to removal of the exudate) and subjected to CFU counts. Then, 1.0 mL of the exudate was serially diluted in sterile saline solution, and the dilutions were plated on BHI-S and incubated under anaerobic conditions at 37°C. Some plates were also incubated aerobically (control) to assess any possible abscess contamination. Gram staining was also performed for quality control purposes and to visualize the *B. fragilis* cells in the drawn exudates (Fig. 1E).

Bacteria cells distribution in the tissue cage exudate and interaction with host's leukocytes

To visualize the *B. fragilis* cells in the tissue cage exudates and their interactions with host's leukocytes, exudates samples were recovered as previously described, before and after experimental infection, and diluted in Turk solution (0.01% crystal violet in 2% acetic acid solution) to lyse the red blood cells. Eukaryotic cells were counted in a Neubauer chamber. A total of 1×10^5 cells from the exudates were smeared in a cytocentrifuge (Cytospin, Thermo Scientific) ($140 \times g$) and then stained with May-Grünwald-Giemsa to analyze the leukocyte before experimental infection and leukocyte-bacteria interaction after infection. Images were acquired using a Panoramic Slide Scan (3DHISTECH, Budapest, Hungary) equipped with a 20x objective. The cell viability was assessed through the Trypan blue exclusion method at the end of the experiment and was found to be greater than 90%. To analyze the CFU of internalized bacteria, 10^6 cells mL^{-1} were centrifuged twice at 1500 rpm for 10 min in antibiotic solution (1 mg mL^{-1} ampicillin/sulbactam). The cells were lysed with 1 mL of saponin 0.1%, and 10 μL of the bacterial-containing suspensions were streaked out in BHI-S plates, which were anaerobically incubated at 37°C, for 48h.

Optimization of prokaryotic cells yield

To increase the number of bacterial cells for RNA extraction from the drained exudates, three different treatment were used: (i) centrifugation at 500 rpm for 10 min in a serological table centrifuge; (ii) ultrasonic treatment by three sonications at 110.7 μm for 60 s in an ice bath (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials Inc.); and (iii) ultrasonic treatment by three sonication at 110.7 μm for 60 s in an ice bath followed by centrifugation at 500 rpm for 10 min in a serological table centrifuge. To verify the best treatment with potential to yield prokaryotic cells Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) was used.

Aliquots of 0.3 mL for each treatment were filtered through 0.22- μm polycarbonate filters (Nuclepore Whatman, GE Healthcare) and stored at 4°C until analysis through FISH for determination of the treatment that best yields prokaryotic cells leading to high content of bacterial RNA. To determine the *B. fragilis* concentration after each treatment by FISH, the Cy3 fluorochrome-labeled Bac 303 probe (5'CCAATGTGGGGGACCTT3') was used as previously described [16]. Direct counting at 1000x magnification was performed using an epifluorescence microscope (Olympus BX-60) equipped with the following filters: Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 and U-MWG2. The measurements were performed in triplicate.

Total RNA extraction, cDNA synthesis and pyrosequencing

The total RNA from 1.0 mL of the drawn exudates was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocols. Furthermore, the MicrobEnrich kit (Ambion) was used to deplete the eukaryotic RNA. The *in vitro* total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen). All total RNA quality was evaluated through on-chip microfluidic electrophoresis (2100 Bioanalyzer Instruments, Agilent Technologies) and cDNA libraries were then constructed using the cDNA Rapid Library Preparation Method (Roche) a pyrosequencing in the 454 GS Titanium platform (Roche).

Results

The bacterial count reached a mean value of 1.1×10^9 CFU mL⁻¹ (sd = 3.2×10^8), confirming the viability of *B. fragilis* and the suitability of the tissue cage balls for *in vivo Bacteroides* culture in studies of the host-bacterium relationship. The eukaryotic/prokaryotic cell aggregates were observed (Fig. 1E), in addition, host's leukocytes showed a high number of internalized bacteria, if compared to system before experimental infection. After leukocyte permeabilization, a positive CFU was only found in the cells recovered from the infected animals (Fig. 2).

Following a first round of pirosequencing before any treatment to increase the number of bacterial cells for RNA extraction from the drained exudates, a high number of reads belonging to the rat genome was retrieved. These reads overcame the *B. fragilis* genome, even after the use of the MicrobEnrich kit (Ambion) to deplete the eukaryotic RNA (average number of reads related to eukaryotic genome was 71.924 - 67.7%, and the respective prokaryotic genome reads were 34.338 - 32.3%). Thus, three different treatments were used to optimize prokaryotic cells yield.

The treatment that consisted of ultrasonic and subsequent centrifugation was found to be the most efficient. As observed in Fig. 3C, cells were more dispersed with the greatest number of individual cells. Thus, this treatment resulted in a higher number of individual *Bacteroides* cells ($\approx 2.8 \times 10^9$ CFU ml⁻¹) if compared to the other treatments, namely centrifugation (Fig. 3A) and only ultrasonic treatment (Fig. 3B), which yielded approximately 6.5×10^6 and 1.4×10^9 CFU ml⁻¹, respectively.

As observed in this methodological study, the decrease in the eukaryotic cell density was assumed to allow a yield in prokaryotic DNA/RNA isolation. It is known that eukaryotic cells are more susceptible to digestion by nucleic acid extraction kits, and minimal DNA/RNA extract manipulation is advised to avoid mechanical fragmentation or degradation. With respect to complex samples, such as biological fluids and tissue fragments, the pre-separation of the expected eukaryotic/prokaryotic aggregates will ensure bacterial solubilization and a low eukaryotic contamination. These methodological steps are of extreme importance, especially considering the costs of the high-throughput sequencing technologies that are available and valuable to use in prospective studies on host-bacteria relationships. However, the exudate treatment (ultrasonic treatment and subsequent centrifugation) was not suitable to obtain good quality RNA (RIN < 5.0) for further experiments of cDNA synthesis (Figure 4a). In contrast, the electropherogram of *in vitro* RNA showed the integrality of nucleic acid (RIN=8.1) (Figure 4b). Therefore, new strategies must be addressed to enable the studies on the host-bacteria interaction by transcriptional analysis, once the extent of *in vitro* knowledge is not completely understood if considering an actual infection.

Abbreviations

ETBF: Enterotoxigenic *B. fragilis*; CFU: Colony Forming Unit; RIN: RNA Integrity Number

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ABFM, MCRF and JAR have contributed to the experimental data collection and analyses; ABR has contributed to the animal surgery; GRQS, PEA, DEC have contributed to analyses; MFN, VLS and CGD have contributed to the experimental design, funding and data analyses. ABFM, MCRF and CGD wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Pos-Graduate Program in Biological Sciences (PGCBIO/UFJF). This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are also grateful to Thiago Cesar Nascimento for participating in the animal surgery.

References

1. Delsenya M, Hanb B, Hsing YI. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* 2010, 179:407-422.
2. Passalacqua KD, Varadarajan A, Ondov BD, Okou DT, Zwick ME, Bergman NH. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. *J Bacteriol* 2009,191:3203-3211.
3. Sirbu A, Kerr G, Crane M, Ruskin HJ. RNA-Seq vs Dual- and Single-Channel Microarray Data: Sensitivity Analysis for Differential Expression and Clustering. *PLoS ONE* 2012, 7:1-10.
4. de Souza Filho JA, Diniz CG, Barbosa NB, de Freitas MC, Lopes Neves MS, da Gama Mazzei RN, Gameiro J, Coelho CM, da Silva VL. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Anaerobe* 2012, 18:566-575.
5. Santos SG, Diniz CG, Silva VL, Lima FL, Andrade HM, Chapeaurouge DA, Perales J, Serufo JC, Carvalho MA, Farias LM. Differentially regulated proteins in *Prevotella intermedia* after oxidative stress analyzed by 2D electrophoresis and mass spectrometry. *Anaerobe* 2012, 18:76-82.
6. dos Santos KV, Diniz CG, Veloso LC, de Andrade HM, Giusta MS, Pires SF, Santos AV, Apolônio AC, de Carvalho MA, Farias LM. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Res Microbiol* 2010, 161:268-275.
7. Diniz CG, Arantes RM, Cara DC, Lima FL, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. *Microbes Infect* 2003, 5:19-26.
8. Wexler HM: *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20:593-621.
9. Brook I: The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 2010, 16:183-189.
10. Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS, Border MM: *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infect Immun* 1984, 44:241-244.

11. Myers LL, Shoop DS, Stackhouse LL, Newman FS, Flaherty RJ, Letson GW, Sack RB: Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1987, 25:2330-2333.
12. Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva J: *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis* 2000, 6:171.
13. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir GA: Possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:782-786.
14. Lobo L A, Jenkins AL, Smith J, Rocha ERC: Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model. *MicrobiologyOpen* 2013, 2:326-337.
15. Bamberger DM, Herndon BL, Fitch J, Florkowski A, Parkhurst V: Effects of neutrophils on cefazolin activity and penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* abscesses. *Antimicrob Ag Chemother* 2002, 46:2878-2884.
16. Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* 1996, 142:1097-1106.

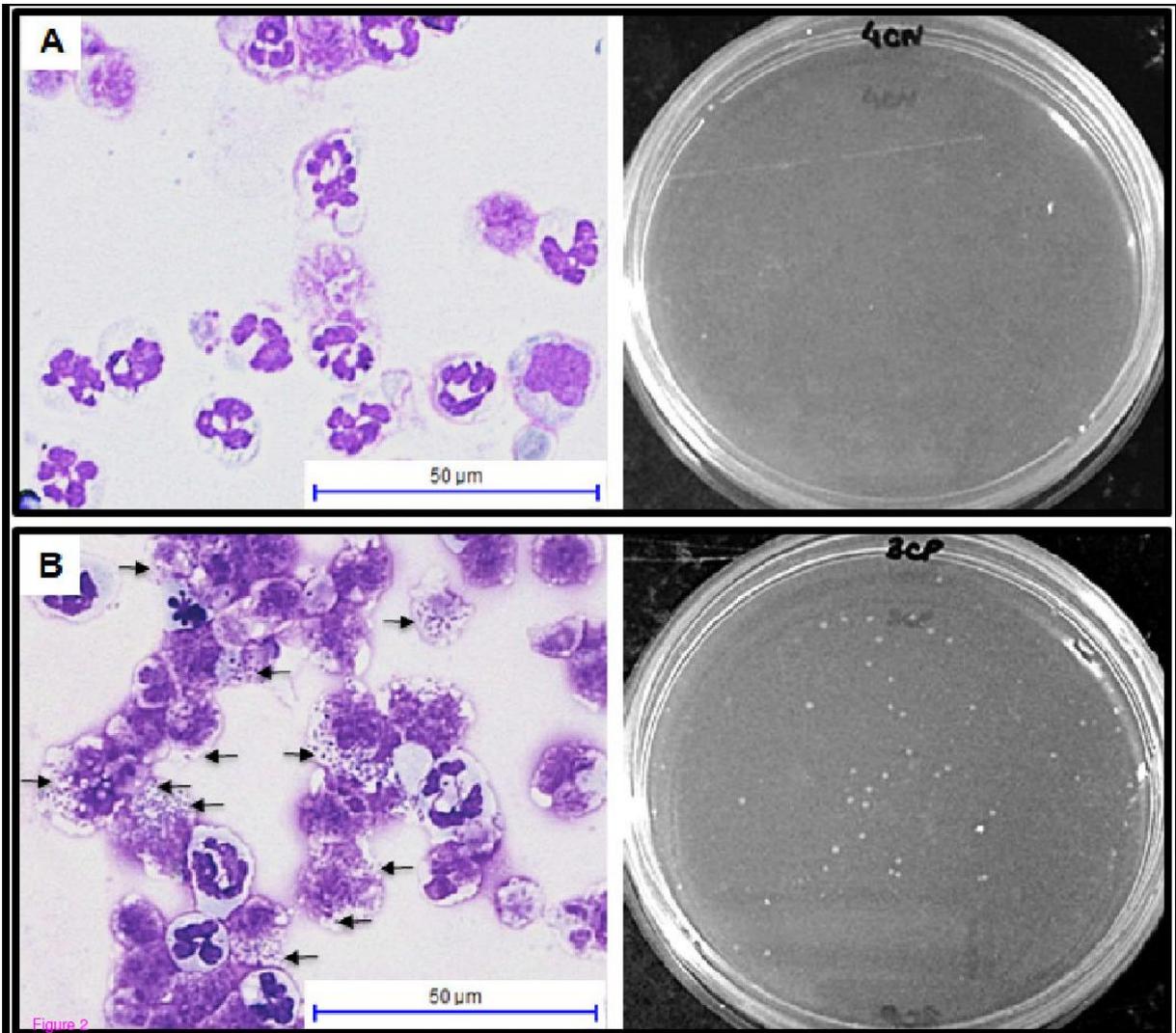
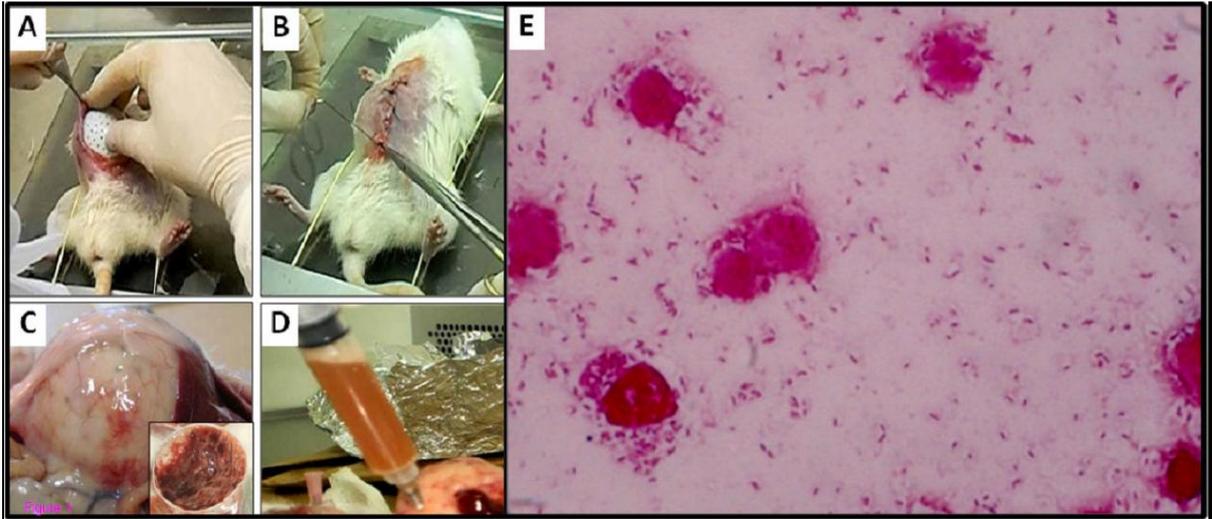
Figure legends

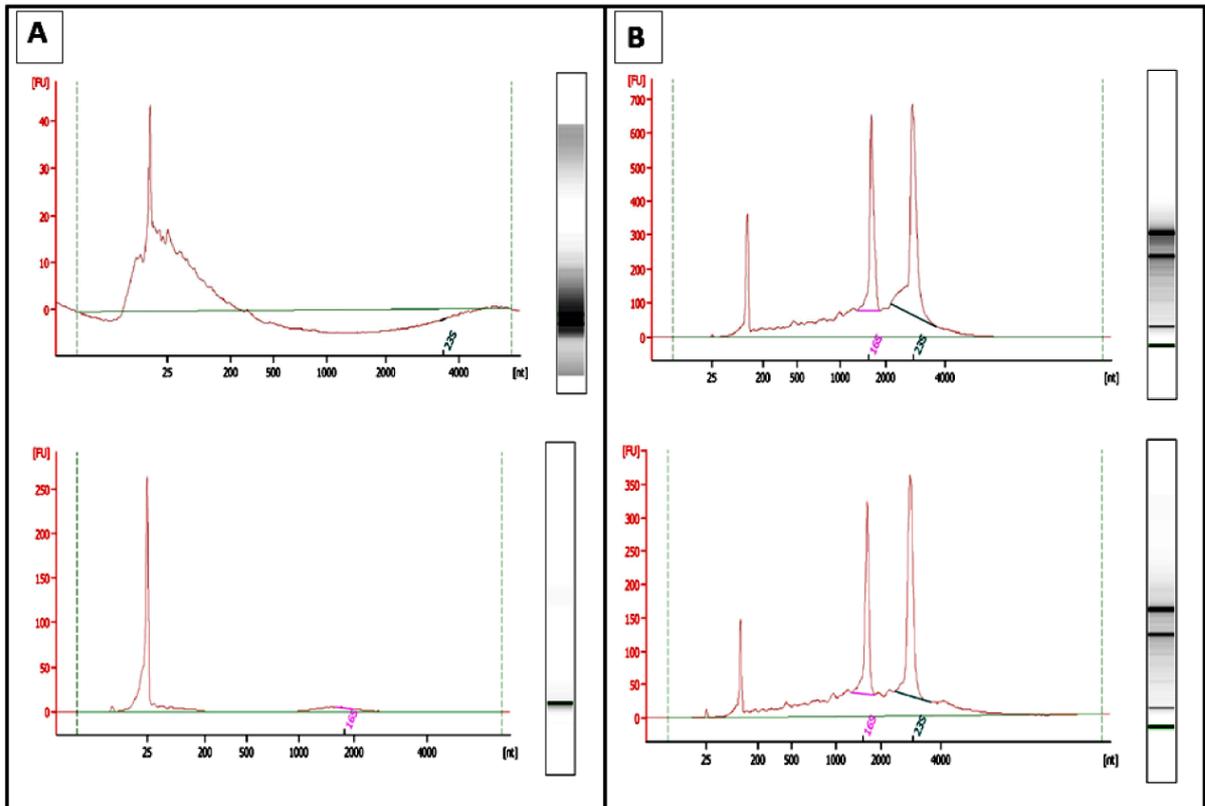
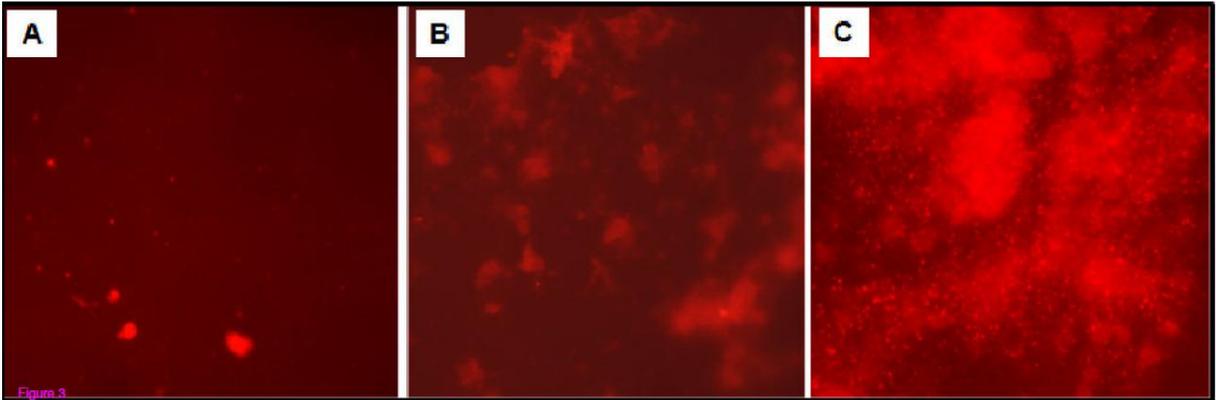
Figure 1. Experimental infection model. Surgical approach used to introduce the table tennis balls into the peritoneal cavity of the animals (A, B). Visualization of tissue formation and fluid accumulation in a tissue cage ball (C). Exudate aspirated from a tissue cage ball (D). Representative photomicrograph of the Gram staining of the exudates (E); original magnification, 1000x.

Figure 2. Microscopy images obtained from leukocytes infected and not infected with *B. fragilis* and stained with May-Grünwald-Giemsa. Leukocytes from exudates of non-infected rats (A). The plate shows no bacterial growth after incubation of the exudate under anaerobic conditions. Leukocytes from infected rats (B). The plate shows bacterial growth after incubation of the exudates under anaerobic conditions. The arrows indicate infected cells.

Figure 3. FISH photomicrographs of the three different treatments evaluated in this study: centrifugation (A), sonication (B), and both centrifugation and sonication (C). Original magnification, 1000x.

Figure 4. Electropherogram of RNA *in vivo* (A) and *in vitro* (B) through on-chip microfluidic electrophoresis (2100 Bioanalyzer Instruments, Agilent Technologies).





APÊNDICE B - Manuscrito em preparação

Metronidazol exposure at subinhibitory concentrations results in *Bacteroides fragilis*-host alterations without major bacteria cellular and physiological modifications

Michele Cristine Ribeiro de Freitas¹, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado¹, Laura Maria Andrade de Oliveira¹, Juliana Alves Resende¹, Alice Belleigoli Rezende², Patrícia Elaine de Almeida, Jacy Gameiro¹, Vânia Lúcia da Silva¹, Cláudio Galuppo Diniz¹

¹ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence: C.G. Diniz, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. Phone/Fax: + 55 32 2102-3213. E-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br

Introduction

Since 1950 the antimicrobials have been used to treat many diseases successfully. Although, the resistance frequency has increased dramatically among human pathogens and is the threat to existing therapeutic options (Andersson and Hughes, 2010). Despite antibiotic resistance is the result of different causes that may act isolated or synergistically, the principal factor of this phenomenon is inadequate use (Bohnen, 1998; Mindlin et al., 2006).

The microorganisms which constitute the resident microbiota, despite its relative stability, are subject to disturbance by the use of antimicrobial agents (Witte, 2000; Sommer and Dantas, 2011). Subinhibitory concentrations (SIC) of antimicrobials, often resulting from chemotherapy, occasionally inappropriate, can interfere with the resident microbiota causing changes in biology. These alterations can interfere with the determinants of microbial virulence expression and thus the bacteria-host relationship (Witte, 2000). *In vitro* studies have described changes in morphology and physiology of microorganisms after the exposure to antimicrobial SIC (Silvestro et al., 2006; Souza Filho et al., 2012; Knudsen et al., 2012).

Bacteroides fragilis, an anaerobic Gram negative rod member from gut microbiota, remains as one of the most important putative pathogen from endogenous infections (Wexler, 2007; Brook, 2010). To date the determinant of most important virulence identified for *B. fragilis* is the capsular polysaccharide. Furthermore, the presence of membrane proteins associated with adhesion and aerotolerance also contributes to the pathogenicity. However, since 1984, the strains of *B. fragilis* associated with diarrheal disease in animals and young children have been known to secrete a toxin fragilisin (Myers et al., 1984; Myers et al., 1987).

The presence of a pathogenicity island in the genome discriminates *B. fragilis* strains *fragilis* (Franco et al., 2002). The *B. fragilis* toxin stimulates inflammation mainly by a production IL-8 when the infection is present in the bowel (Wu et al., 2004). The presence of enterotoxigenic *B. fragilis* in the bowel can or may not occur diarrhea. However, it is not yet known if ETBF strains exhibit increased virulence in extraintestinal infections as in the bowel (Sears, 2009).

Bacteroides fragilis through polysaccharide A (PSA), an immunomodulatory molecule that mediates T cell dependent response of the immune system, active interleukin-10 (IL-10), one of the most potent anti-inflammatory cytokines on the immune system, exerting its role immunomodulator. However, when there is the escape of intestinal habitat, *B. fragilis* the body induces the formation of abscess and bacteremia (WEXLER, 2007;. Cohen-paradosu et al., 2011).

Metronidazole, an antimicrobial group of nitroimidazoles, is considered choice in *B. fragilis* infections (Lofmark et al., 2010). Although it is known that the antimicrobial interferes in bacterial physiology, there is a lack of published data about the value of the *in vitro* findings, considering the real situation of infection.

The objective of this study was to evaluate the interference subinhibitory concentrations of metronidazole in the morphological and physiological characteristics of *B. fragilis* in an experimental model of infection and immunological and histological parameters presented by the host against infection.

Materials and Methods

Experimental Design

Bacterial strains and conditions of cultivation

The strains used in this study are described in Table 1. The strains were cultivated in Brain Heart Infusion broth (HIMEDIA) supplemented with hemin (5 mg / ml), menadione (1 mg / ml) and L-cysteine 0.1% w / v (BHI-S) in anaerobic atmosphere (90% N₂, 10% CO₂) at 37°C.

Table 1. Strains used in this study

Strains	Phenotype	References
BfCT	ATCC43859	Myers et al. 1987
BfMTZ+	strains derived from ETBf selected for 4 sucessives cultivations in SICs of MTZ <i>in vitro</i>	This study
BfMTZ-	strains derived from ETBf selected for 4 sucessives cultivations in SICs of MTZ and 4 subsequent cultures in the absence of MTZ <i>in vitro</i>	This study
BfMTZa+	strains derived from ETBf selected for 4 sucessives cultivations in SICs of MTZ <i>in vivo</i>	This study
BfMTZa-	strains derived from ETBf selected for 4 sucessives treatments of SICs of MTZ and subsequent cultures in the absence of MTZ <i>in vivo</i>	This study
BfCTa+	strains derived from ETBf selected <i>in vivo</i> used as control for BfMTZa+	This study
BfCTa-	strains derived from ETBf selected <i>in vivo</i> used as control for BfMTZa-	This study

MTZ, Metronidazole; SIC, subinhibitory concentration.

Infection model and *in vitro* control

Experimental animals

Wistar male rats weighing about 300g were used in the experiments. A table tennis ball was used in the form of cages. Approximately 250-300 small holes were drilled in each of the balls, which were then maintained for 16 hours in 2% hypochlorite and sterilized by ethylene oxide. The cages were placed into the peritoneal cavity of the animals under intraperitoneal anesthesia with ketamine/xylazine as described by Ferreira-Machado et al. (2015) (Figure 1). A period of three weeks was allowed for vascularization and fluid accumulation in the cages. The bacterial suspensions were inoculated by percutaneous via (1 ml ~ 10⁸ CFU/mL) in 0.85 % NaCl. Furthermore, the negative control group animals received only the vehicle suspension (0.85 % NaCl).

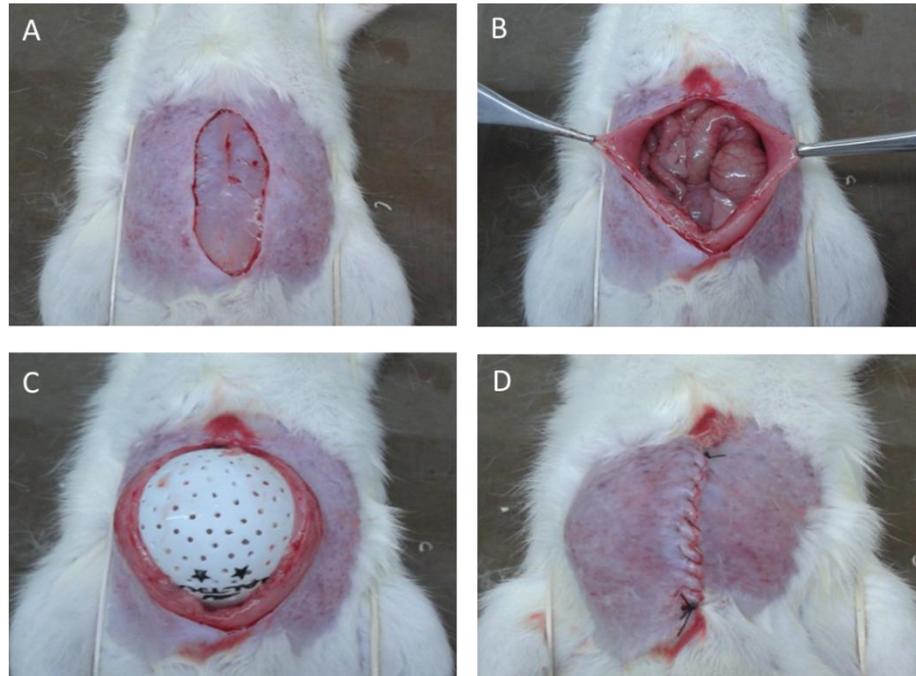


Figure 1. Experimental infection model adapted from Ferreira-Machado et al. (2015). Surgical approach used to introduce the table tennis balls into the peritoneal cavity of the animals. A and B – Incision, C - A sterile perforated “tennis ping-pong” ball was implanted into the peritoneal cavity of rats. D – Surgical suture after implantation of cage ball.

The animals were divided into three groups: negative control group (NCG) (n = 6) without bacterial inoculation, only with vehicle; positive control group (PCG) (n = 10) animals infected with parental bacterial strain; experimental group (EG) (n = 8) animals infected with the parental bacterial strain, treated with metronidazole SIC (1 mg/ml) percutaneously for a period of eight days in 48 hour intervals.

Groups of animals were euthanized and divided in three stages: two days after infection (2 animals NCG, 2 animals PCG) before treatment with metronidazole (2 animals NCG, 4 animals PCG, 4 animals EG) for evaluation of drug interference in the infection process and bacterial behavior (time 1) and eight additional days after treatment (2 animals NCG, 4 animals PCG, 4 animals EG) for evaluation of bacterial behavior (time 2) according to the experimental design below. The experiment was done in triplicate totalizing 72 animals. This project was submitted to the Animal Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora and is approved in accordance with protocol 035/2010. In parallel, *in vitro* experiments were also performed.

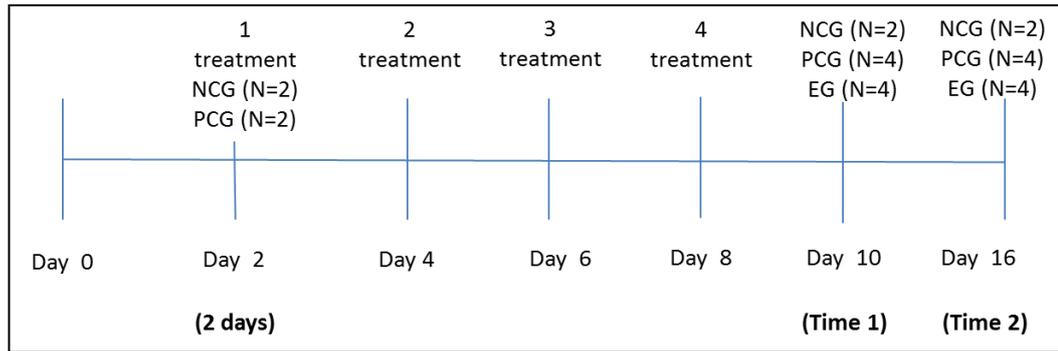


Figure 2: Experimental Design. 2 days: Two days post infection; Time 1: after four treatments with subinhibitory concentration of metronidazole. Time 2: After four treatments with subinhibitory concentration of metronidazole and consecutive eight days without metronidazole. NCG – Negative control group; PCG - Positive control group; EG - Experimental group.

Evaluation of the infection process

To evaluate the infection of all analyzed points was made PCR specific for *B. fragilis* from DNA obtained from the exudate of animals. To obtain bacterial DNA was used QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. The primers utilized were BF1 (5'GACGGTGTATGTGATTTGTCTGAGAGA-3') and BF2 (5'ATCCCTAAGATTTTATTATCCCAAGTA-3'), according to Pantosti et al. (1997).

Quantification of microorganisms

Quantification of microorganisms in the cage was performed by real-time quantitative PCR (qPCR). The primers utilized were Bfr-F (5'CTGAACCAGCCAAGTAGCG-3') e Bfr-R (5'-CCGCAAACCTTTCACAACACTGACTTA-3') (IDT Integrated DNA Technologies). The quantitative analyzes were performed on Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) using Syber Green PCR Master Mix (Qiagen) to monitor the synthesis of double stranded DNA. Reactions were assembled in a final volume of 25µL according manufacturer's instructions. Each run included a standard curve in duplicate and each sample was run in duplicate. The specificity of amplification was determined by analyzing the dissociation curves.

Dynamics of infection and evaluation of host response

Hemogram

Blood analysis was performed on animals automatic Cell Counter Coulter STKS using laser impedance and counting and classifying cells. The blood was obtained performed from the brachial plexus after anesthesia.

Histological analysis of the tissue cage

Tissue samples were collected after euthanasia of animals. The embedment was performed the method of Historesin (Leica) according to the manufacturer's recommendations and cut into microtome in thickness from about three microns and subsequently stained by the method of hematoxylin and eosin (HE).

Phagocytosis

To analyze leukocytes *B. fragilis* infection, exudate samples were recovered as described before. Total cells were counted in a Neubauer chamber, after being diluted in Turk solution (0.01% crystal violet in 2 % acetic acid solution) to lyse the red blood cells. To analyze the CFU of internalized bacteria, 10^6 cells/mL were centrifuged at 1500 rpm twice in antibiotic solution (Ampicilin/sulbactam 1 mg/mL) during 10 min. Next the cells were lysed with 1 mL of saponin 0,1% and 10 uL of bacterial-containing suspensions were incubated for 48 h on BHIS in anaerobiosis.

Analysis of the expression of genes encoding cytokines

The extraction of total RNA was made from 1.0 mL of the drawn exudates with the Rneasy mini kit (Qiagen). RNA samples were treated with DNase (Promega) to ensure the absence of contamination by genomic DNA. Then, the samples were immediately stored -80°C until the moment of use. The total RNA quality was evaluated by on-chip microfluidic electrophoresis (2100 Bioanalyzer Instruments, Agilent Technologies), followed by cDNA using a ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega).

The expression levels of cytokine mRNA was measured by qPCR, using HPRT as an internal control after confirmation that its expression was not significantly affected under the experimental conditions. The analyzes were performed on Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) using Syber Green PCR Master Mix (Qiagen). All samples were analysed in duplicate. The efficiencies of each reaction were determined and the specificity of amplification was determined by analysing the dissociation curves. Relative expression determination was made by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The primers and the amplicon size used in this study are described in Table 2.

Table 2: Sequence of primers forward and reverse related to genes evaluated and size of the amplicon

Target	5'-3' primer sequence	Amplicon Length (bp)
HPRT	F: CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R: GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	122
IL-10	F: GAGAGA AGCTGA AGACCCTCTG R: TCATTCATGGCCTTGTAGACAC	120
IL-8	F: GCACCCAAACCGAAGTCA R: AAGCCAGCGTTCACCAGA	168
IL-6	F: TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC R: TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	79
IL-1b	F: CACCTCTCAAGCAGAGCACAG R: GGGTCCATGGTGAAGTCAAC	79
MCP-1	F: GCTGCTACTCATTCCCTGGCAAG R: GGTCAAGTTCACATTCAAAGGTGC	112
TNF- α	F: AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC R: TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	111

Note. bp: base pairs; F, Forward; R, Reverse.

Evaluation of cellular and physiological characteristic bacterial

Bacterial cellular morphology

Samples of exudate and bacterial culture *in vitro* were stained by Gram method for the observation of the morphology after exposure and suspension of use the metronidazole SIC antimicrobial.

Biofilm formation

After recovery of all bacterial strains from the exudate were evaluated bacterial adhesive properties in an experimental biofilm model. Bacteria were cultured in polystyrene microtiter plates and absorbance of the dye incorporated was determined (crystal violet 0.01% w/v) in optical density at 590 nm. Thus, the absorbance was equivalent to the density of adherent bacteria, and the results were recorded as an average of three different experiments. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism v5.0 The data were compared by Tukey's Multiple Comparison Test and the level of significance was $p < 0.05$.

Evaluation of sensitivity to oxidative stress

To evaluate the oxidative stress bacterial suspensions (1 McFarland scale) were spread with Drigalsky into BHI-S plates, where distributed paper with 5 μ l of hydrogen peroxide (20%). The inhibition zone was measure after 48 hours in anaerobic conditions.

Biochemical characteristics

The biochemical characteristics of bacterial strains recovered after experimental infection and *in vitro* experiment were evaluated compared to the parental strain *B. fragilis* ATCC 43859 using the kits semi-automated Api20A (bioMérieux®) specific for anaerobic identification. The systems consist of panels with dehydrated substrates and bacterial suspension was performed according to the manufacturer's instructions. The panels were filled

in an anaerobic chamber and incubated at 37 ° C for 24 hours, followed by visual interpretation of displayed colors.

Results

Animal model of infection

In this experimental model, the infection process remains confined within the cage (filled with fluids), and became encased in connective tissue. This controlled experimental conditions showed to be adequate for the evaluation of the bacteria-host interaction.

The presence of *B. fragilis* was confirmed by amplification of DNA extracted from exudate with primer specific for the gene encoding the enterotoxin of the species (Figure 3).

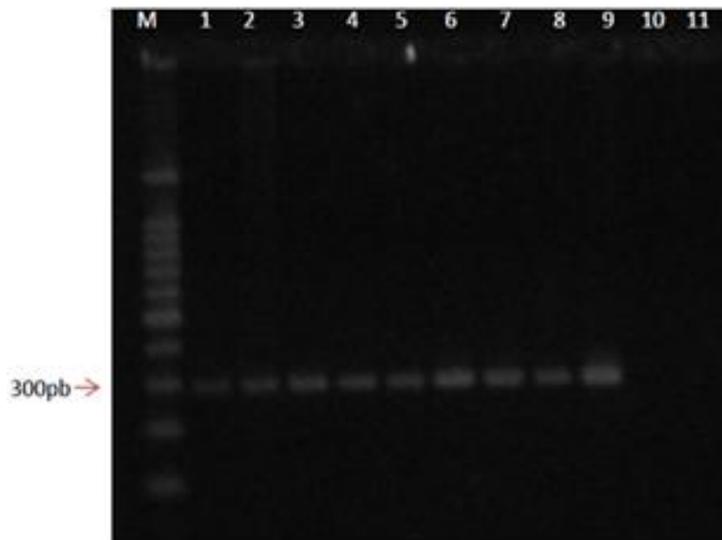


Figure 3: Products formed from the PCR with primers specific for enterotoxin of *B. fragilis* analyzed by agarose gel. M- molecular weight standard, 1- BfCT- *In vitro* control; 2, 3 - BfMTZa + (Exposed to 4 passages in subinibitória concentration metronidazole *in vivo*); 4, 5 - BfMTZa- (Exposed to 4 passages in subinibitória concentration of metronidazole and 4 passages without metronidazole *in vivo*), 6,7 - BfCTa+ *in vivo* control, 8,9 - BfCTa- *In vivo* control, 10- CN Negative control , 11- blank. Size of amplified fragment: 294 bp.

Effects of the SIC of antimicrobials on bacterial growth

To verify the interference of metronidazole in bacterial growth within the tissue cage and the *in vitro* culture, from the extracted DNA was performed absolute quantification using

qPCR with specific primers for *B. fragilis* identification. The bacterial load presented at time 2 was higher for both *in vivo* (Figure 4A) and *in vitro* (Figure 4B) experiment, which shows the interference of the pressure exerted by the drug in the bacterial population dynamics when compared with control.

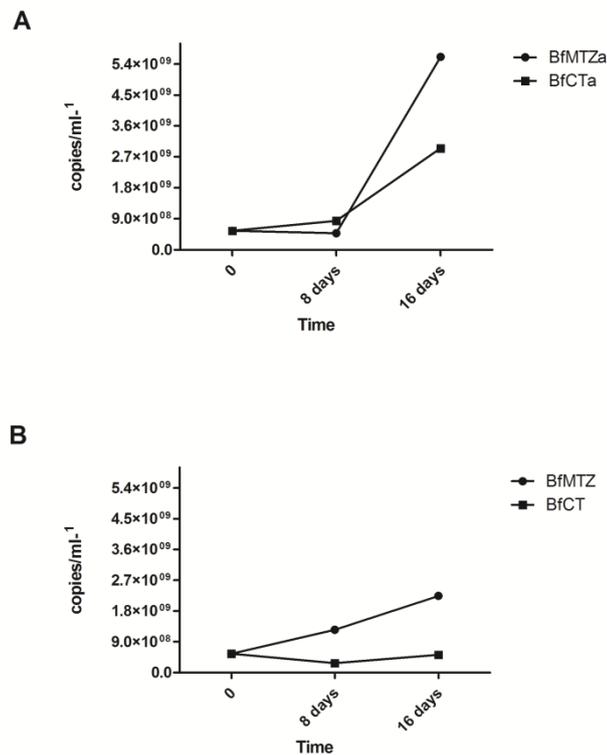


Figure 4. Quantification of bacterial load within the tissue cage and the *in vitro* culture by real-time PCR. A – BfCTa - *In vivo* control; BfMTZa - Exposed to 4 passages in subinhibitory concentration metronidazole *in vivo* (8 days) and 4 passages without metronidazole *in vivo* (16 days). B - BfCT - *In vitro* control; BfMTZ - Exposed to 4 passages in metronidazole *in vitro* (8 days) and exposed to 4 passages in metronidazole and 4 passages without metronidazole *in vitro* (16 days)

Hemogram analysis

Alterations were observed in hematological parameters related to neutrophil count. PCG showed an increased number of neutrophils at time 2 when compared to the time 1 (8 days), which was not observed for the experimental group, demonstrating the possible interference of metronidazole in host response (Figure 5B). Although at time 1 the total number of leukocytes showed no difference at the time 2 (16 days), differences were observed among EG and NCG (Figure 5A).

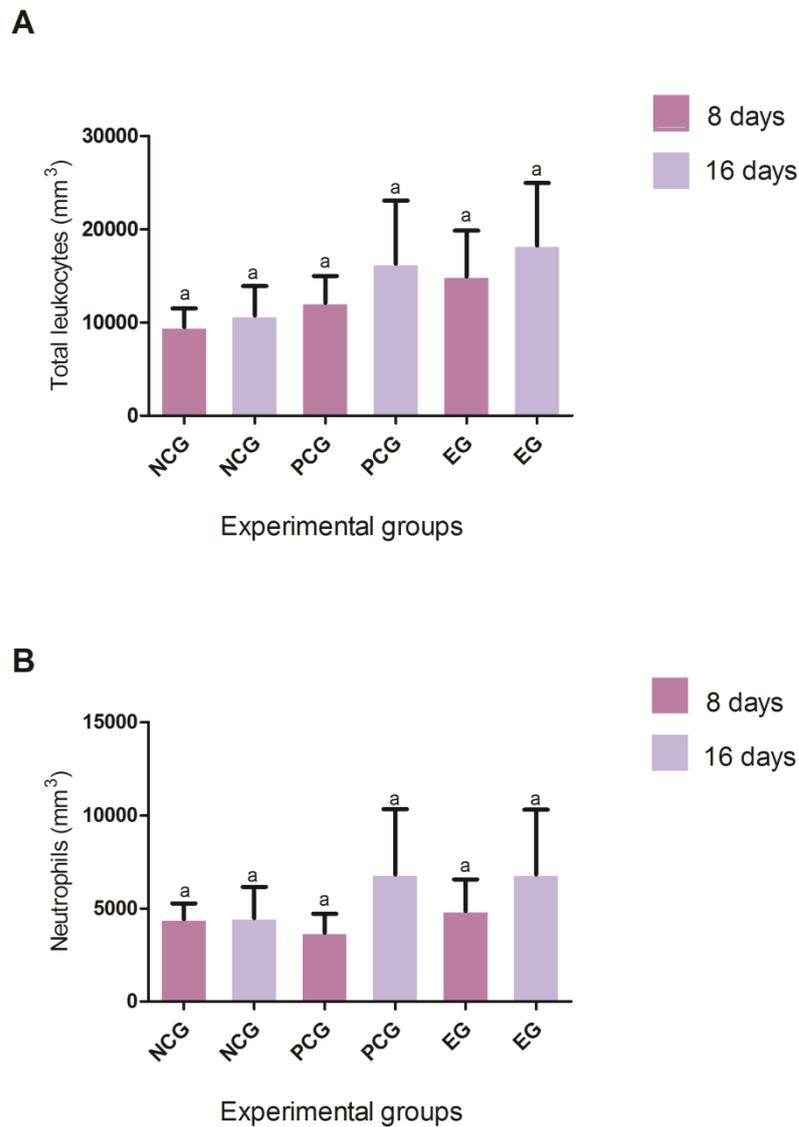


Figure 5: Analysis of neutrophil and total leukocytes after treatment subinhibitory concentration of metronidazole (8 days) and 8 consecutive days without metronidazole (16 days). PCG - Positive Control Group; EG - Experimental Group; NCG - Negative Control Group.

Histology analysis

In histological evaluation of tissue cage both groups showed an exacerbated inflammatory infiltrate at time 1 (Figure 6C and E). Formation of tissues and vasculature were visualized in all groups analyzed. Negative control group showed no inflammatory infiltrate (Figure 6A and B). However, after metronidazole removal, the inflammatory infiltrate decreased in EG (Figure 6F) when compared to the positive control group (Figure 6E). Thus, these results suggest that during MTZ treatment (8 days) there was an increase of inflammatory process and after MTZ treatment (16 days) there was a reduction of local inflammatory cell.

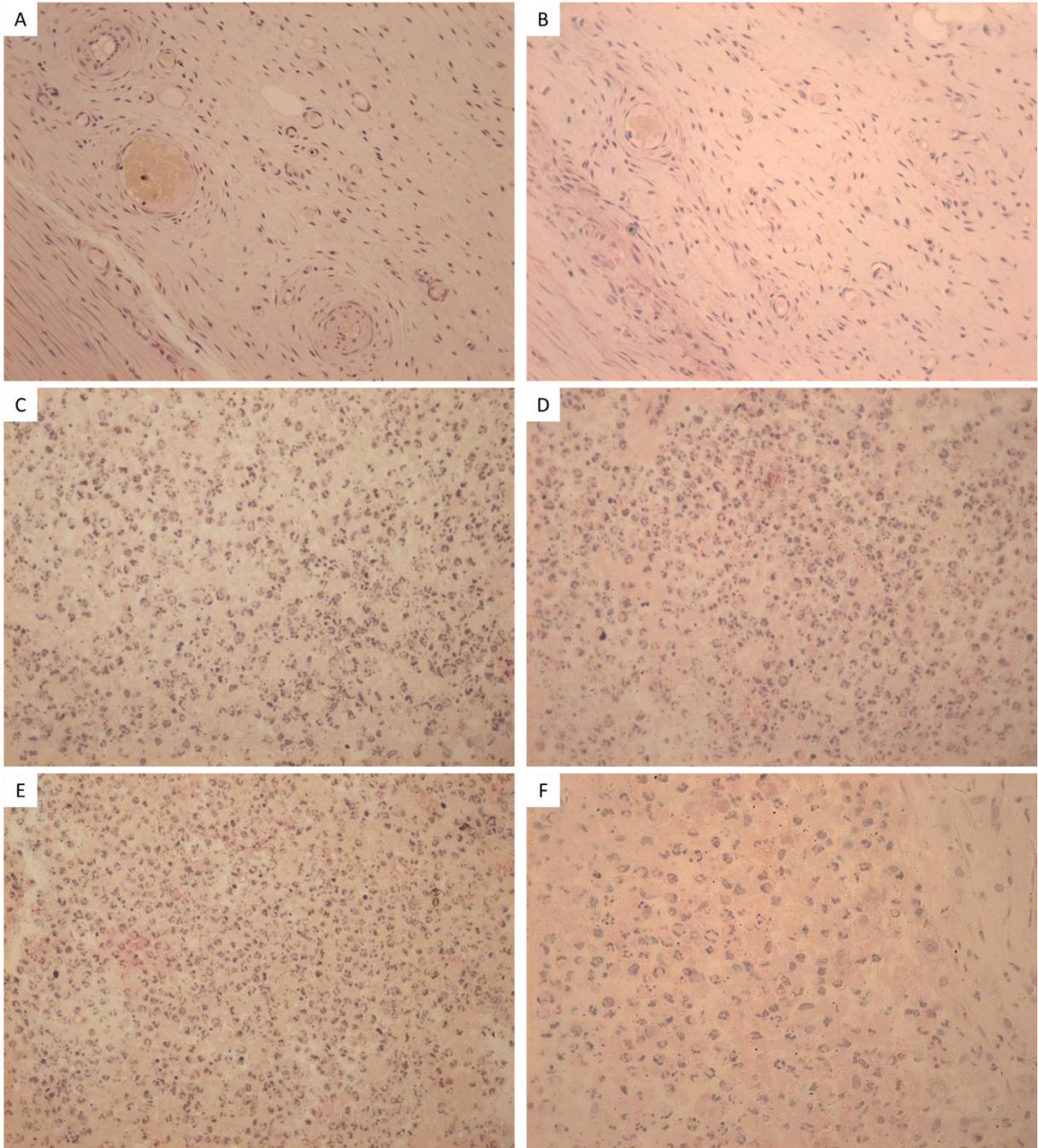


Figure 6: Histological analysis of tissue cage after treatment subinhibitory concentration of metronidazole (8 days) and 8 consecutive days without metronidazole (16 days). A - NCG - Negative Control (8 days); B - SCN - Negative Control Group (16 days); C - PCG - Positive Control Group (8 days); D - PCG - Positive Control Group (16 days); E - EG - Experimental Group (8 days); F - EG - Experimental Group (16 days).

Analyze leukocytes infected with *B. fragilis*

After leukocytes permeabilization, CFU was positive only in the cells recovered from infected animals. There were no differences among the groups in the number of recovered bacterial cells after permeabilization of leukocytes (Figure 7).

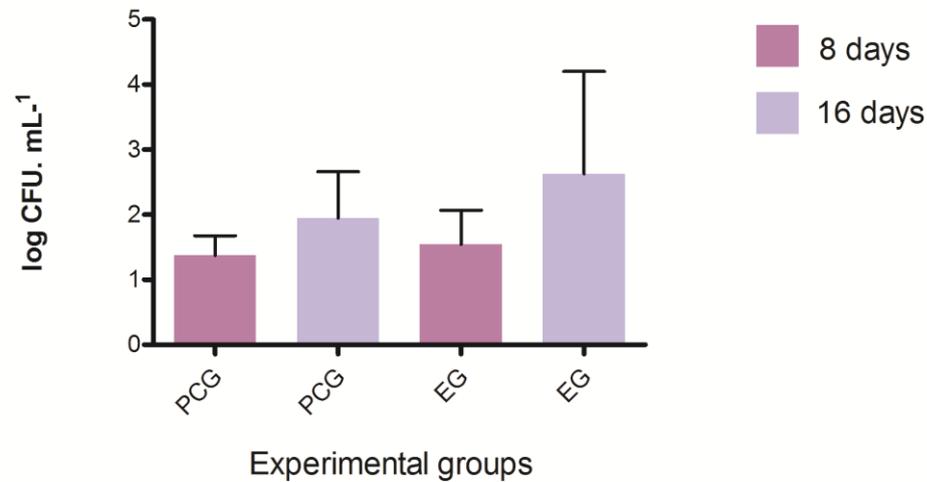


Figure 7. Counting of viable bacterial cells after lysis of the phagocytes after treatment subinhibitory concentration of metronidazole (8 days) and 8 consecutive days without metronidazole (16 days). PCG – Positive Control Group; EG – Experimental Group.

qPCR analysis of gene expression that encode cytokines in animals infected with *B. fragilis*

In this experiment an additional point was used to evaluate cytokine production after two days from the infection. At this point elevated levels of TNF- α , IL-1 α and IL-8 were detected.

At time 1, the cytokine more expressed was TNF- α , where the PCG was 10.0-fold upregulated, while the EG was 4.0-fold.

At time 2, considering IL-8, the expression was 14.0- and 6.5-fold upregulated at time 2 in EG and PCG, respectively. High level expression of IL-6 was shown, 94.6- and 56.5-fold upregulated was observed in EG and CG, respectively. Different levels of IL-1 α were detected, in the EG the expression was 7.0-fold upregulated and the PC was 20.3-fold.

The relative expression of IL-10 was 30.0-fold upregulated in EG and 3.0-fold upregulated in PCG demonstrating metronidazole treatment interfere in the host response in relation to IL-10 levels, especially.

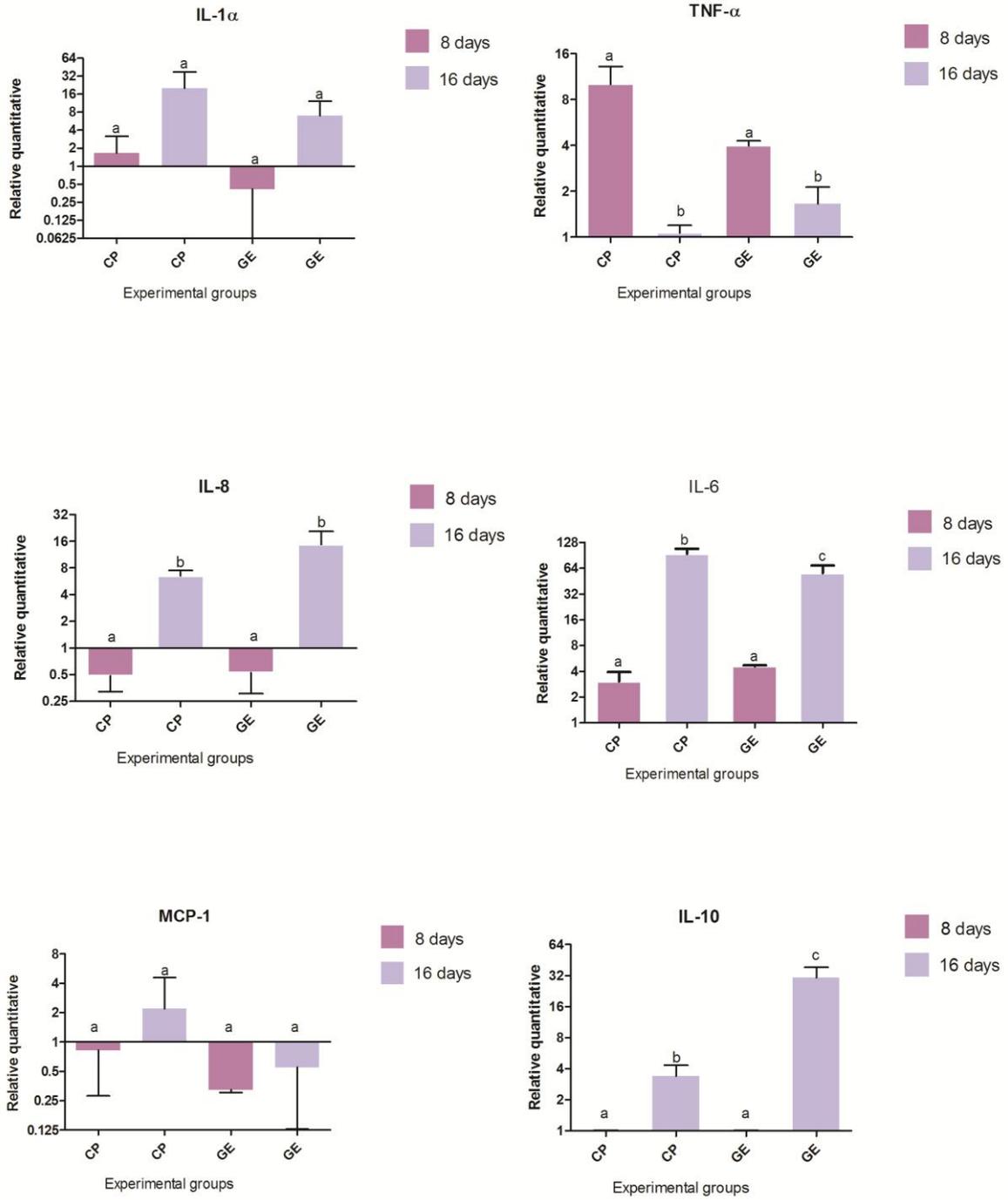


Figure 8: Expression levels of cytokines and chemokines after 2 days post infection, 8 days after treatment subinhibitory concentration of metronidazole (8 days) and 8 consecutive days without metronidazole (16 days) from exudates of infected rats. PCG - Positive Control Group; EG - Experimental Group.

Effects of the SIC of antimicrobials on cellular morphology

No change on cellular morphology was observed *in vivo* experiments after use of SIC of metronidazole (Figure 3E e 3G), when compared with the *in vivo* control (Figure 3A and 3C). However, evident morphological changes were observed *in vitro* experiments, BfMTZ+ showed bacterial filamentation (Figure 3F) when compared with the *in vitro* control (Figure 3B e 3D) and BfMTZ- (Figure-3H).

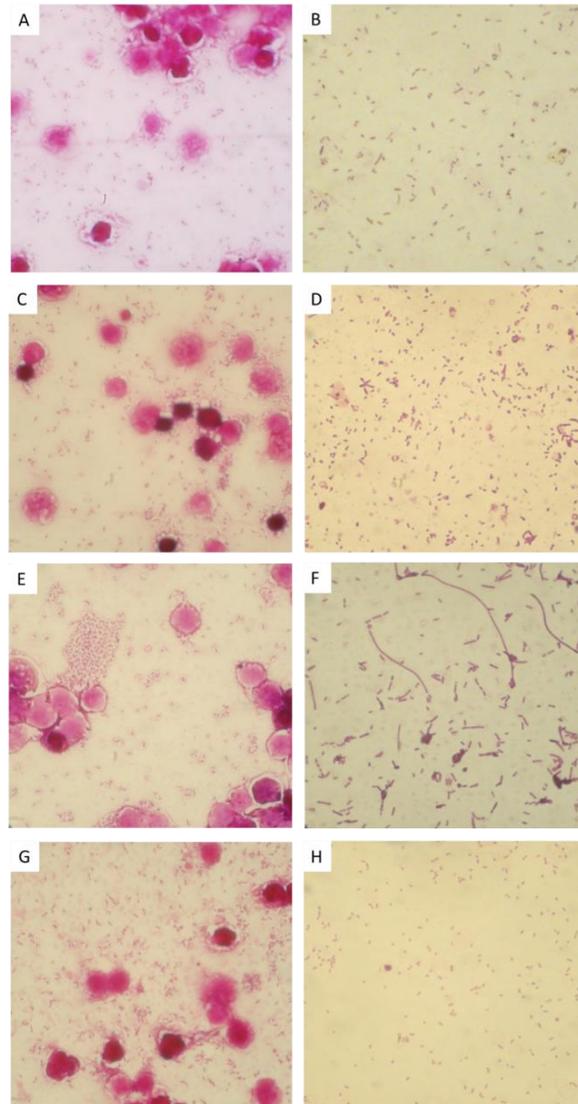
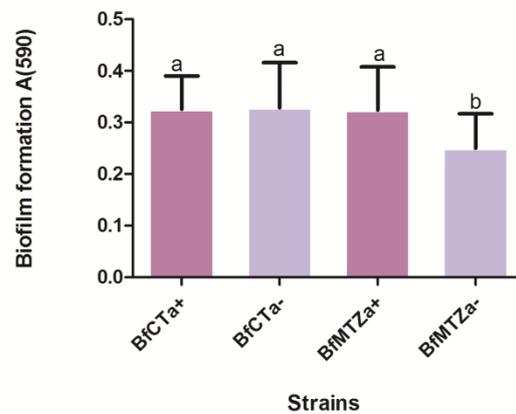


Figure 9. Photomicrograph of the morphological aspect of the cells exposed to subinhibitory concentration of metronidazole. A and C – BfCTa *In vivo* control; F - BfMTZa+ (Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days); G - BfMTZa- Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days) and 4 passages without metronidazole *in vivo* (16 days). B e D - BfCT *In vitro* control; F - BfMTZ+ Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro*(8 days); H - BfMTZ- (Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro*(8 days) and 4 passages without metronidazole *in vitro* (16 days). 1000x.

Effects of antimicrobial SICs on biofilm formation

Although no alteration in biofilm formation was observed in BfMTZa+ (Figure 10A), the BfMTZ + strain showed increased significantly compared the *in vitro* control (Figure 10B). After the drug was removed, the ability in biofilm formation decreased both in vitro and in vivo when compared with drug. The BfMTZa- strain significantly decreased the ability of biofilm formation.

A



B

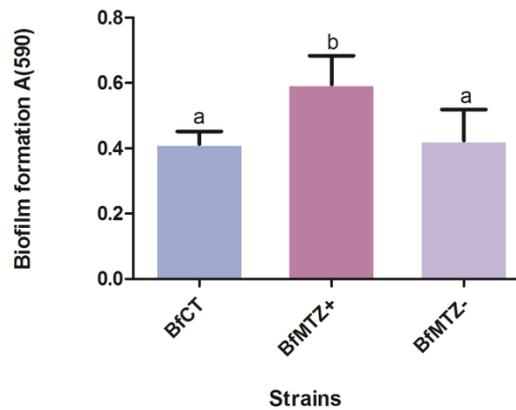


Figure 10: Effect subinhibitory concentration of Metronidazole on biofilm formation by *Bacteroides fragilis*. A- *In vivo* experiment. BfCTa+ *In vivo* control; BfMTZa+ (Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days); BfMTZa- Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days) and 4 passages without metronidazole *in vivo* (16 days). B - BfCT *In vitro* control; BfMTZ+ Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro*(8 days); BfMTZ- (Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro*(8 days) and 4 passages without metronidazole *in vitro* (16 days).

Effects of antimicrobial SICs in tolerance to oxidative stress

The recovered strains of the experiment *in vivo* showed no changes in oxidative stress tolerance when compared to control strain (Figure 11A). However, BfMTZ+ strain showed a significant increase in oxidative stress tolerance when compared to the control strain (Figure 11B).

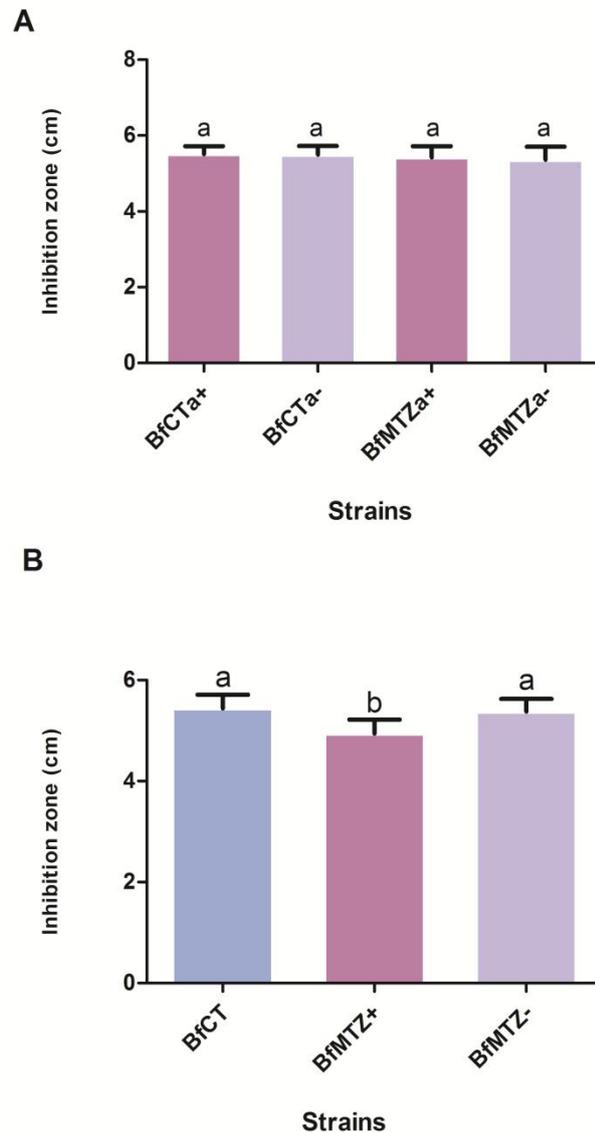


Figure 11. Effect subinhibitory concentration of Metronidazole in tolerance of *Bacteroides fragilis* to oxidative stress. A- *In vivo* experiment. BfCTa+ *In vivo* control; BfMTZa+ (Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days); BfMTZa- Exposed to 4 passages metronidazole *in vivo* (8 days) and 4 passages without metronidazole *in vivo* (16 days). B - BfCT *In vitro* control; BfMTZ+ Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro* (8 days); BfMTZ- (Exposed to 4 passages metronidazole *in vitro* (8 days) and 4 passages without metronidazole *in vitro* (16 days).

3.6 Biochemical profile of the effects of antimicrobial SICs

No alteration metabolic was observed *in vivo* and *in vitro* strains using the kit api20A, according to data shown in Table 2.

Table 2: Biochemical characteristics of the parental strain *Bacteroides fragilis* ATCC 43859 (ETBF) and strains selected after use of metronidazole SIC

Strains	Reactions ^a																		
	I N D	U R E	G L U	M A N	L A C	M A L	S A L	X Y L	A R A	G E L	E S C	G L Y	C E L	M N E	M L Z	R A F	S O R	R H A	T E R
BfCT	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZ+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZ-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfMTZa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
BfCTa-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-

^a IND: indole; URE: urease; GLU: D-glucose; MAN: D-mannitol; LAC:D-lactose; MAL: D-maltose; SAL: salicin; XYL: D xylose; ARA: L-arabinose; GEL: gelatin; ESC: esculin; GLY:glycerol; CEL:D-cellobiose; MNE: D-mannose; MLZ:D-melezitose; RAF:D-raffinose; SOR:D-sorbitol; RHA:L-rhamnose; TER: D-trehalose

+: positive reactions; -: negative reactions.

Discussion

Subinhibitory concentrations of antibiotics are found in anatomical sites, especially after therapy, and microorganisms belonging to the resident microbiota are often exposed to these conditions. This is a particular concern, leading to an imbalance that is often related to disease in the host. Inflammatory bowel disease, type II diabetes, irritable bowel syndrome,

autism and obesity have been related to the composition and diversity of the microbiota (Duncan et al., 2008; Finegold, 2008; Finegold et al., 2010; Khor, Gardet e Xavier, 2011; Kinross, Darzi and Nicholson, 2011; Öhman and Simrén, 2013).

Studies have demonstrated alterations in morphological and physiological profiles of microorganisms on contact with antimicrobial drugs, however these studies demonstrate changes *in vitro* behavior (Lorian and Gemmel, 1994; Chen et al., 2005; Silvestro et al., 2006; Silva et al., 2007). Culture assays showed that even the presence of metronidazole SIC there was a exacerbated growth with filamentation when compared to BfCT. *In vitro* assays have been extremely useful and provide information about the mechanisms of bacterial pathogenesis, but they are not representing all aspects of host-pathogen interaction (Chiang et al., 1999).

In vivo assays, the effect of metronidazole SIC can stimulate the bacterial growth even after drug removal. However, no filamentation was observed *in vivo* strains exposed to metronidazole. Consequently, a pattern that seems important *in vitro* studies may not be relevant *in vivo*. Although studies have associated the filamentation as escaped of immune system (Justice et al., 2008) and increase in virulence (Diniz et al., 2000), this response was not observed in actual model.

Considering that 99.9% of bacteria have the ability to form biofilm in a natural way, including *B. fragilis*, and is recognized an important cause in human infections, the increase or decrease in the ability of the microorganism to form biofilm can directly influence the pathogenicity. *B. fragilis* is a species with high capacity aggregation which provides a high potential for colonization and is considered the most virulent microorganism of genus (Pumbwe et al., 2007). The presence of metronidazole visibly influenced the morphological change and also exacerbated biofilm formation, however only strains recovered *in vitro*.

Other virulence factor considered, particularly in anaerobic is the aerotolerance, catalase and superoxide dismutase which are present in *B. fragilis*, are associated with protection against the toxicity of reactive oxygen forms (Baughn and Malamy, 2004). *In vivo* strains exposed to metronidazole did not present alterations in response to oxidative stress. Only BfMTZ + strain increased tolerance to hydrogen peroxide. The antimicrobial may contribute to increased tolerance to hydrogen peroxide, influencing the bacterial metabolism, interfering with the production of enzymes capable of degrading these toxic compounds (Fonseca et al., 2004).

It is important to consider that the exposure of unicellular organisms to environmental stress conditions can result in changes in the physiological behavior, reflected in the results of

conventional tests of physiological and biochemical evaluation. In relation to parameters related to bacterial metabolism, studies have shown that the presence of antimicrobials SIC or other stress factors such as oxidative may change the biochemical characteristics of microorganisms that can lead to misidentification (Silva et al., 2007; Souza Filho et al., 2012) however, using the API 20A kit showed no changes *in vivo* and *in vitro* recovered strains.

Altogether all these results of factor virulence demonstrate that *in vivo* and *in vitro* bacterial behavior in presence of antimicrobial is different and an analysis of the host response patterns becomes necessary to elucidate the bacteria-drug-host relationship.

Considering the host response, the results showed that the infectious process extraintestinal with ETBF remained in the site. In our model a large inflammatory infiltrate was observed in the tissue formed at the specimen in both infected groups, particularly at time 1. However, a decrease in infiltration was seen in EG at time 2. This decrease can be related to the significant increase in IL-10 at this time. The inflammatory infiltrate during ETBF infection has been observed, particularly in infections in the gastrointestinal tract (Sanfilippo et al., 2000).

The immune response against ETBF showed the expression of high levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , TNF- α and IL-8 after two days of infection prior to the onset of treatment with metronidazole. These cytokines are involved in chemotaxis, phagocytosis and production of acute phase proteins, mainly produced by macrophages and monocytes leading to an inflammatory response (Kim et al., 2002).

TNF- α levels were increased mainly in the first PCG time, moreover, an increase in cytokine expression was also observed in EG. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine involved in pleiotropic leukocyte migration and induction of chemokines and cytokines. The pro-inflammatory cytokines are necessary and often beneficial to the host during an infectious process, however the increase of its production can be directly related to disease manifestations such as shock and tissue injury (Tracey and Cerami, 1994).

However the increase in IL-10 expression levels can be beneficial for both the host and to the pathogen, since the anti-inflammatory cytokine limits the damage to host tissue and can facilitate pathogen-attenuation of the host immune response, thereby facilitating the persistent infection (Cohen-Paradosu, et al., 2011). At time 2, IL-10 levels were exaggeratedly expressed in the EG in addition there was a reduction of inflammation in the tissue examined specimen which may promote an increase in bacterial population within the capsule.

Some pathogens are able to interfere with the host immune response by mediating the production of anti-inflammatory cytokines. For example, mycobacteria induce the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β which attenuate the host immune responses through mechanisms such as induction of regulatory T cells and inhibition of macrophage activation (Hornef et al. , 2002).

B. fragilis induces the production of IL-10 for intestinal colonization by especially regulatory T cells during the infectious process but the production has been related to macrophages to reduce the inflammatory process and survival of the host containing the infectious process (Cohen-Poradosu , et al., 2011)

Although classical morphological and physiological changes, already studied during exposure in vitro (Chen et al, 2005;. SILVESTRO et al., 2006; Souza-Filho et al, 2012;.. FREITAS et al, 2015) have not been observed , compared to experimental tests in lines exposed to CSI metronidazole in vivo, we observed changes in the bacteria-host relationship. Studies addressing the profile of expression of bacterial genes during the infectious process can help to elucidate such changes.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Pos-Graduate Program in Biological Sciences (PGCBIO/UFJF). This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

APÊNDICE C – Outras atividades acadêmico-científicas desenvolvidas no período de abril de 2011 a abril de 2015

1. Artigos:

1.1 Autoria:

- *Bacteroides fragilis* response to subinhibitory concentrations of antimicrobials includes different morphological, physiological and virulence patterns after in vitro selection. *Microbial Pathogenesis*, v. 78, p. 103-113, 2015.

1.2 Co-autoria:

- Contamination with rRNA and degradation of mRNA constitutes major problems in isolating prokaryotic RNA for *in vivo* bacterial transcriptome analysis in complex samples. *Genetics and Molecular Research*. 2015
- Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Anaerobe* (London. Print), v. 18, p. 566-575, 2012.

2. Resumos publicados em Anais de congresso:

2.1 Internacionais:

- **Freitas, M. C. R.** ; Ferreira-Machado, A. B. ; Resende, A. B. ; Oliveira, L. M. A.; Nascimento, T. C. ; J., Gameiro ; Silva, Vânia L ; Diniz, C. G. . Experimental infection model to study drug-bacteria interactions: in vivo colonization dynamics and physiological characteristics of *Bacteroides fragilis* exposed to sub-inhibitory concentrations of metronidazole. In: 113th General Meeting American Society for Microbiology, 2013, Denver, Colorado
- **Freitas, M. C. R.** ; Ferreira-Machado, A. B. ; Resende, A. B. ; Castro, P. P. ; Nascimento, T. C. ; Silva, Vânia L ; Diniz, C. G. . Adequação de modelo experimental para o estudo in vivo da interação entre *Bacteroides fragilis*,

antimicrobianos e hospedeiros.. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos, SP. CD-ROM do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

- Souza Filho, J.A. ; Barbosa, N.B. ; Neves, M.S.L ; **Freitas, M. C. R.** ; Coelho, Cintia M ; Diniz, C. G. ; Silva, Vânia L . Physiological and Molecular Alterations in *Fusobacterium nucleatum* Exposed to Sub-inhibitory Concentrations of Antimicrobials. In: 111th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2011, New Orleans, Louisiana.

2.2 Nacionais

- **Freitas, M. C. R.** Local and systemic effects in response to *Bacteroides fragilis* infection in tissue cage model after treatment with metronidazole. In: XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology . Búzios. XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology 2014.
- **Freitas, M. C. R.** . Avaliação dos níveis populacionais de *Bacteroides fragilis* em modelo de infecção experimental após exposição à concentração subinibitória de metronidazol.. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
- Ferreira, L. F. ; Andrade, A. B. ; Campos, M. B. ; **Freitas, M. C. R.** ; Ferreira-Machado, A. B. ; Silva, Vânia L ; Diniz, Cláudio Galuppo . Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos e características fisiológicas de bactérias resistentes a drogas de relevância clínica, humana e ambiental. In: XIX Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013, Juiz de Fora
- Diniz, Cláudio Galuppo ; Souza Filho, J.A. ; **Freitas, M. C. R.** ; Macedo, G. C. ; J., Gameiro ; Silva, Vânia Lúcia ; Barbosa, Natália Bento . Alterações Induzidas por drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico e resistência em *Fusobacterium*. In: XVIII Seminário de Iniciação Científica, 2012, Juiz de Fora. XVIII Seminário de Iniciação Científica, 2012.
- Souza Filho, J.A. ; Barbosa, N.B. ; **Freitas, M. C. R.** ; Macedo, G. C. ; J., Gameiro ; Diniz, C. G. ; Silva, Vânia L . Influence of antimicrobials at subinhibitory concentrations in host-bacteria interactions of *Fusobacterium nucleatum*. In: XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2011.

3. Participação em eventos:

- XXXIX Congress of The Brazilian Society of Immunology 2014.
- XXXVII Semana de Biologia E XX Mostra De Produção Científica Da UFJF. Comissão Avaliadora dos Resumos Expandidos Apresentados na XXXVII Semana de Biologia E XX Mostra de Produção Científica da UFJF. 2014.
- 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2013.
- XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012.
- III SIMC - III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. 2012.
- 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2011.

4. Atividades docentes:

4.1 Aulas ministradas durante o período do Doutorado:

- Práticas de Microbiologia (2 semestres) - 16 horas/aula Turma medicina - Universidade Federal de Juiz de Fora
- Aulas teóricas e práticas - Micologia (1semestre) - Turma de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora
- Aula teórica : (3 semestres) Turma Medicina/Farmácia: 8 horas/aula - Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2. Participação em bancas de trabalho de conclusão de curso de Pós-graduação *Latu sensu* -Especialização

- Resende, J. A.; **FREITAS, M. C. R.**; Nascimento, T. C. Participação em banca de Fabiane Beatriz Rodrigues da Silva. Análise da frequência e do perfil de susceptibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes hospitalares e comunitários.. 2012. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Análises Clínicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.3. Participação em bancas de trabalho de conclusão de curso -

Graduação

- Da Silva, Vânia Lúcia; Fontes, C. O.; Paiva, A. D.; **Freitas, M. C. R.** Participação em banca de Suzane Fernandes da Silva. Pesquisa de substâncias antagonistas produzidas por bastonetes Gram negativos isolados de ambientes diversos em Juiz de Fora, MG. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Da Silva, Vânia Lúcia; **Freitas, M. C. R.**; Resende, J. A.. Participação em banca de Luciana de Souza Talha. Diversidade bacteriana em amostras de secreção vaginal de mulheres com e sem diagnóstico clínico de vaginose bacteriana pela técnica de DGGE. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Diniz, Cláudio Galuppo; Resende, J. A.; Nascimento, T. C.; **Freitas, M. C. R.** Participação em banca de Marina Barros Campos. Determinação da concentração inibitória fracionária de antimicrobianos associados a nanopartículas de prata. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Diniz, C. G.; **Freitas, M. C. R.**; Nascimento, T. C.. Participação em banca de Tamara Lopes Rocha de Oliveira. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. isolados de sistema de aquicultura, mediada por plasmídios.. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Da Silva, Vânia Lúcia; **Freitas, M. C. R.**; Resende, J. A.. Participação em banca de Pedro Possa de Castro. Prospecção de linhagens de cocos Gram-positivos produtores de substâncias antagonistas. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Silva, Vânia L; **Freitas, M. C. R.**; Silva, C.S.F. Participação em banca de Natália Bento Barbosa.. Aspectos bioquímicos e moleculares da resposta de *Fusobacterium nucleatum* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

- Silva, Vânia L; **Freitas, M. C. R.**; Souza Filho, J.A.; Fontes, C. O. Participação em banca de Rafaella Nogueira da Gama Mazzei. Resistência cruzada e implicações das concentrações subinibitórias de antimicrobianos na morfologia de *Fusobacterium Nucleatum* e na sua habilidade de formação de biofilme. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

5. Projetos de Pesquisa

- Avaliação do transcriptoma bacteriano e de aspectos fisiológicos e da patogênese de *Bacteroides fragilis* durante infecção experimental em resposta a concentrações subinibitórias de metronidazol
- Alterações celulares e avaliação de aspectos da interação bactéria-droga-hospedeiro, de linhagem de *Bacteroides fragilis* exposta a concentração sub-inibitória de metronidazol durante infecção experimental.
- Pesquisa sobre a participação de *Gardnerella vaginalis*, espécies de Candida e o Papiloma Virus Humano em manifestações clínicas de doenças cérvico-vaginais em mulheres atendidas no serviço de ginecologia da cidade de Juiz de Fora, seu perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas e relações fenéticas entre linhagens de mesma espécie.
- Alterações induzidas por drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico e resistência cruzada em *Fusobacterium*.

ANEXO

Anexo - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa Animal:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 035/2010 – CEEA sobre “AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO TRANSCRIPTOMA E DA PATOGENICIDADE DE *Bacteroides fragilis* SELECIONADO EM CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE METRONIDAZOL”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de CLÁUDIO GALUPPO DINIZ, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 09/11/2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 050/2010 - CEEA about “IN VIVO EVALUATION OF TRANSCRIPTOME AND PATHOGENOCITY FROM *Bacteroides fragilis* SELECTED IN SUB-INHIBITORY CONCENTRATION OF METRONIDAZOLE” – CLÁUDIO GALUPPO DINIZ - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 09/11/2010.

Juiz de Fora, 11 de novembro de 2010.



Presidente/CEEA

pl 

Secretário/CEEA