

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Interferência do regulador transcricional OxyR e da enzima catalase na capacidade de sobrevivência e virulência de *Bacteroides fragilis* em condições *in vitro* e *in vivo***

Livia Queiroz Ferreira

2007



**Interferência do regulador transcricional OxyR e da enzima catalase na capacidade de sobrevivência e virulência de *Bacteroides fragilis* em condições *in vitro* e *in vivo***

Livia Queiroz Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2007

Ferreira, Livia Queiroz

Interferência do regulador transcricional OxyR na capacidade de sobrevivência e virulência de *Bacteroides fragilis* em condições *in vitro* e *in vivo*/ Livia Queiroz Ferreira. – Rio de Janeiro: UFRJ/IMPPG, 2007

xii, 59f

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ IMPPG/ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 46-59

1. *Bacteroides fragilis*. 2. OxyR. 3. Catalase. 4. Aerotolerância. 5. Estresse oxidativo. 6. Virulência. I. Domingues, Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título

**“When a thing ceases to be a subject of controversy, it  
ceases to be a subject of interest.”**

*William Hazlitt*

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues.

## ***AGRADECIMENTOS***

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida, pela minha família, agradeço por seu amor, por me fortalecer a cada manhã, por me dar sabedoria. Agradeço a Deus por ter me dado saúde durante esse percurso, por ter me dado condições de iniciar e finalizar esta etapa da minha vida. Obrigada Deus, por ter me sustentado e cuidado de mim com tanto amor!

A minha família, meus pais Eligio e Eunice, por me darem a vida, seu amor, carinho e compreensão, por me darem todo o apoio para fazer o mestrado, mesmo não tendo bolsa, pois sabiam do imenso valor em se fazer uma pós-graduação em uma instituição pública reconhecida. A minha irmã Bianca, pelas centenas de horas que passei em frente ao computador enquanto ela também precisava fazer trabalhos da faculdade, ou então entrar no Orkut ou no MSN! ☺ A minha cadelinha Rhanna (sei lá como se escreve, coisas da minha irmã) por todas as vezes que cheguei cansada da faculdade e lá vinha ela com a bolinha na boca e o rabo balançando pra me receber. Agradeço a Deus todos os dias por vocês existirem! Amo vocês!!

Ao namorado mais amado do mundo, Daniel, pelos fins de semana que me acompanhou até o Fundão para que eu fizesse algum experimento, pela compreensão quando não podia sair, pois tinha algum trabalho pra fazer ou, então, agora na reta final, quando estava terminando esta bendita dissertação. Obrigada por me ensinar a mergulhar, uma das melhores coisas da vida!!! Todo mundo deveria mergulhar pelo menos uma vez antes de morrer! Pelas viagens que fizemos pra relaxar, abstrair os problemas do dia-a-dia. Ai, Búzios... Mesmo após 10 anos, te amo desde aquele dia! ☺

A minha eterna orientadora e meio vizinha, Candida, que mesmo não estando mais tão perto, sempre esteve torcendo por mim. Obrigada por ceder sua casa de Pendotiba para tantos churrascos dos anaeróbios. Não posso esquecer de agradecer ao Paulo, que faz o churrascão, e aos filhos Paula e Léo, que sempre nos receberam muitíssimo bem.

A minha segunda mãe, amiga e também orientadora, Regina, por sempre ter tentado arrumar uma bolsa pra mim, por me ajudar nos meus resultados mais esquisitos e inesperados, por ter tantas idéias espetaculares. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelas conversas sobre todos os assuntos, pelos inúmeros elogios, pela sua simpatia e, acima de tudo, obrigada por sua dedicação. Para ser orientadora não basta só ter vontade, é preciso ter o dom, e isso ela tem de sobra! Valeu mesmo! ☺ A-DO-RO VOCÊ!!!

À grande família, os Anaeróbios: Laís (Lalá, dessa vez não vou esquecer de você! Me desculpe! E que venha o casamento ☺), Karlinha, Heidi (a melhor organizadora da semana de micro de todos os tempos), a internacional Lili, Renata (de volta a família), Joyce (ou então Heidi, como é chamada pela Regina ☺), ao também internacional Rafael, Mariana (mãe da Alice, barrigudinha), Bruno (toma conta da minha última camundonga, hein), André (ex futuro anaeróbio), Gabriel (modelo capa de caderno huahauhauhah), Joaquim, e a nossa secretária Jacque, que já faz parte desta família. Obrigada pela amizade, pela força que vocês me dão, pela alegria que sinto quando estou com vocês. Vocês estarão sempre no meu coração!

Aos ex e sempre anaeróbios: Ana Paula, Leandrão, Leandrinho (voltando aos poucos), Caetano, Kátia, Renato (mais aqui do que na UFF), Eduardo, Jéssica, Saulo e Deysoca. Vocês são a história deste laboratório!!!

Um agradecimento super, ultra, mega, hiper especial ao nosso querido técnico Joaquim. Desculpe pelos 180 tubos de tampão “Blanks” que você descontaminava e lavava em 1 dia para que eu pudesse fazer meus experimentos astronômicos, pelas centenas de placas de agar sangue, pelas jarras de anaerobiose que você desocupava para eu incubar minhas placas! Muitíssimo obrigada! Espero não te dar tanto trabalho no doutorado.

Um parágrafo é pouco pra agradecer a minha amiga e estagiária Joyce Maria. Fiz tanta maldade com ela! Tinha dias que ela saía do Fundão às 18h por causa dos MEUS experimentos. Tadinha! Lembro do primeiro dia em que ela, o Rafael e eu fomos sacrificar o primeiro camundongo. Os dois quase choraram. E até hoje eles não gostam de ver os bichinhos morrendo. Desculpem por tanta coisa ruim... ☺ Joyce, obrigada por tudo!!! Pelos papos no subsolo, afinal de contas os experimentos foram quase todos feitos lá embaixo, pelas horas gastas com meus experimentos, por suportar trabalhar com camundongos, mesmo não gostando do rabinho deles. Essa menina é uma fera. Dizem que ela é minha aprendiz, sei lá, acho que é mais brava que eu. Este ano é ano de monografia! Tá ficando uma moça, né. É fato que eu vou estar na sua banca! Torço por você! Te adoro!

Não posso deixar de destacar e agradecer meus outros estagiários. O Rafael, agora internacional, trabalhando com “quorum sensing” nos EUA, me ajudou muito também, afinal de contas uma mãozinha masculina é sempre bem vinda ☺! E a Mariana, ainda no 5º período, novinha, mas pau-pra-toda-obra. Essa aí não se importa em trabalhar com animais, leva até

jeito. Foi ela que, com muita paciência, me ajudou a colocar todos os dados deste trabalho no computador para fazer as análises estatísticas. Muito obrigada.

Ao Dr. Edson Rocha, pelo envio das cepas estudadas e pela paciência com meus emails sem pé nem cabeça, cheio de dúvidas sobre as cepas e meus resultados enigmáticos.

Ao Prof. Sérgio Fracalanza e ao técnico Marquinhos, agradeço pela atenção, boa vontade e paciência de vocês e pela ajuda com os experimentos *in vivo*.

À Prof<sup>a</sup>. Rossiane, agradeço por tanta dedicação, paciência, disposição, simpatia e bom humor. Muito obrigada por dedicar tanto tempo do seu dia aos meus experimentos!

Aos alunos e professores do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (IBCFF), que sem tamanha colaboração parte deste trabalho não seria realizado.

À Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Colombo, que além de revisar minha dissertação, ainda me ajudou com todas as análises estatísticas. Agradeço muito por sua paciência, boa vontade, simpatia.

Aos alunos e à Prof<sup>a</sup>. Lucy Seldin do Laboratório de Genética Microbiana, que muito me ajudaram no meu primeiro projeto de mestrado.

Aos meus queridos amigos Renata, Felipe e Vanessa, companheiros de Ponte Rio-Niterói engarrafada. Rê, obrigada pela ajuda com meus experimentos de DGGE, mesmo não tendo dado muito certo. Felipe, com uma carona como você, nunca vou precisar comprar um carro!

Aos meus antigos e novos amigos, de infância, do colégio, do prédio. São tantos que não daria pra listar aqui. Todos vocês foram e sempre serão muito importantes na minha vida!

Aos amigos do Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose (Fiocruz), Kátia, Ilana (boa sorte na sua nova carreira, professora!), Tati (mestranda sofredora), Dani, Antônio, Vanessa, Mariana, Beth, Fernando, Darcília, e a Dr<sup>a</sup> Martha Pereira.

Aos alunos, técnicos e professores do Departamento de Microbiologia Médica, agradeço pelos empréstimos de reagentes, de aparelhos, de livros. Obrigada pelas conversas divertidíssimas na sala de almoço e pelos papos fora de hora nos corredores.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo do Góes nas pessoas da diretora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Agnes Marie de Sá Figueiredo, e da coordenadora de pós-graduação, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Padrón, pela oportunidade.

Às instituições de apoio à pesquisa: FUJB, PRONEX, CAPES, FINEP-BID e CNPq.



## SUMÁRIO

<i>Resumo</i> .....	10
<i>Abstract</i> .....	11
<i>Introdução</i> .....	12
1. <i>Microrganismos anaeróbios</i>	12
2. <i>Bacteroides fragilis</i>	13
3. <i>Infecções por anaeróbios</i>	13
4. <i>Resposta do hospedeiro às infecções por anaeróbios</i>	16
5. <i>Fatores de virulência de B. fragilis associados a infecções</i>	19
6. <i>Aerotolerância</i>	20
7. <i>O regulador transcricional OxyR</i>	24
<i>Objetivos</i> .....	27
<i>Materiais e Métodos</i> .....	28
a) <i>Cepas bacterianas e condições de cultivo</i> .....	28
b) <i>Avaliação do comportamento das cepas em condições de ausência de O<sub>2</sub></i> .....	29
c) <i>Avaliação da capacidade de sobrevivência in vitro</i> .....	30
d) <i>Avaliação da capacidade de sobrevivência in vivo</i> .....	30
e) <i>Avaliação da sobrevivência frente a macrófagos peritoneais residentes</i> .....	32
f) <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	33
g) <i>Modelo animal de indução de abscessos intra-abdominais e mortalidade</i> .....	33
h) <i>Análise estatística</i> .....	34
<i>Resultados</i> .....	35
<i>Discussão</i> .....	50
<i>Conclusões</i> .....	56
<i>Referências Bibliográficas</i> .....	58

## RESUMO

### **Interferência do regulador transcricional OxyR e da enzima catalase na capacidade de sobrevivência e virulência de *Bacteroides fragilis* em condições *in vitro* e *in vivo***

Livia Queiroz Ferreira

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Bacteroides fragilis* é um microrganismo anaeróbio habitante do trato intestinal humano que nos últimos anos tem sido considerado como altamente aerotolerante, sendo capaz de sobreviver por mais de 48h na presença de O<sub>2</sub> sem perda significativa em sua viabilidade. Neste estudo, avaliamos se o regulador transcricional OxyR, responsável pela resposta adaptativa ao peróxido de hidrogênio e ao oxigênio, interfere com a sobrevivência e virulência de *B. fragilis* através de análises comparativas do comportamento de cepas parental e mutantes. Em ensaios para a avaliação da interferência na capacidade de sobrevivência *in vitro*, a cepa 638R parental e as mutantes *oxyR* e *katB* foram expostas ao oxigênio pela agitação das culturas em atmosfera aeróbia. Em diferentes tempos (0, 4, 7, 18 e 24h) foram retiradas alíquotas para a contagem de células viáveis. A cepa parental, assim como a mutante *katB*, não apresentou decréscimo na viabilidade celular após 24h de exposição ao oxigênio, enquanto a mutante *oxyR* apresentou decréscimo de 50% na contagem de células viáveis. Experimentos com modelo animal foram realizados através da implantação de câmaras contendo uma suspensão bacteriana (10<sup>9</sup> UFC/mL) na cavidade peritoneal de camundongos. As câmaras foram retiradas nos tempos 0, 4, 24 e 48h pós-implantação para determinação de UFC/mL. Neste experimento, as cepas parental e mutantes não apresentaram decréscimo na viabilidade celular. Para avaliar a sobrevivência das cepas frente a macrófagos (Mφ) peritoneais residentes, foram realizados ensaios de interação bactéria:Mφ por 1h. Pôde-se observar uma maior susceptibilidade a morte por Mφ para a cepa mutante *oxyR* (99,08%) em relação à cepa 638R e mutante *katB* (taxas de mortalidade de 63,4% e 94,33%, respectivamente). Microscopia eletrônica de varredura foi realizada na tentativa de observar alterações morfológicas nos macrófagos após interação com as cepas de *B. fragilis*. Nenhuma alteração foi detectada para as 3 cepas. Um modelo *in vivo* de infecção intraperitoneal foi utilizado para avaliação da capacidade de indução de abscessos. A cepa 638R foi capaz de induzir um número menor de abscessos e também de menor tamanho, quando comparados aos das cepas mutantes. A contagem de UFC/mL/mm de abscesso da cepa parental foi similar à da cepa IB 298, enquanto que a da cepa IB 260 foi maior. Juntos, estes resultados mostram que a resistência de *B. fragilis* ao estresse oxidativo desempenha um papel na sua sobrevivência em ambientes oxigenados, mas em condições *in vivo* este regulon parece interferir na capacidade de indução de abscessos pela espécie.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, OxyR, catalase, aerotolerância, estresse oxidativo, virulência

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2007

## ABSTRACT

### **Interference of the transcriptional regulator OxyR and catalase in *Bacteroides fragilis* survival and virulence *in vivo* and *in vitro***

Livia Queiroz Ferreira

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro

*B. fragilis* is an obligate anaerobic Gram negative bacterium which is able to survive in the presence of O<sub>2</sub> for approximately 48h without significant loss of viability. In this study it was evaluated if the transcriptional regulator OxyR affects *B. fragilis* under *in vivo* and *in vitro* conditions. For the *in vitro* assays, *oxyR*, *katB* mutants and the 638R wild strains were grown under aerobic atmosphere by shaking the cultures. Aliquots were taken at different time points (0, 4, 7, 18, 24h) for cell viable counts. Parental and *katB* mutant strains did not show a decrease in cell viability after 24h of O<sub>2</sub> exposure. In contrast, the *oxyR* mutant lost 50% in cell viable counts. One *in vivo* mouse model was performed using capsules containing bacteria (10<sup>9</sup> CFU/mL) implanted into peritoneal cavity. Samples from the capsules were taken at 0, 4, 24 e 48h post-implantation to determine the CFU/mL. In these *in vivo* experiments, *oxyR* and *katB* mutants did not show a decrease in cell viability after 48h incubation and the parental strain presented a similar behavior. To evaluate the survival of these strains in peritoneal macrophages (Mφ) a bacteria:Mφ interaction assay was performed. IB 298 showed a greater susceptibility to macrophages killing (99,08%). In contrast, IB 260 e 638R seemed to be less sensitive (94,33% and 63,4%, respectively). Scanning electron micrograph was performed to observe macrophages modifications after *B. fragilis* interaction. No morphological changes were observed. An *in vivo* mouse model of intraperitoneal abscess induction was also employed and it was observed that mutants strains induced more abscesses than the parental strain. The CFU/mL/abscess mm from parental strain were very similar to IB 298 strain, while the CFU/mL/abscess mm from IB 260 strain were bigger. Taken together, these data show that *B. fragilis* resistance to oxidative stress plays a role in its survival in oxygenated environment, but on *in vivo* conditions this regulon seems to interfere with abscesses induction by this species.

Key-wors: *Bacteroides fragilis*, OxyR, catalase, aerotolerance, oxidative stress, virulence

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2007

## *Introdução*

---

### **1. Microrganismos anaeróbios**

As bactérias anaeróbias são componentes das populações que compõem as microbiotas de animais e humanos, predominando no trato gastrointestinal, principalmente no cólon, além de estarem presentes também em sítios como pele, cavidade oral, trato respiratório superior e trato urogenital (FINEGOLD & GEORGE, 1989). Numericamente, as bactérias anaeróbias chegam a ultrapassar as aeróbias na proporção de 1000:1 em partes do trato intestinal (WILLIS, 1991). Estes microrganismos participam da microbiota auxiliando o hospedeiro na manutenção de sua saúde, através da produção de vitaminas essenciais, como a vitamina K, cofatores e ácidos graxos. Eventualmente, membros deste grupo apresentam-se como patógenos oportunistas causando uma série de infecções endógenas, principalmente intra-abdominais (GOLDSTEIN, 1995), sendo parte destas infecções (65%) causada por componentes do gênero *Bacteroides* (POXTON *et al.*, 1997).

Originalmente, os membros deste gênero eram representados por mais de 40 espécies, sendo descritos como bastonetes Gram negativos, anaeróbios estritos, sacarolíticos e não formadores de esporos (HOLDEMAN, KELLY & MOORE, 1984). Em função de uma grande heterogeneidade quanto à morfologia celular, atividade sacarolítica e proteolítica, esta classificação passou a ser considerada insatisfatória. Diversos estudos tendo por base análises sorológicas (LAMBE, 1976), análises das propriedades fisiológicas e bioquímicas, tais como composição do peptidoglicano, ácidos graxos e produtos finais do metabolismo, levaram a propostas de exclusão de algumas espécies do gênero (BRONDZ *et al.*, 1989; 1991; COLLINS & SHAH, 1987; HOLDEMAN, KELLY & MOORE, 1984). Foi a partir da realização de estudos de homologia de DNA (JOHNSON, 1978), hibridização DNA-RNA ribossomal (JOHNSON & HARICH, 1986) e técnicas para análise comparativa do RNA ribossomal da subunidade 16S (PASTER *et al.* 1985) e subunidade 5S (VAN DEN EYDE *et al.*, 1989) que a grande heterogeneidade do gênero *Bacteroides* foi comprovada. Em 1989, Shah & Collins propuseram que o gênero fosse então restrito à espécie *Bacteroides fragilis* e a espécies intimamente relacionadas. Este gênero é composto por espécies sacarolíticas, resistentes a bile, não pigmentadas, capazes ou não de hidrolisar a esculina e que tem como principais produtos finais do metabolismo da glicose os ácidos succínico e acético. Dez espécies fazem parte do gênero *Bacteroides*: *B. fragilis*, *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. merdae*,

*B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. stercoris*, *B. vulgatus* e *B. eggerthii* (SHAH, 1992).

## **2. *Bacteroides fragilis***

A espécie *B. fragilis* é considerada, clinicamente, a mais importante dentro do gênero. Esta é a mais comumente isolada de processos infecciosos endógenos, estando geralmente associada a infecções nos tratos gastrointestinal, respiratório e genital feminino, e nos tecidos moles (GIAMARELLOU, 2000). Quadros como infecções intra-abdominais (CRAB *et al.*, 1990), bacteremias (GOLDSTEIN & CITRON, 1988), abscessos retroperitoneais (BROOK & FRAZIER, 1998), cerebrais, hepáticos, pulmonares (PATRICK, LUTTON & CROCKARD, 1995) e cutâneos (BROOK & FINEGOLD, 1981) merecem destaque como os mais freqüentemente associados à espécie.

É interessante mencionar que apesar do destaque que a espécie *B. fragilis* apresenta em infecções originárias de desequilíbrios no trato intestinal, esta representa apenas cerca de 1% das bactérias anaeróbias obrigatórias componentes da microbiota anfibiônica intestinal de humanos. Entretanto, uma íntima associação destes microrganismos com a mucosa intestinal já foi observada, sugerindo um possível envolvimento da aderência com um maior potencial de agressão da espécie quando comparada às demais (NAMAVAR *et al.*, 1989; NAMAVAR, VERWEIJ VAN VUGHT & MACLAREN, 1991).

## **3. Infecções por anaeróbios**

Muito do que se sabe hoje em dia sobre o papel das bactérias anaeróbias em processos infecciosos foi baseado, principalmente, em observações feitas em modelos animais desenvolvidos durante as décadas de 1970 e 1980 (ONDERDONK, 2005). Os primeiros indícios de que os anaeróbios obrigatórios, outros que não os clostrídeos toxigênicos, eram importantes agentes etiológicos em certos processos infecciosos vieram de estudos experimentais em camundongos mostrando que abscessos no fígado eram induzidos por anaeróbios pertencentes aos gêneros *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* (HILL, OSTERHOUT & PRATT, 1974). Neste estudo foi demonstrado que quando animais eram desafiados com bactérias anaeróbias obrigatórias na ausência de espécies facultativas havia o

desenvolvimento de abscessos hepáticos, indicando que tais microrganismos tinham um potencial patogênico, até então desconsiderado.

Talvez o modelo animal mais usado para infecções anaeróbias seja o descrito em 1974, em duas publicações paralelas (ONDERDONK *et al.*, 1974; WEINSTEIN *et al.*, 1974). Neste modelo no qual se empregou ratos Wistar para a observação de sepse intra-abdominal, a implantação cirúrgica de conteúdo cecal na cavidade peritoneal é proposta visando o desencadeamento de um processo infeccioso consistente com o processo de sepse intra-abdominal em humanos. Os achados microbiológicos quantitativos dos conteúdos dos abscessos obtidos após este desafio revelaram que os anaeróbios obrigatórios eram os microrganismos numericamente dominantes e que apenas algumas das muitas espécies presentes no conteúdo cecal eram encontradas nos abscessos (ONDERDONK *et al.*, 1974; WEINSTEIN *et al.*, 1974).

Muitas das observações feitas no modelo de sepse intra-abdominal com ratos foram verificadas também em outros animais como cobaias e camundongos, usando modelos de infecções por feridas, o que incluiu, por exemplo, a verificação do forte sinergismo entre *B. fragilis* e *Escherichia coli* no estabelecimento de infecções purulentas (KELLY, 1978; 1980; SCHEIBEL, NIELSEN & LINDENBERG, 1978). Um dos aspectos mais importantes destes estudos foi a determinação de que os anaeróbios obrigatórios eram, na maioria das vezes, parte de uma infecção polimicrobiana que incluía tanto patógenos facultativos quanto anaeróbios.

O uso de melhores técnicas para o isolamento e caracterização de anaeróbios isolados de espécimes clínicos veio a confirmar que membros do gênero *Bacteroides* eram realmente os mais comumente associados a infecções polimicrobianas. Em 1977, Kasper e colaboradores mostraram que *B. fragilis* parecia ter uma cápsula polissacarídica não detectada nos outros microrganismos do gênero. Em uma série de experimentos usando o modelo de sepse intra-abdominal em ratos, foi sugerido que o polissacarídeo capsular de *B. fragilis* era o principal fator de virulência deste microrganismo e que, diferentemente dos outros membros do grupo, *B. fragilis* era capaz de causar abscessos em ratos sem a presença de sinergismo microbiano (ONDERDONK *et al.*, 1977a).

Desde o início do século, existem relatos de que exsudatos peritoneais de pacientes com inflamação ou perfuração do intestino grosso contém um grande número de microrganismos anaeróbios obrigatórios (FREIDRICH, 1902 *apud* BROOK, 2003). Já em 1932, Meleney e

colaboradores relacionaram a importância desta microflora com a severidade da infecção. Em 1938, tal microflora foi estudada com mais detalhes por Altemeier, o qual demonstrou o sinergismo das infecções polimicrobianas verificando um maior potencial de agressão quando cepas facultativas estavam associadas a cepas anaeróbias estritas (*apud* BROOK, 2003).

Os processos inflamatórios da cavidade peritoneal ou da membrana peritoneal são designados como peritonites, sendo que na maioria dos casos estas são de origem infecciosa. Em condições normais, a cavidade peritoneal é estéril e encontra-se isolada do trato intestinal e urogenital por barreiras de tegumento e interstício que correspondem ao primeiro e mais importante mecanismo de defesa peritoneal. Desta forma, a grande maioria das infecções neste sítio se inicia com soluções de continuidade na barreira tegumentar e subsequente contaminação do peritônio por microrganismos (DOBBIE, 1993).

As peritonites infecciosas são classificadas tradicionalmente em primárias ou secundárias (LEVINSON & BUSH, 1995). As formas primárias são as formas espontâneas sem causa aparente, com um único agente etiológico, quase sempre uma bactéria aeróbia. Postula-se a existência de cinco vias de contaminação: pela corrente sanguínea (via hematogênica), pela pele (via transcutânea), pelo sistema linfático (via linfática), através da parede do intestino (via transmural) ou por migração ascendente seguindo o trajeto das tubas uterinas (via genital). Nas formas secundárias, existe um foco de contaminação óbvio, sendo a maior causa devido a processos primários intra-abdominais. Embora lesões genitais ou rupturas de abscessos intra – ou para-peritoneais sejam responsáveis por alguns casos, predominam soluções de continuidade na parede das vísceras ocas abdominais, ocasionadas por lesões inflamatórias, infecciosas ou traumáticas. Uma vez alcançada a cavidade peritoneal, os microrganismos iniciam uma série de eventos que culminam com sua proliferação ou destruição pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (BROOK, 2003).

A capacidade ou não de desenvolver a doença está relacionada com propriedades intrínsecas ao microrganismo: capacidade de adesão e multiplicação, presença de cápsula, produção de toxinas, dentre outros fatores de virulência. As defesas do hospedeiro incluem a restrição à obtenção de nutrientes e os sistemas de defesa humorais e celulares, envolvendo tanto a imunidade inata quanto à adquirida. Na verdade, o desenvolvimento da infecção dependerá tanto dos atributos de virulência do microrganismo infectante e da dose infectante, assim como dos mecanismos locais e sistêmicos de defesa do hospedeiro (FINLAY & FALKOW, 1997).

#### 4. Resposta do hospedeiro às infecções por anaeróbios

A formação de abscessos é uma resposta complexa do hospedeiro a uma variedade de microrganismos invasores, que envolve o recrutamento e acúmulo de neutrófilos, deposição de fibrina, entre outros processos ainda indefinidos (GIBSON III *et al.*, 1998). No caso de infecção intra-abdominal, esta resposta patológica pode ser inicialmente benéfica ao hospedeiro, resultando na localização e contenção bacteriana dentro da cavidade peritoneal. Entretanto, a falha no tratamento completo dos abscessos formados causa severa morbidade em pacientes e pode ser fatal (NICHOLS, 1985). Além do uso da terapia antimicrobiana, a intervenção cirúrgica é geralmente requerida para drenar ou remover os abscessos intra-abdominais estabelecidos (TZIANABOS *et al.*, 1995).

Clinicamente, os abscessos intra-abdominais são comumente formados seguindo eventos que levam à perfuração do intestino, com subsequente vazamento do conteúdo colônico na cavidade abdominal. Apesar de *B. fragilis* ser um dos anaeróbios menos prevalentes no trato intestinal, este é responsável pela maioria dos casos clínicos de sepse anaeróbia e abscessos intra-abdominais (POLK & KASPER, 1977).

Alguns estudos têm demonstrado que a resposta imune do hospedeiro é crítica para a formação de abscessos e que diversos tipos celulares são importantes no desenvolvimento de abscessos intra-abdominais (GIBSON III, TZIANABOS & ONDERDONK, 1996). O desafio intraperitoneal de animais com *B. fragilis* é seguido por infiltração de células de defesa, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos (ONDERDONK *et al.*, 1980).

A fagocitose é uma etapa essencial para proteção do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e para a retirada de células mortas da circulação. Os patógenos invasores são inicialmente neutralizados por uma bateria de proteínas circulantes de defesa do hospedeiro e rapidamente retirados da circulação ou do fluido corporal pelas células fagocíticas via fagocitose. O reconhecimento e engolfamento do patógeno são iniciados pela interação com receptores específicos nos fagócitos e seguidos da reorganização da actina celular, extensão do pseudópode e fechamento do fagossomo (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

As células fagocíticas estão entre os mais importantes componentes da resposta imune inata, que é a primeira linha de defesa do hospedeiro. Os fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, produzem ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e outros derivados intermediários de oxigênio que podem modificar moléculas orgânicas. Esses componentes são referidos como espécies



reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) e são produzidos durante a fagocitose ou pela estimulação com uma variedade de agentes que ativam a oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A produção estimulada de ROS foi primeiramente descrita em células fagocíticas e foi chamada de “burst” respiratório devido ao consumo transitório de oxigênio. O “burst” respiratório acontece pela ativação da NADPH oxidase e é crítico para a ação bactericida dos fagócitos (FORMAN & TORRES, 2002). Dois dos mais importantes sistemas antimicrobianos das células fagocíticas são as vias da NADPH oxidase e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que são responsáveis pela geração dos radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e óxido nítrico (NO), respectivamente. Apesar de ambos os sistemas dependerem de NADPH e de oxigênio molecular, e às vezes funcionarem juntos, NADPH oxidase e iNOS são complexos enzimáticos separados com regulação independente (Figura 1). NO e seus derivados são coletivamente chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (FANG, 2004).

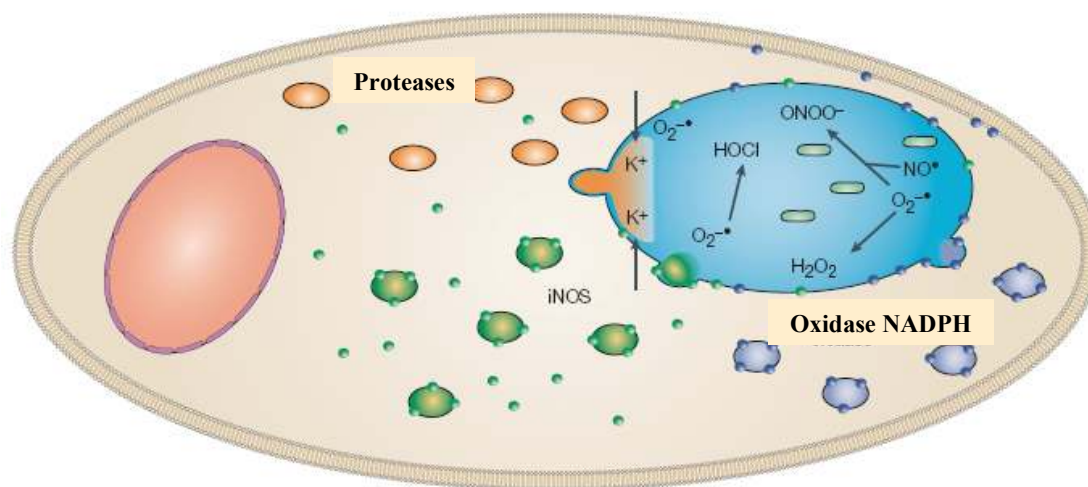


Figura 1: Mecanismos antimicrobianos dos fagócitos. Uma célula fagocítica idealizada simplificada é mostrada. Óxido nítrico (NO) é gerado pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Superóxido ( $O_2^-$ ) é gerado pela NADPH oxidase e pode subsequentemente ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl; pela mieloperoxidase) ou peroxinitrato ( $ONOO^-$ ; pela interação com NO).  $O_2^-$  também pode coordenar o influxo de potássio ( $K^+$ ) para dentro do fagossomo, promovendo assim a liberação de proteases associadas aos grânulos da matrix proteoglicana sulfatada. Algumas evidências indicam que a NADPH oxidase ativa é transportada ao fagossomo ou a membrana plasmática em vesículas, enquanto a iNOS parece estar presente tanto no citosol quanto em vesículas (Adaptação de FANG, 2004).

As células peritoneais residentes, que consistem principalmente de macrófagos, são a primeira linha de defesa imunológica contra bactérias após ruptura de alça intestinal ou outra perturbação na cavidade peritoneal. Estas células realizam várias funções, incluindo apresentação de antígeno e secreção de citocinas como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1) (GIBSON III *et al.*, 1998). Sabe-se que os macrófagos quando ativados adquirem competência para aumentar a função microbicida, por exemplo, pela produção de óxido nítrico (MACMICKING, XIE & NATHAN, 1997; DAMATTA *et al.*, 2000). Entretanto, já foi amplamente demonstrado que alguns patógenos possuem a capacidade de inibir sua produção (SEABRA, DE SOUZA & DAMATTA, 2000), assim como o contato inicial entre as células, determinando uma vantagem na sua sobrevivência durante o processo infeccioso (MACMICKING, XIE & NATHAN, 1997). Enzimas bacterianas e componentes de superfície, como cápsula, lipopolissacarídeo, e proteínas de superfície têm sido descritas como potentes evasinas e modulinas (PIETERS, 2001).

A produção das ROS pelos fagócitos tem sido principalmente estudada no contexto de morte bacteriana. Prova de sua importância neste processo é demonstrada pela natureza através da doença genética granulomatosa crônica, onde a falta de NADPH oxidase resulta na ausência da produção de ROS e, conseqüentemente, em uma eliminação ineficiente de muitos patógenos bacterianos e fúngicos. Contudo, os macrófagos, em particular os alveolares, são muito menos potentes do que os neutrófilos e eosinófilos em produzir ROS, e eles precisam adquirir um fenótipo ativado para regular sua capacidade bactericida. A sinalização redox pode ajudar a organizar a resposta inflamatória pela indução da síntese de citocinas que afetam macrófagos e induzem o influxo de neutrófilos (FORMAN & TORRES, 2002).

As ROS desempenham um importante papel na eliminação dos microrganismos pelas células do sistema imune (BEAMAN & BEAMAN, 1984; HASSETT & COHEN, 1989). O sistema mieloperoxidase/halato/peróxido de hidrogênio é altamente tóxico para bactérias, fungos, vírus e protozoários. A NADPH-oxidase presente na superfície dos fagócitos catalisa a redução do oxigênio a ânion superóxido ( $O_2^-$ ) durante o “burst” oxidativo. O peróxido de hidrogênio formado ( $H_2O_2$ ) pela dismutação do  $O_2^-$  pode formar ácido hipocloroso (HOCl) na presença de cloro e da mieloperoxidase neutrofilica. O HOCl prejudica os microrganismo pela halogenação de proteínas-chave de membrana, pela oxidação de grupamentos sulfidril, oxidação dos centros ferro-enxofre da ferredoxina, e pela deaminação e descarboxilação oxidativa de proteínas. O HOCl pode também reagir com amônio, por exemplo, para formar

um derivado de cloramina, que é mais estável e tóxico para os microrganismos (KLEBANOFF, 1988; PARK, MYERS & MARZELLA, 1992).

### 5. Fatores de virulência de *B. fragilis* associados a infecções

Acredita-se que a espécie *B. fragilis* se destaque como um dos principais patógenos em infecções anaeróbias devido a sua versatilidade no relacionamento com o hospedeiro, ora como componente da microbiota em um relacionamento comensal, ora como patógeno expressando atributos de virulência (ONDERDONK *et al.*, 1977a e b; 1990). Alguns fatores têm sido propostos a fim de explicar o comportamento patogênico da espécie e a sua emergência em relação aos demais componentes da microbiota intestinal em situações de desequilíbrio (KASPER *et al.*, 1979; MYERS *et al.*, 1987). Dentre eles, a capacidade de expressão de um complexo polissacarídeo capsular, de fímbrias, de enzimas extracelulares e toxinas podem contribuir decisivamente nos processos de interação com o hospedeiro e na determinação de doenças (PATRICK, LUTTON & CROCKARD, 1995).

As fímbrias são estruturas normalmente associadas à adesão de bactérias Gram negativas à superfície da mucosa. Dois tipos de fímbrias têm sido identificados na espécie *B. fragilis*. Em 1984, Pruzzo, Danielli & Richeti descreveram as fímbrias de *B. fragilis* como estruturas filamentosas de aproximadamente 30 nm de diâmetro, e subseqüentemente fímbrias de 4-5 nm foram descritas em 1987, por van Doorn e colaboradores. Entretanto, o real papel destas estruturas na virulência é ainda controverso, visto que alguns autores comprovaram uma maior capacidade de adesão às células fimbriadas, enquanto outros não detectaram diferenças na adesão de células fimbriadas e não fimbriadas.

A liberação de enzimas extracelulares por *B. fragilis* tais como hialuronidase, neuraminidase, colagenase, condroitina sulfatase, DNases, proteases e lipases também tem sido reconhecida, sendo atribuído ao microrganismo a capacidade de degradar inúmeros componentes do hospedeiro (GIBSON, MCFARLAN & MACFARLANE, 1989; MACFARLANE, MACFARLANE & GIBSON, 1992; BOTTA *et al.*, 1994; NAMAVAR *et al.*, 1994), o que pode ser associado aos danos verificados nas infecções em tecidos moles.

Neste contexto, é de extrema importância citar a atuação de uma protease secretada pela espécie, denominada *Bacteroides fragilis toxin* – BFT. Myers e Shoop, em 1984, descreveram pela primeira vez esta protease como um fator enterotóxico expresso por cepas de *B. fragilis* isoladas de diarreia de carneiros neonatos. Cepas com esta atividade também foram isoladas

posteriormente em humanos (MYERS *et al.*, 1987), sendo a partir deste momento referidas como *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas (*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* – ETBF). Esta toxina é capaz de induzir uma resposta secretória, verificada através de ensaios em alça intestinal ligada de ovelhas e bezerras, além da observação do efeito citopático através da alteração da morfologia de linhagens epiteliais de células HT29/C<sub>1</sub> (carcinoma de cólon humano) (WEIKEL *et al.*, 1992).

A cápsula polissacarídica, além de proteger *B. fragilis* contra a fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos e induzir a formação de abscessos (KRINOS *et al.*, 2001; TZIANABOS *et al.*, 1993), tem um importante papel na adesão às células mesoteliais (GIBSON III *et al.*, 1998). O complexo polissacarídeo capsular (CPC) é composto por polissacarídeos distintos, com diferentes propriedades antigênicas e imunoeletroforéticas, que se mantêm juntos por interações iônicas. Um estudo mais recente revelou que *B. fragilis* é, na verdade, capaz de modular antígenos de superfície produzindo até 8 tipos de polissacarídeos capsulares distintos. Além disso, pode regular a sua expressão por um mecanismo do tipo “liga – desliga”, através do envolvimento de promotores contendo inversões reversíveis de segmentos de DNA. Isto quer dizer que a espécie é capaz de exibir uma ampla combinação de polissacarídeos de superfície, o que pode ter grande implicação na sua manutenção no hospedeiro (KRINOS *et al.*, 2001). Acredita-se que cada polissacarídeo presente no CPC seja composto de distintas unidades oligossacarídicas repetidas e possui um balanço entre grupamentos de carga positiva e de carga negativa. Tal estrutura *zwitteriônica* é proposta como fundamental para a indução dos abscessos (TZIANABOS *et al.*, 1993).

## 6. Aerotolerância

Nos últimos anos, alguns autores têm atribuído à característica de aerotolerância um papel decisivo na virulência de bactérias anaeróbias. Muitos estudos já demonstraram que este grupo microbiano não é uniformemente sensível ao oxigênio e que existe uma ampla faixa de tolerância variando de espécies extremamente sensíveis ao oxigênio àquelas que são capazes de permanecer viáveis por longos períodos expostas ao oxigênio (FINEGOLD & GEORGE, 1989).

Os anaeróbios estritos não são capazes de crescer na presença de mais do que 5µM de oxigênio dissolvido (ENGELKIRK, DUBEN-ENGELKIRK & DOWELL, 1992). Apesar desta inibição do crescimento, alguns anaeróbios estritos da família *Bacteroidaceae* podem

sobreviver em ambientes oxigenados até que a pressão de oxigênio ( $P_{O_2}$ ) parcial esteja suficientemente reduzida. Por exemplo, os patógenos periodontais *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* colonizam os biofilmes subgingivais de mamíferos, enquanto algumas espécies de *Bacteroides* colonizam o trato gastrointestinal de animais. Levitt (1970) sugeriram que a pré-colonização destes sítios por anaeróbios facultativos é essencial para a redução de  $P_{O_2}$ , e subsequente colonização pelos anaeróbios estritos. Entretanto, este modelo é inconsistente com a observação de que *B. fragilis* pode colonizar o cólon na ausência de anaeróbios facultativos (BORNSIDE, DONOVAN & MYERS, 1976). Então, este anaeróbio estrito deve ter um papel na redução de  $P_{O_2}$  ambiental. Sabe-se que alguns anaeróbios estritos, como o *Desulfovibrio gigas*, podem consumir o oxigênio através de um sistema integral de transporte de elétrons pela membrana (LEMOS *et al.*, 2001), mas o papel fisiológico deste sistema ainda não foi estabelecido para os organismos da família *Bacteroidaceae*.

*B. fragilis* é a espécie mais aerotolerante dentre as bactérias anaeróbias estritas sendo capaz de sobreviver por 48-72 h na presença de oxigênio atmosférico (ROLFE *et al.*, 1977; 1978; ROCHA *et al.*, 1996). Foi verificado que cepas isoladas de espécimes clínicos eram mais resistentes à exposição ao oxigênio do que cepas de espécimes fecais, as quais perdiam totalmente a viabilidade após 4 h de exposição (ROLFE *et al.*, 1977). Estes resultados sugeriram a existência de um sistema relacionado à tolerância ao oxigênio ou ao estresse oxidativo, e a associação deste ao potencial de virulência na espécie. É possível que tal aerotolerância proporcione uma vantagem seletiva à espécie *B. fragilis* por permitir que o microrganismo persista em tecidos do hospedeiro altamente oxidados, como a cavidade peritoneal (RENVALL & NIINIKOSKI, 1975). Durante o início da infecção, ao sair do ambiente intestinal altamente reduzido (0%  $O_2$ ), *B. fragilis* deve resistir ao choque oxidativo e sobreviver à extensa exposição ao oxigênio nos tecidos. Estima-se que a tensão de oxigênio na cavidade peritoneal esteja em torno de 6-7%, sendo esta maior do que em muitos outros tecidos (PARK, MYERS & MARZELLA, 1992). Tais níveis de  $O_2$  representam um severo estresse oxidativo contra o qual *B. fragilis* deve estar protegido.

Recentemente, foi demonstrado que *B. fragilis* codifica uma citocromo *bd* oxidase que é essencial para o consumo de  $O_2$  e é requerida, sob algumas condições, para o estímulo do crescimento na presença de concentrações nanomolares de oxigênio. A identificação de uma cadeia respiratória dependente de  $O_2$  indica que este procarioto pertence, na verdade, a uma nova classe de organismos chamados “nanoaeróbios” (BAUGHN & MALAMY, 2004).

Assim como os anaeróbios facultativos, os nanoaeróbios podem se beneficiar, ainda que não necessitar, de  $O_2$  para seu crescimento. Entretanto, de forma similar aos anaeróbios estritos, os nanoaeróbios são incapazes de crescer na presença de  $> 5\mu M$  de  $O_2$ .

A habilidade de *B. fragilis* de crescer na presença de concentrações nanomolares de oxigênio atmosférico pode ter implicações nas interações deste patógeno com ambientes oxidados no hospedeiro. Em relação ao seu papel como membro da microbiota intestinal, a capacidade de tolerar e usar  $O_2$  podem ser responsáveis pelo fato da espécie ser encontrada em grande quantidade na superfície da mucosa, onde a tensão de  $O_2$  é maior do que a encontrada no lúmen intestinal. Durante o estabelecimento de um processo infeccioso, a capacidade de crescer na presença de concentrações nanomolares de oxigênio pode representar um fator crucial na proliferação microbiana nos tecidos hospedeiros mesmo antes da formação de abscessos, quando então uma atmosfera de anaerobiose se estabelece (BAUGHN & MALAMY, 2004).

Para sobreviver ao estresse oxidativo, *B. fragilis* deve se defender dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido,  $H_2O_2$  e radicais hidroxilas. A formação das ROS é uma consequência inevitável da exposição ao ambiente aeróbio, sendo estas também produzidas como parte do mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção. Os microrganismos aeróbios desenvolveram sistemas enzimáticos e não enzimáticos para eliminar os radicais de oxigênio, proteger as moléculas alvos e reparar as já afetadas (STORZ & IMLAY, 1999). A enzima superóxido dismutase transforma o ânion superóxido pela dismutação em  $H_2O_2$  (FRIDOVICH, 1978), e o acúmulo de  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser prevenido pela ação de catalases e peroxidases (HASSAN & FRIDOVICH, 1978). Em *B. fragilis*, tais mecanismos já foram descritos por alguns autores (WILKINS *et al.*, 1978; PRIVALLE & GREGORY, 1979; ROCHA & SMITH, 1995).

Durante a exposição ao oxigênio ou ao peróxido de hidrogênio, *B. fragilis* induz a expressão de pelo menos 28 proteínas como parte de uma complexa resposta ao estresse oxidativo, como descrito por Rocha e colaboradores (1996) utilizando a técnica de SDS-PAGE 2D. Tais proteínas incluem enzimas que detoxificam as espécies reativas de oxigênio, protegem o DNA e fornecem energia para a síntese de novas proteínas e ácidos nucleicos (ROCHA *et al.*, 1996; ROCHA & SMITH, 1997, 1998, 1999; SMALLEY, ROCHA & SMITH., 2002; HERREN, ROCHA, & SMITH, 2003). Além disso, uma citocromo *bd* oxidase é sintetizada, a qual usa o  $O_2$  como um aceptor de elétron (BAUGHN & MALAMY,

2004). O consumo de O<sub>2</sub> pela citocromo *bd* oxidase é importante para a restauração da anaerobiose e possibilita um crescimento vantajoso em ambientes com baixa tensão de oxigênio. Durante a redução do O<sub>2</sub>, é inevitável que os radicais de oxigênio se formem e devem ser removidos para evitar os danos (SUND, WELLS & SMITH, 2006).

*B. fragilis* é capaz de induzir inúmeras enzimas detoxificantes durante o estresse oxidativo, incluindo a catalase (*katB*), superóxido dismutase (*sod*), alquil hidroperóxido redutase (*ahpC/F*), uma proteína de ligação ao DNA (*dps*), tioredoxina peroxidase (*tpx*) e citocromo c peroxidase (*ccp*) (GREGORY, 1985; ROCHA & SMITH, 1995, 1997, 1999; HERREN, ROCHA, & SMITH, 2003).

As catalases são as proteínas de resposta ao estresse oxidativo e nutricional mais estudadas em bactérias aeróbias, mas pouco se sabe sobre estas enzimas em microrganismos anaeróbios (LOEWEN, 1992). A catalase é utilizada como ferramenta bioquímica para a identificação diferenciada de espécies do gênero *Bacteroides*, e alguns pesquisadores sugerem a exposição das células bacterianas ao ar antes da realização do teste, indicando ser sua atividade induzida após o contato com o oxigênio (HOLDEMAN, CATO, & MOORE, 1977). Entretanto, Wilkins e colaboradores (1978) detectaram a atividade da catalase em crescimento anaeróbio sem exposição ao oxigênio.

A atividade da catalase não é universal entre as espécies do gênero *Bacteroides*. *B. fragilis* e *B. distasonis* são catalase positivos, enquanto *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* e *B. eggerthi* possuem atividade variável (WILKINS *et al.*, 1978). *B. vulgatus* e *B. uniformis* são catalase negativos. Rocha & Smith (1995) mostraram que *B. fragilis* possui uma única catalase similar a de *B. distasonis*, sendo que a catalase de *B. distasonis* possui o dobro do tamanho, com peso molecular de 250.000 Da (GREGORY, KOWALSKI & HOLDEMAN, 1977).

A expressão do gene da catalase é típica em mecanismos de resposta ao estresse oxidativo de *B. fragilis*, sendo esta induzida no meio da fase log após adição de peróxido de hidrogênio ou exposição ao oxigênio molecular, ou após entrada na fase estacionária (ROCHA & SMITH, 1997). Estudos realizados por Rocha e colaboradores verificaram que uma cepa mutante para o gene *katB*, IB 260, era mais sensível ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno sob condições anaeróbias do que a cepa selvagem, não sendo, no entanto, a aerotolerância na presença de oxigênio atmosférico significativamente alterada (ROCHA *et al.*, 1996). Os estudos da resistência ao peróxido levaram ao isolamento de um mutante super produtor de

KatB, IB 263, com resistência constitutiva ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos, mas não ao oxigênio atmosférico (ROCHA & SMITH, 1998). Duas outras proteínas antioxidantes, AhpCF e Dps, também foram constitutivamente expressas na cepa resistente ao peróxido (ROCHA & SMITH, 1998). Estudos recentes revelaram que os genes *katB*, *ahpCF* e *dps* são regulados coordenadamente ao nível transcricional, sugerindo que estes estejam sob controle de um regulador comum, em particular a proteína OxyR (ROCHA & SMITH, 1998; 1999).

## 7. O regulador transcricional OxyR

A proteína OxyR, codificada pelo gene *oxyR*, foi originalmente descrita como reguladora da resposta adaptativa ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e em outras enterobactérias. OxyR é uma proteína de 34,4 kDa, tetramérica, membro da família de proteínas regulatórias bacterianas LysR (STORZ & ZHENG, 2000). Os membros da família LysR são proteínas ligantes de DNA que regulam positivamente a expressão de seus genes alvos e negativamente sua própria expressão (SCHELL, 1993). Esta família se divide em duas classes, uma que contém as proteínas regulatórias que são capazes de se ligar ao DNA e ativar a transcrição dos genes alvos em forma de dímeros, e outra que incluem as que só são funcionais na forma de tetrâmero (KULLIK *et al.*, 1995).

O mecanismo da regulação dos genes antioxidantes pela proteína OxyR é mais conhecido e estudado na espécie *Escherichia coli*. Quando exposta ao estresse oxidativo, *E. coli* induz um ou ambos os sistemas regulatórios, os regulons OxyR e SoxRS (STORZ & IMLAY, 1999; STORZ & ZHENG, 2000).

Quando o ânion superóxido é gerado na célula, os genes regulados pelo regulon SoxRS são induzidos. O fator de transcrição SoxR ativa a expressão de *soxS* em resposta a exposição aos agentes geradores de superóxido e ao óxido nítrico. As proteínas SoxS regulam positivamente muitos genes, entre eles *sodA*, *zwf* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *fpr* (NADPH : flavodoxina oxidoreductase), *fldA* (flavodoxina I), *fumC* (fumarase C), *acnA* (aconitase), *nfo* (endonuclease IV) e *micF* (um RNA regulatório) (STORZ & IMLAY, 1999; STORZ & ZHENG, 2000).

Em sua forma reduzida, a proteína OxyR se liga a duas partes adjacentes do DNA separadas por uma volta (*helical turn*) agindo como um repressor. Já na forma oxidada, OxyR se liga a quatro partes adjacentes do DNA e ativa a transcrição dos genes alvos por contato



direto com a RNA polimerase (ZHENG, ASLUND & STORZ, 1998). Na presença de peróxidos, como peróxido de hidrogênio, OxyR é ativada pela oxidação de duas cisteínas (C-199 e C-208) com a formação de uma ponte dissulfídica intramolecular ou pela formação de um ácido sulfênico no resíduo de cisteína C-199 da proteína. Como estes dois resíduos de cisteína estão separados por  $\sim 17 \text{ \AA}$  no estado reduzido, a oxidação é necessariamente acompanhada pela remodelagem do domínio regulatório de OxyR (CHOI *et al.*, 2001). Tais mudanças estruturais levam a uma alteração da ligação da proteína ao DNA e à RNA polimerase, e conseqüentemente, à transcrição dos genes envolvidos na proteção e metabolismo do peróxido (*katG*, *ahpCF*, *dps*), no balanço redox (*gorA* [glutathione redutase], *grxA* [glutaredoxina I], *trxC* [tioredoxina]), na regulação da captação do ferro (*fur*) e no reparo do DNA (RNA *oxyS*) (ZHENG *et al.*, 2001 a,b).

Os genes regulados por OxyR são induzidos igualmente tanto por  $\text{H}_2\text{O}_2$  quanto por  $\text{O}_2$ , mas ainda não se sabe a real molécula efetora. Portanto existe uma relação significativa entre os genes induzidos pelo oxigênio molecular e os induzidos por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De fato, 23 das 28 proteínas induzidas são idênticas em culturas tratadas com ambos os agentes, indicando uma considerável sobreposição da resposta (ROCHA *et al.*, 1996). O contrário acontece em *E. coli*, onde existem respostas separadas ao peróxido de hidrogênio e ao superóxido, cada uma é controlada por um regulador transcricional independente (CHRISTMAN *et al.*, 1985; GREENBERG *et al.*, 1990).

A síntese de OxyR ocorre mesmo na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e não há aumento na síntese após adição de peróxido de hidrogênio, o que indica que a ativação do regulon OxyR é resultado de uma modificação em uma proteína OxyR pré-existente (STORZ, TARTAGLIA & AMES, 1990).

Para entender como OxyR responde às alterações oxidativas do ambiente, diversos estudos têm sido realizados. Inúmeras análises determinaram que OxyR não contém nenhum metal ou grupos prostéticos que poderiam funcionar como centro ativo redox (STORZ, TARTAGLIA & AMES, 1990; ZHENG, ASLUND & STORZ, 1998). Análises *in vivo* demonstraram que mutações em quatro dos seis resíduos de cisteína conservados não tem efeito na defesa dependente de OxyR (KULLIK *et al.*, 1995; ZHENG, ASLUND & STORZ, 1998). Entretanto, uma mutação na cisteína C-199 resultou em células hipersensíveis a morte por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , assim como ocorre em células sem o gene *oxyR*. Uma mutação em C-208 também

mostrou ser parcialmente defectiva na resistência ao estresse oxidativo (KULLIK *et al.*, 1995).

Acredita-se que as proteínas de estresse oxidativo em *B. fragilis* aliviem a toxicidade do oxigênio e permitam ao microrganismo sobreviver por longos períodos em ambientes aeróbios. Apesar de *B. fragilis* ser um componente minoritário do total de espécies de *Bacteroides* encontradas no intestino humano, ele ultrapassa todas as outras espécies na determinação de infecções anaeróbias extra-intestinais (ALDRIDGE, 1995; FINEGOLD & GEORGE, 1989). É possível que a habilidade de síntese de novas proteínas após mudança de ambiente anaeróbio (ambiente intestinal) para aeróbio (ambiente extra-intestinal) venha representar uma vantagem ecológica, permitindo sua sobrevivência em tecidos oxidados do hospedeiro até que condições anaeróbias adequadas sejam novamente estabelecidas (ROCHA *et al.*, 1996), e que esta particularidade seja um aspecto fundamental para explicar o maior potencial de agressão da espécie quando comparada aos demais componentes do gênero. Desta forma, a avaliação do envolvimento do regulador transcricional OxyR na sobrevivência e na virulência de *B. fragilis* poderá contribuir para esta discussão.

## **Objetivos**

---

O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência do regulador transcricional OxyR e da enzima catalase na sobrevivência de *Bacteroides fragilis*, bem como na expressão do potencial de agressão.

Para tal, foram realizadas análises do comportamento de cepas parental e mutantes (ausência de expressão de OxyR e ausência de expressão de catalase) quanto a capacidade de:

- 1) Sobrevivência *in vitro* em condições aeradas;
- 2) Sobrevivência *in vivo* em modelo animal;
- 3) Sobrevivência frente a macrófagos peritoneais residentes;
- 4) Capacidade de indução de abscessos intra-abdominais e mortalidade através de emprego de um modelo animal para avaliação de virulência.

## *Materiais e Métodos*

### a) Cepas bacterianas e condições de cultivo:

As cepas de *Bacteroides fragilis* que foram utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. A cepa 638R é uma cepa clínica com resistência intrínseca a rifampicina. Já as cepas IB298 e IB260 foram obtidas pela inativação dos genes *oxyR* e *katB*, respectivamente, mutados por recombinação homóloga no cromossoma da cepa 638R. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Edson Rocha, East Carolina University Brody School of Medicine, Greenville, NC, EUA).

O conteúdo do tubo de criopreservação das cepas em estudo foi inoculado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Oxoid) pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (PRAS) suplementado com menadione (10 µg/mL – Sigma) e hemina (0,5 mg/mL – Sigma) (JOUSIMIES-SOMES *et al.*, 2002) sob fluxo de CO<sub>2</sub> e incubado em estufa a 37°C por 24h. Com o auxílio da alça bacteriológica de platina, o cultivo foi semeado em meio de Ágar Sangue Suplementado (ASS) com menadione (10 µg/mL) e hemina (0,5 mg/mL – Sigma), e também em meio *Bacteroides* Bile Esculina (BBE – Oxoid), com os objetivos, respectivamente, de verificar a pureza das cepas e caracterizá-las parcialmente. A incubação foi realizada em ambiente de anaerobiose (80% de N<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 10% de CO<sub>2</sub>) estabelecido em jarra de anaerobiose tipo *GasPak*, por 48h a 37°C. Rifampicina (20 µg/mL) e tetraciclina (5 µg/mL) foram adicionadas ao meio quando necessário. Na figura 2 estão ilustrados os diagramas simplificados das construções dos mutantes.

Tabela 1: Características relevantes das cepas de *B. fragilis* usadas neste estudo

Cepa	Fenótipo <sup>a</sup>	Referência
638R	Isolado clínico, Rif	PRIVITERA, DUBLANCHET & SEBALD, 1979
IB298	638R $\Delta oxyR::tetQ$ , Rif, Tet	ROCHA, OWENS & SMITH, 2000
IB260	638R $\Delta katB::tetQ$ , Tet	ROCHA <i>et al.</i> , 1996

<sup>a</sup> Rif: resistência a rifampicina; Tet: resistência a tetraciclina;

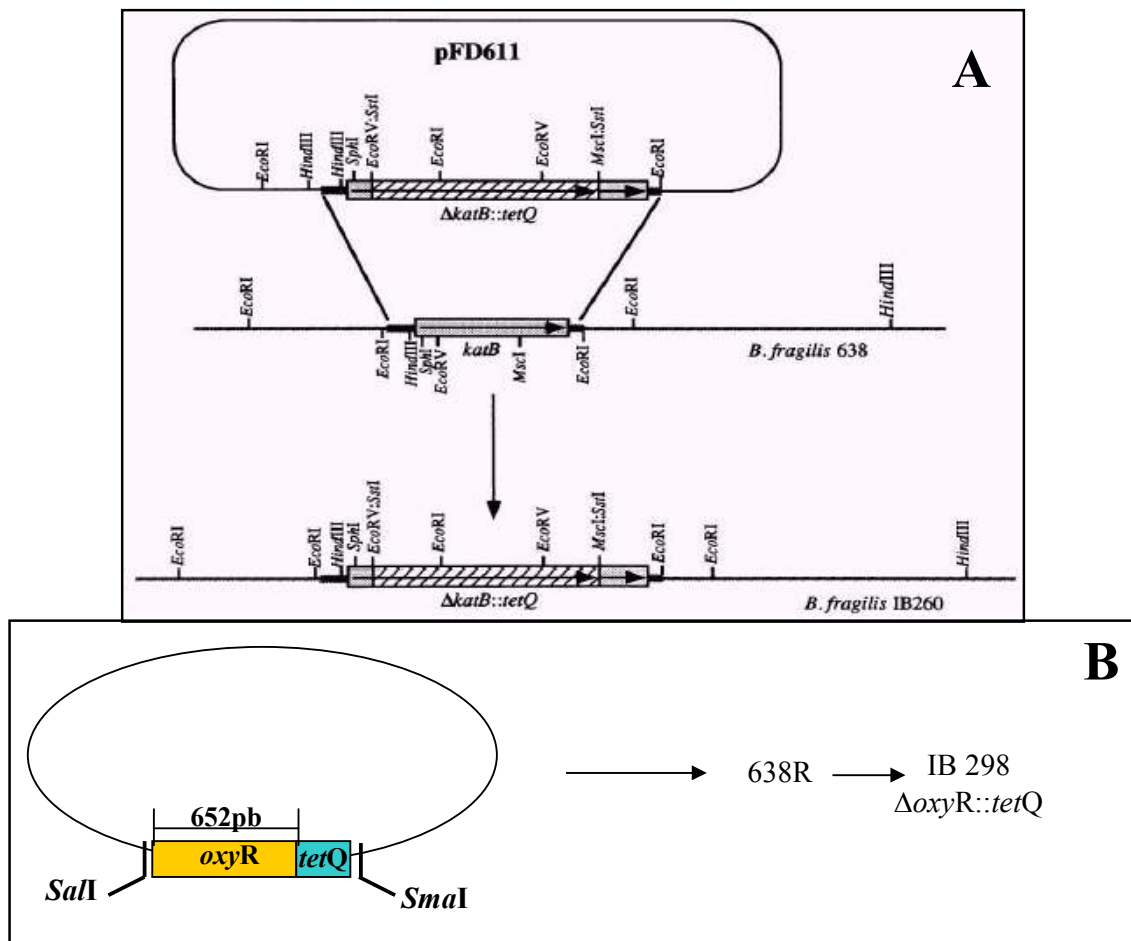


Figura 2: Diagramas simplificados da recombinação por *crossover* duplo, mostrando a transferência e integração do gene *katB* mutado no plasmídio pFD611 na região homóloga do cromossoma de *B. fragilis* 638R (A) (Fonte: ROCHA *et al.*, 1996), e do gene *oxyR* mutado no plasmídio pFD754 na região homóloga do cromossoma de *B. fragilis* 638R (B) (Fonte: ROCHA, OWENS & SMITH, 2000).

### b) Avaliação do comportamento das cepas em condições de ausência de O<sub>2</sub>

Este ensaio foi realizado com o propósito de investigar se as mutações realizadas nas cepas IB 298 e IB 260 afetaram de alguma maneira sua viabilidade. Para isso, as cepas de *B. fragilis* foram crescidas em caldo BHI-PRAS até o meio da fase exponencial (18h), diluídas em BHI-PRAS até uma DO<sub>660</sub> de 1,4 ( $3 \times 10^9$  UFC/mL – escala 10 McFarland), sendo então 100  $\mu$ L inoculados em 4 tubos de ensaio contendo 9,9 mL de BHI-PRAS, correspondentes aos tempos 0, 7, 18, 24h. A temperatura de incubação foi 37°C. Nos tempos citados acima, 100  $\mu$ L do crescimento bacteriano foram diluídos inicialmente em 0,9 mL de Tampão Blanks-

PRAS (HOLDEMAN, CATO & MOORE, 1976) e sucessivamente até a diluição de  $10^{-10}$ , e 10  $\mu\text{L}$  das 5 últimas diluições ( $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ) foram plaqueadas em agar sangue. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48h, e após este período foi feita a contagem das colônias (UFC/mL) com o auxílio do equipamento *Quebec® Colony Counter* (American Optical Corporation, Buffalo, NY, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram plotados em um gráfico através do programa Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). Os dados dos gráficos estão em porcentagem. O inóculo inicial foi considerado 100%.

#### **e) Avaliação da capacidade de sobrevivência *in vitro* em condições aeróbias**

Como descrito no item b, as cepas de *B. fragilis* foram crescidas em caldo BHI-PRAS até o meio da fase exponencial (18h), diluídas em BHI (sem adição de cisteína e resazurina) até uma  $\text{DO}_{660}$  de 1,4 ( $3 \times 10^9$  UFC/mL – escala 10 McFarland), e 100  $\mu\text{L}$  foram inoculados em 5 erlenmeyers contendo 9,9 mL de BHI, correspondentes aos tempos 0, 4, 8, 18 e 24h, sendo estes posteriormente incubados sob agitação (condições aeróbias) a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em cada momento citado acima, 100  $\mu\text{L}$  do crescimento bacteriano foram diluídos em 0,9 mL de Tampão Blanks-PRAS (HOLDEMAN, CATO & MOORE, 1976) até a diluição de  $10^{-5}$ , e 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ) foram plaqueados em agar sangue. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48h, e após este período foi feita a contagem das colônias (UFC/mL) com o auxílio do equipamento *Quebec® Colony Counter*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram plotados em um gráfico através do programa Excel 2003 (Microsoft Corporation). Os dados dos gráficos estão em porcentagem. O inóculo inicial foi considerado 100%.

#### **d) Avaliação da capacidade de sobrevivência *in vivo***

O modelo utilizado foi o descrito por Day e colaboradores (1980), adaptado por Silva-Filho (1991).

##### - Preparo do inóculo:

Como já descrito nos itens b e c, as cepas de *B. fragilis* cresceram em caldo BHI-PRAS até o meio da fase exponencial (18h), foram diluídas em BHI-PRAS até uma  $\text{DO}_{660}$  de 1,4, e 300  $\mu\text{L}$  foram inoculados em câmaras.

- Preparo das câmaras:

As câmaras foram preparadas utilizando-se o corpo de uma seringa descartável de 1ml, devidamente esterilizada e cortada em pedaços de aproximadamente 1 cm. Suas extremidades foram seladas usando-se membranas de nitrocelulose de 0,8  $\mu\text{m}$  de porosidade. Um pequeno orifício foi feito no corpo da câmara, usando-se agulha flambada para posterior inoculação das cepas bacterianas. Tal orifício foi vedado com polietileno derretido (Figura 3A).

- Inserção das câmaras nos camundongos:

Camundongos fêmeas BalbC saudáveis de 45 dias e pesando 25 g foram operados sob anestesia com  $\text{CO}_2$ , e as câmaras contendo as cepas de *B. fragilis* em estudo foram, então, inseridas na região da cavidade peritoneal próxima às alças intestinais, o peritônio e a pele foram suturados com agulha e linha cirúrgica, e seguiu-se os procedimentos de assepsia adequados (Figura 3B). Os camundongos foram mantidos em gaiolas com água e comida durante todo o período do experimento.

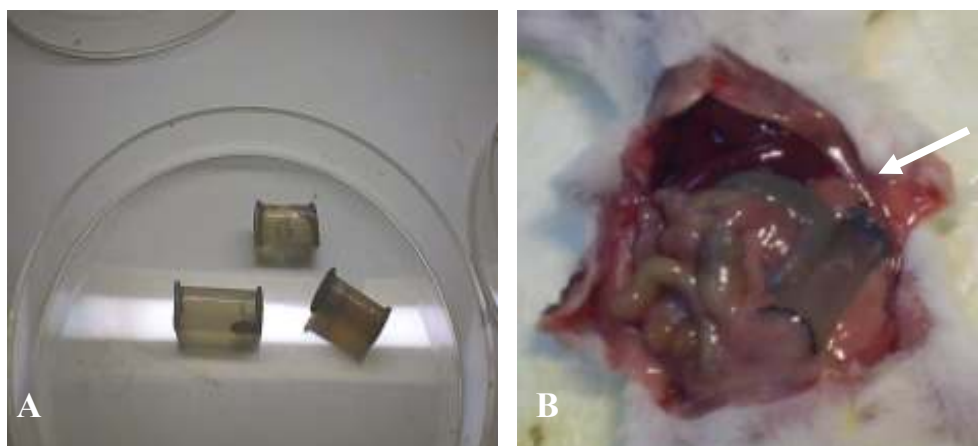


Figura 3: Fotos representativas dos experimentos *in vivo*; A, Câmaras contendo suspensão bacteriana; B, Localização da câmara nas proximidades das alças intestinais (seta)

- Contagem de colônias:

Após os tempos determinados (4, 24 e 48h), os camundongos foram sacrificados em câmara de  $\text{CO}_2$  e as câmaras intraperitoneais retiradas pela abertura da cavidade abdominal dos animais. Cem microlitros do conteúdo da câmara foram diluídos até  $10^{-10}$  em 0,9 mL de Tampão Blanks-PRAS, e 10  $\mu\text{L}$  foram plaqueados em agar sangue. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a  $37^\circ\text{C}$  por 48h e foi feita a contagem das colônias

(UFC/mL) com o auxílio do equipamento *Quebec® Colony Counter*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram plotados em um gráfico através do programa Excel 2003 (Microsoft Corporation). Os dados dos gráficos estão em porcentagem. O inóculo inicial foi considerado 100%.

Todos os procedimentos com os animais respeitaram a Declaração Universal dos Direitos do Animal (ONU, 1978), da qual o Brasil é signatário, os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e a Lei nº 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas sobre a prática didático-científica da vivisseção de animais.

#### **e) Avaliação da sobrevivência frente a macrófagos peritoneais residentes**

Para obtenção de macrófagos (M $\phi$ ) peritoneais residentes de camundongo, 1 mL de uma solução a 3% de tioglicolato foi inoculado na cavidade peritoneal de camundongos BalbC fêmeas saudáveis de aproximadamente 45 dias. Após 72h, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e as células peritoneais foram coletadas assepticamente pela lavagem peritoneal com DMEN (Dulbelco's Modified Eagle's Medium / Sigma®) gelado. As células retiradas foram centrifugadas a 600 xg por 10 minutos a 4°C, ressuspensas em 1 mL de DMEM gelado e ajustadas para 5 x 10<sup>5</sup> M $\phi$  / orifício de uma placa de 24 orifícios (Corning®). Trezentos microlitros da suspensão de células foram inoculados nos 24 orifícios sem lamínulas e, após 1h de aderência a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, os orifícios foram lavados com 500  $\mu$ L de DMEM para a remoção das células não aderentes. Após as lavagens, 500  $\mu$ L de DMEM com 10% de soro fetal bovino foram adicionados nos orifícios e a placa foi incubada “overnight” a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para a formação de monocamada. Duzentos microlitros de uma suspensão bacteriana de cada uma das 3 cepas de *B. fragilis* (638R, IB 298 e IB 260) contendo 10<sup>7</sup> bactérias/mL foram inoculados nos orifícios correspondentes aos tempos 5 e 24h (triplicata). As interações bactérias : M $\phi$  foram realizadas por 1h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, usando uma proporção de 100 bactérias:1 M $\phi$ . Após 1h, os orifícios foram lavados 5 vezes com DMEM para a retirada dos microrganismos e a placa foi reincubada por mais 1, 5 e 24h com 500  $\mu$ L de DMEM com 2% de soro fetal bovino. Nos tempos indicados, os M $\phi$  foram lisados com uma solução de 20  $\mu$ M de digitonina por 2 minutos. Os lisados foram coletados em tubos tipo “eppendorf” e centrifugados a 500 xg por 2 minutos. O precipitado foi lavado com 100  $\mu$ L de Tampão Blanks-PRAS e novamente centrifugado. Cem



microlitros deste precipitado foi diluído até  $10^{-5}$  em Tampão Blanks-PRAS e 10  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados em agar sangue. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37° C por 48 h e foi feita a contagem das colônias (UFC/mL) com o auxílio do equipamento *Quebec® Colony Counter*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram plotados em um gráfico através do programa Excel 2003 (Microsoft Corporation). Os dados dos gráficos estão em porcentagem. O inóculo inicial foi considerado 100%.

#### **f) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A MEV foi realizada segundo Vieira e colaboradores (2005). Após obtenção e plaqueamento dos macrófagos peritoneais residentes de camundongos e interação de 1 e 2h com as três cepas de *B. fragilis* (638R, IB 298 e IB 260), como já descrito no item e, as células foram lavadas com DMEM sem soro, fixadas em solução de glutaraldeído (EMS®) a 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1h, e em seguida lavadas com tampão PBS 0,1 M, pH 7,2. As células foram pós-fixadas com um solução de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$  / Sigma®) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1h a temperatura ambiente, e em seguida lavadas com tampão PBS 0,1 M. As células foram desidratadas em série gradual de etanol (30-100% / 5 min cada), secas pelo método do ponto crítico usando  $CO_2$ , montadas em suportes apropriados (“stubs”) e metalizadas com ouro (20-30 nm) para observação em microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM5310 (JEOL, Japão).

#### **g) Modelo animal de indução de abscessos intra-abdominais e mortalidade**

O modelo utilizado foi o proposto por Onderdonk e colaboradores (1976).

As cepas de *B. fragilis* cresceram em caldo BHI-PRAS até o meio da fase exponencial (18h) e foram diluídas em caldo PYG-PRAS (peptona, extrato de levedura e glicose) (JOUSIMIES-SOMES *et al.*, 2002) até  $3 \times 10^8$  UFC/mL (correspondente ao tubo 1 da escala de McFarland). O inóculo continha uma mistura de 1:1 do microrganismo e de uma solução adjuvante de conteúdo cecal estéril de camundongo. Quinhentos microlitros do inóculo foram inoculados na cavidade peritoneal dos camundongos com o auxílio de uma seringa de insulina (1 mL) e agulha de 27,5G 1/2” (0,38 x 13 mm). Os camundongos foram observados durante os 7 dias pós-infecção para o caso de haver morte, e após este período eles foram sacrificados em câmara de  $CO_2$  e necropsiados para a investigação da presença de abscessos. Pelo menos 3

abscessos foram retirados de cada camundongo e estes foram macerados em 0,9 mL de Tampão Blanks-PRAS e 10  $\mu$ L foram plaqueados em agar sangue. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 48h e foi feita a contagem das colônias (UFC/mL) com o auxílio do equipamento *Quebec® Colony Counter – American Optical Corporation*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **h) Análise estatística**

Todos os testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados utilizando-se o programa estatístico “Statistical Package for the Social Sciences”, versão 10.0 (SPSS Inc<sup>®</sup>. Chicago, IL, EUA). As UFC/ml foram computadas para cada cepa nos diferentes tempos e as médias e desvio-padrão calculados. Os abscessos peritoneais foram mensurados em milímetros e as medidas computadas. Diferenças significativas na contagem de UFC/mL entre as três cepas em cada tempo, e do tamanho dos abscessos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças entre pares de cepas foram determinadas pelo teste Mann-Whitney. Diferenças na UFC/mL para cada cepa ao longo do tempo foram determinadas pelo teste de Friedman. O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

### **a) Avaliação do comportamento das cepas em condições de ausência de O<sub>2</sub>**

A fim de saber se as mutações presentes nas cepas IB 298 ( $\Delta oxyR$ ) e IB 260 ( $\Delta katB$ ) estariam influenciando o crescimento das cepas em anaerobiose, foram realizadas curvas de crescimento tanto das cepas mutantes quanto da parental em condições de ausência total de oxigênio atmosférico. A figura 4 mostra o perfil de crescimento das três cepas nestas condições. Em linhas gerais, foi possível observar um perfil de crescimento semelhante entre as cepas, sendo observado um menor crescimento da cepa IB 260 no tempo 18h ( $p=0,006$ ) quando comparada com a cepa IB 298, e menor crescimento em todos os tempos, quando comparada com a cepa 638R ( $p<0,05$ ). A cepa IB 298 apresentou um maior crescimento em relação a 638R no tempo 18h ( $p=0,042$ ). Porém, observou-se que no tempo 24h as duas cepas mutantes apresentaram uma menor UFC/mL quando comparadas com a cepa parental 638R ( $p<0,05$ ; Tabela 2).

### **b) Avaliação da capacidade de sobrevivência em condições de aeração**

Para comprovar a aerotolerância e avaliar a influência das proteínas OxyR e KatB na sobrevivência de *B. fragilis* na presença de oxigênio atmosférico, as cepas mutantes IB298 ( $\Delta oxyR$ ) e IB260 ( $\Delta katB$ ) e parental (638R) foram mantidas sob agitação por até 24h. A Tabela 3 apresenta a média de UFC/mL das cepas nos tempos investigados, o desvio padrão das média e ainda mostra que houve diferença significativa para cada cepa ao longo dos tempos. Na figura 5 pode-se observar a aerotolerância da cepa parental 638R, que não perdeu sua viabilidade mesmo após 24h de exposição ao oxigênio ( $p<0,05$ ). A cepa IB 260, mutante *katB*, demonstrou um comportamento similar a cepa parental, apesar de apresentar um ligeiro crescimento ao longo das 24h, quando comparada com a cepa parental. Já a cepa IB298, mutante *oxyR*, apresentou uma queda de 50% na contagem de colônias após 24h de contato com o oxigênio atmosférico.

### **c) Avaliação da capacidade de sobrevivência *in vivo* (câmara intraperitoneal)**

A análise do comportamento das três cepas *in vivo* dentro de câmaras colocadas na cavidade peritoneal de camundongos por procedimento cirúrgico mostrou um perfil de

crescimento semelhante entre elas, não sendo detectada nenhuma diferença significativa neste modelo de estudo (Tabela 4 e Figura 6).

#### **d) Avaliação da sobrevivência frente a macrófagos peritoneais residentes de camundongos**

Na tentativa de observar se as proteínas OxyR e KatB estariam influenciando a sobrevivência das cepas parental e mutantes *oxyR* e *katB* frente ao “burst” oxidativo dos M $\phi$  peritoneais, um ensaio *in vitro* de interação microrganismo : M $\phi$  foi realizado. Após análise dos resultados nos tempos 5 e 24h pós-interação, observou-se que a cepa mutante *oxyR* se mostrou mais susceptível à morte por M $\phi$  (99,08%) em relação à cepa parental e à mutante *katB*, que apresentaram taxas de mortalidade diferenciadas, de 63,4% e 94,33%, respectivamente, após 24h (Figura 7). Os valores obtidos para a contagem de UFC/mL são apresentados na Tabela 5.

#### **e) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A fim de observar possíveis alterações morfológicas na superfície dos M $\phi$  peritoneais residentes após interação com as cepas de *B. fragilis*, foram realizadas interações entre as cepas 638R, IB298 e IB260 e os macrófagos por 1 e 2h. A observação dos M $\phi$  por MEV permitiu a visualização e comparação da superfície das células infectadas e não infectadas. Nas figuras 8A e 9A é possível observar alguns M $\phi$  que não entraram em contato com nenhuma das três cepas em estudo apresentando *ruffles* de membrana, o que é uma característica comum destas células. Foi possível observar que os M $\phi$  que interagiram com as cepas 638R e as mutantes IB 298 e IB 260, após 1 e 2h do contato (Figuras 8 e 9), apresentaram muitos prolongamentos, conhecidos como pseudópodes, o que é característico para tal célula fagocítica quando na presença de microrganismos. Porém, aparentemente, não houve diferenças entre as 3 cepas estudadas em relação a este aspecto.

#### **f) Indução de abscessos intra-abdominais em camundongos**

Com base nos resultados obtidos no ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoneais residentes, onde as três cepas apresentaram perfis de sobrevivência diferentes frente aos macrófagos, partiu-se então para um ensaio onde pudéssemos observar a virulência destas cepas em estudo de modelo animal. Através da inoculação de uma mistura do microrganismo

e conteúdo cecal estéril de camundongo na cavidade abdominal de camundongos saudáveis para indução de abscessos intra-abdominais observou-se que as cepas mutantes *oxyR* e *katB* apresentaram muito mais focos de abscessos do que a cepa parental 638R. Todos os animais testados apresentaram abscessos ao final dos 7 dias de infecção. A cepa IB 298 causou em média 13 abscessos por camundongo. Já a cepa IB 260 apresentou 17 focos por camundongo, enquanto a cepa 638R causou 6 abscessos para cada animal. É interessante observar a localização destes abscessos (Figura 10). Os abscessos provocados pela cepa parental estavam em sua maioria presentes no peritônio parietal, que reveste a face interna da parede abdominal (Figura 10A), enquanto os causados pelas cepas mutantes apresentavam-se em maior número no peritônio visceral, que envolve os órgãos como estômago e intestinos, e também no fígado e baço (Figura 10B e 10C). Não houve diferença significativa entre as cepas mutantes em nenhuma característica analisada (UFC/mL, tamanho do abscesso e UFC/mL/mm de abscesso; Tabela 6). Em relação à contagem de UFC/mL e ao tamanho dos abscessos, a cepa IB 298 apresentou valores superiores à cepa parental 638R ( $p=0,036$  e  $p=0,029$ , respectivamente). Da mesma forma, os abscessos gerados pela cepa IB 260 possuíram uma contagem de UFC/mL maior do que a da cepa 638R ( $p=0,006$ ), assim como a UFC/mL/mm de abscesso ( $p=0,027$ ), apesar destes apresentarem tamanho similar aos abscessos causados pela cepa parental (Tabela 6).

Tabela 2: Análise do crescimento das cepas de *B. fragilis* em condições de ausência de O<sub>2</sub>. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*.

Cepas	UFC/mL (x10 <sup>3</sup> )			
	Tempo 0◇	Tempo 7◇	Tempo 18◇	Tempo 24◇
638R	2,0	10100,0	15825,0	6954,5
	±0,44	±1773,4	±21913,3	±1074,6
IB 298	1,3	846,25	59000,0	639,0
	±0,29	±291,0	±5477,2	±238,7
IB 260	1,55	1062,5	6387,5	573,75
	±0,23	±55,6	±996,3	±305,4

◇ Refere-se à diferença entre as cepas em cada tempo; p < 0,05; Teste de Kruskal-Wallis.

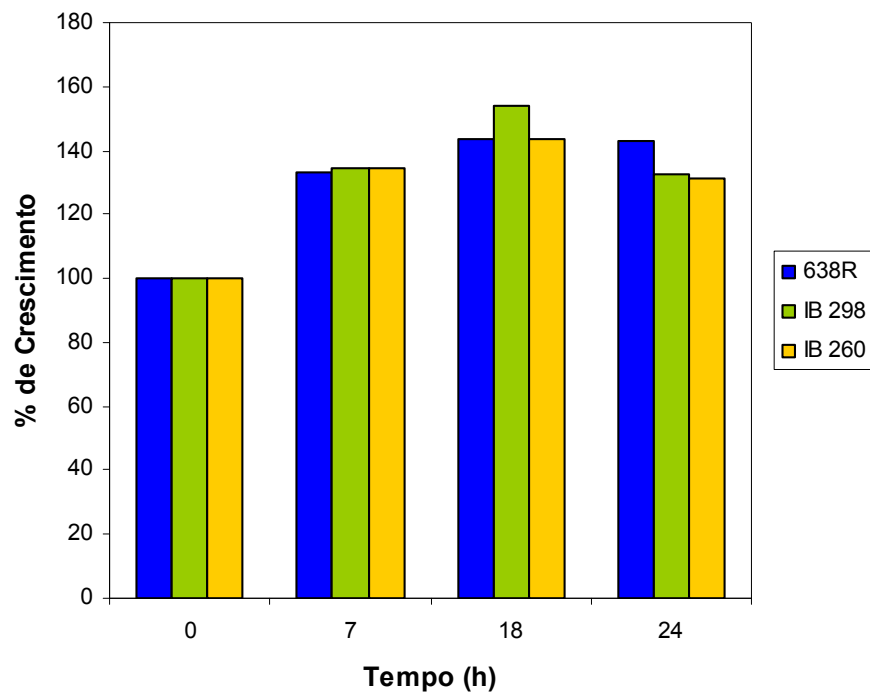


Figura 4: Avaliação do comportamento das cepas de *Bacteroides fragilis* em condições de ausência de O<sub>2</sub>. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*. A contagem de colônias foi determinada nos tempos indicados. O inóculo inicial foi considerado 100%.

Tabela 3: Análise da viabilidade das cepas de *B. fragilis* em condições de aeração. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*.

Cepas	UFC/mL ( $\times 10^3$ )				
	Tempo 0 $\diamond$	Tempo 4 $\diamond$	Tempo 7 $\diamond$	Tempo 18 $\diamond$	Tempo 24 $\diamond$
638R*	416,25	286,25	109,75	122,4	402,5
	$\pm 57,3$	$\pm 78,7$	$\pm 15,9$	$\pm 407,7$	$\pm 67,0$
IB 298*	22785,7	6514,3	2581,4	557,7	19,8
	$\pm 6380,3$	$\pm 4624,4$	$\pm 1363,0$	$\pm 407,7$	$\pm 13,8$
IB 260*	4,3	27,9	40,4	43,25	20,4
	$\pm 1,0$	$\pm 3,8$	$\pm 10,2$	$\pm 3,6$	$\pm 6,9$

\* Refere-se à diferença significativa ao longo dos tempos;  $p < 0,05$ ; Teste de Friedman

$\diamond$  Refere-se à diferença entre as cepas em cada tempo; Teste de Kruskal-Wallis



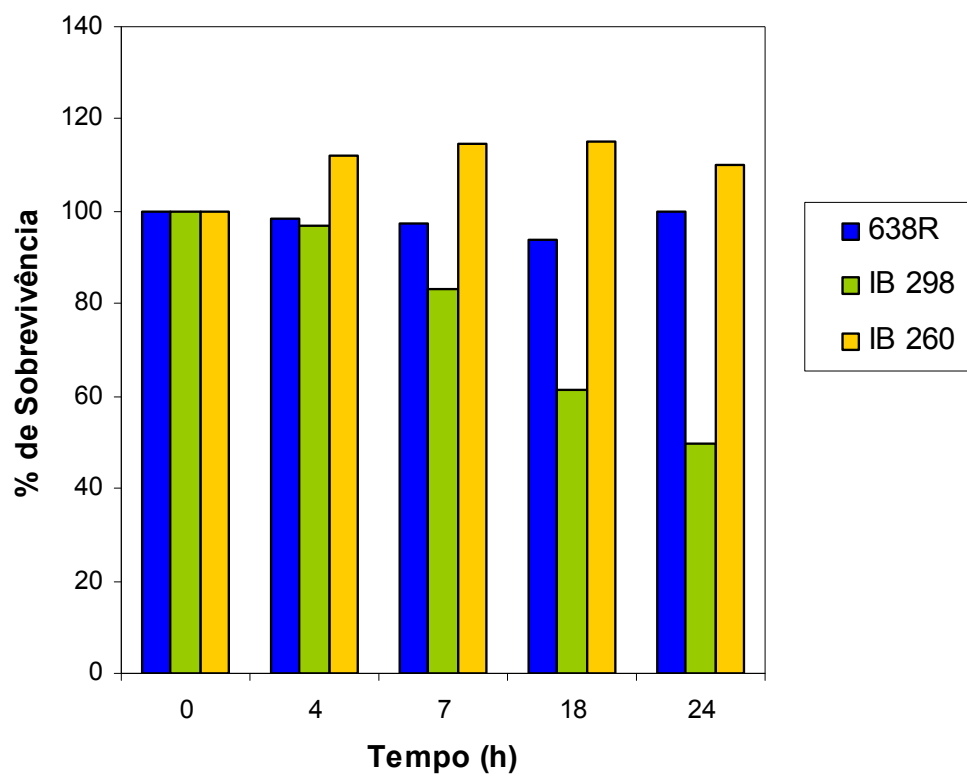


Figura 5: Avaliação da capacidade de sobrevivência das cepas de *B. fragilis* em condições de aeração. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*. A contagem de colônias foi determinada nos tempos indicados. O inóculo inicial foi considerado 100%.

Tabela 4: Análise da viabilidade das cepas de *B. fragilis* em condições *in vivo* (câmara intraperitoneal). Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*.

Cepas	UFC/mL ( $\times 10^3$ )			
	Tempo 0 $\diamond$	Tempo 4 $\diamond$	Tempo 24 $\diamond$	Tempo 48 $\diamond$
638R	133,3	65,0	282,5	2056,6
	$\pm 38,7$	$\pm 10,8$	$\pm 53,3$	$\pm 66,6$
IB 298	1040,0	2520,0	21000,0	2263,3
	$\pm 130,4$	$\pm 433,5$	$\pm 1131,4$	$\pm 68,0$
IB 260	155,0	329,0	2835,0	154150,0
	$\pm 14,3$	$\pm 26,05$	$\pm 318,2$	$\pm 23970,9$

$\diamond$  Refere-se à diferença entre as cepas em cada tempo; Teste de Kruskal-Wallis.

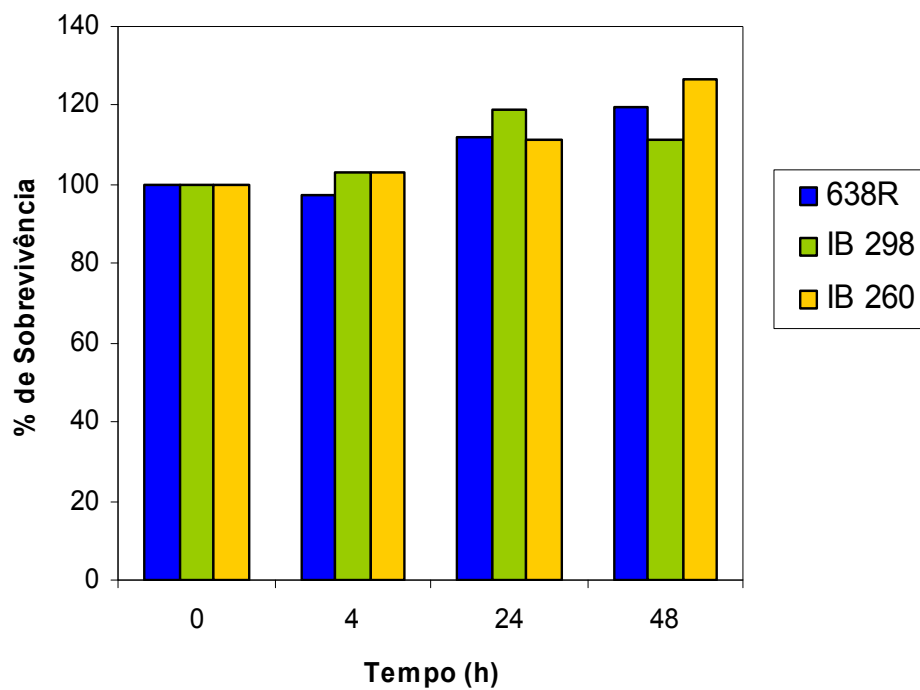


Figura 6: Avaliação da capacidade de sobrevivência das cepas de *B. fragilis in vivo* (câmara intraperitoneal). Cepa 638R – parental; cepa IB298 - mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*. A contagem de colônias foi determinada nos tempos indicados. O inóculo inicial foi considerado 100%.

Tabela 5: Análise da sobrevivência das cepas de *B. fragilis* frente a macrófagos peritoneais. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*.

Cepas	UFC/mL ( $\times 10^3$ )	
	Tempo 5 $\diamond$	Tempo 24 $\diamond$
638R	39,8	21,6
	$\pm 26,14$	$\pm 9,66$
IB 298	54,3	3,5
	$\pm 18,0$	$\pm 1,3$
IB 260	730,0	54,5
	$\pm 106,6$	$\pm 25,3$

$\diamond$  Refere-se à diferença entre as cepas em cada tempo;  $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis.

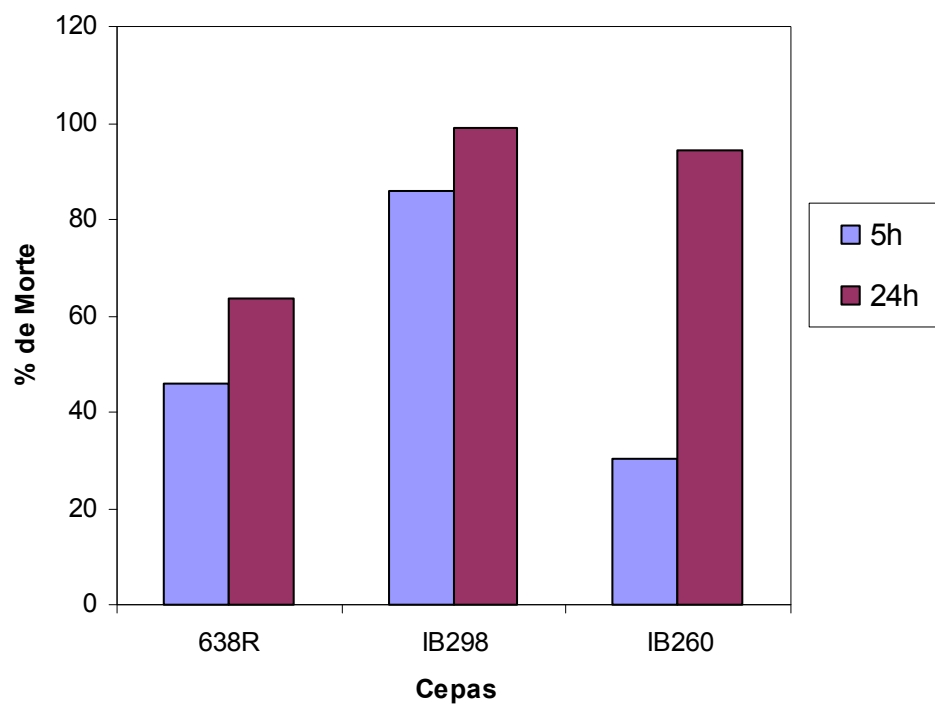


Figura 7: Avaliação da mortalidade das cepas de *B. fragilis* por macrófagos peritoneais residentes de camundongos. Cepa 638R – parental; cepa IB298 – mutante *oxyR*; cepa IB 260 – mutante *katB*.

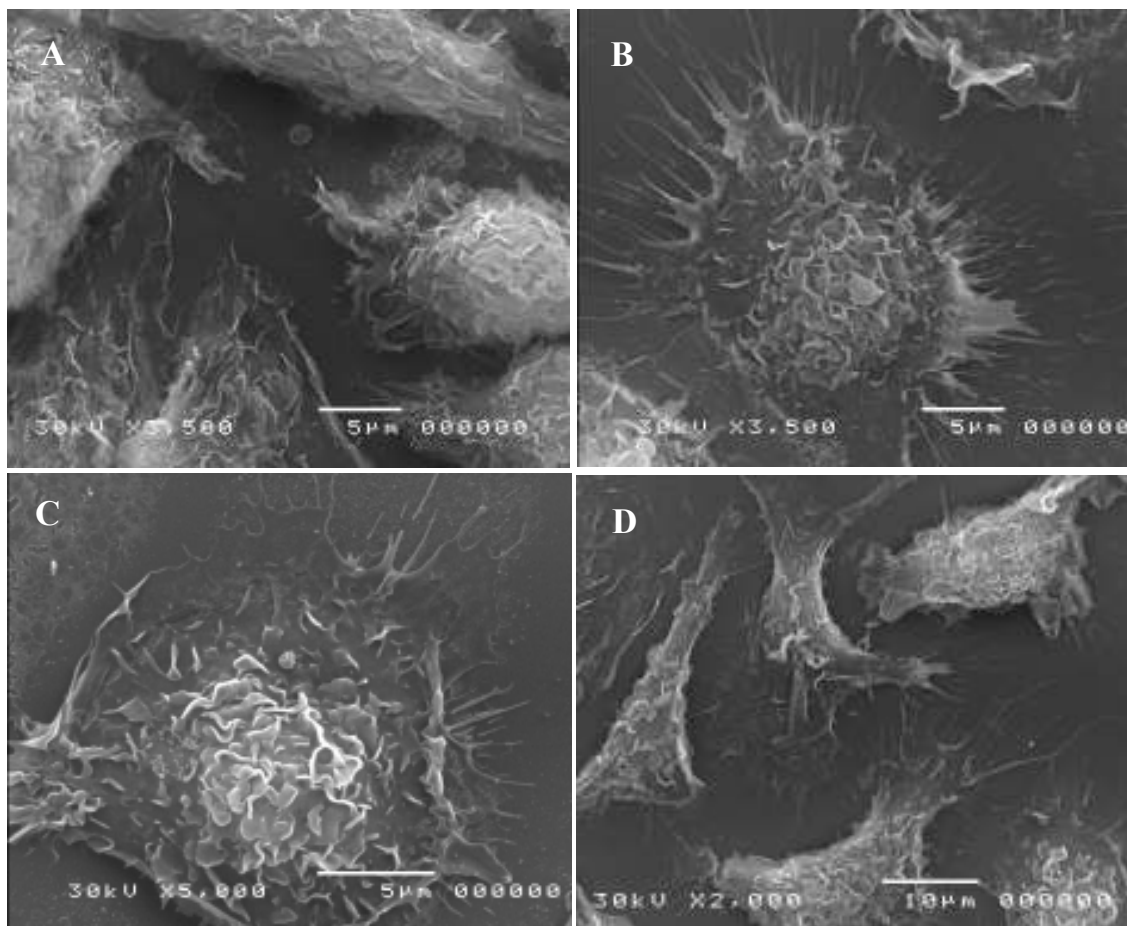


Figura 8: Micrografia eletrônica de varredura mostrando macrófagos peritoneais após 1h de interação com as cepas 638R, IB298 e IB260. (A): macrófago livre de bactéria; (B): macrófago após contato com a cepa parental 638R; (C): macrófago após contato com a cepa mutante *oxyR* IB298; (D): macrófago após contato com a cepa mutante *katB* IB260

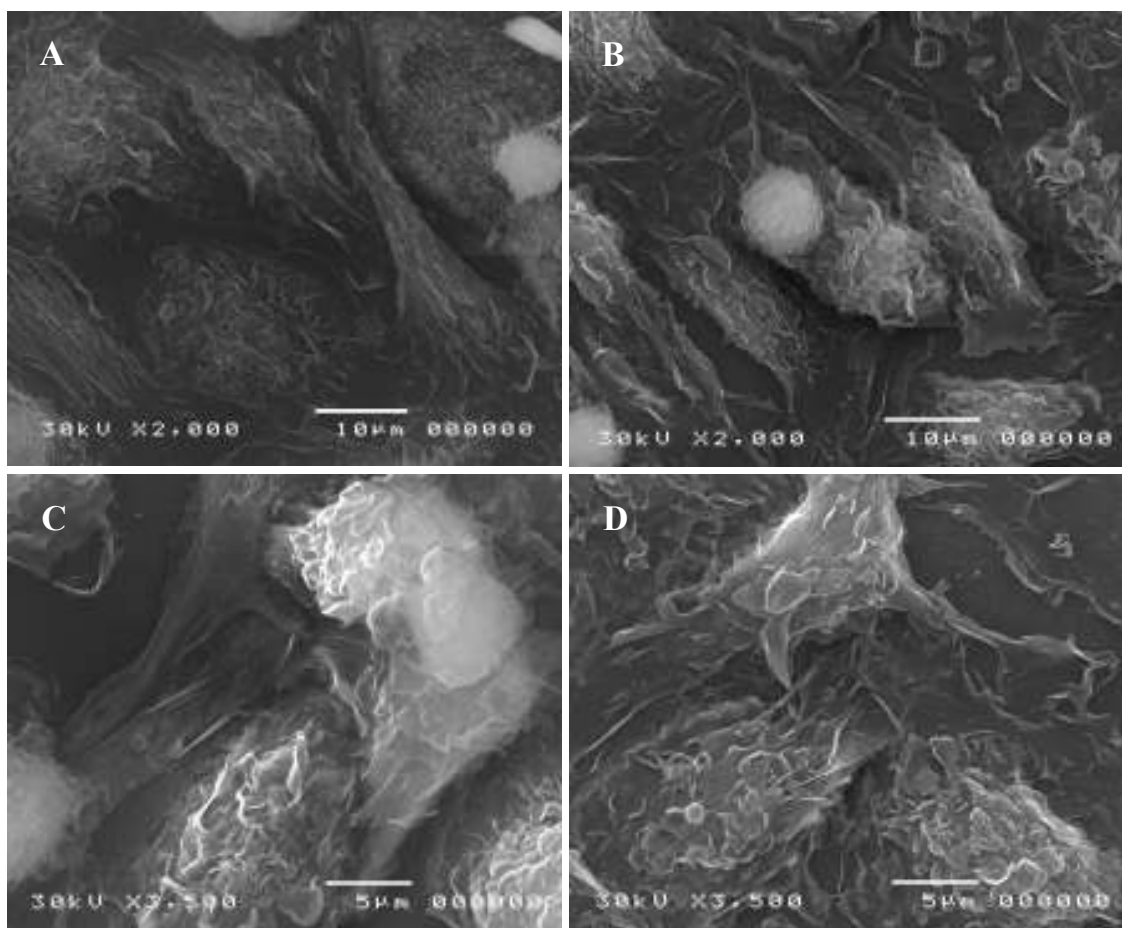


Figura 9: Micrografia eletrônica de varredura mostrando macrófagos peritoneais após 2h de interação com as cepas 638R, IB298 e IB260. (A): macrófago livre de bactéria; (B): macrófago após contato com a cepa parental 638R; (C): macrófago após contato com a cepa mutante *oxyR* IB298; (D): macrófago após contato com a cepa mutante *katB* IB260

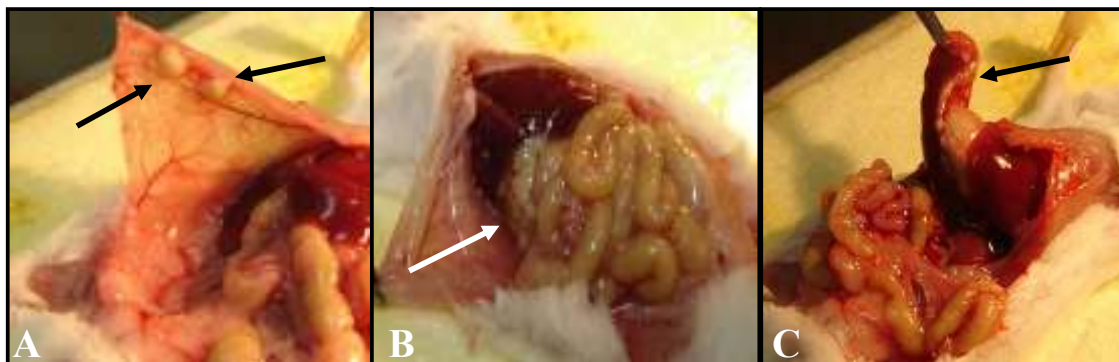


Figura 10: Abscessos intraperitoneais em camundongos fêmeas BALB/c. Os camundongos foram inoculados com  $10^8$  UFC/mL de *B. fragilis* e necropsiados 7 dias depois. As setas indicam a localização dos abscessos. (A): abscessos na membrana peritoneal causados pela cepa parental 638R; (B): abscessos hepáticos causados pela cepa  $\Delta oxyR$  IB298; (C): abscessos esplênicos causados pela cepa IB260  $\Delta katB$ .



Tabela 6: Visão geral do ensaio de indução de abscessos intra-abdominais pelas cepas de *B. fragilis* em camundongos saudáveis. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

<b>Cepa</b>	<b>UFC/mL (x 10<sup>3</sup>) <math>\diamond</math></b>	<b>Tamanho do abscesso (mm) <math>\diamond</math></b>	<b>UFC/mL/mm de abscesso (x 10<sup>3</sup>) <math>\diamond</math></b>
638R	77,4	181	1119
	$\pm 161,65$	$\pm 164,9$	$\pm 3148,9$
IB 298	6966,5	274	23295
	$\pm 24526,5$	$\pm 149,3$	$\pm 81645$
IB 260	6479	188	70633
	$\pm 14300,7$	$\pm 89,4$	$\pm 134971,3$

$\diamond$  Refere-se à diferença entre as cepas para cada parâmetro; Teste de Kruskal-Wallis.

## Discussão

---

Os microrganismos do gênero *Bacteroides* são membros predominantes da microbiota intestinal onde desempenham um importante papel na fisiologia intestinal normal. *Bacteroides* spp. também são patógenos oportunistas responsáveis por uma variedade de infecções intra-abdominais dentre outras (GOLDSTEIN, 1995). *Bacteroides fragilis* é o patógeno anaeróbico mais comumente isolado em infecções extraintestinais de humanos e é capaz de expressar diversos fatores de virulência, tais como um complexo capsular polissacarídico e enzimas hidrolíticas, que contribuem para seu sucesso como patógeno (GODOY *et al.*, 1993; KRINOS *et al.*, 2001). Os processos infecciosos associados a esta espécie, na maioria das vezes, tem início quando os microrganismos escapam do cólon (anaeróbico) para outros sítios oxidados como, por exemplo, a cavidade abdominal, onde a concentração de O<sub>2</sub> é em torno de 6% (PARK, MYERS & MARZELLA, 1992).

Assim, além da expressão de fatores de virulência “clássicos”, a resistência ao estresse oxidativo pode ser discutida como um fator essencial para a sobrevivência e virulência de *B. fragilis*, estando envolvida no estabelecimento e persistência da infecção. De fato, *B. fragilis* é altamente aerotolerante, sobrevivendo por extensos períodos (> 48h) de exposição ao O<sub>2</sub>, sem perda significativa de sua viabilidade (ROLFE *et al.*, 1977; ROLFE *et al.*, 1978; ROCHA *et al.*, 1996). Já foi mencionado que para se proteger contra o estresse oxidativo, *B. fragilis* apresenta uma complexa resposta fisiológica, que inclui a indução de aproximadamente 28 proteínas, que podem estar envolvidas diretamente na detoxificação dos radicais de O<sub>2</sub>, na proteção das macromoléculas e na fisiologia adaptativa, assim como no potencial de agressão da espécie (ROCHA *et al.*, 1996).

Neste estudo, três cepas de *B. fragilis* foram utilizadas para avaliar as consequências da ausência de expressão das proteínas OxyR e KatB na sobrevivência desta espécie em ambiente aerado, frente a macrófagos peritoneais, em modelos de sobrevivência *in vivo* e determinação de abscessos na membrana e na cavidade abdominal de animais de laboratório. A cepa IB298 possui o gene *oxyR* mutado e não expressa o regulador transcricional OxyR, o que leva a não ativação de alguns genes antioxidantes quando na presença dos radicais de oxigênio. Já a cepa IB260 não expressa a proteína catalase, responsável pela redução do peróxido de hidrogênio em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, pois possui o gene *katB* mutado (ROCHA *et al.*, 1996; ROCHA, OWENS & SMITH, 2000).

As curvas de crescimento em anaerobiose das cepas 638R parental, IB298 mutante *oxyR* e IB260 mutante *katB* mostrou algumas pequenas diferenças no comportamento destas cepas, sendo no entanto, detectado um perfil de crescimento similar, o que nos permite sugerir que tais mutações não chegam a causar um comprometimento na viabilidade destas cepas em ambientes com ausência de O<sub>2</sub>. O contrário aconteceu após 24h de exposição ao oxigênio atmosférico, onde a queda de 50% na contagem de colônias da cepa IB298 comprovou a importância da proteína OxyR de *B. fragilis* no combate às ROS e, conseqüentemente, na sua sobrevivência em ambientes aerados. Já a cepa IB260 que não expressa a catalase, mas expressa todos os outros genes antioxidantes regulados ou não pela OxyR, não apresentou perda na viabilidade celular, assim como a cepa parental 638R, que se mostrou também aerotolerante.

*B. fragilis* parece possuir apenas uma catalase que é claramente induzida por condições de estresse oxidativo decorrente da exposição ao oxigênio ou especificamente ao peróxido de hidrogênio (ROCHA *et al.*, 1996). É interessante observar que sob condições de exposição ao oxigênio atmosférico (21%), a catalase não foi requerida para a sobrevivência da IB260. Existem algumas possíveis explicações para este resultado. As células estressadas pelo oxigênio podem não ter gerado níveis suficientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> internamente para causar danos às estruturas celulares. Alternativamente, outros componentes da resposta ao estresse oxidativo podem ser capazes de compensar a perda da catalase na IB260, como por exemplo, as enzimas alquil hidroperóxido redutase (AhpC) e tioredoxina peroxidase (Tpx) que reduzem peróxidos orgânicos e são reguladas pela proteína OxyR (ROCHA & SMITH, 1999 ; ROCHA *et al.*, 2003). Outras enzimas como superóxido dismutase (Sod), glutatona peroxidase (Glp), citocromo *c* peroxidase (Ccp), tiol peroxidase específica (Tps) apesar de não serem controladas pela OxyR, em *B. fragilis*, são rapidamente ativadas em resposta ao estresse oxidativo (ROCHA *et al.*, 2003).

Muitos dos genes *sod* em diversas bactérias são controlados por SoxR, o que parece ser justificável já que a molécula alvo para Sod é o radical superóxido, que ativa o regulador transcricional SoxR. Em *E. coli*, duas Sod citoplasmáticas já foram identificadas, Mn-Sod e Fe-Sod. *sodA*, que codifica Mn-Sod, é induzida em resposta a agentes geradores de superóxido e tal indução é regulada por SoxR, enquanto *sodB*, que codifica Fe-Sod, é constitutivamente expressa, independente de estresse oxidativo. Entretanto, estes dois genes são regulados pelos sistemas de captação/armazenamento de ferro incluindo Fur e RyhB.

Recentemente, Ohara e colaboradores demonstraram que em *Porphyromonas gingivalis* *sod* é induzido por estresse oxidativo e esta indução é regulada pelo regulador transcricional OxyR, ao contrário do que ocorre em *E. coli*, onde SoxRS, e não OxyR, regula *sodA* (OHARA *et al.*, 2006). O gene *sod* de *B. fragilis*, assim como o de *P. gingivalis*, é induzido pelo estresse oxidativo (GREGORY, 1985). Entretanto, em *B. fragilis*, *sod* não deve ser regulado por OxyR, já que este é expresso em nível basal em condições de anaerobiose e tem sua expressão induzida quando exposto ao oxigênio atmosférico em uma cepa que expressa constitutivamente o gene *oxyR* (SMALLEY, ROCHA & SMITH, 2002). Ainda que *B. fragilis* pertença à mesma ordem de *P. gingivalis*, o tamanho do seu genoma é duas vezes maior do que o de *P. gingivalis*. Portanto, *B. fragilis* pode ter adquirido um novo mecanismo regulatório para o controle da expressão de *sod* independente de OxyR (OHARA *et al.*, 2006).

Também em 2006, uma tiol peroxidase Tps (*thiol peroxidase scavengase*) foi identificada em *B. fragilis* como uma enzima relativamente abundante durante a exposição ao O<sub>2</sub> (SUND, WELLS & SMITH, 2006). Tal proteína possui 57% de identidade com a tioredoxina peroxidase p20 de *E. coli*. Tps e p20 são membros da classe 'atípica 2-cisteína' de peroxiredoxinas e Tps contém as cisteínas conservadas nas posições 60 e 94, que são requeridas para atividade enzimática de p20 (BAKER & POOLE, 2003; WOOD *et al.*, 2003).

Boa parte da resposta ao estresse oxidativo em *B. fragilis* está focada na remoção de peróxidos e é controlada pelo regulador transcricional OxyR, que ativa a expressão da catalase (KatB) e de duas peroxidases 'típica 2-cisteína' AhpCF e Tpx. A citocromo *c* peroxidase, CcpA, é induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas não por O<sub>2</sub> e não é controlada pela OxyR. Em contraste, Tps é parcialmente induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e altamente induzida pela exposição ao O<sub>2</sub> em um mecanismo independente de OxyR. O papel específico de cada peroxidase ainda não está bem definido, mas todas elas fornecem proteção significativa contra peróxidos orgânicos. Tal fato sugere que a formação de peróxidos orgânicos complexos pode ser especialmente problemática durante o estresse oxidativo em anaeróbios, e que por isso eles adquiriram uma variedade de enzimas para combater os efeitos tóxicos (SUND, WELLS & SMITH, 2006).

O uso de modelos animais neste trabalho visou avaliar, tendo como ponto de partida os resultados obtidos *in vitro*, a sobrevivência e virulência das cepas estudadas na cavidade abdominal de camundongos. O modelo de inserção de câmaras contendo suspensão bacteriana na cavidade abdominal não pareceu adequado para o estudo da interferência de proteínas como OxyR e KatB na sobrevivência de *B. fragilis*. As três cepas apresentaram um pequeno

crescimento dentro das câmaras, mostrando que o ambiente no interior destas não estava oxidado o suficiente para a produção das ROS e, conseqüentemente, levar a perda de viabilidade celular nas cepas mutantes pela ausência da proteção antioxidante.

O “burst” oxidativo ou respiratório é um dos principais meios pelo qual os microrganismos são eliminados pelos macrófagos no hospedeiro. Quando o macrófago fagocita um microrganismo, ocorre o aumento do consumo de oxigênio e se inicia uma cascata de sinalização bioquímica complexa que visa à geração de uma série de produtos tóxicos na tentativa de eliminar o microrganismo infectante. Os mais importantes são o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o óxido nítrico, que são diretamente tóxicos às bactérias. Ainda são produzidos peptídeos antimicrobianos, como defensinas e proteínas catiônicas, enzimas, como lisozima e hidrolases bacterianas, e competidores que se ligam a nutrientes essenciais impedindo sua captação pela bactéria, como a lactoferrina e a proteína de ligação à vitamina B<sub>12</sub> (WEISS, 1989).

A avaliação da sobrevivência das três cepas após interação com macrófagos peritoneais residentes mostrou que mais de 30% das células da cepa 638R conseguiram se manter viáveis após 24h da interação. Já as cepas que possuíam uma mutação em um dos genes relacionados a resposta ao estresse oxidativo, *oxyR* e *katB*, mostraram-se mais susceptíveis à geração das ROS pelos macrófagos infectados. A cepa IB298 mutante *oxyR* obteve uma taxa de sobrevivência de 0,92% contra 5,67% da cepa IB260. Tais resultados sugerem que os genes *oxyR* e *katB* sejam realmente importantes para a proteção contra o “burst” oxidativo dos macrófagos e para a manutenção da viabilidade celular. Recentemente, estudos demonstraram que a interação de *B. fragilis* com M $\phi$  pode determinar o decréscimo da atividade microbicida por alterações morfológicas e interferindo com a produção de óxido nítrico (VIEIRA *et al.*, 2005). Para avaliarmos se as diferenças detectadas entre o comportamento das cepas parental e mutantes estariam ou não associadas a estas propriedades, análises em MEV foram realizadas e nenhuma diferença morfológica foi observada entre os M $\phi$  infectados com as 3 cepas. Estudos para a avaliação de interferência, como a produção de iNOS, não foram realizados. A princípio, os dados sugerem que de fato as mutações nas cepas IB 298 e IB 260 é que sejam os fatores responsáveis pela maior susceptibilidade à morte por fagocitose.

*Bacteroides fragilis* é o microrganismo anaeróbio mais freqüentemente isolado de infecções humanas, como a sepse intra-abdominal e a bacteremia (GORBACH & BARTLETT, 1974; POLK & KASPER, 1977), apesar desta bactéria constituir menos de 1%

da microbiota normal do cólon (NAMAVAR *et al.*, 1989). A formação de abscessos associados com a sepse intra-abdominal é um exemplo da resposta patobiológica do hospedeiro, que funciona como uma barreira de contenção dos organismos infectantes dentro da cavidade peritoneal. Embora a resposta tecidual seja inicialmente benéfica ao hospedeiro, abscessos não tratados causam significativa morbidade e podem ser fatais. Investigações do potencial patogênico de *B. fragilis* mostram que seu complexo polissacarídico capsular (CPC) é um determinante de virulência primário (KASPER *et al.*, 1977; ONDERDONK *et al.*, 1977a). O CPC induz a formação de abscessos em um modelo de sepse intra-abdominal em ratos, e a vacinação com este complexo fornece proteção contra a indução de abscessos após desafio com o organismo completo (KASPER *et al.*, 1979; ONDERDONK *et al.*, 1977a). No presente estudo, empregamos um modelo de indução de abscessos proposto por Onderdonk e colaboradores (1976) para avaliarmos a virulência das cepas parental e mutantes na cavidade peritoneal de camundongos. Ao contrário do que esperávamos, a capacidade de indução de abscessos pelas cepas mutantes *oxyR* e *katB* foi maior do que a observada para a cepa parental, tanto no que diz respeito ao número de abscessos formados quanto ao número de colônias por abscesso. É possível se especular que a perda de um sistema (OxyR) ou de uma enzima de proteção às ROS (catalase) nas cepas mutantes leve à expressão de um potencial de virulência diferenciado. É reconhecido que situações de estresse variadas são determinantes na regulação da expressão de genes de sobrevivência e de virulência bacteriana. No entanto, a complexidade dos sistemas de regulação, que operam muitas vezes como participantes de intrincadas redes, não nos permite no momento apresentar propostas para a elucidação do comportamento observado para estas cepas. Certamente, o emprego de novos modelos poderá nos auxiliar em investigações futuras.

O estudo dos mecanismos antioxidantes e das enzimas responsáveis pela remoção das ROS em bactérias anaeróbias aerotolerantes como *B. fragilis* pode fornecer novas reflexões para o entendimento da resposta protetora ao estresse oxidativo em todos os seres vivos. Primeiro, porque este é um microrganismo anaeróbio, que não pode utilizar exclusivamente o O<sub>2</sub> ou mudar para um modo de crescimento aeróbio quando exposto a ambientes oxidados. Sendo assim, a resposta à exposição ao oxigênio deve ser rápida e induzida completamente, visto que a diminuição dos recursos celulares prevenirá outra expressão significativa de mecanismos protetores. Segundo, a resposta deve ser programada por um período de tempo específico que poderia maximizar sua viabilidade até que fossem restabelecidas condições

anaeróbias apropriadas para o crescimento. Finalmente, o gênero *Bacteroides* divergiu muito cedo das eubactérias (WEISBURG *et al.*, 1985), o que sugere que esta bactéria seria o organismo apropriado para se estudar como diferentes bactérias desenvolveram mecanismos independentes e altamente regulados contra a toxicidade do oxigênio (ROCHA & SMITH, 1995).

Por fim, estes resultados mostram o ativador transcricional OxyR desempenha um papel na sobrevivência de *B. fragilis* em ambientes aerados e frente ao “burst” oxidativo após eventos de fagocitose. Por outro lado, em condições *in vivo* a ausência deste regulon e da enzima catalase parece interferir na capacidade de indução de abscessos, um critério considerado na determinação do potencial de virulência da espécie.

## *Conclusões*

---

1. Os dados encontrados neste estudo, com relação a avaliação da capacidade de sobrevivência em condições de exposição ao oxigênio atmosférico, confirmaram a aerotolerância da cepa 638R. Por outro lado, uma queda de 50% na viabilidade da cepa IB 298 mutante *oxyR* pôde ser detectada. A cepa IB 260, apesar da mutação no gene que codifica a proteína catalase, apresentou um comportamento similar a cepa parental, o que sugere o envolvimento de outras enzimas de proteção às ROS, reguladas ou não pelo ativador transcricional OxyR.
2. O modelo utilizado neste estudo para a avaliação comparativa da capacidade de sobrevivência das cepas parental e mutantes *in vivo* em câmaras intraperitoneais não se mostrou adequado. Distinções com relação a viabilidade das cepas nos períodos estudados não foram detectadas. É possível que o ambiente estabelecido no interior das câmaras não tenha atingido o nível de oxigenação estimado para a cavidade peritoneal, e conseqüentemente, não tenha havido a produção de uma quantidade letal das ROS.
3. Nos ensaios para a avaliação da sobrevivência das cepas parental e mutantes frente a macrófagos peritoneais observou-se a um perfil de susceptibilidade diferente entre as cepas. A cepa IB 298 mostrou-se mais susceptível à morte após o evento de fagocitose, confirmando o papel dos genes antioxidantes pertencentes ao regulon OxyR na defesa microbiana frente ao “burst” oxidativo. Como era de se esperar, a cepa IB 260 apresentou um comportamento intermediário. Em análises ao MEV não foram detectadas alterações morfológicas entre os macrófagos infectados com as 3 cepas estudadas.
4. A cepa parental foi capaz de induzir um número menor de abscessos, bem como um número menor de UFC/mL/mm de abscesso, quando comparada às cepas mutantes. Estes dados sugerem um comportamento inverso entre a expressão dos genes antioxidantes analisados e o critério de determinação de virulência selecionado para este estudo. A expressão de um potencial de agressão diferenciado na ausência de expressão de KatB e OxyR pode ser considerado.



## ***Referências Bibliográficas***

---

ADEREM, A. & UNDERHILL, D.M. **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** Annu Rev Immunol. 1999. 17:593-623.

ALDRIDGE, K.E. **The occurrence, virulence and antimicrobial resistance of anaerobes in polymicrobial infections.** Am. J. Surg. 1995. 169 (5A):2S-7S

BAKER, L.M. & POOLE, L.B. **Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia col*: sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61.** J. Biol. Chem. 2003. 14;278(11):9203-11

BAUGHN, A. D. & MALAMY M. H. **The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen.** Nature. 2004.427: 441-44

BEAMAN, L. & BEAMAN, B.L. **The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense.** Annu Rev Microbiol. 1984. 38:27-48.

BORNSIDE, G.H., DONOVAN, W.E. & MYERS, M.B. **Intracolonic tensions of oxygen and carbon dioxide in germfree, conventional, and gnotobiotic rats.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1976. 151:437-441

BOTTA, G.A., ARZESE, A., MINISINI, R. & TRALF, G. **Role of Structural and Extracellular Virulence Factors in Gram Negative Anaerobic Bacteria.** Clin. Infect. Dis. 1994. 18(4): S260-264

BRONDZ, I.; CARLSSON, J., SJOSTROM, M. & SUNDQVIST. **Significance of cellular fatty acids and sugars in defining the genus *Porphyromonas*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 1989. 39: 314-318

BRONDZ, I., OLSEN, I.; HAAPASALO, M. & VAN WINKELHO F. **Multivariate of fatty acid data from whole-cell methano-lysates of *Prevotella*, *Bacteroides* and *Porphyromonas* spp.** J. Gen. Microbiol. 1991. 137:1445-1452

BROOK, I. **Microbiology and management of intra-abdominal infections in children.** Pediatr. Int. 2003. 45(2):123-9

BROOK, I. & FINEGOLD, S. M. **Aerobic and anaerobic bacteriology of cutaneous abscesses in children.** Pediatr. 1981. 67: 891-895

BROOK, I. & FRAZIER, E. H. **Aerobic and anaerobic microbiology of retroperitoneal abscesses.** Clin. Inf. Dis. 1998. 26: 938-941

CHOI, H., KIM, S., MUKHOPADHYAY, P., CHO, S., WOO, J., STORZ, G. & RYU, S. **Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor.** Cell. 2001. 105:103-113

CHRISTMAN, M.F., MORGAN, R.W., JACOBSON, F.S. & AMES, B.N. **Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*.** Cell. 1985. 41:753-762

COLLINS, M. D. & SHAH, H. N. 1987. **Recent advances in the taxonomy of the genus *Bacteroides***, p. 249-258. In Borriello, S. P. Hardie, J. M., Drasar, B. S., Duerden, B. I., Hudson, M. J., and Lyson, R. J. (ed.), Recent advances in anaerobic bacteriology. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

CRAB, J. H., FINDBERG, R., ONDERDONK, A. B. & KASPER, D. L. **T cell regulation of *Bacteroides fragilis* induced intraabdominal abscesses.** Rev. Infec. Dis. 1990. 12(52): S178-184

DAMATTA, R.A, SEABRA, S.H., MANHAES, L. & DE SOUZA, W. **Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages.** Parasitol. Res. 2000. 86(3):239-43.

DAY, S.E.J., VASLI, K.K., RUSSEL, R.J., ARBUTHNOTT, J.P. **A simple method for the study in vivo of bacterial growth and accompanying host response.** J. Infec. 1980. 2:39-51

DOBBIE, J. W. **Serositis: Comparative analasys of histological findings and pathogenic mechanisms in nonbacterial serosal inflammation.** Perit. Dial. Int. 1993. 13: 256-269

ENGELKIRK, P.G., DUBEN-ENGELKIRK, J. & DOWELL, V.R. **Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology.** Star Publishing Company, Belmont, California, 1992

FANG, F.C. **Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.** Nature. 2004. 2:820-832

FINEGOLD, S. M. & GEORGE, W. L. (eds.) 1989. **Anaerobic Infections in Humans.** Academic Press, San Diego, CA

FINLAY, B.B. & FALKOW, S. **Common themes in microbial pathogenicity** revised. Microbiol Molec Biol Rev. 1997. 61(2)

FORMAN, H.J. & TORRES, M. **Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophages signaling.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002. 166:S4-S8

FRIDOVICH, I. **The biology of oxygen radicals.** Science. 1978.201:875–880

GIAMARELLOU, H. **Anaerobic infection therapy.** J. Antimicrob. Agents. 2000. 16:341-346

GIBSON, F.C. III, TZIANABOS, A.O. & ONDERDONK, A.B. **The capsular polysaccharide complex of *Bacteroides fragilis* induces cytokine production from human and murine phagocytic cells.** Infect. Immun. 1996. 64:1065

GIBSON, F.C. III, ONDERDONK, A.B., KASPER, D.L. & TZIANABOS, A.O. **Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*.** J. Immunol. 1998. 160(10): 5000-6

GIBSON, S.A.W.; MCFARLAN, C. HAY, S. & MACFARLANE, G.T. **Significance of Microflora in Proteolysis in the colon.** Applied and Environmental Microbiology. 1989. 55(3): 679-673

GODOY, V.G., DALLAS, M.M., RUSSO, T.A. & MALAMY, M.H. **A role for *Bacteroides fragilis* neuraminidase in bacterial growth in two model systems.** Infect. Immun. 1993. 61(10):4415-26.

GOLDSTEIN, E.J. **Anaerobes under assault: from cottage industry to industrialization of medicine and microbiology.** Clin. Infect. Dis. 1995. 20(2): S112-116

GOLDSTEIN, E.J. & CITRON, D.M. **Annual incidence, epidemiology, and comparative *in vitro* susceptibilities to cefoxitin, cefotetan, cefmetazole and ceftizoxime of recent community-acquired isolated of the *Bacteroides fragilis* group.** J. Clin. Microbiol. 1988. 26: 2361-2366

GORBACH, S.L. & BARTLETT, J.G. **Anaerobic infections.** N. Engl. J. Med. 1974. 290:1177-1184.

GREENBERG, J.T., MONACH, P.J., CHOU, H.P., JOSEPHY, D. & DEMPLE, B. **Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. 87:6181-6185

GREGORY, E.M. **Characterization of the O<sub>2</sub>-induced manganese-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis*.** Arch Biochem Biophys. 1985. 238(1):83-9.

GREGORY, E.M., KOWALSKI, J.B. & HOLDEMAN, L.V. **Production and some properties of catalase and superoxide dismutase from the anaerobe *Bacteroides distasonis*.** J. Bacteriol. 1977. 129:1298-1302

HASSAN, H. M., & I. FRIDOVICH. **Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*.** J. Biol. Chem. 1978. 253:6445–6450

HASSETT, D.J. & COHEN, M.S. **Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells.** FASEB J. 1989. 3(14):2574-82.

HERREN, C.D., ROCHA, E.R & SMITH, C.J. **Genetic analysis of an important oxidative stress locus in the anaerobe *Bacteroides fragilis*.** Gene. 2003. 316:167-175

HILL, G.B., OSTERHOUT, S. & PRATT, P.C. **Liver abscess production by non-spore-forming anaerobic bacteria in mouse model.** Infect. Immun. 1974. 9:599-603

HOLDEMAN, L. V., CATO, E.P. & MOORE, W.E.C. 1977. Em: **Anaerobic Laboratory Manual.** 4<sup>th</sup> ed. Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg

HOLDEMAN, L.V., KELLY, R.W. & MOORE, W.E.C. 1984. **Genus I. *Bacteroides*** Castellani and Chalmers 1919, 959AL. In: Krieg, N. R. & Holt, J. G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The Willians and Wilkins Co., Baltimore, p. 604-631

JOHNSON, J.L. **Taxonomy of the *Bacteroides*. I. Deoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species.** Int. J. Syst. Bacteriol. 1978. 28: 245-256.

JOHNSON, J.L. & HARICH, B. **Ribosomal ribonucleic acid homologies among species of the genus *Bacteroides*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. 36: 71-79

JOUSIMIES-SOMER, H., SUMMANEN, P., CITRON, D.M., BARON, E.J., WEXLER, H.M. & FINEGOLD, S.M. 2002. Em: **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 6th ed. National Public Health Institute (KTL). Department of Bacteriology. Anaerobe Reference Laboratory. Helsinki, Finland

KASPER, D.L., HAYES, M.E., REINAP, B.G., CRAFT, F.O., ONDERDONK, A.B. & POLK, B.F. **Isolation and identification of encapsulated strains of *Bacteroides fragilis***. J. Infect. Dis. 1977. 136:75-81

KASPER, D.L., ONDERDONK, A.B., CRABB, J. & BARTLETT, J.G. **Protective efficacy of immunization with capsular antigen against experimental infection with *Bacteroides fragilis***. J. Infect. Dis. 1979a. 140:724-731.

KASPER, D.L., ONDERDONK, A.B., POLK, B.F. & BARTLETT, J.G. **Surface antigens as virulence factors in infection with *Bacteroides fragilis***. Rev. Infect. Dis. 1979b. 1:278-88

KELLY, M.J. **The quantitative and histological demonstration of pathogenic synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in guinea-pig wounds**. J. Med. Microbiol. 1978. 11:513-23

KELLY, M.J. **Wound infection: a controlled clinical and experimental demonstration of synergy between aerobic (*Escherichia coli*) and anaerobic (*Bacteroides fragilis*) bacteria**. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 1980. 62:52-9

KLEBANOFF, S.J. **Phagocytic cells: products of oxygen metabolism**. In: Inflammation: basic principles and clinical correlates. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R. (eds). New York: Raven Press, 1988:391-444

KRINOS, C.M, COYNE, M.J, WEINACHT, K.G., TZIANABOS A.O, KASPER D.L. & COMSTOCK L.E. **Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions**. Nature. 2001. 414:555-8

KULLIK, I., STEVENS, J., TOLEDANO, M.B. & STORZ, G. **Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization.** J. Bacteriol. 1995. 177(5):1285-1291

LAMBE JR, D. W. **Serogrouping of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis* by the agglutination test.** J. Clin. Microbiol. 1976. 3: 586-592

LEMOS, R.S., GOMES, C.M., SANTANA, M., LEGALL, J., XAVIER, A.V., TEIXEIRA, M. **The 'strict' anaerobe *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain.** FEBS Lett. 2001. 496:40-43

LEVINSON, M. E. & BUSH, L. M. 1995. **Peritonitis and other intra-abdominal infections.** In: Principles and practice of infectious diseases. G. L. Mandell, J. E. Bennett and R. Dolin (eds), Churchill Livingstone, New York 705-740

LEVITT, M.D. **Oxygen tension in the gut.** N. Engl. J. Med. 1970. 282:1039-1040

LOEWEN, P.C. **Regulation of bacterial catalase synthesis.** In: Molecular biology of free radical scavenging systems. J.G. Scandalios (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. & GIBSON, G.R. **Synthesis and Release of Proteases by *Bacteroides fragilis*.** Current Microbiol. 1992. 24: 55-59

MACMICKING, J., XIE, Q.W. & NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function.** Annu. Rev. Immunol. 1997. 15:323-50

MYERS, L.L. & SHOOP, D.S. **Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs.** Am. J. Vet. Res. 1984. 48(5): 774-775

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

NAMAVAR, F., THEUNISSEN, E.B.M., VERWEIJ VAN VUGHT, M.A.J.J., PEERBOMS, P.G.H., BAL, M., HOITSMA, H.F.W. & MACLAREN, D.M. **Epidemiology of *Bacteroides fragilis* group in the colonic flora in 10 patients with colonic cancer.** J. Med. Microbiol. 1989. 29: 171-176

NAMAVAR, F., VERWEIJ VAN VUGHT, M.A.J.J. & MACLAREN, D.M. **A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*.** J. Gen. Microbiol. 1991. 137:1431-1435

NAMAVAR, F., VAN DER BIJL, M.W., APPELMELK, B.J., GRAAF, J. & MACLAREN, D.M. **The role of neuraminidase in haemagglutination and adherence to colon WiDr cells by *Bacteroides fragilis*.** J. Med. Microbiol. 1994. 40: 393-396

NICHOLS, R.L. **Intraabdominal infections: an overview.** Rev. Infect. Dis. 1985. 7:S709-S715

OHARA, N., KIKUCHI, Y., SHOJI, M., NAITO, M. & NAKAYAMA, K. **Superoxide dismutase-encoding gene of the obligate *Porphyromonas gingivalis* is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR.** Microbiology. 2006. 152:955-966

ONDERDONK A.B. **Animal models simulating anaerobic infections.** Anaerobe. 2005. 11(4):189-195

ONDERDONK, A.B., WEINSTEIN, W.M., SULLIVAN, N.M., BARTLETT, J.G. & GORBACH, S.L. **Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals.** Infect. Immun. 1974. 10:1256-9



ONDERDONK, A.B., BARTLET, J.G., LOUIE, T., SULLIVAN-SEIGLER, N. & GORBACH, S.L. **Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess.** Infect. Immun. 1976. 13: 22-26

ONDERDONK, A.B., KASPER, D.L., CISNEROS, R.L. & BARTLET, J.G. **The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* as a virulent factor: comparison of the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated strains.** J. Infect. Dis. 1977a. 136: 82-89

ONDERDONK, A.B., MOON, N.E., KASPER, D.L. & BARTLETT, J.G. **Adherence of *Bacteroides fragilis* in vivo.** Infect. Immun. 1977b. 19: 1083

ONDERDONK, A.B., CISNEROS, R.L., CRABB, J.H., FINBERG, R. & KASPER, D.L. **Intraperitoneal response and in vivo killing of *Bacteroides fragilis* in a bacterial containment chamber.** Infect. Immun. 1980. 57:3030

ONDERDONK, A.B., CISNEROS, R.L., FINBERG, R., CRABB, J.H. & KASPER, D.L. **Animal model system for studying virulence of and host response to *Bacteroides fragilis*.** Rev. Infect. Dis. 1990. 12 (S2): S169-177

PARK, M.K., MYERS, R.A.M. & MARZELLA, L. **Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses.** Clin Infect Dis 1992. 14:720-40.

PASTER, B.J., LUDWIG, W., WEISBURG, W.G., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R.B., HAHN, C.M., REICHENBACH, H., STETTER, K.O. & WOESE, C.R. **A phylogenetic grouping of the *Bacteroides*, *Cytophaga* and certain *Flavobacteria*.** Syst. Appl. Microbiol. 1985. 6: 34-42.

PATRICK, S., LUTTON, D. A. & CROCKARD, A.D. **Immune reactions of *Bacteroides fragilis* populations with three different types of capsule in a model of infection.** Microbiol. 1995. 141: 1969-1976

PIETERS, J. **Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria.** *Curr Opin Immunol.* 2001. 13(1):37-44

POLK, B.J. & KASPER, D.L. ***Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates.** *Ann. Intern. Med.* 1977. 86:567

POXTON, I.R., BROWN, R., SAWYFER, A. & FERGUSON, A. **The mucosal anaerobic Gram-negative bacteria of human colon.** *Clin. Infect. Dis.* 1997. 25: 111- 113

PRIVALLE, C.T. & GREGORY E.M. **Superoxide dismutase and O<sub>2</sub> lethality in *Bacteroides fragilis*.** *J. Bacteriol.* 1979. 138: 139-145

PRIVITERA, G., DUBLANCHET, A. & SEBALD, M. **Transfer of multiple antibiotic resistance between subspecies of *Bacteroides fragilis*.** *J. Infect. Dis.* 1979. 139:97-101

PRUZZO, C.; DANIELLI, B. & RICHETTI, M. **Pilliated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and are more sensitive to phagocytosis by human neutrophils than nonpilliated strains.** *Infect. Immun.* 1984. 43: 189-194

RENVALL, S., & NIINIKOSKI, J. **Intraperitoneal oxygen and carbon dioxide tensions in experimental adhesion disease and peritonitis.** *Am. J. Surg.* 1975. 130, 286– 292.

ROCHA, E.R., SELBY, T., COLEMAN, J.P. & SMITH, C.J. **Oxidative stress response in an anaerobe *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide.** *J. Bacteriol.* 1996. 178: 6895–903

ROCHA, E.R., OWENS, G. & SMITH, C.J. **The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*.** *J. Bacteriol.* 2000. 182(18):5059-5069

ROCHA, E.R., HERREN, C.D., SMALLEY, D.J. & SMITH, C.J. **The complex stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression.** *Anaerobe.* 2003. 9: 165-173

ROCHA, E.R. & SMITH, C. J. **Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol. 1995. 177:3111-3119

ROCHA, E. R., & SMITH, C. J. **Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation**. J. Bacteriol. 1997. 179(22):7033-9

ROCHA, E.R. & SMITH, C. J. **Characterization of a peroxide-resistant mutant of the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol. 1998. 180: 5906–5912

ROCHA, E.R. & SMITH, C.J. **Role of the alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol. 1999. 181:5701–5710. 266

ROLFE, R.D., HENTGES, D.J., BARRETT, J.T., CAMPBELL, B.J. **Oxygen tolerance of human intestinal anaerobes**. Am J Clin Nutr 1977. 30:1762–9

ROLFE, R.D., HENTGES, D.J., CAMPBELL, B.J & BARRETT, J.T. **Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria**. Appl Environ Microbiol 1978. 36:306–13

SCHEIBEL, J.H., NIELSEN, M.L. & LINDENBERG, S. **Assessment of wound contamination by wound irrigation. Experimental investigations on quantitative recovery of anaerobic and aerobic bacteria**. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1978. [B] 86: 201-5

SCHELL, M. A. **Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators**. Annu. Rev. Microbiol. 1993. 47: 597-626

SEABRA, S.H., DE SOUZA, W. & DAMATTA, R.A. ***Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages**. Exp. Parasitol. 2002. 100(1):62-70.

SHAH, H. N. 1992. **The genus *Bacteroides* and related species**, p. 3593-3607. In A. Balows, Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. (ed.), *The prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York

SHAH, H. N. & COLLINS, M. D. **Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species**. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989. 39: 85-87

SILVA-FILHO, RENATO GERALDO. **Propriedades do *Streptococcus* do grupo B crescido “in vivo” usando câmaras permeáveis intraperitoneais**. 1991. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991

SMALLEY, D., ROCHA, E.R. & SMITH, C.J. **Aerobic-type ribonucleotide reductase in the anaerobe *Bacteroides fragilis***. *J. Bacteriol.* 2002. 184:895-903

STORZ, G., TARTAGLIA L.A. & AMES, B.N. **Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation**. *Science*. 1990. 248(4952):189-94.

STORZ, G. & INLAY, J.A. **Oxidative stress**. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. 2(2):188-94

STORZ, G. & ZHENG, M. **Oxidative stress**. In G. Storz and Hengge-Aronis, R. (ed.), *Bacterial Stress Responses*, 2000. pp.47-59. Washington, DC: American Society for Microbiology

SUND, C.J., WELLS, W.G. & SMITH, C.J. **The *Bacteroides fragilis* P20 scavengase homolog is important in the oxidative stress response but is not controlled by OxyR**. *FEMS Microbiol Lett.* 2006. 261:211-217

TZIANABOS, A.O., ONDERDONK, A.B., ROSNER, B., CISNEROS, R.L. & KASPER, D.L. **Structural features of polysaccharides that induce intraabdominal abscesses.** Science 1993. 262: 416-9

TZIANABOS, A.O., KASPER, D.L., CISNEROS, R.L., SMITH, R.S. & ONDERDONK, A.B. **Polysaccharide-mediated protection against abscess formation in experimental intra-abdominal sepsis.** J. Clin. Invest. 1995. 96:2727-2731

VAN DEN EYDE, H.V., DE BAERE, R., SHAH, H.N., GHARBIA, S.E., FOX, G.E. & DE WATCHER, R. **5S ribosomal ribonucleic acid sequence in *Bacteroides* and *Fusobacterium*: evolutionary relationships within these genera and among eubacteria in general.** Int. J. Syst. Bacteriol. 1989. 39:78-84

VAN DOORN, J., MOOI, F.R., VERWEIJ VAN VUGHT, A.M.J.J. & MACLAREM, D.M. **Characterization of fimbriae from *Bacteroides fragilis*.** Microbial. Pathogen. 1987. 3: 87-95

VIEIRA, J.M.B.D., VALLIM, D.C., FERREIRA, E.O., SEABRA, S.H., FERREIRA, M.C.S. & DOMINGUES, R.M.C.P. ***Bacteroides fragilis* interferes with iNOS activity and leads to pore formation in macrophage surface.** Bioch. Bioph. Res. Comm. 2005. 326:607-613

WEIKEL, C.S., GRIECO, F.D., REUBEN, J., MYERS, L.L. & SACK, R. B. **Human colonic epithelial cells, HT 29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology.** Infect. Immun. 1992. 60: 321-327

WEINSTEIN, W.M., ONDERDONK, A.B., BARTLETT, J.G. & GORBACH, S.L. **Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model.** Infect. Immun. 1974. 1250-5

WEISBURG, W.G., OYAIZU, Y., OYAIZU, H. & WOESE, C.R. **Natural relationship between bacteroides and flavobacteria.** J Bacteriol. 1985. 164(1):230-6.

WEISS, S.J. **Tissue destruction by neutrophils.** N. Engl. J. Med. 1989. 320:365-376.

WILKINS, T.D.M., WAGNER, D.L., VELTRI, B.J. & GREGORY, E.M. **Factors affecting production of catalase by *Bacteroides*.** J. Clin. Microbiol. 1978. 8: 553-557

WILLIS, A. 1991. **Abdominal sepsis.** In: Anaerobes in Human Diseases. B. I. Duerden & Drasar. B. S. (ed.), Edward Arnold. p. 197-223

WOOD, Z.A., SCHRODER, E., ROBIN HARRIS, J. & POOLE, L.B. **Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins.** Trends Biochem. Sci. 2003. 28(1):32-40

ZHENG, M., ASLUND, F. & STORZ, G. **Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.** Science .1998. 279: 1718–1721

ZHENG, M., WANG, X., DOAN, B., LEWIS, K.A., SCHNEIDER, T.D., & STORZ, G. **Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 2001a. 183: 4571–4579

ZHENG, M., WANG, X., TEMPLETON, L.J., SMULSKI, D.R., LAROSSA, R.A., & STORZ, G. **DNA microarray mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide.** J. Bacteriol. 2001b. 183:4562–4570