



Departamento de
Parasitologia, Microbiologia e
Imunologia



**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E
MOLECULARES DA RESPOSTA DE *Fusobacterium nucleatum* A
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS**

Job Alves de Souza Filho

Juiz de Fora

2011



Departamento de
Parasitologia, Microbiologia e
Imunologia



ASPECTOS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESPOSTA DE *Fusobacterium nucleatum* A CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS

Job Alves de Souza Filho

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia da Silva

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Cíntia Marques Coelho

Prof^a. Dr^a. Jacy Gameiro

Juiz de Fora

2011

Souza Filho, Job Alves de.

Aspectos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e moleculares da resposta de *Fusobacterium nucleatum* a concentrações subinibitórias de antimicrobianos / Job Alves de Souza Filho. – 2011.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Antimicrobianos. 2. *Fusobacterium nucleatum*. I. Título.

CDU 615.2

JOB ALVES DE SOUZA FILHO

**Aspectos morfológicos, fisiológicos e moleculares da resposta de
Fusobacterium nucleatum a concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 04 / 11 / 2011.

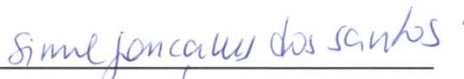
BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Vânia Lúcia da Silva

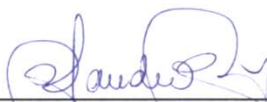
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª. Drª. Simone Gonçalves dos Santos

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Universidade Federal de Juiz de Fora

DESENVOLVIMENTO:

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Juiz de Fora

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia da Silva
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Cíntia Marques Coelho
Prof^a. Dr^a. Jacy Gameiro

COLABORAÇÃO:

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Laboratório de Imunologia

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Juiz de Fora

APOIO FINANCEIRO:

FAPEMIG – Processo CBB-APQ 00729-09
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

"O temor do SENHOR é a sabedoria, e apartar-se do mal é a inteligência"

Job 28:28

A meu Pai, Job Alves de Souza
A minha Mãe, Marlene T. S. Alves
A meus Irmãos e minha grande Família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a Deus, que me concedeu saúde e sabedoria suficiente para cumprir a jornada até aqui.

Também, várias pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. A todas elas, incluindo as não citadas nominalmente aqui, registro minha gratidão.

Ao meu Pai e à minha Mãe, pelo auxílio constante e incondicional.

Aos meus irmãos, sempre grandes amigos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Vânia por me aceitar como seu primeiro aluno de mestrado e por estar sempre acessível e a disposição para resolver qualquer dúvida ou problema.

Aos professores Cláudio, Cintia, Gilson e Jacy, pela colaboração e o direcionamento das discussões.

À Michele, minha tutora em vários experimentos e minha consultora na análise dos resultados, sempre com calma e bom humor.

À Natalia Barbosa, Rafaella Mazzei e Mariana Lopes, ICs neste projeto, que me ensinaram mais do que aprenderam comigo e possibilitaram que eu concluí-se o mestrado muito antes do tempo previsto.

A todos os pesquisadores – ICs, mestrandos e doutorandos – do laboratório de microbiologia da UFJF, pelo auxílio sempre que preciso e pela amizade.

Aos demais amigos e familiares.

Obrigado a todos!

RESUMO

Concentrações subinibitórias de antimicrobianos (CSI), frequentemente decorrentes de antibioticoterapia, podem resultar em alterações na biologia bacteriana, com implicações no seu potencial agressor. Esse efeito tem considerável importância para as bactérias da microbiota residente, em especial para *Fusobacterium nucleatum*, um dos mais proeminentes anaeróbios residentes em humanos. Os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos de concentrações subinibitórias (CSI) de antimicrobianos em características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares de *F. nucleatum*. A partir da linhagem *F. nucleatum* ATCC 25586 (denominada FnPAR), foram obtidas 14 linhagens selecionadas por 10 cultivos sucessivos em CSI de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina/sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), levofloxacina (FnLEV⁺), metronidazol (FnMET⁺) e piperacilina/tazobactam (FnPTZ⁺) e, subsequente, 10 cultivos na ausência das mesmas drogas. Foram avaliados o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a morfologia bacteriana, o perfil bioquímico, a formação de biofilme e o custo de *fitness*. Também foram realizadas genotipagem e análise dos perfis proteômicos. Para avaliação global das alterações fenotípicas e genotípicas foram obtidas matrizes de similaridade. O perfil de susceptibilidade mostrou sensibilidade diminuída para a maioria das linhagens derivadas, mesmo após o cultivo sem drogas. Alterações morfológicas e de complexidade celular foram observadas, principalmente nas linhagens cultivadas em CSI de β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMS⁺ e FnPTZ⁺), que também expressaram capacidade diminuída para formação de biofilme. Contudo, a morfologia regular e a habilidade de formação de biofilme foram retomadas após o cultivo sem droga. As linhagens FnCLI, FnCLO, FnLEV e FnMET não apresentaram alterações morfológicas evidentes, porém, foi observado aumento na formação de biofilme, com destaque para FnCLI⁺. As linhagens FnMET⁺ e FnCLI⁺ apresentaram um alto custo de *fitness*. Foram observadas alterações no padrão de metabolismo de carboidratos e na atividade de enzimas microbianas. Comparado com a FnPAR, várias proteínas (de 4.5 a 240 kDa) foram positivamente ou negativamente reguladas nas linhagens derivadas. Observou-se polimorfismo no DNA em todas as linhagens derivadas. As matrizes de similaridade não mostraram relações entre o padrão de polimorfismo de DNA e as outras características. Entretanto, existe uma tendência de que as alterações bioquímicas estejam relacionadas com alterações nos perfis proteômicos. CSI de antimicrobianos podem, de fato, induzir alterações em *F. nucleatum*, com reflexo direto na sua biologia. Estes resultados alertam para o risco de antibioticoterapia inadequada, que podem ter sérias implicações para a microbiologia clínica e doenças infecciosas e, ainda, interferir com a relação bactéria-hospedeiro.

Palavras-chave: *Fusobacterium nucleatum*, concentrações subinibitórias, antimicrobianos, alterações morfológicas, características bioquímico-fisiológicas, alterações moleculares

ABSTRACT

Subinibitory Concentrations (SIC) of antimicrobials, often arising from antibioticotherapy, may result in alterations in bacterial biology with implications for its potential aggressor. This effect has considerable importance for the bacteria of resident microbiota, especially for *Fusobacterium nucleatum*, one of the most prominent anaerobes in humans. Our aim was to analyze the effects of antimicrobials SIC in morphological, biochemical, physiological and molecular characteristics of *F. nucleatum*. From the strain *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnWLD) were obtained 14 strains selected by 10 successive culture on SIC of ampicillin (FnAMP⁺), ampicillin/sulbactam (FnAMS⁺), clindamycin (FnCLI⁺), chloramphenicol (FnCLO⁺), levofloxacin (FnLEV⁺), metronidazole (FnMET⁺) and piperacillin/tazobactam (FnPTZ⁺) and subsequent 10 cultures in the absence of the same drugs. We evaluated the antimicrobial susceptibility patterns, bacterial morphology, biochemical profile, biofilm formation and the fitness cost. We also performed genotyping and analysis of protein profiles. For the global evaluation of phenotypic and genotypic alterations, similarity matrices were obtained. The antimicrobial susceptibility patterns showed decreased sensitivity to most of derived strains, even after culture without drugs. Morphological and cell complexity alterations were observed, mainly in strains grown in SIC of β -lactam (FnAMP⁺, FnAMS⁺ and FnPTZ⁺), which also expressed decreased ability to biofilm formation. However, the regular morphology and the ability to biofilm formation were restored after culture without drug. The strains FnCLI, FnCLO, FnLEV and FnMET showed no apparent morphological changes, however, there was an increase in biofilm formation, especially for FnCLI⁺. The strains FnMET⁺ and FnCLI⁺ had a high fitness cost. Changes were observed in the carbohydrate metabolism patterns and activity of microbial enzymes. Compared with the FnWLD, several proteins (from 4.5 to 240 kDa) were positively or negatively regulated in the derived strains. It was observed polymorphism in the DNA in all derived strains. The similarity matrices showed no relationship between the DNA polymorphism patterns and other features. However, there is a tendency that the biochemical changes to be related to alterations in protein profiles. SIC of antimicrobials may, indeed, to induce alterations in *F. nucleatum* with direct impact on its biology. These results emphasize the risk of inadequate antibioticotherapy, which may have serious implications for the clinical microbiology and infectious diseases and also to interfere with the bacteria-host relationship.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*, subinibitory concentrations, antimicrobials, morphological changes, physiological-biochemical characteristics, molecular alterations

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto morfológico das células de <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 em exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam (1° e 10° passagem), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (11° e 20° passagem). Células visualizadas após coloração pelo método de Gram.....	35
Figura 2. Área média das células de <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 visualizadas após coloração de Gram, durante exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos.....	36
Figura 3. Avaliação por citometria de fluxo das células da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos.....	37
Figura 4. Habilidade de formação de biofilme da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos.....	39
Figura 5. Curva de crescimento e tempo de geração da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, metronidazol e piperacilina-tazobactam.....	40
Figura 6. Identificação molecular da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos.....	41
Figura 7. Perfil protéico da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos, analisados por eletroforese capilar microfluídica.....	42
Figura 8. Genotipagem por AP-PCR da linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos, utilizando os <i>primers</i> aleatórios, D8635 e D11344.....	43
Figura 9. Matrizes de similaridade resultante dos perfis bioquímicos, de acúmulo protéico e de polimorfismo do DNA, obtidos para a linhagem parental <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e para as linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol, levofloxacina e piperacilina-tazobactam, e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos.....	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Subinibitória (CSI) dos antimicrobianos para a linhagem <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586.....	33
Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, da linhagem <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas pela exposição às CSI de antimicrobianos e após o cultivo sem antimicrobianos.....	34
Tabela 3. Características bioquímicas da linhagem <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas pela exposição às CSI de antimicrobianos e após o cultivo sem antimicrobianos.....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A - Peso em kDa do perfil de acúmulo protéico da linhagem <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 e das linhagens selecionadas pela exposição às CSI de antimicrobianos e após o cultivo sem antimicrobianos, analisados por eletroforese capilar microfluidica.....	69
--	----

SIGLAS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CSI – Concentração Subinibitória

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (*Ensaio por Enzimas Imuno-Adsorvidas*)

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

GRAs – Genes de Resistência a Antimicrobianos

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

OMP – “Outer Membrane Protein” (*Proteínas de Membrana Externa*)

ORF – “Open Reading Frame” (*Quadros Abertos de Leitura*)

PAGE- “PolyAcrylamide Gel Electrophoresis” (*Eletroforese em Gel de Poliacrilamida*)

PBMC – “Peripheral Blood Mononuclear Cell” (*Células Mononucleares do Sangue Periférico*)

PMN – “Polymorphonuclear Leukocytes” (*Linfócitos Polimorfonucleares*)

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

TGI – Trato Gastrointestinal

TNF- α – “Tumor Necrosis Factor-Alpha” (*Fator de Necrose Tumoral - Alfa*)

UPGMA – “Unweighted Pair Group Method” (*Método por Grupo Pareado Não-Ponderado*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Microbiota Residente.....	15
2.2 Bactérias anaeróbias.....	16
2.3 O Gênero <i>Fusobacterium</i>	17
2.3.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	18
2.4 Microrganismos e antimicrobianos.....	20
2.4.1 Mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	21
2.4.2 Disseminação de Genes de Resistência a Antimicrobianos (GRAs) e bactérias resistentes.....	22
2.4.3 Antibioticoterapia e <i>Fusobacterium nucleatum</i>	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos Gerais.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Linhagens bacterianas e cultivo.....	26
4.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação da CIM e da CSI.....	26
4.3 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características morfológicas das linhagens bacterianas.....	27
4.3.1 Avaliação direta da morfologia celular bacteriana.....	27
4.3.2 Avaliação da morfologia celular bacteriana por citometria de fluxo.....	28
4.4 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas.....	28
4.4.1 Avaliação de características bioquímicas.....	28
4.4.2 Avaliação da formação de biofilme bacteriano experimental.....	29
4.4.3 Obtenção de curvas de crescimento.....	30
4.5 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características moleculares das linhagens bacterianas.....	30
4.5.1 Identificação molecular das linhagens bacterianas obtidas.....	30
4.5.2 Genotipagem bacteriana.....	31
4.5.3 Análise dos perfis de acúmulo protéico das linhagens.....	32
4.6 Construção das matrizes de similaridade.....	32
4.7 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Avaliação do efeito das CSI dos antimicrobianos no perfil de susceptibilidade.....	33
5.2 Avaliação do efeito das CSI dos antimicrobianos na morfologia.....	35
5.3 Avaliação do efeito das CSI dos antimicrobianos nas características bioquímicas e fisiológicas.....	38
5.4 Avaliação do efeito das CSI dos antimicrobianos nas características moleculares.....	40
5.5 Análise fenética das alterações bioquímico-fisiológicas e moleculares induzidas por CSI de antimicrobianos.....	43
6 DISCUSSÃO	45
6.1 Efeito das CSI de antimicrobianos no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	45
6.2 Efeito das CSI de antimicrobianos sobre características morfológicas.....	48
6.3 Efeito das CSI de antimicrobianos sobre características bioquímicas, fisiológicas e moleculares.....	49
6.4 Considerações finais.....	54
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os seres humanos podem ser considerados como biomas, onde diversos ecossistemas microbianos são estabelecidos e compõem a microbiota residente. Estes microrganismos são mediadores cruciais de várias funções fisiológicas, metabólicas e imunológicas, sustentando um vasto e complexo nível de interdependência com o hospedeiro. No entanto, a microbiota residente tem caráter anfibiótico e, em uma situação de desequilíbrio, seus integrantes podem causar doenças. Além disso, como a microbiota residente tem influência marcante no desenvolvimento, manutenção e modulação do sistema imunológico, a interferência no seu desenvolvimento normal pode resultar em desequilíbrio do sistema imune e potencialmente também predispor o hospedeiro a várias doenças não-infecciosas. Portanto, a microbiota residente tem o potencial para exercer respostas pró e antiinflamatórias, e a composição das comunidades microbianas pode estar intimamente ligada ao *status* de saúde e doença do hospedeiro.

Embora seja relativamente estável, a microbiota residente está sujeita a perturbação pelo uso de antimicrobianos. Além disso, os antimicrobianos agem como agentes seletivos de microrganismos resistentes. Esse processo já ocorria na natureza mesmo antes do uso terapêutico dessas drogas, mas, nos últimos anos, o desenvolvimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos se tornou um problema global de saúde pública. Durante muitos anos, as pesquisas para amenizar esse problema estavam voltadas para os microrganismos resistentes a altas concentrações de antimicrobianos, mas, recentemente, o estudo dos efeitos de baixas concentrações dessas drogas sobre os microrganismos e as implicações para a relação bactéria-hospedeiro tem ganhado importância. As concentrações subinibitórias (CSI) de antimicrobianos, frequentemente decorrentes de antibioticoterapias, principalmente as inadequadas, podem interferir na microbiota residente, causando modificações na biologia dos microrganismos. Estas modificações podem afetar a expressão de determinantes de virulência microbianos e, conseqüentemente, a relação bactéria-hospedeiro.

As bactérias anaeróbias representam um importante grupo da microbiota residente, em função de sua predominância em quase todos os sítios colonizados do corpo, de sua versatilidade metabólica e de seu potencial agressor. A espécie *Fusobacterium nucleatum* representa um dos mais proeminentes anaeróbios da

microbiota residente e pode estar envolvido em infecções, locais ou disseminadas, isoladamente ou em sinergismo com outras bactérias em infecções mistas. Além da exposição aos antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções causadas por *F. nucleatum*, como participante da microbiota residente, este também estará exposto a outras drogas, e a possíveis CSI, durante qualquer antibioticoterapia.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, em *Bacteroides fragilis*, demonstraram que exposições a CSI dos antimicrobianos ampicilina, ampicilina-sulbactam, clindamicina e cloranfenicol podem interferir com a susceptibilidade de *B. fragilis* a outros antimicrobianos, além de modular outras habilidades microbianas e alterar os padrões de virulência, interferindo na relação antimicrobiano-bactéria-hospedeiro. Considerando que *B. fragilis* é um anaeróbio putativo da nossa microbiota residente, é importante entender se o fenômeno ocorre também em outros microrganismos da microbiota, como os representantes do gênero *Fusobacterium*.

Assim, dando sequência a linha de pesquisa: “Respostas bacterianas a desafios ambientais” e atendendo a necessidade de estudos sobre os fenômenos envolvidos na relação antimicrobiano-bactéria-hospedeiro, pretende-se contribuir para o conhecimento da biologia de *F. nucleatum* e as consequências da exposição às CSI de antimicrobianos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota Residente

Imediatamente após o nascimento, os mamíferos são iniciados em um processo de colonização por microrganismos em superfícies externas e internas (LEY, PETERSON e GORDON, 2006; DETHLEFSEN, MCFALL-NGAI e RELMAN, 2007). Os microrganismos que interagem com o corpo humano e de outros animais podem ser divididos em dois grupos: microbiota residente e microbiota transitória.

A microbiota transitória é constituída, primariamente, de microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, encontrados em superfícies externas e internas durante um período de tempo, podendo ser horas ou semanas. A microbiota transitória, geralmente, tem pouca importância, desde que a microbiota residente esteja em equilíbrio. Mas, havendo alteração nesse equilíbrio, os microrganismos transitórios podem proliferar-se e causar doença (VOLLAARD e CLASENER, 1994).

A microbiota residente é composta por certos tipos microbianos relativamente fixos, encontrados com regularidade num determinado sítio anatômico, em uma determinada condição fisiológica (SUMMANEM et al., 1993). A microbiota residente, também chamada indígena ou autóctone, pode proporcionar vários benefícios ao hospedeiro, como fornecimento de nutrientes essenciais, metabolismo de compostos tóxicos ou indigestos, defesa contra a colonização por patógenos, contribuição para o desenvolvimento da arquitetura intestinal e do sistema imunológico, e participação da modulação da resposta imune (HOOPER e GORDON, 2001; MACPHERSON e HARRIS, 2004; MAZMANIAN et al., 2005; SHARMA, YOUNG e NEU, 2010).

No entanto, a microbiota residente tem caráter anfibiótico, e em uma situação de desequilíbrio, seus integrantes podem se proliferar excessivamente e/ou alcançarem sítios estéreis do corpo, causando doenças infecciosas de origem endógena (TANNOCK, 1988; HENTGES, 1993). O desequilíbrio imunológico é a causa não só de muitas doenças infecciosas, mas também de doenças não-infecciosas, tais como hipersensibilidades, câncer e doenças auto-imunes. E, como a microbiota residente tem influências marcantes sobre o sistema imunológico, a interferência no desenvolvimento normal desta microbiota, como a causada por antimicrobianos, pode

resultar em desequilíbrio do sistema imune e potencialmente predispor o hospedeiro a várias das doenças supracitadas (ROUND e MAZMANIAN, 2009).

A interação entre bactérias e o sistema imune do hospedeiro é considerada um elemento-chave na determinação do *status* de saúde e doença (ROUND e MAZMANIAN, 2009). Animais *germ-free*, isentos de microrganismos, apresentam defeitos no desenvolvimento dos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) e na produção de IgA (MOREAU et al., 1978; FALK et al., 1998; MACPHERSON e HARRIS, 2004; SHARMA, YOUNG e NEU, 2010), e também são mais susceptíveis a infecções por alguns patógenos (MAIER e HENTGES, 1972; NARDI et al., 1989; INAGAKI et al., 1996). Os defeitos no desenvolvimento de animais *germ-free*, a níveis teciduais, celulares e moleculares, sugerem que o desenvolvimento ultraestrutural do intestino está intimamente ligado às bactérias intestinais, e que a função imune normal pode ser prejudicada na ausência da microbiota residente. Assim, de uma forma paradoxal, o sistema imune, que parece ter sido desenhado para controlar microrganismos, pode ser de fato modulado por microrganismos (ROUND e MAZMANIAN, 2009).

A microbiota residente dos mamíferos é extremamente vasta em número e diversidade. Este consórcio de bactérias contém aproximadamente 10 vezes mais células do que o corpo humano, 100 vezes o número de genes do genoma humano e tem uma capacidade metabólica comparada ao fígado humano. A microbiota residente do TGI é composta por microrganismos aeróbios e anaeróbios, com predominância de anaeróbios e Gram-negativos, atingindo a proporção de mil anaeróbios para cada aeróbio em alguns sítios. Entre os anaeróbios obrigatórios, destacam-se os gêneros *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* e *Clostridium* (FINEGOLD, 1990; HOOPER et al., 1998; CITRON, 2002; HOOPER, 2004; ECKBURG et al., 2005; LEY, PETERSON e GORDON, 2006; GILL et al., 2006; PETERSON et al., 2008).

2.2 Bactérias anaeróbias

Bactérias anaeróbias obrigatórias podem ser descritas como aquelas que crescem em condições de baixo potencial de oxido-redução, usualmente relacionadas a reduzidas concentrações de oxigênio. De acordo com a relação de tolerância com o oxigênio, esses microrganismos podem ser classificados como “anaeróbios

microaerotolerantes”, “anaeróbios aerotolerantes” e “anaeróbios extremamente sensíveis” (ENGELKIRK et al., 1992). As bactérias anaeróbias são encontradas em diversos nichos ecológicos, como solo, água e em animais (ENGELKIRK et al., 1992).

Como constituem um grupo significativo da microbiota residente dos mamíferos, sua notável habilidade e versatilidade metabólica lhes conferem condições privilegiadas para agressões oportunistas (FINEGOLD, 1990). Assim, a grande maioria das doenças infecciosas por anaeróbios é causada por microrganismos residentes anfibióticos, que podem estar envolvidos em processos infecciosos em qualquer parte do corpo (FINEGOLD, 1995; GOLDSTEIN, 1999).

A virulência dos anaeróbios estritos pode estar relacionada aos polissacarídeos capsulares, que podem inibir a fagocitose, aos lipopolissacarídeos (LPS) e à produção de enzimas hidrolíticas e exotoxinas (FINEGOLD, 1995; YOSHIMURA et al., 1997; ALLEN, 2003). Além disso, acredita-se que os anaeróbios possam expressar componentes que poderiam degradar proteínas do complemento e inibir a quimiotaxia e a opsonização (KLEMPNER, 1984; ROTSTEIN et al., 1986). Alguns estudos indicam que os ácidos graxos de cadeia curta também podem ser importantes fatores de virulência. Estes ácidos podem inibir a ativação de neutrófilos, a proliferação de células T e induzir apoptose em macrófagos (EFTIMIADI et al., 1991; TONETTI et al., 1991).

Alguns anaeróbios também podem produzir enzimas protetoras (catalases, peroxidases, superóxido dismutases e superóxido redutases), que podem neutralizar espécies reativas do oxigênio, contribuindo para o controle do chamado “estresse oxidativo” e, portanto, contribuindo para a sobrevivência destes microrganismos em seus sítios indígenas e nos processos infecciosos (ADAMS et al., 2002; IMLAY, 2002; KURTZ, 2004; NIVIÈRE e FONTECAVE, 2004; SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2007). Apesar da grande quantidade de relatos, os mecanismos de participação dos microrganismos anaeróbios na patogênese de determinadas doenças necessitam de maiores esclarecimentos.

2.3 O Gênero *Fusobacterium*

O gênero *Fusobacterium* Knorr 1922 (do latim *fusos*, alongado) pertence à família *Fusobacteriaceae*, e inclui bacilos anaeróbios obrigatórios, Gram negativos, não formadores de esporos, imóveis e fusiformes. Entretanto, a forma fusiforme, típica de *F.*

nucleatum, não é observada em muitas outras espécies do gênero (SUMMANEN, 1995; GARRITY, BELL e LILBURN, 2004). São microrganismos quimiorganotróficos, fracamente fermentadores de carboidratos, e produtores de butirato como principal produto final do seu metabolismo (GHARBIA e SHAH, 1988; BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996). Em geral, estes microrganismos metabolizam pequenos peptídeos e aminoácidos, como principal fonte de energia (GHARBIA e SHAH, 1991, JANG e HIRSH, 1994; BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996).

De acordo com a Lista de Nomes Procarióticos com Base na Nomenclatura (EUZÉBY, 2011), o gênero *Fusobacterium* inclui 20 espécies e 7 subespécies: *F. alocis*, *F. canifelinum*, *F. equinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum* (subespécies *funduliforme* e *necrophorum*), *F. nucleatum* (subespécies *animalis*, *fusiforme*, *nucleatum*, *polymorphum* e *vincentii*), *F. perfoetens*, *F. periodonticum*, *F. plautii*, *F. polysaccharolyticum*, *F. prausnitzii*, *F. pseudonecrophorum*, *F. russii*, *F. simiae*, *F. sulci*, *F. ulcerans* e *F. varium*.

Os representantes do gênero *Fusobacterium* constituem o grupo microbiano anaeróbio obrigatório mais frequentemente isolado da microbiota residente de seres humanos, e são comumente isolados da cavidade bucal, trato respiratório superior, gastrointestinal e geniturinário feminino (BROOK e FRAZIER, 1997; CITRON, 2002).

2.3.1 *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum Knorr 1922 é a espécie tipo do gênero *Fusobacterium* e faz parte da microbiota residente da cavidade bucal, gastrointestinal, urogenital e respiratório superior, e representa um dos mais proeminentes anaeróbios Gram-negativos, podendo estar envolvido em infecções locais ou disseminadas, isoladamente ou em infecções polimicrobianas (FINEGOLD e WEXLER, 1988; GOLDSTEIN et al., 1995; BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996; CANDONI et al., 2003).

Em geral, *F. nucleatum* é a bactéria mais frequentemente isolada na cavidade bucal (MOORE e MOORE, 1994; KÖNÖNEN et al., 1999; NYFORS et al., 2003; PERIASAMY e KOLENBRANDER, 2009). Embora seja mais comumente associada à periodontites, a patogênese de *F. nucleatum* não é limitada apenas a cavidade bucal. *F. nucleatum* também está relacionado a várias condições sistêmicas, tais como abscessos cerebrais, hepáticos e periamigdalinos, infecções intra-uterinas, do trato

urinário, obstétricas, pélvicas, pulmonares e pleuropulmonares, ventriculite, pericardite, endocardite, úlceras, artrite séptica, vaginose, bacteremia e síndrome de Lemierre, o que confere a este microrganismo uma ampla relevância clínica (LANDSAAT et al., 1995; BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996; COULIBALLY et al., 1997; CANDONI et al., 2003; LOVE e ZACCHEO, 2006; SYED et al., 2007; PATEL et al., 2007; HUGGAN e MURDOCH, 2008; KAI et al., 2008; SU et al., 2009).

F. nucleatum medeia a inibição de muitas funções imunológicas, o que pode permitir a evasão das defesas do sistema imune. Esse microrganismo pode inibir a função de células B e T (MANGAN, WON e LOPATIN, 1984; SHENKER e DIRIENZO, 1984; DEMUTH et al., 1996), inibir a expressão de IL-2R α de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (HAAKE e LINDMANN, 1997) e ativar mecanismos de morte celular nas PBMCs e polimorfonucleares (PMNs) (JEWETT et al., 2000; KAPLAN et al., 2005). *F. nucleatum* também exibe a atividade de hemaglutinação (DEHAZYA e COLES, 1980; FALKLER, CLAYMAN e SHAEFER, 1983; XIE, GIBBONS e HAY, 1991), e pode induzir hemólise (FALKLER, CLAYMAN e SHAEFER, 1983).

F. nucleatum pode estimular a produção de imunoglobulinas A, G e M (FALKLER et al., 1982; MANGAN, WON e LOPATIN, 1983; NAITO, OKUDA e TAKAZOE, 1984; GUNSOLLEY et al., 1990; GEMMELL e SEYMOUR, 1992), estimula diferentes tipos celulares a produzir IL-1, IL-6, TNF- α , e TGF- β (GEMMELL e SEYMOUR, 1993; ROSSANO et al., 1993), e também tem a capacidade de induzir a ativação policlonal de células B (MANGAN, WON e LOPATIN, 1983).

Proteínas de membrana externa (OMPs) estão envolvidas na patogenicidade de bactérias Gram-negativas, incluindo *F. nucleatum* (BAKKEN et al., 1989; HOLT e BRAMANTI, 1991; BOLSTAD, TOMMASSEN e JENSEN, 1994). As OMPs estão relacionadas à coagregação (KINDER e HOLT, 1993), nutrição celular (BENZ, 1994), e a susceptibilidade a antimicrobianos (SAWAI et al., 1982; COHEN, MCMURRAY e LEVY, 1988; SPEER, SHOEMAKER e SALYERS, 1992). Também há evidências que as OMPs induzem respostas imunológicas, muitas delas semelhantes às causadas por LPS e peptidoglicano (JEWETT et al., 2000).

O LPS de *F. nucleatum* é uma endotoxina que possui atividades biológicas semelhante ao LPS de certas linhagens de *Escherichia coli* (HAMADA et al., 1988; HOFSTAD, SKAUG e SVEEN, 1993). A ativação do complemento também foi demonstrada por LPS purificado de *F. nucleatum* isoladas de canais radiculares infectados, sugerindo uma habilidade de provocar inflamação (HORIBA et al., 1992).

A coagregação e a aderência bacteriana nos tecidos do hospedeiro é essencial na colonização e estabelecimento de uma infecção (KOLENBRANDER, 1988; HOLT e BRAMANTI, 1991; HOEPELMAN e TUOMANEN, 1992). Geralmente, um microrganismo não é um patógeno efetivo a menos que ele consiga se aderir e, subsequentemente, se reproduzir em um hospedeiro (LONDON, 1991). *F. nucleatum* também pode se aderir às células epiteliais, fibronectina, colágeno, eritrócitos, fibroblastos, e PMNs (FALKLER, SMOOT e MONGIELLO, 1982; OZAKI et al., 1990; XIE, GIBBONS e HAY, 1991). Além disso, *F. nucleatum* tem um importante papel, atuando como “bactéria-ponte” entre colonizadores primários e tardios, devido a sua habilidade de coagregação com outras espécies microbianas, o que explicaria o fato destes microrganismos serem tão numerosos em espécimes clínicos de indivíduos saudáveis e doentes (WEISS et al., 2000; PERIASAMY e KOLENBRANDER, 2009).

Entretanto, diferenças de potencial patogênico entre as subespécies de *F. nucleatum* tem sido relatadas, como diferenças em propriedades adesivas e na produção de β -lactamases (GHARBIA et al., 1990; XIE, GIBBONS e HAY, 1991; KÖNÖNEN et al., 1999; NYFORS et al., 2003; VOHA et al., 2006). Além disso, fatores de estresse, como antimicrobianos, podem alterar importantes fatores de virulência de *F. nucleatum* (LANDUCCI et al., 2003).

2.4 Microrganismos e antimicrobianos

Antimicrobianos são compostos que matam (bactericidas) ou inibem o crescimento vegetativo do microrganismo (bacteriostáticos). O termo “antimicrobiano” inclui compostos presente naturalmente nos ecossistemas microbianos (antibióticos) e também compostos sintéticos ou semi-sintéticos (quimioterápicos). A resistência antimicrobiana é a capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar em presença de drogas de uso terapêutico, em concentrações iguais ou superiores às doses terapêuticas (WHO, 2001).

Os antimicrobianos são, provavelmente, o recurso quimioterapêutico de maior sucesso desenvolvido no século XX. Entretanto, a exposição dos microrganismos à pressão seletiva de antimicrobianos, quimioterápicos ou naturais, aliada à habilidade de rápida replicação das bactérias e da transferência horizontal de genes, tem feito da resistência bacteriana um fato inevitável (WRIGHT, 2007). Nos últimos anos, o

desenvolvimento e a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos tornou-se um problema global de saúde pública (FAO/OIE/WHO, 2003; ASM, 2009).

2.4.1 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos estimulam o desenvolvimento de resistência, por mecanismos de adaptação, e sua transmissão para novas gerações (LEVY, 1998). Entre os vários mecanismos de resistência, os principais são: (1) inativação direta da molécula do antimicrobiano (WRIGHT, 2005), (2) bombas de efluxo, gerando a redução das concentrações intracelulares de antimicrobianos (KUMAR e SCHWEIZER, 2005; MIRANDA e ZEMELMAN, 2002); (3) alteração do alvo, ocorrendo modificação dos locais de ação de antimicrobianos (LAMBERT, 2005).

A resistência a certos antimicrobianos pode estar associada a Genes de Resistência a Antimicrobianos (GRAs) diferentes, caracterizando uma resistência múltipla. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é, geralmente, espécie ou gênero-específica, e é transferida verticalmente para as próximas gerações, enquanto que a adquirida está presente em apenas certas linhagens da espécie ou gênero, fato relacionado com a mutação ou com a aquisição de nova informação genética por mecanismos de recombinação, como conjugação, transformação ou transdução, responsáveis pela transferência horizontal (CUCHURAL e TALLY, 1986; LEVY, 1998; DAVISON, 1999; TANG e MOXON, 2001).

A resistência pode ser mediada por genes cromossômicos, genes situados em elementos extracromossomais, como plasmídios, ou ainda em elementos móveis no genoma, como os transposons e os integrons. Portanto, além do desenvolvimento da resistência por alteração em genes cromossomais, por meio de mutações ou expressão diferencial de genes intrínsecos pela pressão exercida por uma droga, os microrganismos podem adquirir resistência aos antimicrobianos pela aquisição de elementos extracromossomais que contenham genes de resistência (ODELSON et al., 1987; TAIT, 1993; DAVIES, 1996; LEVY, 1998; NORMARK e NORMARK, 2002). Estes elementos podem carrear simultaneamente determinantes de resistência a várias drogas, o que pode levar ao fenômeno de seleção cruzada, aumentando o número de bactérias multirresistentes em determinado ambiente (MCPHEARSON et al., 1991).

2.4.2 Disseminação de Genes de Resistência a Antimicrobianos (GRAs) e Bactérias resistentes

A ampla utilização dos antimicrobianos na medicina humana e veterinária, tem resultado em pressão seletiva sobre as bactérias em ambientes hospitalar (LIU et al. 2007) e de produção animal (CABELLO, 2006; AGERSO e PETERSEN, 2007), que são as principais fontes de GRAs (TEUBER, 2001). A pressão seletiva dos antimicrobianos pode estimular a seleção/aparecimento de GRAs em bactérias e a disseminação desses genes e, conseqüentemente, leva ao surgimento de bactérias resistentes (MIRANDA e ZEMELMAN, 2002; FAO/OIE/WHO, 2006).

A transferência horizontal de GRAs pode ocorrer entre bactérias filogeneticamente próximas ou não (RHODES et al., 2000; SCHMIDT et al., 2001). Destaca-se, neste contexto, a resistência entre os microrganismos anaeróbicos, que tem crescido muito nos últimos anos (HECHT, 2004). A resistência em microrganismos da microbiota residente, além de ser um fator complicador para o tratamento de infecções envolvendo estas bactérias, limitando as opções terapêuticas, é uma importante fonte de transmissão de resistência (MCGOWAN e TENOVER, 2004; HARBARTH e SAMORE, 2005).

Além das conseqüências na seleção de linhagens bacterianas resistentes, CSI de antimicrobianos podem ser detectadas em vários locais do corpo após o uso dessas drogas e podem interferir no equilíbrio da microbiota residente e em outros grupos microbianos (WITTE, 2000; STORTEBOOM et al., 2010). Vários estudos têm relatado que agentes antimicrobianos podem interferir na biologia dos microrganismos de diversas maneiras. Isto pode interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos e, conseqüentemente, na relação bactéria-hospedeiro (VAN DEN BROEK, 1989; LORIAN e GEMMEL, 1991; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2003).

2.4.3 Antibioticoterapia e *Fusobacterium nucleatum*

No tratamento das infecções causadas por *F. nucleatum*, constituem antibióticos de primeira escolha a clindamicina e agentes β -lactâmicos. A clindamicina é uma lincosamida com um potente efeito bacteriostático contra estreptococos, estafilococos e anaeróbios, incluindo o *F. nucleatum*. A clindamicina liga-se exclusivamente à

subunidade 50S dos ribossomos bacterianos, suprimindo a síntese protéica, e ainda possui atividade imunoestimuladora, pois potencializa a opsonização e acelera a quimiotaxia (RANG et al., 2007).

Dentre os β -lactâmicos utilizados, a ampicilina faz parte de um grupo de penicilinas cuja atividade antimicrobiana é ampliada em relação às demais, para incluir determinados microrganismos Gram negativos. Entretanto, esses fármacos podem ser hidrolisados por β -lactamases, enzimas cada vez mais frequentes em isolados clínicos (BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996; NYFORS et al., 2003). Para contornar esse problema, é comum o uso da associação ampicilina-sulbactam, sendo este um inibidor de β -lactamases. Outra opção é a associação piperacilina-tazobactam, sendo que a piperacilina tem o mais amplo espectro antibacteriano entre as penicilinas quando em associação com o inibidor de β -lactamases tazobactam (GOODMAN e GILMAN, 2001).

O metronidazol possui grande eficiência contra bactérias anaeróbias, principalmente contra o grupo *Bacteroides*, e é indicado como droga de segunda escolha contra infecções por *Fusobacterium*. Este antimicrobiano é um pró-fármaco que necessita da ativação redutora do seu grupo nitro por organismos susceptíveis. Seus mecanismos de ação para outros anaeróbios não-*Bacteroides* ainda não estão claros, mas é aceito que sua toxicidade seletiva contra anaeróbios deriva de seu metabolismo energético diferente daquele das células aeróbias, por conter componentes transportadores de elétrons como as ferredoxinas, com um potencial de oxidação-redução suficientemente negativo para doar elétrons ao metronidazol. A transferência única de elétrons forma um ânion altamente reativo do radical nitro, que mata os microrganismos susceptíveis por mecanismos mediados pelos radicais que tem como alvo o DNA e, possivelmente, outras biomoléculas vitais (EDWARDS, D. I. 1993; LAMP et al., 1999; GOODMAN e GILMAN, 2001; DINIZ et al., 2000).

O cloranfenicol está entre as drogas de terceira escolha. Porém, devido a sua toxicidade elevada só é recomendado para tratamento de infecções potencialmente fatais ou quando não se podem utilizar fármacos alternativos mais seguros, devido a problemas de resistência ou alergias. O cloranfenicol age inibindo a síntese protéica nas bactérias por bloqueio específico na subunidade 50S ribossomal bacteriana, inibindo assim a fase de transpeptidação da síntese protéica (RANG et al., 2007). Análises estruturais do complexo cloranfenicol/subunidade 50S ribossomal bacteriana revelaram que o cloranfenicol interage especificamente com nucleotídeos da cavidade

da peptidil transferase do RNAr 23S através de pontes de hidrogênio, sem interações com proteínas ribossomais (SCHLUNZEN et al., 2001).

As quinolonas são fármacos de importância relativamente menor contra anaeróbios, em virtude de sua utilidade terapêutica limitada e do rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. Entretanto, a introdução de quinolonas fluoradas, como a levofloxacin, representa um avanço terapêutico particularmente importante, visto que esses fármacos são dotados de ampla atividade antimicrobiana. O alvo das quinolonas consiste na topoisomerase II bacteriana, uma DNA girase, inibindo a síntese de DNA (RANG et al., 2007).

Apesar dos vários estudos abordando resistência a antimicrobianos, existem poucos dados na literatura sobre o impacto de antimicrobianos na biologia e na virulência de anaeróbios do gênero *Fusobacterium*. Assim, atendendo a necessidade de estudos sobre os fenômenos envolvidos na relação antimicrobiano-microrganismo-hospedeiro, pretende-se contribuir para o conhecimento das consequências da exposição às CSI de antimicrobianos na biologia de *F. nucleatum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Pesquisar alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares em resposta à exposição a diferentes drogas antimicrobianas de relevância clínica, em linhagens de *Fusobacterium nucleatum* selecionadas em concentrações subinibitórias de drogas.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas para *F. nucleatum* ATCC 25586 à ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina/tazobactam;
- Selecionar linhagens de *F. nucleatum* por cultivos sucessivos em concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina/tazobactam e, posteriormente, na ausência dos antimicrobianos;
- Determinar o perfil de cada linhagem de *F. nucleatum* quanto à susceptibilidade à ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina/tazobactam;
- Avaliar a morfologia e a complexidade celular das linhagens de *F. nucleatum* antes, durante e após a exposição aos antimicrobianos;
- Avaliar o efeito dos antimicrobianos em características bioquímico-fisiológicas, na formação de biofilmes e na taxa de crescimento das linhagens de *F. nucleatum* antes e após a exposição aos antimicrobianos;
- Avaliar os padrões de acúmulo protéico das linhagens de *F. nucleatum*;
- Avaliar os padrões genéticos das linhagens de *F. nucleatum*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e cultivo

Foi utilizada neste estudo a linhagem de referência *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (Instituto Fio Cruz, RJ - Brasil) como linhagem parental (FnPAR), e 14 linhagens derivadas, selecionadas por 10 cultivos sucessivos, ou passagens, em concentrações subinibitórias (CSI) dos antimicrobianos ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina/sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), levofloxacina (FnLEV⁺), metronidazol (FnMET⁺) e piperacilina/tazobactam (FnPTZ⁺), e posterior cultivo das 7 linhagens obtidas por 10 cultivos sucessivos na ausência de antimicrobianos, designadas respectivamente FnAMP⁻, FnAMS⁻, FnCLI⁻, FnCLO⁻, FnLEV⁻, FnMET⁻ e FnPTZ⁻. A cada cultivo, foram realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram e teste respiratório, para avaliar a pureza das culturas.

As linhagens bacterianas foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (Himedia) suplementado com L-cisteína, extrato de levedura, hemina e menadiona (caldo BHI-S). O cultivo foi realizado em condições de anaerobiose mecânica, em jarra (90% N₂, 10% CO₂) a 37 °C por 24 a 48h. As linhagens foram congeladas em caldo BHI-S, acrescido de glicerina (10 %), em freezer a - 20°C.

4.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da CSI

A determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi feita pelo método de diluição em caldo segundo recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Porém, o cultivo foi feito em caldo BHI-S para permitir o crescimento de *F. nucleatum* (LANDUCCI et al., 2003).

Concentrações crescentes (de 0,03 µg/mL a 64,00µg/mL) das drogas foram obtidas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de caldo BHI-S, a partir de soluções estoque dos antimicrobianos ampicilina (Medquímica, Brasil), ampicilina/sulbactam (Cellofarm, Brasil), clindamicina (Sigma-Aldrich, Deutschland), cloranfenicol (Medquímica, Brasil), levofloxacina (Cristália, Brasil), metronidazol (Metroniflex Baxter -

USA) e piperacilina/tazobactam (Novafarma, Brasil). As soluções estoque das drogas foram obtidas através de diluição em água destilada ou solvente conforme instrução do fabricante. As soluções foram esterilizadas em filtro com membrana Milipore (0,22 µm) e mantidas em geladeira a 4°C.

Uma amostra da linhagem parental foi diluída em salina 0,9% na escala 1.0 Mcfarland, e inóculos de 100µL das diluições foram adicionados ao tubo contendo o meio e a droga (em duplicata). A leitura dos resultados foi feita após 48 horas de incubação, determinando-se a CIM para cada droga. A CIM é menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2007).

A CSI considerada foi $\frac{1}{2}$ CIM, que é a maior concentração das drogas antimicrobianas abaixo da CIM onde houve crescimento bacteriano. Após a obtenção das linhagens derivadas da linhagem parental (ver item 4.1), o perfil de susceptibilidade de cada linhagem foi avaliado para todas as drogas testadas.

4.3 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características morfológicas das linhagens bacterianas

4.3.1 Avaliação direta da morfologia celular bacteriana

A morfologia celular microbiana foi avaliada pela coloração de Gram, durante os 10 cultivos em CSI e os 10 cultivos sucessivos na ausência dos antimicrobianos. Para uma melhor visualização da coloração de Gram a partir das culturas em caldo, amostras de 1mL das culturas foram centrifugadas, 5000g/2min., e o *pellet* foi suspenso em salina. Esse processo foi realizado por duas vezes, antes da coloração de Gram.

A morfologia foi registrada por fotografias de esfregaços corados, pela utilização de uma câmera digital (Sony, DCS-W35) acoplada a um microscópio óptico (Coleman), em aumento de 1000X. Em seguida, a morfologia celular foi avaliada com auxílio do *software Image Tool 3.0*, para o cálculo da área média das células bacterianas, em micrômetros quadrados (µm²). Foram medidas 50 células bacterianas por amostra.

4.3.2 Avaliação do volume e complexidade celular bacteriana por citometria de fluxo

O volume e a complexidade das células foram avaliados por citometria de fluxo para a linhagem parental e as linhagens derivadas, obtidas por cultivo na presença e posterior ausência da CSI dos antimicrobianos. Suspensões das células bacterianas foram obtidas em solução salina (NaCl 0,9%) após cultivo em caldo BHI-S por 24h, correspondentes à 0,5 da escala McFarland. As suspensões (700µL) foram avaliadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) utilizando-se os parâmetros FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) para avaliação do volume e complexidade celular, respectivamente. Foram analisadas 10.000 células para cada amostra.

4.4 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas

4.4.1 Avaliação de características bioquímicas

Para todas as linhagens estudadas, foram realizados 27 testes bioquímicos para avaliação das seguintes características: produção de enzimas (arginina dehidrolase, catalase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, urease, β -lactamases); produção de outros compostos (ác. fenil pirúvico, acetoína, H₂S, indol); hidrólise (esculina, β -galactosidase); utilização de fontes de carbono (acetamida, citrato, malonato); testes de tolerância (bile, cetramida); utilização de carboidratos (ramnose, adonitol, salicina, arabinose, inositol, sorbitol, sacarose, manitol, rafinose, maltose).

O teste da catalase foi realizado em lâmina de vidro, onde esfregaços microbianos foram cobertos com solução de peróxido de hidrogênio a 10%, e então observado a formação de bolhas de gás para reação positiva.

Para avaliação da produção β -lactamases, foi utilizado o disco de Cefinase (BD-BBL, MD - USA), o qual é impregnado com nitrocefina, uma cefalosporina cromógena. A mudança de cor do disco, de amarelo para vermelho, indica a presença de β -lactamase. Foram utilizadas linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* – ATCC29213 como controle positivo e *S. aureus* ATCC 25913 como controle negativo.

Os outros testes foram realizados utilizando-se kits que compõem os sistemas comerciais Bactray I, Bactray II e Bactray III (LB Laborclin, PR - Brasil). Os sistemas consistem de painéis com os substratos desidratados, e os inóculos bacterianos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. A leitura dos painéis foi realizada após incubação em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas.

4.4.2 Avaliação da formação de biofilme bacteriano experimental

A verificação da interferência dos antimicrobianos na formação de biofilme pelas linhagens em estudo foi realizada de acordo com a metodologia já estabelecida (ANDRADE, 2010). A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em caldo BHI-S de todas as linhagens bacterianas, 500µL de cultura foram diluídos em 5 mL de caldo BHI-S e 200µL foram aplicados em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. As linhagens FnAMP⁺, FnAMS⁺, FnCLI⁺, FnCLO⁺, FnLEV⁺, FnMET⁺ e FnPTZ⁺ foram cultivadas na presença das respectivas CSI dos antimicrobianos, enquanto as linhagens FnAMP⁻, FnAMS⁻, FnCLI⁻, FnCLO⁻, FnLEV⁻, FnMET⁻ e FnPTZ⁻, assim como a FnPAR, foram cultivadas na ausência das drogas antimicrobianas.

As placas foram então incubadas em anaerobiose por 24 horas, a 37°C. Após o período de crescimento, foi retirado o caldo de cultivo com o auxílio de uma pipeta esterilizada, e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Foram adicionados 300µL de metanol e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Logo após, retirou-se o metanol e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente por 5 min., para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250µL de cristal violeta (0,1%) e as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada, para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas.

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

4.4.3 Obtenção de curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em caldo BHI-S contendo os antimicrobianos em concentração subinibitória previamente definida. Neste ensaio, um pré-inóculo em caldo BHI-S, com 24h de crescimento, foi diluído em 100mL do mesmo meio, a 1,0 na escala Mcfarland. O crescimento foi avaliado por 42 horas, em anaerobiose, a 37°C, em intervalos de 6 horas. Alíquotas de 3 mL foram retiradas a cada intervalo e então foi feita a leitura da densidade óptica (550nm) de cada uma das amostras, utilizando-se espectrofotômetro (Biospectro). A curva de crescimento obtida foi plotada em função do aumento da densidade óptica das culturas e do tempo de incubação. O tempo médio de geração das linhagens foi determinado considerando-se o intervalo de tempo necessário para incremento de duas vezes o valor da densidade óptica da cultura durante o crescimento exponencial.

4.5 Avaliação da interferência dos antimicrobianos nas características moleculares das linhagens bacterianas

Para a obtenção de DNA bacteriano, as linhagens foram cultivadas em caldo BHI-S, na presença ou ausência dos antimicrobianos, por 24 horas a 37°C em anaerobiose, e 1mL das culturas foi utilizado para extração de DNA genômico. Para a extração, foi usado o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, WI - USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído, utilizou-se eletroforese em gel de agarose a 0,8% e análise por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, DE - USA).

4.5.1 Identificação molecular das linhagens bacterianas obtidas

Para identificação das linhagens de *F. nucleatum* obtidas por exposição às drogas antimicrobianas, foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos para região de DNA codificadora do 16S rRNA da espécie *F. nucleatum* (KULEKÇI et al., 2001).

As reações foram realizadas em termociclador T1 Termocycler (Biometra - Deutschland) em volumes de 25µL, contendo 1 ng de cada *primer*, 30ng de DNA molde e 12,5µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI - USA). As condições de amplificação para reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 min.; seguida por 36 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 7 min. Os *amplicons* foram observados em gel de agarose 0,8%. Para confirmação do tamanho dos *amplicons*, foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pb (Amresco) em TBE 0,5X. As imagens dos géis foram analisadas sob transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (Promega, WI - USA). Foram utilizados como controle positivo, *F. nucleatum* ATCC 25586, e como controle negativo, reação sem o DNA molde.

4.5.2 Genotipagem bacteriana

A técnica da reação da polimerase em cadeia usando-se *primers* aleatórios (AP-PCR) foi utilizada para genotipagem da linhagem parental e das linhagens derivadas. Foram utilizados os *primers* D8635 (5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3') e D11344 (5'-GTGAATTCGCGGTGAGATGCCA-3') (IDT, IA - USA), (AVILA-CAMPOS et al., 1999; HARALDSSON, HOLBROOK e KÖNÖNEN, 2004). As reações foram feitas em volumes de 20µL, utilizando 10 µL de Gotaq Green Master Mix 2X (Promega, WI - USA), 1 ng de cada iniciador e 50 ng de DNA molde bacteriano. As reações foram feitas em triplicatas, em termociclador T1 Termocycler (Biometra - Deutschland), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial 94°C e anelamento 35°C por 5 min. seguido por 5 ciclos de desnaturação 94°C por 3 min., anelamento 37°C por 3 min. e extensão 72°C por 3 min., seguido novamente por 30 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 3 min., e uma extensão final 72°C por 10 min. (SILVA et al., 2007). Os *amplicons* foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6% em TBE 1X, sob transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (Promega, WI - USA). Como controle negativo foi realizado reações de amplificação sem o DNA molde. Os padrões eletroforéticos foram inspecionados visualmente. Apenas as bandas consistentes foram consideradas na análise.

4.5.3 Análise dos perfis de acúmulo protéico

A linhagem parental e as linhagens derivadas foram crescidas anaerobiocamente em caldo BHI-S, a 37°C, por 24 horas, e as proteínas foram extraídas pela utilização do kit *Qproteome Bacterial Protein Preparation* (Promega, WI - USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após quantificação pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), a concentração dos extratos protéicos foi ajustada para 300ng/ μ L e, então, foram separadas através de chips para proteína em um sistema de eletroforese capilar microfluídica (Bioanalyzer 2100, Agilent), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Construção das matrizes de similaridade

Para avaliação global das alterações fenotípicas e genotípicas nas diferentes linhagens bacterianas derivadas da linhagem parental após exposição e cultivo ou não na presença das drogas antimicrobianas, foram obtidas matrizes de similaridade pela utilização do *software Genes* (CRUZ, 2006; CRUZ, 2008). Foi construída uma matriz binária pela atribuição dos parâmetros 1 para os testes cujos resultados foram positivo/presente e 0 para os testes cujos resultados foram negativo/ausente. A partir desses dados, foi construída uma matriz de similaridade, onde o coeficiente de *Dice* foi adotado para estimar a similaridade fenética entre as linhagens estudadas. Para o agrupamento dos dados da matriz, foi utilizado o método *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA), com análise de *bootstrap* de 1000x. Foram considerados significativos os agrupamentos com mais de 50% de repetibilidade.

4.7 Análise estatística

Foi realizado, quando necessário, tratamento estatístico para comparação entre médias por análise de Desvio Padrão e o Teste t de Student, considerando-se como significativo os valores de $p < 0,05$. Os cálculos e gráficos foram feitos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, CA - USA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito das CSI dos antimicrobianos no perfil de susceptibilidade

Primeiramente, foi determinado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos da linhagem *F. nucleatum* ATCC 25586 para as drogas selecionadas para esse estudo. Considerou-se como CSI a maior concentração para cada antimicrobiano onde houve crescimento bacteriano, ou seja, $\frac{1}{2}$ CIM (Tab. 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Subinibitória (CSI) dos antimicrobianos para a linhagem *F. nucleatum* ATCC 25586.

Antimicrobianos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CSI ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	0,0625	0,0312
Ampicilina/Sulbactam	0,0625	0,0312
Clindamicina	0,0625	0,0312
Cloranfenicol	2,0	1,0
Levofloxacina	4,0	2,0
Metronidazol	1,0	0,5
Piperacilina/ Tazobactam	0,0625	0,0312

Após a obtenção de linhagens derivadas da parental por cultivos sucessivos na presença e, subsequentemente, na ausência dos antimicrobianos em suas respectivas CSI, também foi feita a determinação do perfil de susceptibilidade para tais linhagens, utilizando os mesmos antimicrobianos testados para a linhagem parental. Foi observada sensibilidade diminuída a vários antimicrobianos, em relação à linhagem parental, para a maioria das linhagens derivadas, mesmo para as linhagens selecionadas após o cultivo sem as drogas. Essa sensibilidade diminuída não foi observada de maneira significativa ($> 1 \log_2\text{CIM}$) apenas para clindamicina e, em alguns casos, para levofloxacina e metronidazol (Tab. 2).

Considerando os antimicrobianos β -lactâmicos (ampicilina, ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam), não houve diferença significativa entre o perfil de susceptibilidade das linhagens selecionadas em ampicilina (FnAMP⁺ e FnAMP⁻) e ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺ e FnAMS⁻). Todas as linhagens derivadas tiveram a sensibilidade diminuída para os β -lactâmicos, chegando a $+8\text{Log}_2\text{CIM}$ em ampicilina e ampicilina-sulbactam para as linhagens FnAMP⁺ e FnAMS⁺. Ou seja, essas linhagens resistiram a concentrações até 267 vezes maiores destes antimicrobianos, em relação à linhagem de *F. nucleatum* parental (FnPAR).

As linhagens obtidas pelo cultivo em presença e posterior ausência de CSI dos β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMP⁻, FnAMS⁺, FnAMS⁻, FnPTZ⁺ e FnPTZ⁻), também diminuíram a sensibilidade ao cloranfenicol e ao metronidazol. Para levofloxacina, houve diminuição significativa de sensibilidade, +4Log₂CIM, apenas para as linhagens obtidas por cultivo na presença e posterior ausência de CSI deste antimicrobiano (FnLEV⁺ e FnLEV⁻), não ocorrendo resistência cruzada com os outros antimicrobianos. De maneira semelhante, a linhagem obtida por cultivo em CSI de metronidazol (FnMET⁺) foi a menos sensível à este antimicrobiano, diminuindo a sensibilidade em +3Log₂CIM. A linhagem obtida por cultivo na CSI de cloranfenicol (FnCLO⁺), assim como as linhagens FnLEV⁺ e FnLEV⁻, também diminuiu a sensibilidade ao cloranfenicol em +3Log₂CIM. As linhagens derivadas do cultivo na CSI dos β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMP⁻, FnAMS⁺, FnAMS⁻, FnPTZ⁺ e FnPTZ⁻), da clindamicina (FnCLI⁺ e FnCLI⁻) e do metronidazol (FnMET⁺ e FnMET⁻) tiveram a sensibilidade diminuída em +2Log₂CIM para o cloranfenicol. A clindamicina foi o único antimicrobiano que não sofreu diminuição significativa de sensibilidade para nenhuma linhagem.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina, (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-).

Linhagens	Antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)						
	AMP	AMS	CLI	CLO	LEV	MET	PTZ
FnPAR	0,0625	0,0625	0,0625	2,0	4,0	1,0	0,0625
FnAMP⁺	16,0	16,0	0,0625	8,0	4,0	2,0	4,0
FnAMP⁻	8,0	8,0	0,0625	8,0	4,0	2,0	8,0
FnAMS⁺	16,0	16,0	0,0625	8,0	8,0	4,0	4,0
FnAMS⁻	8,0	8,0	0,125	8,0	8,0	4,0	8,0
FnCLI⁺	1,0	1,0	0,125	8,0	4,0	2,0	1,0
FnCLI⁻	2,0	2,0	0,125	8,0	4,0	2,0	4,0
FnCLO⁺	8,0	8,0	0,0625	16,0	4,0	2,0	16,0
FnCLO⁻	8,0	8,0	0,125	8,0	4,0	4,0	8,0
FnLEV⁺	4,0	4,0	0,0625	16,0	64,0	2,0	4,0
FnLEV⁻	4,0	4,0	0,125	16,0	64,0	2,0	4,0
FnMET⁺	8,0	8,0	0,0625	8,0	4,0	8,0	8,0
FnMET⁻	8,0	8,0	0,0625	8,0	4,0	4,0	16,0
FnPTZ⁺	1,0	2,0	0,0625	8,0	8,0	4,0	1,0
FnPTZ⁻	2,0	2,0	0,125	8,0	4,0	4,0	2,0

Números em negrito indicam diminuição significativa da susceptibilidade ao antimicrobiano, (> 1 log₂CIM) (CLSI, 2007).

Fn (*F. nucleatum*); PAR (parental); AMP (ampicilina); AMS (ampicilina-sulbactam); CLI (clindamicina); CLO (cloranfenicol); LEV (levofloxacina); MET (metronidazol); PTZ (piperacilina-tazobactam)

5.2 Avaliação do efeito da CSI dos antimicrobianos na morfologia

Durante o cultivo da linhagem parental nas CSI dos antimicrobianos para a obtenção das linhagens derivadas, amostras de cada passagem foram coradas pela técnica de Gram e visualizadas em microscópio óptico. Então, as bactérias foram medidas para o cálculo da área média.

As alterações morfológicas mais evidentes foram causadas pelos agentes β -lactâmicos (ampicilina, ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam), que induziram filamentação e um aumento médio da área celular de até 22 vezes, nas primeiras exposições às CSI, em relação à linhagem parental. No cultivo com piperacilina-tazobactam, também foram observadas eventuais dilatações centrais ou nas extremidades das células. Os antimicrobianos clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina e metronidazol não provocaram grandes alterações morfológicas. Entretanto, o cultivo em clindamicina, aparentemente, aumentou a autoagregação entre as células, causando a formação de grandes grumos. Porém, a morfologia normal foi retomada, em todas as linhagens, imediatamente após o cultivo sem antimicrobianos (Fig. 1 e 2).

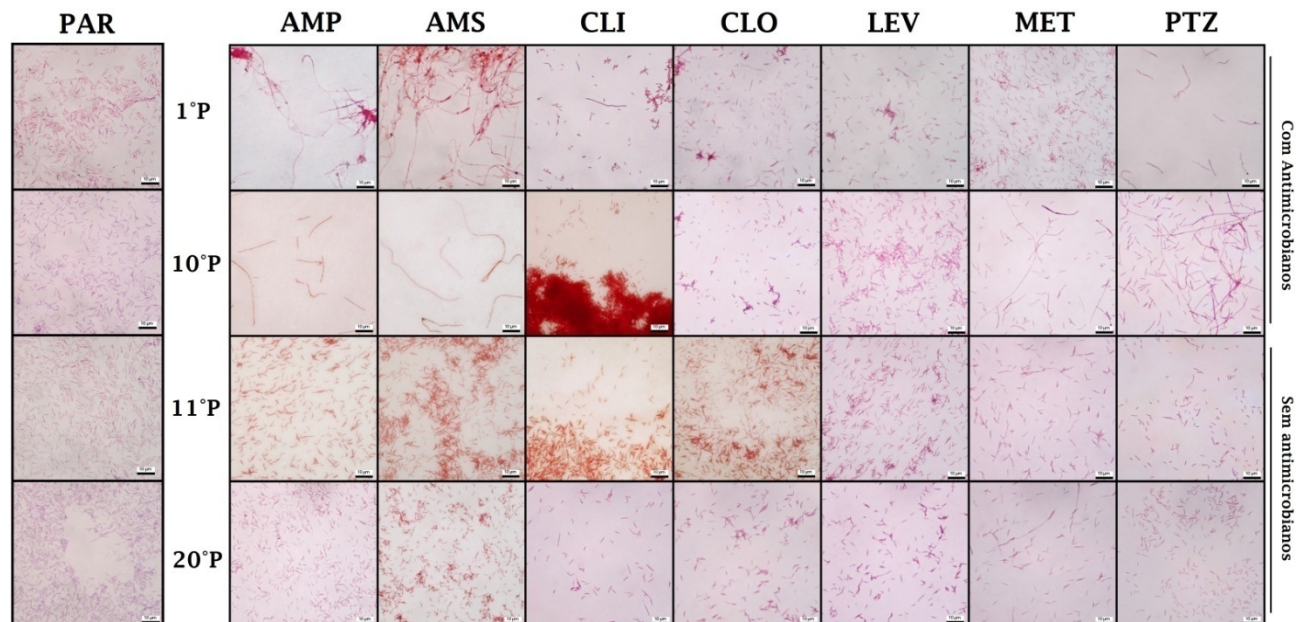


Figura 1. Aspecto morfológico das células de *F. nucleatum* ATCC 25586 (PAR) em exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS), clindamicina (CLI), cloranfenicol (CLO), metronidazol (MET), levofloxacina (LEV) e piperacilina-tazobactam (PTZ) (1° e 10° passagem), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (11° e 20° passagem). Células visualizadas após coloração pelo método de Gram. Aumento de 1000X. Barras 10 μ m.

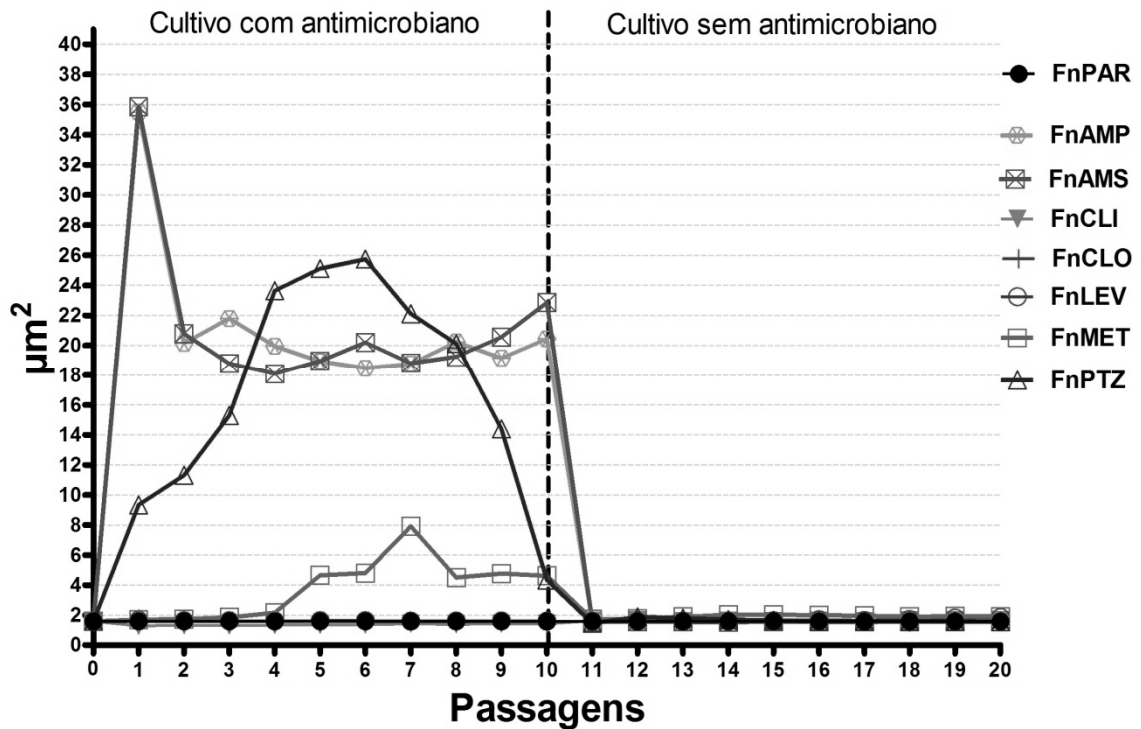


Figura 2. Área média das células de *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) visualizadas após coloração de Gram, durante exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS), clindamicina (CLI), cloranfenicol (CLO), metronidazol (MET), levofloxacina (LEV) e piperacilina-tazobactam (PTZ), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos. A figura mostra 10 passagens na presença das drogas e 10 passagens na ausência das drogas.

Também foi feita análise de volume e complexidade celular através de citometria de fluxo (Fig. 3). A complexidade celular é afetada por fatores como a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana, por exemplo.

As linhagens obtidas por cultivo em CSI de β -lactâmicos, FnAMP⁺, FnAMS⁺ e FnPTZ⁺ sofreram grandes alterações, com 38,8 %, 75,2% e 85,0%, respectivamente, das células alteradas morfológicamente ou em complexidade. As linhagens FnCLO⁺, FnCLI⁺, FnLEV⁺ e FnMET⁺ apresentaram pouca alteração morfológica e de complexidade, entre 5,8% a 8,5% de células alteradas. As linhagens obtidas pelo cultivo após a retirada dos antimicrobianos tiveram um perfil morfológico e de complexidade muito semelhante à FnPAR, apresentando em torno de 92% a 94% das células em estado normal, corroborando os dados da análise direta em microscópio.

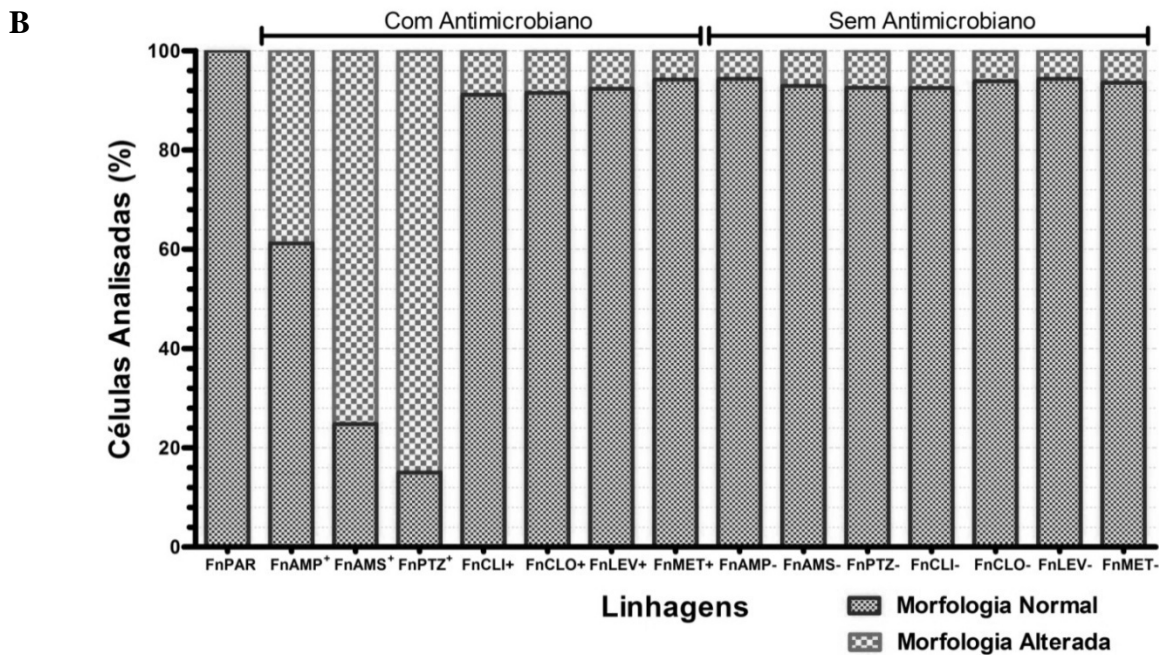
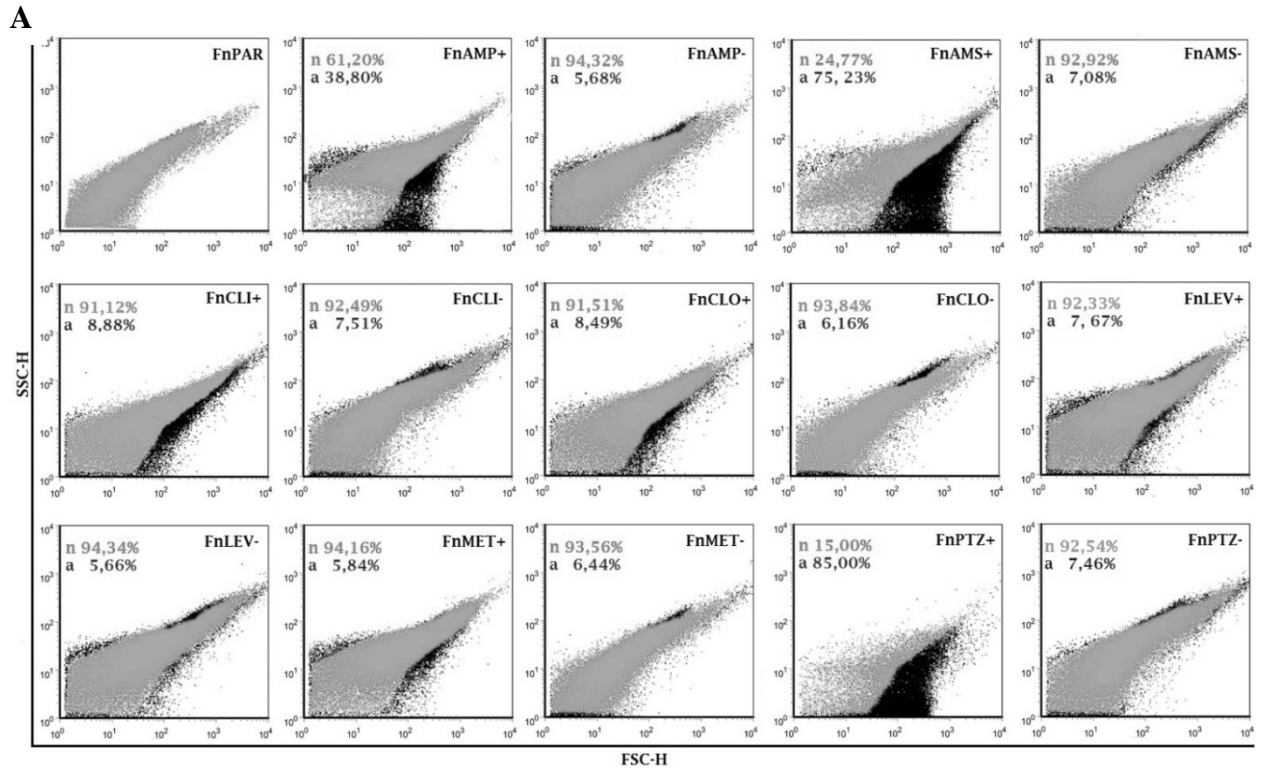


Figura 3. Avaliação por citometria de fluxo das células da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-). **A.** Volume celular (eixo FSC) e complexidade celular (eixo SSC) das linhagens bacterianas. “n” - células com morfologia normal; “a” - células com morfologia alterada em relação ao controle FnPAR. **B.** Porcentagem de células normais e alteradas nas linhagens bacterianas.

5.3 Avaliação do efeito da CSI dos antimicrobianos nas características bioquímicas e fisiológicas

Para avaliar a interferência das CSI de antimicrobianos no perfil bioquímico, foram utilizados testes abordando a produção de enzimas e de outros compostos, hidrólise, fontes de carbono, testes de tolerância e utilização de carboidratos.

Tabela 3. Características bioquímicas da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina, (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-).

	Fn PAR	Fn AMP ⁺	Fn AMP ⁻	Fn AMS	Fn AMS ⁻	Fn CLI ⁺	Fn CLI ⁻	Fn CLO ⁺	Fn CLO ⁻	Fn LEV ⁺	Fn LEV ⁻	Fn MET ⁺	Fn MET ⁻	Fn PTZ ⁺	Fn PTZ ⁻
Enzimas															
ADH	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção															
Ác. fenil pirúvico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculetina ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fonte de Carbono															
Acetamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerância															
Bile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cetramida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação															
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ADH (Arginina dehidrolase); LDC (Lisina descarboxilase); ODC (Ornitina descarboxilase); ONPG (hidrólise da beta-galactosidase); ^aproduzida se há hidrólise da esculina. Células em destaque indicam diferença em relação a linhagem parental (FnPAR).

Todas as linhagens foram produtoras de indol, tiveram o crescimento inibido pela bile e não hidrolisaram a esculina, de acordo com o que preconiza a literatura para *F. nucleatum* (MOORE, HOLDEMAN e KELLEY, 1984; TUNER et al., 1992). A maioria

das alterações foi referente à utilização de carboidratos. A exposição à CSI das drogas testadas induziu o metabolismo de até três carboidratos a mais que a linhagem parental (FnPAR), mesmo nas linhagens obtidas após o cultivo sem antimicrobianos. Não foi detectado a atividade das enzimas arginina-dehidrolase e ornitina-decarboxilase na maioria das linhagens derivadas da FnPAR (Tab. 3).

Também foi analisada a interferência das CSI de antimicrobianos na capacidade de formação de biofilme. Os dados mostraram que as propriedades agregativas foram muito alteradas devido à exposição às CSI dos antimicrobianos. As linhagens obtidas por cultivo na presença de agentes β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMS⁺ e FnPTZ⁺) diminuíram expressivamente a formação de biofilme, durante o cultivo com droga. Porém, as linhagens obtidas após a retirada desses antimicrobianos (FnAMP⁻, FnAMS⁻ e FnPTZ⁻) não só recuperaram a habilidade de formação de biofilme, mas também aumentaram significativamente esta habilidade, em relação a FnPAR. O oposto ocorreu com a linhagem obtida pelo cultivo em clindamicina (FnCLI⁺), em que o cultivo na presença desta droga aumentou mais que o dobro a formação de biofilme, mas após a retirada da clindamicina (FnCLI⁻), a formação de biofilme diminuiu para níveis abaixo da FnPAR. As linhagens FnCLO, FnLEV e FnMET aumentaram a formação de biofilme, na presença ou ausência destes antimicrobianos (Fig. 4).

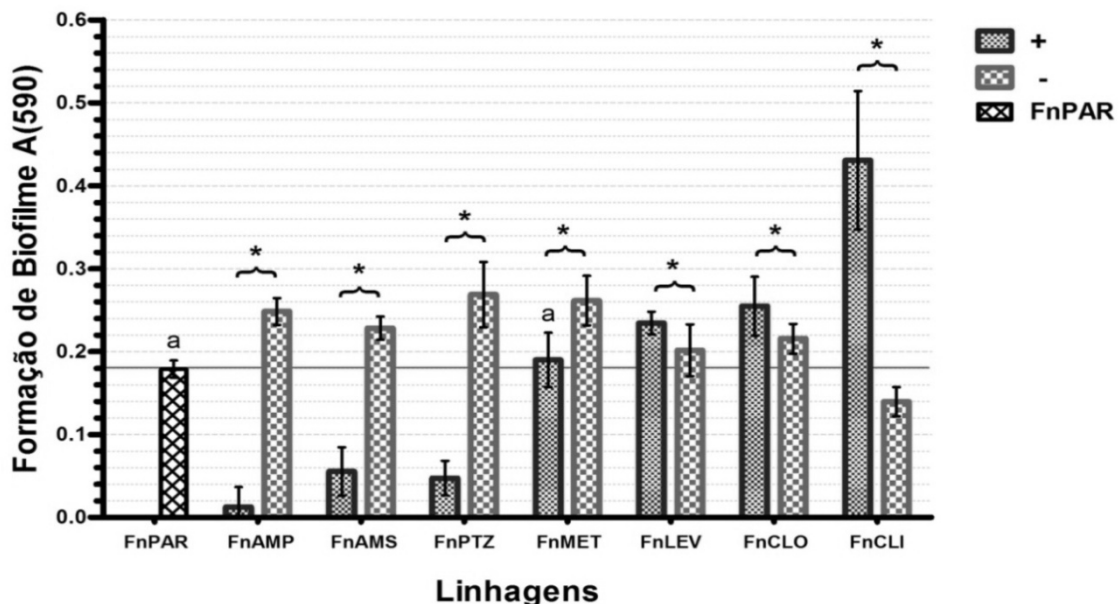


Figura 4. Habilidade de formação de biofilme da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-). "a" indica ausência de diferença estatisticamente significativa; * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Pela análise das curvas de crescimento, foram observadas alterações nos padrões de crescimento para todas as linhagens selecionadas pela exposição à CSI dos antimicrobianos. Observou-se que as linhagens derivadas do cultivo em β -lactâmicos - FnAMP⁺ (7h18m), FnAMS⁺ (6h18m) e FnPTZ⁺ (8h18m) - exibiram durante o crescimento exponencial tempos de geração (TG) mais próximos ao da linhagem FnPAR (6h48m). Por outro lado, o padrão de crescimento das linhagens FnCLI⁺ (16h12m) e FnMET⁺ (13h18m) mostraram-se bastante alterados. A linhagem FnCLI⁺ apresentou o padrão de crescimento mais lento entre todas as linhagens selecionadas, e o nível populacional atingiu apenas cerca de 60% do observado para a linhagem FnPAR (Fig. 5).

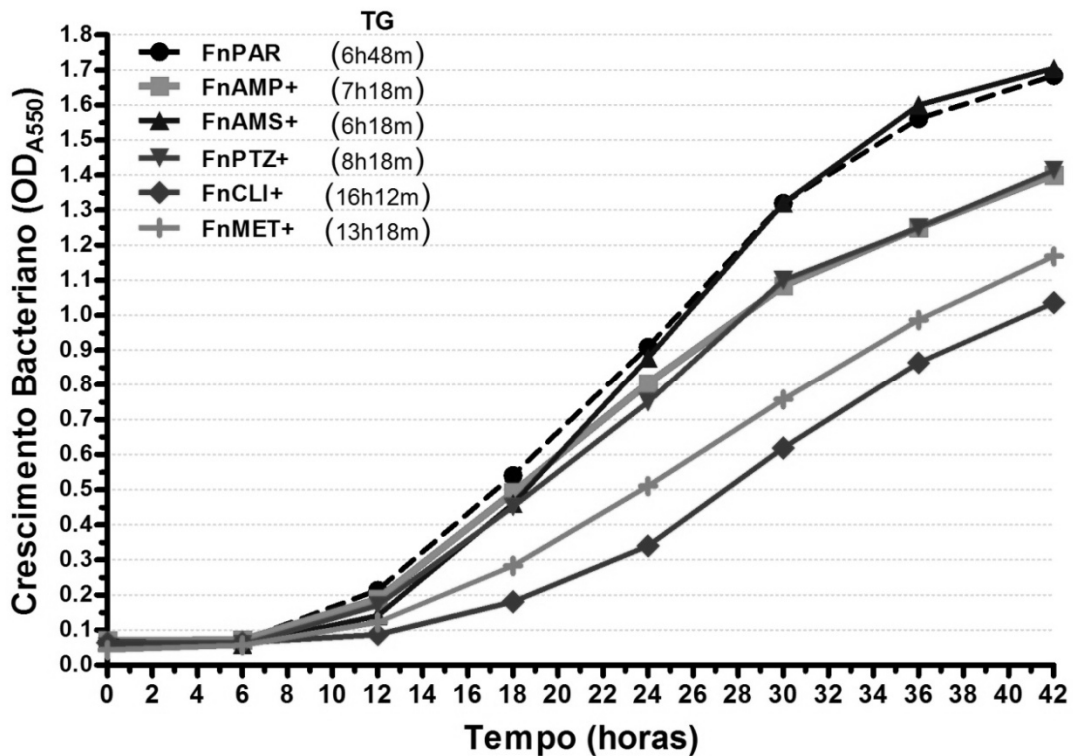


Figura 5. Curva de crescimento e tempo de geração (TG) da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), metronidazol (FnMET⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺).

5.4 Avaliação do efeito da CSI dos antimicrobianos nas características moleculares

Também foi analisado o efeito das CSI de antimicrobianos no acúmulo de proteínas e no padrão de DNA *fingerprint* gerado por AP-PCR. Para a certificação da

identidade da linhagem parental e das linhagens derivadas, foi feita a amplificação da região de DNA codificadora de 16S RNAr, utilizando-se *primers* específicos para a espécie *F. nucleatum* (Fig. 6).

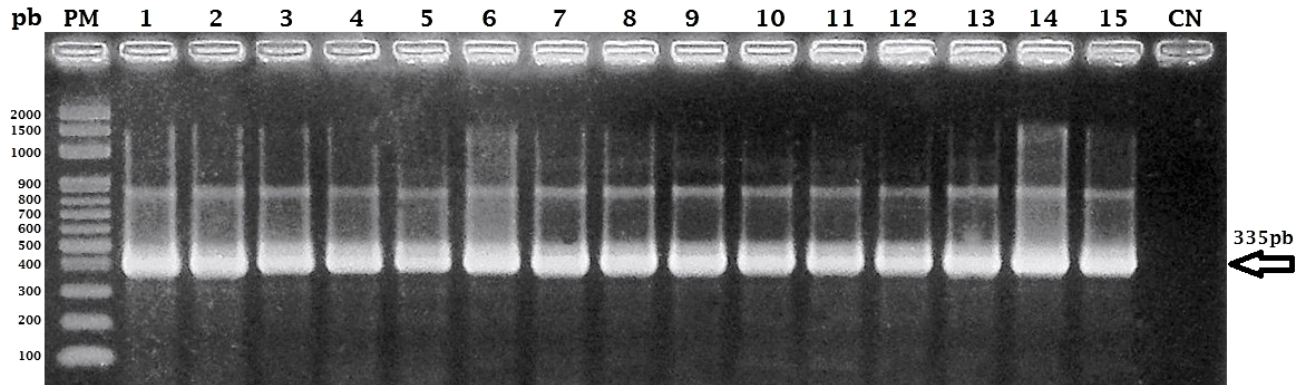


Figura 6. Identificação molecular da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-). A seta mostra a banda gerada pela amplificação da região de DNA codificadora do 16S RNAr utilizando-se *primers* específicos para da espécie *F. nucleatum*, em gel de agarose 0,8%. Canaletas: PM (padrão de peso molecular); CN (controle negativo); 1 (FnPAR), 2 (FnAMP⁺), 3 (FnAMP⁻), 4 (FnAMS⁺), 5 (FnAMS⁻), 6 (FnCLI⁺), 7 (FnCLI⁻), 8 (FnCLO⁺), 9 (FnCLO⁻), 10 (FnMET⁺), 11 (FnMET⁻), 12 (FnLEV⁺), 13 (FnLEV⁻), 14 (FnPTZ⁺), 15 (FnPTZ⁻).

Os perfis de acúmulo de proteínas totais solúveis foram analisados comparativamente entre a linhagem parental (FnPAR) e as linhagens derivadas através de um sistema de eletroforese capilar microfluídica. Foram detectadas proteínas diferencialmente reguladas em todas as linhagens derivadas, em comparação com a FnPAR. As modificações no padrão protéico também foram detectadas quando comparamos as linhagens obtidas por cultivo nas CSI dos antimicrobianos e as respectivas linhagens obtidas após o cultivo sem antimicrobianos. As proteínas foram analisadas na faixa de 4,5 kDa a 240 kDa, considerando-se a presença e a ausência destas (Fig. 7 e Anexo A).

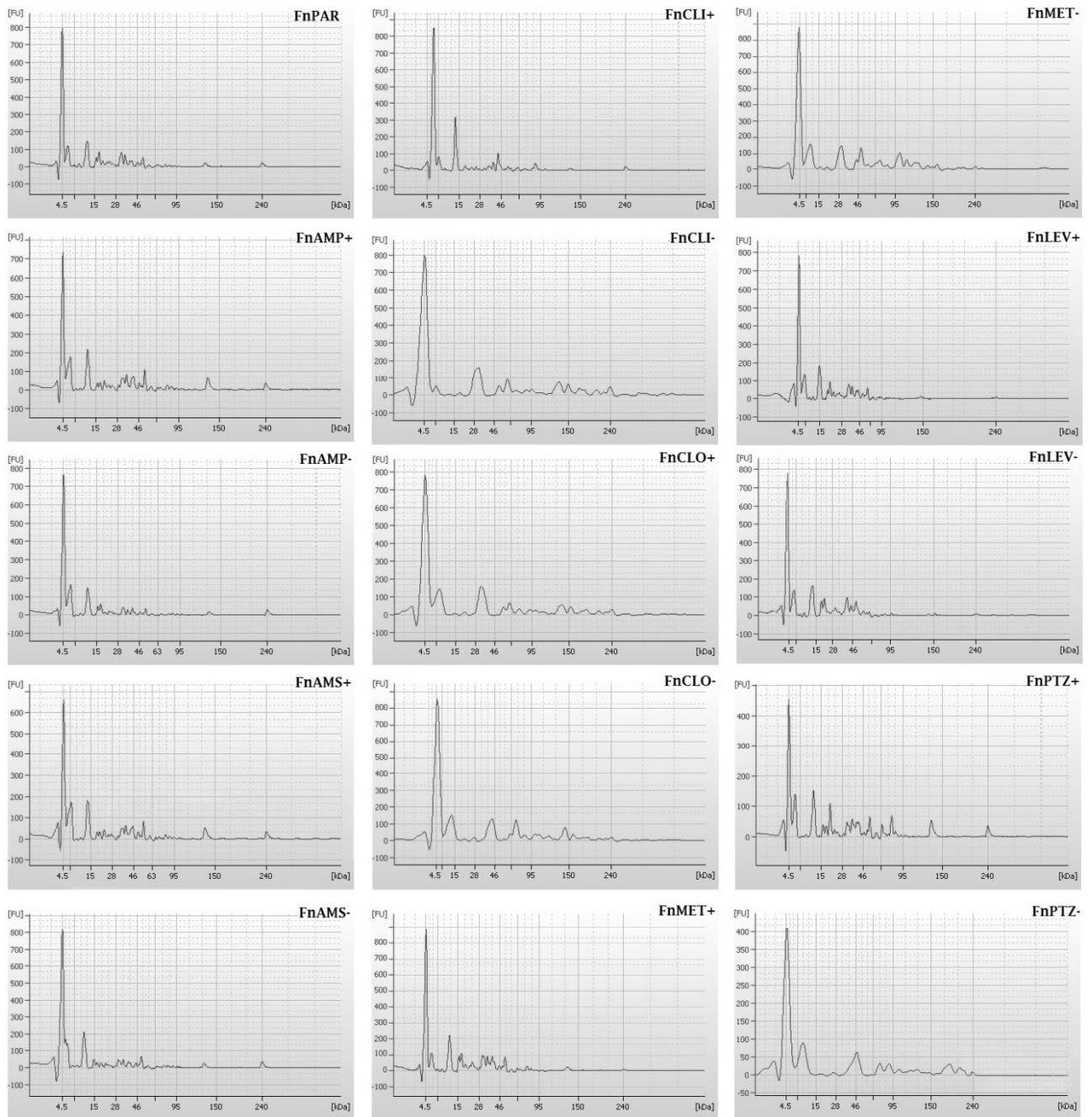


Figura 7. Perfil protéico da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-), analisados por eletroforese capilar microfluídica.

Através da genotipagem por AP-PCR, foi possível detectar 27 lócus, dos quais a porcentagem de bandas polimórficas nas linhagens variaram de 5,5% (FnPTZ⁺ e FnPTZ⁻), 10,5% (FnCLI⁺ e FnCLO⁺), 15% (FnCLO⁻), 19% (FnAMP⁺, FnAMP⁻, FnAMS⁺, FnAMS⁻ e FnCLI⁻) a 22,7% (FnMET⁺, FnMET⁻, FnLEV⁺ e FnLEV⁻). Mesmo com o baixo

número de fragmentos amplificados, foi possível detectar polimorfismos em todas as linhagens expostas às CSI, durante e após a exposição aos antimicrobianos (Fig. 8).

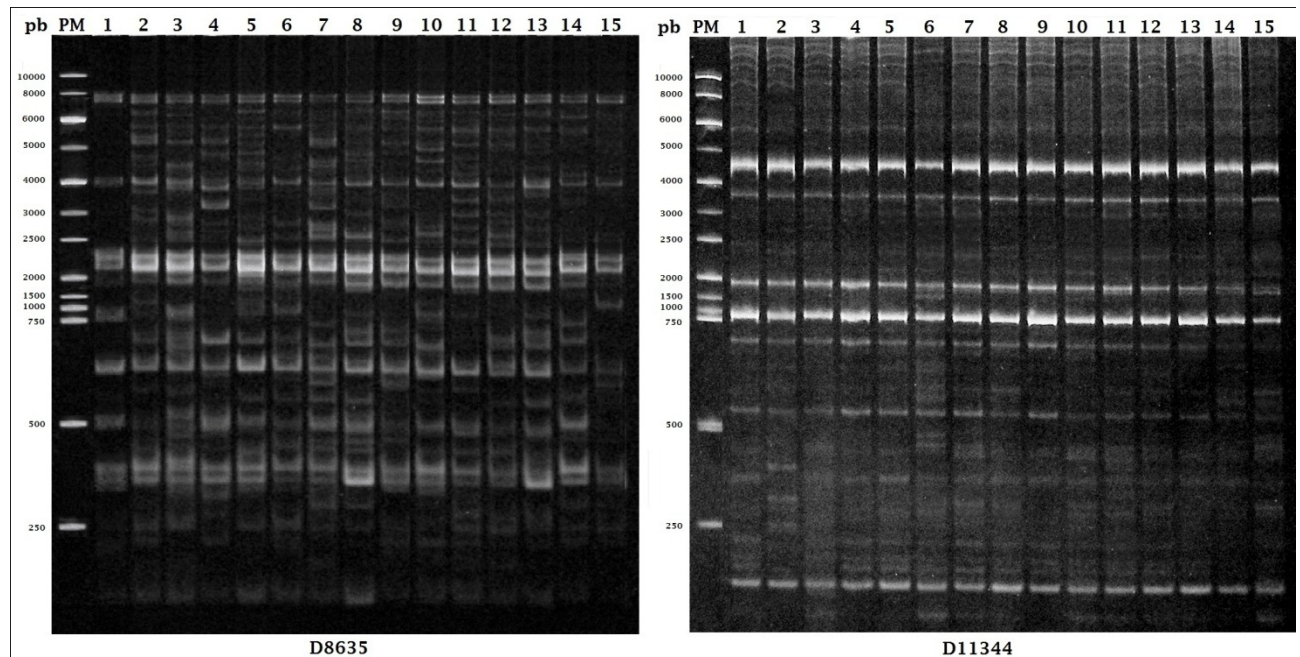


Figura 8. Genotipagem por AP-PCR da linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-), utilizando os *primers* aleatórios, D8635 e D11344. Os fragmentos de DNA foram separados por PAGE. Canaletas: PM (padrão de peso molecular); 1 (FnPAR), 2 (FnAMP⁺), 3 (FnAMP⁻), 4 (FnAMS⁺), 5 (FnAMS⁻), 6 (FnCLI⁺), 7 (FnCLI⁻), 8 (FnCLO⁺), 9 (FnCLO⁻), 10 (FnMET⁺), 11 (FnMET⁻), 12 (FnLEV⁺), 13 (FnLEV⁻), 14 (FnPTZ⁺), 15 (FnPTZ⁻).

5.5 Análise fenética das alterações bioquímico-fisiológicas e moleculares induzidas por CSI de antimicrobianos

Para avaliação global das alterações, foram gerados três dendrogramas resultantes do perfil bioquímico (baseado em 27 testes bioquímicos), do perfil protéico (baseado em análises qualitativas de proteínas na faixa de 4,5 a 240 kDa) e da análise do polimorfismo do DNA (baseado no padrão de *amplicons* obtidos por AP-PCR).

Considerando as matrizes de similaridade geradas pelos perfis protéicos e o baseado nos perfis bioquímicos, ambos indicam afinidades entre as linhagens FnCLO⁻ e FnLEV⁻, FnMET⁻ e FnPTZ⁻, FnCLI⁻ e FnLEV⁺, e maior divergência entre a FnPAR e as linhagens FnAMS⁺, FnAMS⁻, FnCLI⁺, FnCLI⁻, FnLEV⁺ e FnLEV⁻. Também, foi possível

detectar diferenças evidentes entre as linhagens obtidas por cultivos em CSI dos antimicrobianos (+) e as respectivas linhagens obtidas após a retirada das drogas (-). Em relação ao perfil de acúmulo protéico, a linhagem FnCLO⁺ foi a mais similar à linhagem FnPAR; já em relação ao perfil bioquímico, a linhagem FnMET⁺ foi a mais similar com a linhagem FnPAR. Contudo, as linhagens selecionadas após a retirada desses antimicrobianos (FnCLO⁻ e FnMET⁻) se diferenciaram fenotipicamente da FnPAR. Os polimorfismos do DNA e o perfil bioquímico geraram matrizes que não foram sustentadas de maneira significativa (com valores de bootstrap inferiores a 50%). Porém, podemos perceber que existe um distanciamento de todas as linhagens derivadas em relação à FnPAR (Fig. 9).

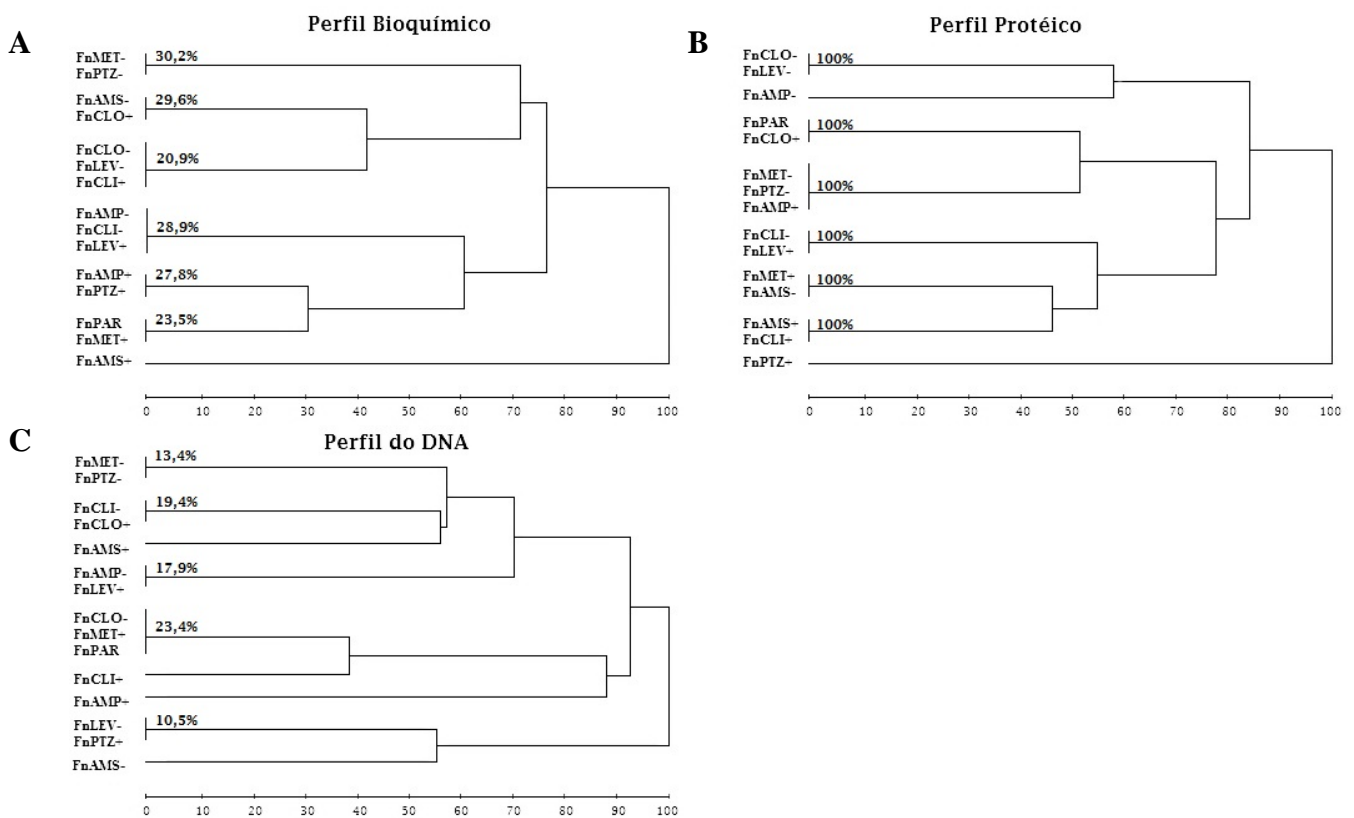


Figura 9. Matrizes de similaridade resultante dos perfis bioquímicos (A), de acúmulo protéico (B) e de polimorfismo do DNA (C), obtidos para a linhagem parental *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e para as linhagens selecionadas por exposição às concentrações subinibitórias de ampicilina (FnAMP⁺), ampicilina-sulbactam (FnAMS⁺), clindamicina (FnCLI⁺), cloranfenicol (FnCLO⁺), metronidazol (FnMET⁺), levofloxacina (FnLEV⁺) e piperacilina-tazobactam (FnPTZ⁺), e após o subsequente cultivo sem antimicrobianos (-). Foi utilizado o método UPGMA com o coeficiente de Dice e *bootstrap* de 1000 réplicas. Agrupamentos com repetibilidade > 50% são significativos.

6 DISCUSSÃO

Pouco tempo após a introdução dos antimicrobianos na medicina começou-se a observar o aparecimento de microrganismos resistentes às doses terapêuticas. Desde então, diversos pesquisadores tem estudado as respostas dos microrganismos a altas concentrações dessas drogas. Entretanto, o estudo dos efeitos de baixas concentrações de antimicrobianos sobre os microrganismos e as implicações para as relações destes com o hospedeiro tem ganhado importância nos últimos anos (WRIGHT, 2007; ASM, 2009). Esses efeitos podem ter grande relevância para a microbiota residente, que possui um grande potencial benéfico e também patogênico, considerando que esses microrganismos ficam expostos frequentemente a baixas concentrações de antimicrobianos durante antibioticoterapias, principalmente em terapias inadequadas (WITTE, 2000). Portanto, este estudo teve por objetivo examinar as repostas da bactéria anaeróbia obrigatória *F. nucleatum*, uma das principais espécies da microbiota residente humana e a mais comumente isolada de espécimes clínicos, às concentrações subinibitórias (CSI) dos antimicrobianos ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina e metronidazol.

6.1 Efeito das CSI de antimicrobianos no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Nossos dados mostraram que a exposição às CSI dos antimicrobianos testados interfere com a susceptibilidade de *F. nucleatum* a estes antimicrobianos. Estas alterações podem estar relacionadas a mecanismos de resistência adquiridos, que resultam em alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana, devido a variações genotípicas ou na regulação da expressão gênica (ASM, 2009; WITTE, 2000; O'BRIEN, 2002). Em ambos os casos, essas bactérias podem apresentar uma diminuição da sensibilidade para substâncias com mecanismos de ação semelhantes ou substâncias para as quais eles compartilham os mesmos mecanismos de resistência.

Os agentes antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados na medicina, contudo, a resistência bacteriana aos β -lactâmicos está aumentando em uma

grande velocidade, incluindo-se os anaeróbios (BOLSTAD, JENSEN e BAKKEN, 1996; NYFORS et al., 2003). Todos os β -lactâmicos compartilham um anel β -lactâmico, sendo seu principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular. A resistência a β -lactâmicos na maioria das bactérias Gram-negativas anaeróbias é mediada pela produção de β -lactamases, mas os mecanismos de resistência também incluem alterações nas Proteínas de Ligação com a Penicilina (PBPs), permeabilidade diminuída por alterações em proteínas de membrana externa (OMPs) ou nos canais de porina e efluxo ativo do antimicrobiano (ELLIE, GOLDSTEIN e CITRON, 2011). Neste estudo, foram utilizados três antimicrobianos β -lactâmicos: ampicilina, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam.

As linhagens obtidas pelo cultivo em CSI dos β -lactâmicos diminuíram drasticamente a susceptibilidade para estes antimicrobianos. Essas linhagens também diminuíram a susceptibilidade ao cloranfenicol e ao metronidazol. Já foi relatada a presença de β -lactamase classe A no genoma de *F. nucleatum* ATCC 25586, entretanto, esta linhagem permanece susceptível aos β -lactâmicos (VOHA et al., 2006). Assim, como esperado, não houve diferenças significativas no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos ampicilina e ampicilina-sulbactam. Além disso, de acordo com os testes bioquímicos, nenhuma linhagem analisada foi produtora de β -lactamases. Portanto, a diminuição da sensibilidade de forma cruzada entre os β -lactâmicos, o cloranfenicol e o metronidazol poderia sugerir a indução de mecanismos de resistência comuns, como alteração de permeabilidade na superfície celular, considerando-se que estes antimicrobianos possuem mecanismos de ação diferentes.

A clindamicina e o cloranfenicol inibem a síntese protéica bacteriana por interferir com as funções da subunidade 50S dos ribossomos bacterianos (RANG et al., 2007). Entretanto, enquanto a clindamicina não sofreu diminuição significativa de susceptibilidade para nenhuma linhagem, todas as linhagens diminuíram significativamente a susceptibilidade ao cloranfenicol. Este fato pode estar relacionado às diferenças nos principais mecanismos de resistência para estes antimicrobianos. A resistência à clindamicina pode ocorrer por metilação de adeninas do RNA ribossômico por metilases codificadas por genes *erm* (WHITTLE, SHOEMAKER e SALYERS, 2002; LÖFMARK et al., 2006). A resistência ao cloranfenicol geralmente é causada por uma acetiltransferase (CAT), que inativa o fármaco ao transferir dois grupos acil para seus grupos hidróxido, impedindo-o de se ligar ao ribossomo (RANG et al., 2007).

Para levofloxacin, uma fluoroquinolona de terceira geração que inibe a sntese de DNA, o principal mecanismo de resistncia é devido à mutação no gene *gyrA*. Devido ao mecanismo de ação, inibição da atividade da DNA-girase, geralmente não há resistncia cruzada entre a levofloxacin e outras classes de antimicrobianos (MAXWELL, 1992; CASTRO et al., 1997; GOODMAN e GILMAN, 2001). Linhagens de *Fusobacterium canifelinum* podem ser intrinsecamente resistente às fluoroquinolonas devido à substituão da Ser79 por leucina e da Gly83 por arginina em *gyrA* (CONRADS, CITRON e GOLDSTEIN, 2005). Isto poderia explicar a diminuão na sensibilidade  levofloxacin apenas nas linhagens cultivadas em CSI deste antimicrobiano (FnLEV⁺ e FnLEV⁻).

Houve diminuão da susceptibilidade ao metronidazol para todas as linhagens. Contudo, a mais significativa também ocorreu na linhagem cultivada em CSI deste antimicrobiano (FnMET⁺). A resistncia ao metronidazol no anaeróbio *Bacteroides fragilis* pode ser devido a genes *nim*, que parecem codificar uma nitroimidazol-redutase que converte 4- ou 5-nitroimidazol a 4- ou 5-aminoimidazole, impedindo a formação de resíduos nitrosos tóxicos, necessários para a atividade antimicrobiana (GAL e BRAZIER, 2004). O mecanismo de resistncia ao metronidazol para anaeróbios não-*Bacteroides* ainda é desconhecido (ELLIE, GOLDSTEIN e CITRON, 2011).

A análise genmica de *F. nucleatum* ATCC 25586 (KAPATRAL et al., 2002) revelou uma série de bombas de efluxo multidrogas. Há cinco quadros abertos de leitura (ORFs) para proteínas de resistncia a acriflavina, que podem proteger a bactéria de inibidores hidrofóbicos. Uma ORF para a resistncia ao cloranfenicol e duas para resistncia  5-nitroimidazol também foram encontradas no genoma, um achado inesperado, considerando que vários estudos indicam que *Fusobacterium* spp. são sensíveis a nitroimidazis, especialmente ao metronidazol (POULET, DUFFAUT e LODTER, 1999).

Nossos dados mostram que o padrão de diminuão de sensibilidade aos antimicrobianos se manteve nas linhagens obtidas pelo cultivo na ausência destes. Assim, sugere-se que a seleção microbiana pela exposição às CSI das drogas foi suficiente para modulação de habilidades microbianas e eliminação das subpopulações mais susceptíveis.

6.2 Efeito das CSI de antimicrobianos sobre características morfológicas

Foi analisado o efeito das CSI de antimicrobianos na morfologia de *F. nucleatum* utilizando-se coloração de Gram e análise por citometria de fluxo. As principais alterações na morfologia e complexidade foram induzidas por agentes β -lactâmicos, que provocaram o fenômeno da filamentação bacteriana. Os antimicrobianos de diversas classes podem interagir com a célula bacteriana provocando modificações na sua estrutura, como formação de bulbos e filamentação. Entre essas modificações, a filamentação é a alteração mais discutida na literatura, e é sugerido que ela ocorra quando o processo de reprodução bacteriana continua na ausência de divisão celular, resultando em bactérias alongadas e com múltiplas cópias cromossômicas (ROTHFIELD, JUSTICE e GARCIA-LARA, 1999; JUSTICE et al., 2008).

Vários trabalhos têm atribuído importantes papéis biológicos à filamentação em ambientes de estresse, os quais incluem a evasão da resposta imune do hospedeiro, fuga de predadores protistas, resistência a terapias antimicrobianas e ao estresse causado pelo oxigênio (em anaeróbios obrigatórios). A filamentação pode ser acompanhada de variações metabólicas, danos ao DNA e mutações (JÜRGENS e MATZ, 2002; SILVA et al., 2005; SANTOS et al., 2007; JUSTICE, et al., 2008).

Há um amplo relato na literatura de alterações morfológicas e fisiológicas induzidas por diversos antimicrobianos em células bacterianas aeróbias e anaeróbias obrigatórias, Gram-positivas e Gram-negativas, cocos e bacilos, e mesmo em leveduras (TULASNE e VENDRELY, 1948; NOVAES et al., 1991; LORIAN e GEMMELL, 1991; TAKAHATA e NISHINO, 1997; GIESBRECHT et al., 1998; NOSANCHUK, et al., 1999; DIARRA et al., 2002; DINIZ et al., 2003; FONSECA et al., 2004; GARCIA et al., 2004; SILVESTRO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; BUIJS et al., 2008; JUSTICE et al., 2008). Entretanto, existe uma discussão sobre a relação entre a resistência a antimicrobianos e a filamentação bacteriana. Muitos autores sugerem que a filamentação é um mecanismo de resistência a diversos estresses, enquanto outros sugerem que as células filamentadas, na verdade, estariam morrendo (FONSECA et al., 2004; CHEN et al., 2005; JUSTICE et al., 2008).

Neste estudo, embora tenham sido detectadas células filamentadas, principalmente nas linhagens derivadas do cultivo em agentes β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMS⁺ e FnPTZ⁺), uma grande parte das culturas era composta por células com a morfologia normal. E, após o cultivo na ausência de antimicrobianos não foram

detectadas quantidades significativas de células morfologicamente alteradas. Portanto, é provável que as células filamentadas sejam as mais sensíveis aos antimicrobianos.

Alguns autores sugerem que o inibidor de β -lactamases sulbactam pode induzir a filamentação (MOOSDEEN, WILLIAMS e YAMABE, 1988). Neste estudo, a análise por citometria de fluxo mostrou um aumento de aproximadamente 2 vezes na quantidade de células alteradas na linhagem cultivada em ampicilina-sulbactam, em relação a linhagem cultivada em ampicilina. Assim, é provável que o sulbactam possa causar alterações morfológicas e de complexidade celular em *F. nucleatum*. E, considerando que a linhagem FnPTZ⁺ apresentou alterações morfológicas consideráveis e que o tazobactam também é um inibidor de β -lactamases, sugerimos que o tazobactam pode induzir alterações morfológicas em *F. nucleatum*. Entretanto, fazem-se necessários testes confirmatórios utilizando-se apenas piperacilina.

6.3 Efeito das CSI de antimicrobianos sobre características bioquímicas, fisiológicas e moleculares

As alterações causadas por antimicrobianos podem interferir de forma significativa não só na estrutura bacteriana, mas também nas propriedades de antigenicidade, no processo de adesão a superfícies, na produção de enzimas e exotoxinas e, conseqüentemente, na virulência, potencializando ou diminuindo a patogenicidade dos microrganismos (GEMMELL, 1988; DINIZ et al., 2003; LINARES-RODRÍGUEZ e MARTINEZ-MENÉNDEZ, 2005; SILVESTRO et al., 2006; PRUDHOMME et al., 2006).

Os testes bioquímicos realizados mostraram que as CSI de diversos antimicrobianos interferem com a atividade das enzimas arginina dehidrolase e ornitina descarboxilase, e induzem o metabolismo de carboidratos que não são metabolizados pela linhagem parental na ausência de antimicrobianos. O principal produto do metabolismo de carboidratos por bactérias do gênero *Fusobacterium* é o butirato. Íons butirato inibem a proliferação de células T e fibroblastos e estão presentes em níveis elevados em placas associadas com periodontite (SINGER e BUCKNER, 1981; BARTOLD et al., 1991). O incremento no potencial de fermentação de carboidratos pode ter efeitos diretos no potencial de produção de butirato, e o efeito destes

metabólitos sobre a inibição da proliferação de linfócitos e fibroblastos podem suprimir o sistema imune e comprometer o potencial de rápida cicatrização.

Outro importante fator de virulência é a aderência bacteriana nos tecidos do hospedeiro, essencial na colonização e estabelecimento de uma infecção (HOLT e BRAMANTI, 1991; HOEPELMAN e TUOMANEN, 1992). Uma comunidade bacteriana de uma ou mais espécies agregadas por uma matriz polimérica aderentes a superfícies vivas ou inanimadas, é chamada de biofilme (DICKSCHAT, 2010). Os fatores que desempenham um papel essencial na formação de biofilme incluem a fixação inicial de bactérias a uma superfície, coagregação, comunicação, e o crescimento das células aderidas. Embora os mecanismos exatos pelos quais células bacterianas podem se aderir a outras células ou a secreções ainda precise ser esclarecidos, interações via pili e adesão mediada por adesinas podem estar envolvidos (LONDON, 1991; PALMER et al., 2001; DONLAN, 2001; WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010).

Xie et al. (1991) mostraram que várias adesinas estão presentes em *F. nucleatum*, e sugeriram que a adesão pode ser aumentada ou diminuída pela influência de diferentes substâncias químicas, incluindo antimicrobianos. Já estruturas como fímbrias ou cápsula estão ausentes em *F. nucleatum* (OKAMOTO et al., 2002). Contudo, *F. nucleatum* pode produzir e secretar poli- γ -glutamato que, quando ancorado à superfície, age como uma cápsula e pode estar envolvido na formação de biofilme (CANDELA et al., 2009).

Nossos resultados mostraram que a exposição às CSI de diversos antimicrobianos provocou um aumento na formação de biofilme, principalmente durante o cultivo em CSI de clindamicina. Portanto, é provável que a CSI destes antimicrobianos induza à expressão de adesinas na superfície bacteriana e/ou a secreção de poli- γ -glutamato. Em contraste, houve grande diminuição na formação de biofilme bacteriano durante o cultivo em CSI dos antimicrobianos β -lactâmicos. Seguindo o mesmo raciocínio, a CSI de β -lactâmicos provavelmente provocou a diminuição na concentração de adesinas na superfície bacteriana e/ou a secreção de poli- γ -glutamato, possivelmente relacionada à ação destes antimicrobianos na parede celular.

Jewett et al. (2000) observaram uma íntima relação entre a habilidade de *F. nucleatum* induzir agregação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e a sua habilidade em causar apoptose. Esses autores sugeriram que a bactéria pode sobrerregular receptores mediadores de morte Fas e TNF nos PBMCs, e a agregação

poderia servir para aproximar as moléculas Fas e Fas-ligante, assim como o receptor de TNF e o TNF, promovendo a sinalização nos PBMCs. Assim, considerando que *F. nucleatum* pode induzir apoptose em linfócitos (JEWETT et al., 2000) e possui grande habilidade em coagregar com outros patógenos (KOLENBRANDER e LONDON, 1993), o aumento nas propriedades agregativas poderia acarretar numa maior eliminação de células que são importantes para a defesa imunológica e na agregação de outras bactérias patogênicas em biofilmes, aumentando os riscos de infecções. A formação de biofilme ainda está relacionada a infecções associadas a dispositivos protéticos, endocardites, doenças orofaciais, respiratórias e do trato gastrointestinal e geniturinário, dentre outras (WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010).

Para obter informações sobre o acúmulo protéico na linhagem parental e nas derivadas do cultivo em antimicrobianos e, posteriormente, sem antimicrobianos, foi utilizada a técnica de eletroforese capilar microfluídica. As modificações no acúmulo protéico foram notáveis nas linhagens selecionadas por exposição às CSI de antimicrobianos e mesmo nas linhagens selecionadas após a retirada dos antimicrobianos. Essas alterações metabólicas poderiam ser uma consequência do custo biológico da resistência aos antimicrobianos (ANDERSSON, 2003; SANTOS et al., 2010), ou ainda, devido à interferência da CSI destas drogas no metabolismo celular. Esses dados podem corroborar com um dos focos de estudos recentes sobre expressão gênica, que é tentar definir as relações entre o perfil de expressão e o modo de ação dos antimicrobianos para o uso na seleção de novas drogas e na identificação dos mecanismos de ação (HUTTER, et al., 2004; FREIBERG et al., 2004; BRAZAS e HANCOCK, 2005).

A técnica de AP-PCR tem sido frequentemente utilizada para análise clonal e para estudos relacionados à detecção de polimorfismos no genoma celular, sendo particularmente útil para avaliação de diversidade genética entre organismos relacionados (GEORGE, REYNOLDS e FALKLER, 1997; SONG, 2005). Através da genotipagem por AP-PCR, foi detectada alta porcentagem de polimorfismos em todas as linhagens expostas às CSI dos antimicrobianos testados, mesmo após o cultivo sem antimicrobianos. Bactérias hipermutáveis têm sido associadas com desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (LECLERC et al., 1996; GUSTAFSSON et al., 2003). Assim, as mutações e o acúmulo protéico diferenciado nas linhagens derivadas do cultivo em antimicrobianos e, posteriormente, sem antimicrobianos podem estar

diretamente relacionadas com modificações na biologia dos microrganismos e, possivelmente, no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e na virulência.

Visando obter uma visão biológica global e integrada do metabolismo celular durante a exposição à CSI das diferentes classes de antimicrobianos, foram construídas matrizes de similaridade das características bioquímico-fisiológicas e moleculares avaliadas neste estudo. Comparando-se os perfis, pode-se reforçar a evidência da interferência das CSI de antimicrobianos na biologia de *F. nucleatum*. Não foi possível relacionar os polimorfismos no DNA às outras características analisadas. Entretanto, existe uma tendência de que os dados bioquímicos estejam relacionados com os dados de acúmulo protéico.

Em concordância com nossos resultados, outros estudos tem mostrado que a alteração na expressão de genes e proteínas, induzidas por diferentes antimicrobianos, é muito diversa, podendo ocorrer em genes não relacionados diretamente com a função da molécula alvo (BANDOW et al., 2003). A detecção destas alterações poderia contribuir para o entendimento da resposta bacteriana à pressão exercida pelas drogas antimicrobianas.

A adaptação bacteriana à presença dos antimicrobianos tem sido muito bem sucedida, e nos últimos anos, o amplo desenvolvimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos se tornou um problema global de saúde pública (FAO/OIE/WHO, 2003; ASM, 2009). Apesar da resistência a muitas drogas conferir um custo adaptativo associado à resistência aos antimicrobianos, também chamado de custo de *fitness*, evidências obtidas a partir de estudos laboratoriais e epidemiológicos indicam que vários processos provocam a persistência, a longo prazo, de bactérias resistentes. A evolução compensatória, que ameniza os custos da resistência, e a ocorrência de resistência sem custo de *fitness* podem conferir uma estabilização da resistência bacteriana (SANDER et al., 2002; ANDERSSON, 2003).

Neste estudo, após a análise das alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares, foram escolhidas cinco linhagens, a saber, FnAMP⁺, FnAMS⁺, FnPTZ⁺, FnCLI⁺ e FnMET⁺ além da FnPAR, para a análise do custo de *fitness* bacteriano.

Para avaliar o custo adaptativo associado à presença dos antimicrobianos, foi determinada a taxa de crescimento e o tempo de geração, padrões frequentemente usados para mensurar os custos de *fitness* associados com a resistência aos antimicrobianos (POPE et al., 2010). As linhagens obtidas por cultivo em β -lactâmicos (FnAMP⁺, FnAMS⁺, FnPTZ⁺) apresentaram um padrão de crescimento mais

semelhante à FnPAR. Porém, as linhagens obtidas por cultivo em metronidazol (FnMET⁺) e clindamicina (FnCLI⁺) aumentaram o tempo de geração em 196% e 238%, respectivamente, apresentando, portanto, um alto custo de *fitness*.

Existe uma correlação entre o aumento na frequência de mutações e o desenvolvimento de resistência (LECLERC et al., 1996; GUSTAFSSON et al., 2003). E, acredita-se que bactérias mutantes são capazes de compensar mais rapidamente os custos de *fitness*, associado frequentemente com a resistência a antimicrobianos, resultando na manutenção da resistência mesmo na ausência da pressão seletiva dos antimicrobianos (PERRON et al., 2010; ABDELRAOUF et al., 2011). Estas observações estão de acordo com os resultados deste estudo, em que as linhagens derivadas obtidas pelo cultivo em CSI de antimicrobianos e após o cultivo sem antimicrobianos apresentaram alta porcentagem de polimorfismos e diminuição na sensibilidade para vários antimicrobianos.

Abdelraouf et al. (2011) associaram mutações de resistência com o aumento no custo de *fitness* e uma redução na virulência em *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos em *Salmonella typhimurium* também mostraram que os mutantes multirresistentes foram avirulentos em camundongos. No entanto, os mutantes resistentes avirulentos rapidamente acumularam mutações compensatórias que restauraram a virulência e o *fitness*, sem perda da resistência aos antimicrobianos (BJORKMAN, HUGHES e ANDERSSON, 1998).

A compensação de *fitness* pode ser adquirida através de vários mecanismos, e permite a sobrevivência de bactérias com mutações de resistência (ANDERSSON e HUGHES, 2010). Mutações compensatórias poderiam, por exemplo, agir para restaurar a eficiência de uma função afetada por mutações de resistência (BJORKMAN, HUGHES e ANDERSSON, 1998; SANDER et al, 2002), resultar em uma reversão para o genótipo selvagem (WOLTER et al., 2006) ou alteração da adequação do fenótipo de resistência através da amplificação gênica (NILSSON et al., 2006).

As modificações no perfil de acúmulo protéico sugerem que as alterações observadas estão relacionadas com eventos associados à regulação de expressão gênica. Contudo, não podemos descartar a interferência de mutações, uma vez que polimorfismos foram detectados no DNA de todas as linhagens e que, mesmo no cultivo sem antimicrobianos, as linhagens derivadas apresentaram características bioquímicas, fisiológicas e moleculares alteradas em relação à FnPAR.

A identificação e classificação bacteriana levam em consideração características morfológicas, bioquímico-fisiológicas e, mais recentemente, métodos moleculares foram desenvolvidos para auxiliar a identificação e investigação epidemiológica (WILLIAMS et al., 1990). Portanto, as alterações nas características morfológicas, bioquímico-fisiológicas e mesmo moleculares, induzidas por CSI de diversos antimicrobianos, podem também prejudicar o diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento de uma infecção por *F. nucleatum* e outros microrganismos, como sugerido por outros estudos.

6.4 Considerações finais

Com base nos resultados apresentados, observa-se que as concentrações subinibitórias de antimicrobianos de diversas classes – os β -lactâmicos ampicilina, ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam; a lincosamida clindamicina; o cloranfenicol; a fluoroquinolona levofloxacina; e o derivado nitroimidazólico metronidazol - foram capazes de interferir com características bioquímicas, fisiológicas e moleculares de *F. nucleatum*. Estas alterações podem ter reflexo no potencial patogênico e interferir com a relação bactéria-hospedeiro. Portanto, estes resultados alertam para o risco de antibioticoterapias, principalmente as inadequadas, que podem ter sérias implicações para a microbiologia clínica e a terapêutica de doenças infecciosas.

Assim, faz-se importante o aprofundamento desta linha de pesquisa para o esclarecimento de outras questões, como: a identificação das proteínas diferencialmente expressas e das mutações no DNA bacteriano induzidas por CSI de antimicrobianos, o que pode contribuir para o entendimento da resposta bacteriana à pressão exercida pelas drogas antimicrobianas; e, ainda, a avaliação de alterações na interação bactéria-hospedeiro e as conseqüências da antibioticoterapia inadequada para o hospedeiro.

7 CONCLUSÕES

- A exposição *in vitro* a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina-tazobactam interfere com o perfil de susceptibilidade de *F. nucleatum* ATCC 25586 a outros antimicrobianos e modulam habilidades microbianas;
- Alterações morfológicas e na complexidade celular são observadas em linhagem *F. nucleatum* ATCC 25586 após exposição, *in vitro*, a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam e piperacilina-tazobactam, contudo, parte das células mantém a estrutura normal;
- A exposição *in vitro* a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina-tazobactam induz alterações nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos, como assimilação de carboidratos e a atividade de enzimas, em *F. nucleatum* ATCC 25586;
- A formação de biofilmes bacterianos por *F. nucleatum* ATCC 25586 é influenciada negativamente por concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam e piperacilina-tazobactam, enquanto que concentrações subinibitórias de clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina e metronidazol influenciam positivamente a formação de biofilme por esta linhagem bacteriana;
- O custo de *fitness* bacteriano é afetado por concentrações subinibitórias de clindamicina e metronidazol, que pode ser visualizado pela alteração no tempo de geração e na curva de crescimento de *F. nucleatum* ATCC 25586 após exposição aos antimicrobianos.
- A exposição a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina-tazobactam induz alteração nos padrões de expressão protéica em *F. nucleatum* ATCC 25586.
- A exposição a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina, cloranfenicol, levofloxacina, metronidazol e piperacilina-tazobactam induz alterações polimórficas em seu genoma de *F. nucleatum* ATCC 25586.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAOUF, K.; KABBARA, S.; LEDESMA, K.R.; POOLE, K.; TAM, V.H. 2011. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **66** (6): 1311-1317.
- ADAMS, H.W.; JENNEY Jr., F.E.; CLAY, M.D.; JOHNSON, M.K. 2002. Superoxide reductase: fact or fiction? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **7** (6):647-652.
- AGERSO, Y.; PETERSEN, A. 2007. The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sulII* are common among resistant *Acinetobacter spp.* isolated from integrated fish farms in Thailand. **Journal of Antimicrob Chemotherapy**, **59**:23–27.
- ALLEN, L.A. 2003. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. **Microbes and Infection**, **5**:1329-1335.
- ANDERSSON, D.I., 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, **6**:452-456.
- ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, **8**: 260–71.
- ANDRADE, J. P. 2010. **Efeito de concentração subinibitória de piperacilina-tazobactam na morfologia e fisiologia de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil. 127f.
- ASM - American Society for Microbiology. 2009. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. **American Academy of Microbiology**. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- AVILA-CAMPOS, M.J., SACCHI, C.T., WHITNEY, A.M., STEIGERWALT, A.G. AND MAYER, L.W. 1999. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Periodontology**, **70**:1202-1208.
- BAKKEN, V.; AARO, S.; HOFSTAD, T.; VASSTRAND, E. N. 1989. Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **47**:473–484.
- BANDOW, J.E.; BROTZ, H.; LEICHERT, L.I.; LABISCHINSKI, H.; HECKER, M.. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **47**:948-955.
- BARTOLD, P. M.; GULLY, N. J.; ZILM, P. S.; ROGERS, A. H. 1991. Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. **Journal of Periodontal Research**, **26**:314–322.
- BENZ, R. 1994. Uptake of solutes through bacterial outer membranes, p. 397–423. *In* J.-M. Ghuisen and R. Hackenbeck (ed.), **Bacterial Cell Wall**, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- BJORKMAN, J.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D.I. 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, **95**: 3949–53.

- BOLSTAD, A. I.; TOMMASSEN, J.; JENSEN, H. B. 1994. Sequence variability of the 40-kDa outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum* and a model for the topology of the proteins. **Molecular and General Genetics**, **244**,104–110.
- BOLSTAD, A.I.; JENSEN, H.B.; BAKKEN, V. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clinical Microbiology Reviews**, **9** (1):55-71.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254.
- BRAZAS, M.D.; HANCOCK, R.E. 2005.Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. **Drug Discov Today**, **10**:1245-1252,
- BROOK, I.; FRAZIER, E.H. 1997. The aerobic and anaerobic bacteriology of perirectal abscesses. **Journal of Clinical Microbiology**, **35** (11):2974-2976.
- BUIJS, J.; DOFFERHOFF, A. S. M.; MOUTON, J. W.; WAGENVOORT, J. H. T.; VAN DER MEER, J. W. M. 2008. Concentration-dependency of β -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **14**:344-349.
- CABELLO, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, **8**:1137–1144.
- CANDELA, T.; MOYA, M.; HAUSTANT, M.; FOUET, A. 2009. *Fusobacterium nucleatum*, the first Gram negative bacterium demonstrated to produce polyglutamate. **Canadian Journal of Microbiology**, **55**: 627–632.
- CANDONI A, FILI C, TREVISAN R, SILVESTRI F, FANIN R. 2003. *Fusobacterium nucleatum*: A rare cause of bacteremia in neutropenic patients with leukemia and lymphoma. **Clinical Microbiology and Infection**, **9**:1112-1115.
- CASTRO, D.; RUIZ, J.; SANTAMARIA, J.; VILA, J.; BOREGO. 1997. Mecanismos de resistência a quinolonas em cepas de *Salmonella typhimurium* strains. **Ars Pharmae**, **38**:63-69.
- CHEN, K.; SUN, G. W.; CHUA, K. L.; GAN, Y. H. 2005. Modified virulence of antibiotic-induced Burkholderia pseudomallei filaments. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **49**:1002–1009.
- CITRON, D.M. 2002. Update on taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. **Clinical Infectious Diseases**, **35** (1):S22-S27.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for Antimicrobial Susceptibility Tests for Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Seventh Edition. **CLSI document M11-A7**, Wayne, Pennsylvania, USA.
- COHEN, S. P.; MCMURRAY, L. M.; LEVY, S. B. 1988. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **170**:5416–5422.
- CONRADS, G.; CITRON, D.M.; GOLDSTEIN, E.J.C.. 2005. Genetic determinant of intrinsic quinolone resistance in *Fusobacterium canifelinum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **49**:434-437.
- COULIBALLY, G.; TOURAINÉ, F.; CLAVEL, M.; DENIS, F.; MELLONI, B.; BONNAUD, F. 1997. Pulmonary infection caused by *F. nucleatum*. **Rev Mal Resp**, **14** (5):397-398.
- CRUZ, C. D. 2006. Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes. 1. ed. Viçosa: Editora UFV: 1. 285 p.

- CRUZ, C. D. 2008. Programa Genes - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 278 p.
- CUCHURAL, G.J. JR. E TALLY, F.P. 1986. *Bacteroides fragilis*: current susceptibilities, mechanisms of drug resistance, and principles of antimicrobial therapy. **Drug Intelligence and Clinical Pharmacy**, **20** (7-8):567-573.
- DAVIES, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiologia SEM**, **12**:9-16.
- DAVISON, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, **42**:73-91.
- DEHAZYA, P.; COLES, R. S., JR. 1980. Agglutination of human erythrocytes by *Fusobacterium nucleatum*: factors influencing hemagglutination and some characteristics of the agglutinin. **Journal of Bacteriology**, **143**:205–211.
- DEMUTH, D. R.; SAVARY, R.; GOLUB, E.; SHENKER, B. J. 1996. Identification and analysis of *fipA*, a *Fusobacterium nucleatum* immunosuppressive factor gene. **Infection and Immunity**, **64**:1335–1341.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**, **449**:811–818.
- DIARRA, M. S.; PETITCLERC, D., LACASSE, P. 2002. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, **85**:1141-1149.
- DICKSCHAT, J. S. 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. **Natural Product Reports**, **27**: 343-69.
- DINIZ, C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M. 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes and Infection**, **5** (1):19-26.
- DINIZ, C.G.; SANTOS, S.G.; PESTANA, A.C.N.R.; FARIAS, L.M. E CARVALHO, M.A.R. 2000. Chromosomal breakage in the *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment. **Anaerobe**, **6**:149-153.
- DONLAN, R.M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, **Clinical Infection Disease**, **33**:1387-1392.
- ECKBURG, P. B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, E.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, **308**, 1635–1638.
- EDWARDS, D. I. 1993. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **31**:9–20.
- EFTIMIADI, C.; STASHENKO, P.; TONETTI, M.; MANGIANTE, P.E.; MASSARA, R.; ZUPO, S.; FERRARINI, M. 1991. Divergent effect of the anaerobic bacteria by-product butyric acid on the immune response: suppression of T-lymphocyte proliferation and stimulation of interleukin-1 beta production. **Oral Microbiology and Immunology**, **6**:17-23.
- ELLIE, J.C.; GOLDSTEIN, M.D.; CITRON, D.M. 2011. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part II. **Clinical Microbiology Newsletter**, **32**:2.
- ENGELKIRK, P.G.; ENGELKIRK, J.D.; DOWELL Jr., V.R. 1992. Clinical Anaerobic Bacteriology. **Belmont: Star Publishing Company**, 462p.

- EUZÉBY, J.P.. 2011. Genus *Fusobacterium*. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/f/fusobacterium.html>. Acesso em: 07 nov. 2011.
- FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**:1157–1170.
- FALKLER, W. A. JR.; SMOOT, C. N.; MONGIELLO, J. R. 1982. Attachment of cell fragments of *Fusobacterium nucleatum* to oral epithelial cells, gingival fibroblasts and white blood cells. **Archives of Oral Biology**, **27**:553–559.
- FALKLER, W. A. JR.; LAI, R.; VINCENT, J. W.; DOBER, L.; SPIEGEL, C.; HAYDUK, S. 1982. The ELISA system for measuring antibody reactive to *Fusobacterium nucleatum* in the sera of patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, **53**:762–766.
- FALKLER, W. A., JR.; CLAYMAN, E. B.; SHAEFER, D. F. 1983. Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, **28**:735–739.
- FAO/OIE/WHO. 2003. **Report of a Joint FAO/OIE/WHO**, expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. Switzerland.
- FAO/OIE/WHO. 2006. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. **Report of a Joint FAO/OIE/WHO**, expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Republic of Korea.
- FINEGOLD, S. M. 1995. Anaerobic infections in humans: an overview. **Anaerobe**, 1:3-9.
- FINEGOLD, S. M.; H. M. WEXLER. 1988. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **32**:611–616.
- FINEGOLD, S.M. 1990. Anaerobes: problems and controversies in bacteriology, infections and susceptibility testing. **Reviews Infectious Diseases**, **12**:223-230.
- FONSECA, A.P; EXTREMINA C.; FONSECA A. F.; SOUSA J. C. 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, **53**:903-910.
- FREIBERG, C.; BROTZ-OESTERHELT, H.; LABISCHINSKI, H. 2004. The impact of transcriptome and proteome analyses on antibiotic drug discovery. **Current Opinion in Microbiology**, **7**:451-459.
- GAL, M.; BRAZIER, J.S.. 2004. Metronidazole resistance in *Bacteroides spp.* carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **54**:109-116.
- GARCIA, L. B.; FONSECA, M. E.; BENCHETRIT, L. C. 2004. Effect of penicillin on surface carbohydrate, hemolysin and morphology of *Streptococcus pyogenes* during and after the post-antibiotic phase. **Journal of Chemotherapy**, **16**:28-33.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. 2004. **Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., New York: Springer, p. 320-321.
- GEMMELL, C.G. 1988. The prevalence of *in vitro* measurements of opsonophagocytosis to the study of antibiotic-PMN-bacterium interactions *in vivo*. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, **14**:735-740.

- GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. 1992. Different responses in B cells induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Archives of Oral Biology**, **37**:565–573.
- GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. 1993. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Periodontal Research**, **28**:122–129.
- GEORGE, K.S.; REYNOLDS, M.A.; FALKLER, W.A. JR. 1997. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting and clonal analysis of oral *Fusobacterium nucleatum* isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, **12**:219-226.
- GHARBIA, S. E., H. N. SHAH, P. A. LAWSON, AND M. HAAPASALO. 1990. The distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. **Oral Microbiology and Immunology**, **5**:324–327.
- GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N. 1988. Glucose utilization and growth responses to protein hydrolysates by *Fusobacterium* species. **Current Microbiology**, **17**:229-234.
- GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N. 1991. Pathways of glutamate catabolism among *Fusobacterium* species. **Journal of General Microbiology**, **137** (5):1201-1206.
- GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHOF, H. E WECKE J. 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62** (4):1371-1414.
- GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R.T.; ECKBURG, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I.; RELMAN, D.A.; FRASER-LIGGETT, C.M.; NELSON, K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, **312**, 1355–1359.
- GOLDSTEIN, C.J.E. 1999. Clinical anaerobic infections. **Anaerobe**, **5**, p.347-350.
- GOLDSTEIN, E. J.; P. H. SUMMANEN; D. M. CITRON; M. H. ROSOVE; S. M. FINEGOLD. 1995. Fatal sepsis due to a β -lactamase-producing strain of *Fusobacterium nucleatum* subspecies *polymorphum*. **Clinical Infectious Diseases**, **20**:797–800.
- GOODMAN, L.S; GILMAN, A. 2001. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 10ª edição.
- GUNSOLLEY, J. C.; TEW, J. G.; GOOSS, C.; MARSHALL, D. R.; BURMEISTER, J. A.; H. SCHENKEIN, A. 1990. Serum antibodies to periodontal bacteria. **Journal of Periodontology** **61**:412–419.
- GUSTAFSSON, I.; SJOLUND, M.; TORELL, E.; JOHANNESSON, M.; ENGSTRAND, L.; CARL, O.; ANDERSSON, D.I. 2003. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enriched in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**(4):645-50.
- HAAKE, S. K.; LINDMANN, R. A. 1997. *Fusobacterium nucleatum* T18 aggregates human mononuclear cells and inhibits their PHA-stimulated proliferation. **Journal of Periodontology** **68**:39–44.
- HAMADA, S.; KOGA, T.; NISHIHARA, T.; FUJIWARA, T.; OKAHASHI, N. 1988. Characterization and immunobiologic activities of lipopolysaccharides from periodontal bacteria. **Advances in Dental Research**, **2**:284–291.
- HARALDSSON G., HOLBROOK, W.P. AND KÖNÖNEN, 2004. E. Clonal similarity of salivary and nasopharyngeal *Fusobacterium nucleatum* in infants with acute otitis media experience. **Journal of Medical Microbiology**, **53**:161-165.
- HARBARTH, S.; SAMORE, M.H. 2005. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerging Infectious Disease**, **11**:794-801.

- HECHT, D. W. 2004. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. **Clinical Infectious Diseases**, **39**: 92-97.
- HENTGES, D.J. 1993. The anaerobic microflora of the human body. **Clinical Infectious Diseases**, **16**, 175-80.
- HOEPELMAN, A. I. M.; TUOMANEN, E. I. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. **Infection and Immunity**, **60**:1729–1733.
- HOFSTAD, T.; SKAUG, N.; SVEEN, K. 1993. Stimulation of B lymphocytes by lipopolysaccharides from anaerobic bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, **16**(4):200–202.
- HOLT, S. C.; BRAMANTI, T. E. 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, **2**:177–281.
- HOOPER, L. V. 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends Microbiology**, **12**:129–134.
- HOOPER, L. V., BRY, L., FALK, P. G., GORDON, J. I. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **BioEssays**. **20**: 336 – 343
- HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. 2001. Commensal host–bacterial relationships in the gut. **Science**, **292**:1115–1118.
- HORIBA, N.; MAEKAWA, Y.; YAMAUCHI, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. 1992. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, **74**:648–651.
- HUGGAN, P.J.; MURDOCH, D.R. 2008. Fusobacterial infections: Clinical spectrum and incidence of invasive disease. **Journal of Infection**, **57**:283-289.
- HUTTER, B.; SCHAAB, C.; ALBRECHT, S.; BORGMANN, M.; BRUNNER, N.A.; FREIBERG, C.; ZIEGELBAUER, K.; ROCK, C.O.; IVANOV, I.; LOFERER, H. 2004. Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**:2838-2844.
- IMLAY, J.A. 2002. What biological purpose is served by superoxide reductase? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **7**:659-663.
- INAGAKI, H.; SUZUKI, T.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. 1996. Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation. **Infection and Immunity**, **64**:3280–3287.
- JANG, S.S.; HIRSH, D.C. 1994. Characterization, distribution, and microbiological associations of *Fusobacterium* spp. in clinical specimens of animal origin. **Journal of Clinical Microbiology**, **32** (2):384-387.
- JEWETT, A.; HUME, W.R.; LE, H.; HUYNH, T.N.; HAN, Y.W.; CHENG, G.; SHI, W. 2000. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. **Infection and Immunity**, **68**:1893-1898.
- JÜRGENS, K.; MATZ, C. 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, **81**:413-434.
- JUSTICE, S. S.; HUNSTAD, D. A.; LYNETTE, C.; HULTGREN, S. J. 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. **Nature Reviews Microbiology**, **6**.

- KAI A, COOKE F, ANTOUN N, SIDDHARTHAN C, SULE O. 2008. A rare presentation of ventriculitis and brain abscess caused by *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Medical Microbiology**, **57**:668-671.
- KAPATRAL ,V.; ANDERSON,I.; IVANOVA, N.; REZNIK, G.; LOS, T.; LYKIDIS,A.; BHATTACHARYYA, A.; BARTMAN, A.; GARDNER, W.; GRECHKIN, G.; ZHU,L.; VASIEVA, O.; CHU, L.; KOGAN, Y.; CHAGA, O.; GOLTSMAN, E.; BERNAL, A.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; WALUNAS, T.; PUSCH, G.; HASELKORN,R.; FONSTEIN, M.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R.. 2002. Genome Sequence and Analysis of the Oral Bacterium *Fusobacterium nucleatum* Strain ATCC 25586. **Journal of Bacteriology**, **184**:7 p.2005–2018.
- KAPLAN, C.W.; LUX, R.; HUYNH, T.; JEWETT, A.; SHI, W.; KINDER HAAKE, S. 2005. *Fusobacterium nucleatum* Apoptosis-inducing Outer Membrane Protein. **Journal of Dental Research**, **84**:700.
- KINDER, S. A.; HOLT, S. C. 1993. Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. **Journal of Bacteriology**, **175**:840–850.
- KLEMPNER M.S. 1984. Interactions of polymorphonuclear leukocytes with anaerobic bacteria. **Reviews of Infectious Diseases**, **6** (1):40-44.
- KOLENBRANDER, P. E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annual Reviews of Microbiology**, **42**:627–656.
- KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, **175**:3247–3252.
- KÖNÖNEN, E.; KANERVO, A.; TAKALA, A.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. 1999. Establishment of oral anaerobic microflora during the first year of life. **Journal of Dental Research**, **78**:1634–9.
- KULEKÇI, G.; CIFTCI, S.; KESKIN, F.; KILIC, A.O.; TURKOGLU, S.; BADUR, S.; DEVELIOGLU, O.N.; LEBLEBICIOGLU, B.; KÜLEKÇI, M. (2001) PCR analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum* in middle ear effusion. **Anaerobe**, **7**:241–246.
- KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **57**:1486–1513.
- KURTZ Jr, D.M. 2004. Microbial detoxification of superoxide: the non-heme iron reductive paradigm for combating oxidative stress. **Accounts of Chemical Research**, **37** (11):902-908.
- LAMBERT, P. A. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **57**:1471–1485.
- LAMP, K.C.; FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LACY, M.K. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials, **Clinical Pharmacokinetics**, **36**:353–373.
- LANDSAAT, P.M.; VAN DE LELIE, H.; BONGAERTS, G.; KUIJPER, E.J. 1995. *Fusobacterium nucleatum*, a new invasive pathogen in neutropenic patients? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, **27** (1):83-84.
- LANDUCCI, L. F.; KATO, M. T.; GAETTI-JARDIM, E. C.; GAETTI-JARDIM JR, E. 2003. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials of virulence factors of *Fusobacterium nucleatum* isolates recovered from necrotic pulp. **Jornal Brasileiro de Endodontia**, **4** (15):333-338.

- LECLERC, J.; LI, E.B.; PAYNE, W.L.; CEBULA, T.A. 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. **Science**, **274**:1208-1211.
- LEVY, S. B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, **278** (3):32-39.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, **124**:837–848.
- LINARES-RODRIGUEZ, J.F.; MARTINEZ-MENENDEZ, J.L. 2005. Resistència a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, **23**:86-93.
- LIU, Y. F.; WANG, C. H.; JANAPATLA, R. P.; FU, H. MEI.; WU, H. M.; WU, J. J. 2007. Presence of plasmid pA15 correlates with prevalence of constitutive MLSB resistance in group A streptococcal isolates at a university hospital in southern Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **59**:1167–1170.
- LÖFMARK, S.; JERNBERG, C.; JANSSON, J. K.; EDLUND, C. 2006. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. **58**:1160-1167.
- LONDON, J. 1991. Bacterial adhesins. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, **26**:239–247.
- LORIAN, V.; GEMMELL, C.G. 1991. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses, p. 493-555. In V Lorian, **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, Baltimore.
- LOVE, W. E.; ZACCHEO, M. V. 2006. Lemierre's syndrome: More judicious antibiotic prescribing habits may lead to the clinical reappearance of this often forgotten disease. **American Journal of Medicine**, **119**:e7-e9.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, **4**:478–485.
- MAIER, B. R.; HENTGES, D. J. 1972. Experimental *Shigella* infections in laboratory animals. I. Antagonism by human normal flora components in gnotobiotic mice. **Infection and Immunity**, **6**, 168–173.
- MANGAN, D. F.; WON, T.; LOPATIN, D. E. 1983. Nonspecific induction of immunoglobulin M antibodies to periodontal disease-associated microorganisms after polyclonal human B-lymphocyte activation by *Fusobacterium nucleatum*. **Infection and Immunity**, **41**:1038–1045.
- MANGAN, D. F.; WON, T.; LOPATIN, D. E. 1984. Monocyte suppression of *Fusobacterium nucleatum*-induced human polyclonal B-lymphocyte activation. **Infection and Immunity**, **46**:332–339.
- MAXWELL, A. 1992. The Molecular basic of quinolone action. **Journal of Antimicrobial Chemotherap.** **30**:409-416.
- MAZMANIAN, S.; LIU, C.; TZIANABOS, A.; KASPER, D. 2005. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, **122**:107-118.
- MCGOWAN, J.E. JR; TENOVER, F.C. 2004. Confronting bacterial resistance in healthcare settings: a crucial role for microbiologists. **Nature Reviews Microbiology**, **2**:251-8.
- MCPHEARSON, R. M.; DEPAOLA, A.; ZYWNO, S. R.; MOTES, M. L. J.; GUARINO, A. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**. 99, p.203-211.

- MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **Science of the Total Environment**, **293**:207-218.
- MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V.; KELLEY, R. W. 1984. Genus II. *Fusobacterium* Knorr 1922, 4AL, p. 631–637. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, **1**. Williams and Wilkins, Baltimore.
- MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. 1994. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000** **5**:66–77.
- MOOSDEEN, F.; WILLIAMS, J. D.; YAMABE, S. 1988. Antibacterial Characteristics of YTR 830, a Sulfone 3-Lactamase Inhibitor, Compared with Those of Clavulanic Acid and Sulbactam. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, **32**: 925-927.
- MOREAU, M. C.; DUCLUZEAU, R.; GUY-GRAND, D.; MULLER, M. C. 1978. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. **Infection and Immunity**, **21**:532–539.
- NAITO, Y.; OKUDA, K.; TAKAZOE, I. 1984. Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. **Infection and Immunity**, **45**:47–51.
- NARDI, R. M.; SILVA, M. E.; VIEIRA, E. C.; BAMBIRRA, E. A.; NICOLI, J. R. 1989. Intragastic infection of germfree and conventional mice with *Salmonella typhimurium*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **22**:1389–1392.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standard. Reference agar dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria approved standard. **NCCLS document M-11 A**. Villanova, Pa, 1995.
- NILSSON, A.I.; ZORZET, A.; KANTH, A; DAHLSTRÖM, S.; BERG, O.G.; ANDERSSON, D.I. 2006. Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, **103**: 6976–81.
- NIVIÈRE, V.; FONTECAVE, V. 2004. Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **9**:119-123.
- NORMARK, B.H.; NORMARK, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, **252**, p.91-106,
- NOSANCHUK, J. D.; CLEARE, W.; FRANZOT, S. P.; CASADEVALL, A. 1999. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**:233-239.
- NOVAES, A.B.; DE UZEDA, M.; FONSECA, M.E.F. E FEITOSA, A.C.R. 1991. The effect of subinhibitory concentrations of metronidazole and tetracycline on the ultrastructure of periodontopathic bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **28**:151-154.
- NYFORS, S.; KÖNÖNEN, E.; SYRJÄNEN, R.; KOMULAINEN, E.; JOUSIMIES-SOMER, H. 2003. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **51**, 107–112.
- O'BRIEN, T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of Antimicrobial resistance: how use of an Antimicrobial anywhere can increase resistance to any Antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Disease**, **34**(3):78-84.

- ODELSON, D.A.; RASMUSSEN, J.L.; SMITH C.J. E MACRINA F.L. 1987. Extrachromosomal systems and gene transmission in anaerobic bacteria. **Plasmid**, **17**, p.87-109.
- OKAMOTO, Ana C.; GAETTI-JARDIM JR., Elerson; ARANA-CHAVEZ, Victor E. e AVILA-CAMPOS, Mario J. 2002. Influência de concentrações subinibitórias de antimicrobianos na hidrofobicidade, aderência e ultraestrutura de *Fusobacterium nucleatum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **33** (2):178-184.
- OZAKI, M.; MIYAKE, Y.; SHIRAKAWA, M.; TAKEMOTO, T.; OKAMOTO, H.; SUGINAKA, H. 1990. Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. **Journal of Periodontal Research**, **25**:129–134.
- PALMER, R. J. JR; KAZMERZAK, K.; HANSEN, M. C.; KOLENBRANDER, P. E. 2001. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms *in vitro* using saliva as the sole nutrient source. **Infection and Immunity**, **69**:5794–5804.
- PATEL, A. P.; JACOB, J.; WEHBI, M.; OBIDEEN, K. 2007. *Fusobacterium nucleatum*: An Uncommon Cause of Pyogenic Liver Abscess. **American Journal of Gastroenterology**, **102**, n S2.
- PERIASAMY, S.; KOLENBRANDER, P. E. 2009. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Builds Mutualistic Biofilm Communities with *Fusobacterium nucleatum* and Veillonella Species in Saliva. **Infection and Immunity**, **77** (9):3542–3551.
- PERRON, G.G. ; HALL, A.R. ; BUCKLING, A. 2010. Hypermutability and Compensatory Adaptation in Antibiotic-Resistant Bacteria. University of Chicago Press. **The American Naturalist**, **176**(3):303-311.
- PETERSON, D. A.; FRANK, D. N.; PACE, N. R.; GORDON, J. I. 2008. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Cell Host Microbe**, **3**:417–427.
- POPE, C.F.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. 2010. Methods to Determine Fitness in Bacteria. **Antibiotic Resistance Protocols: Methods in Molecular Biology**, **642**(3):113-121.
- POULET, P. P.; DUFFAUT, D.; LODTER, J. P.. 1999. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, **26**:261–263.
- PRUDHOMME, M.; ATTAIECH, L.; SANCHEZ, G.; MARTIN, B.; CLAVERYYS, J.P. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. **Science**, **313**:89-92.
- RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, J.M.; FLOWER, K.J. 2007. Farmacologia. 5° ed. Elsevier: Rio de Janeiro.
- RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. 2000. Distribution of oxytetracycline plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, **66** (9):3883-3890.
- ROSENBERGER, C. M. e FINLAY, B. B. 2002. Macrophages inhibit Salmonella typhimurium replication through MEK/ERK kinase and phagocyte NADPH oxidase activities. **Journal of Biological Chemistry**, **277**:18753–18762.

- ROSSANO, F.; RIZZO, A.; SANGNES, M. R.; CIPOLLARO DE L'ERO, G.; TUFANO, M. A. 1993. Human monocytes and gingival fibroblasts release TNF- α , IL-1 α and IL-6 in response to particulate and soluble fractions of *Prevotella melaninogenica* and *Fusobacterium nucleatum*. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, **23**:165–168.
- ROTHFIELD, L.; JUSTICE, S.; GARCIA-LARA, J. 1999. Bacterial cell division. **Annual Review of Genetics**, **33**, 423–448.
- ROTSTEIN, O.D.; PRUETT, T.L.; SORENSON, J.J.; FIEGEL, V.D.; NELSON, R.D.; SIMMONS, R.L. 1986. A *Bacteroides* by-product inhibits human PMN's function. **Archives of Surgery**, **121**:81-88.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, **9**:313-323.
- SANDER, P.; SPRINGER, B.; PRAMMANANAN, T.; STURMFELS, A.; KAPPLER, M.; PLETSCHETTE, M.; BÖTTGER, E.C. 2002. Fitness Cost of Chromosomal Drug Resistance-Confering Mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**(5):1204-1211.
- SANTOS, K. V.; DINIZ, C.G.; VELOSO, L.C.; ANDRADE, H.M.; GIUSTA, M.S.; PIRES, S.F.; SANTOS, A.V.; APOLÔNIO, A.C.M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M. 2010. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. **Research in Microbiology**, **161**:268-275
- SANTOS, S.G.; DINIZ, C.G.; SILVA, V.L.; SOUZA, N.C.; CARVALHO, M.A.R. E FARIAS, L.M. 2007. The influence of molecular oxygen exposure on the biology of *Prevotella intermedia*, with emphasis on its antibiotic susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**, **103**:882-891,
- SAWAI, T., HIRUMA, R.; KAWANA, N.; KANEKO, N.; TANIYASU, F.; INAMI, A. 1982. Outer membrane permeation of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **22**:585–592.
- SCHLUNZEN, F.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; BASHAN, A.; TOCILJ, A.; ALBRECHT, R.; YONATH, A.; FRANCESCHI, F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, **413**:814-821.
- SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, **67** (12):5675-5692.
- SHARMA, R.; YOUNG, C.; NEU, J. 2010. Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 1-15.
- SHENKER, B. J.; DIRIENZO, J. M. 1984. Suppression of human peripheral blood lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Immunology**, **132**:2357–2362.
- SHIH, D. Q.; TARGAN, S. R. 2008. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, **21**:390-400.
- SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; CARA, D.C.; SANTOS, S.G.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M. 2005. Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. **Microbial Pathogenesis**, **39** (4):131-138.
- SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; SANTOS, S.G.; GOMES R. M. F.; MAGALHÃES, P.P.; MENDES, E.N.; CARVALHO, M.A.R. E FARIAS, L.M. 2007. Physiological alterations of

- a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **Journal of Applied Microbiology**, **103**: 20-26.
- SILVESTRO, E.M.; NAKANO, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; MARQUES, M.V.; AVILA-CAMPOS, M. J. 2006. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiology Letters**, **257**:189-194.
- SINGER, R. E.; BUCKNER, B. A. 1981. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. **Infection and Immunity**, **32**:458–463.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT Jr, R. L. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, **25** (2):134-144.
- SONG, Y. 2005. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. **Anaerobe**, **11**:79–91.
- SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, **5**:387–399.
- STORTEBOOM, H.; ARABI, M.; DAVIS, J.G.; CRIMI, B.; PRUDEN, A. 2010. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. **Environmental Science & Technology**, **44**:1947–1953.
- SU, C.P.; HUANG, P.Y.; YANG, C.C.; LEE, M.H. 2009. *Fusobacterium* bacteremia: clinical significance and outcomes. **Journal Microbiol Immunol Infect.**, **42**:336-342
- SUMMANEN, P. 1995. Microbiology terminology update: clinically significant anaerobic Gram-positive and Gram-negative bacteria (excluding spirochetes). **Clinical Infectious Diseases**, **21** (2):273-276.
- SYED, M.D.; BARING, D.; ADDIDLE, M.; MURRAY, C.; ADAMS, C. 2007. Lemierre's syndrome: two cases and a review. **Laryngoscope**, **117**:1605-10.
- TAIT, S. 1993. Mobile genetic elements in antibiotic resistance. **Journal of Medical Microbiology**, **38**:157-159.
- TAKAHATA, M. E NISHINO, T. 1997. Antibacterial activities of tosufloxacin against anaerobic bacteria and the electron micrograph of its bactericidal effects. **Chemotherapy**, **43**:153-158.
- TANG, C. M.; MOXON, E. R. 2001. The impact of microbial genomics on Antimicrobial drug development. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, **2**:259-269.
- TANNOCK, G.W. 1988. The normal microflora: new concepts in health promotion. **Microbiology Science**, **5**:4-8.
- TEUBER, M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, **4**:493-499.
- TONETTI, M.; CAVALLERO, A.; BOTTA, G.A.; NIEDERMAN, R.; EFTIMIADI, C. 1991. Intracellular pH regulates the production of different oxygen metabolites in neutrophils: effects of organic acids produced by anaerobic bacteria. **Journal of Leukocyte Biology**, **49** (2):80-188.
- TULASNE K.; VENDRELY, R. 1948. Cytology Of Staphylococci Before And After Treatment With Penicillin. **Nature**, **161**:316-317.
- TUNER, K.; BARON, E. J.; SUMMANEN, P.; FINEGOLD, S. M. 1992. Cellular fatty acids in *Fusobacterium* spp. as a tool for identification. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**:3225–3229.

- VAN DEN BROEK, P.J. 1989. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. **Reviews of Infectious Diseases**, **11**:213-245.
- VOHA, C.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; FOSSE, T. 2006. Genetic and Biochemical Characterization of FUS-1 (OXA-85), a Narrow-Spectrum Class D β -Lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50** (8):2673–2679.
- VOLLAARD, E.J. E CLASENER, H.A.L. 1994. Colonization and resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **38** (3):409-414.
- WEISS, E.I.; SHANIZTKI, B.; DOTAN, M.; GANESSHKUMAR, N.; KOLENBRANDER, P.E.; METZGER, Z. 2000. Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactosebinding adhesin. **Oral Microbiology and Immunology**, **15**:371-377.
- WHITTLE, G.; SHOEMAKER, N.B.; SALYERS, A.A. 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **59**:2044-2054.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. **Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**. Switzerland.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. E TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18** (22):6531-6535.
- WITTE, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **Int Journal of Antimicrobial Agents**, **14**:321-325.
- WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M.E.; WOLCOTT, B.M.; GOGOKHIA L.; COSTERTON J.W.; DOWD, S. E. 2010. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **Journal of Wound Care**, **19**:45-53.
- WOLTER, N.; SMITH, A.M.; FARRELL, D.J.; KLUGMAN, K. P. 2006. Heterogeneous macrolide resistance and gene conversion in the pneumococcus. **Antimicrob Agents Chemother**, **50**: 359–61.
- WRIGHT, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**. **5**:175–186.
- WRIGHT, G. D.. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **57**, p.1451–1470.
- XIE, H.; GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. 1991. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. **Oral Microbiology and Immunology**, **6**:257–263.
- YOSHIMURA, A.; HARA, Y.; KANEKO, T.; KATO, I. 1997. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. **Journal of Periodontal Research**, **32** (3):279-286.

Anexo A – Peso em kDa do perfil de acúmulo protéico da linhagem *F. nucleatum* ATCC 25586 (FnPAR) e das linhagens selecionadas pela exposição às CSI de antimicrobianos (+) e após o cultivo sem antimicrobianos (-) analisados por eletroforese capilar microfluidica. As faixas de kDa correspondem à variações dentro do erro de leitura do equipamento utilizado.

Picos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Faixa	13,6-13,9	14,2-15,9	16,6-18,9	18,3-18,9	19,2-19,8	20,1-21,7	22,4-23,4	25-26,6	27,4-27,7	29,9-31,8	32-33,8	34,5-35,3	35,9-37	39-40,4	43,1-46,3	48,5-51,8	54,2-57,4	60,2-62,2	66,6-68,6	
FnPAR		14,2	16,1		19,8	20,7	22,9	26,6	27,7		33	35,2	37,1	40	45,6	51	55,7	61,5	66,8	
FnAMP⁺	13,9	14,1	16,1	18,8	19,3	20,4	23	25,5	27,7		32,4		35,9	40	45,4	50,5	55,9	60,7	68,3	
FnAMP⁻		15,9	16		19,6	20,1	22,9	26,1	27,4	29,9	32,5	34,5	36,1	39,5	46	50,8	56,4	59,6	68,2	
FnAMS⁺	13,8	14,2		18,9	19,2		23,1	25,7	27,4		-		36,4		43,5	50	54,6	60,7	68,2	
FnAMS⁻		14,4	16,6		19,2		23,3	25,9		30,4		34,7		38,5	44,2	50	54,7			
FnPTZ⁺		14,1	16,3	18,3	19,2	20,6	23,1		27,3		32	34,9	36,5	40,4	44,2	49,8	54,7	60,5	66,1	
FnPTZ⁻											32			39,6	44,9	49,9	56,4		66,4	
FnCLI⁺	13,6			18,7			22,4	25,6	27,5	31,8		35,3		39	43,1	50		61,8		
FnCLI⁻		14,6					23,1			30,6					45,9	51,5		59,4		
FnCLO⁺		14,1			19,4	21,1	23,4	26,1			33,3		36,8	39,9	44	50,2	55	60,5	68,6	
FnCLO⁻	13,7														43,3	48,5				
FnMET⁺		15,1			19,6		22,9	25,8		30,3		34,9	37,4	39,2	45,5	50,3	56,3			
FnMET⁻		14,3			19,4	21,2		26,2	27,4	30,6			36,9	40	44,2	49,6	55,3	61	66,5	
FnLEV⁺		15,3		18,9		20,6			27,8		33,8	34,5	36,3	39,2	46	49,7	56	60,1	67,4	
FnLEV⁻		14,1		18,5	19,5	21,5	22,4	26,5	27,6					37	40,2	43,6	51,2	55,6	61	68,7

Picos	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Faixa	69-72,2	73,6-74,5	75,0-78,1	81,3-85,7	86-88,4	88,9-92,4	95-96,1	97,8-101,6	111,4-113	131,6-133,8	135,2-136,6	137,8-138,6	157,7-162	165,9-167,2	177,4-179,1	191-195	212,0-212,7	228,5-231,7
FnPAR	70,1		76	83,5		91,6		98,4	112,5	133,8		138	158,8		178	192,7	212	229
FnAMP⁺			78,1	83	88,3	91,2	95,3	98,2	-			135,8	162					228,3
FnAMP⁻				83,7	86,7	90,8		97,8	111,4	133,7			157,7					231,7
FnAMS⁺	72,4			82,3	87,6		95,1	101,1			136,2		161,5					230,6
FnAMS⁻	71,4		76,6	82,1	88					132,6	136							229,7
FnPTZ⁺		73,9	77,9	83		92,1	95				136,3						192	231,2
FnPTZ⁻		73,6			87,6				111,5				159,4				191	
FnCLI⁺	71,8			83,7	87			99,8	111,6		136,5							
FnCLI⁻	71,7			83,1	86,7				112,8		136,1		162,7					
FnCLO⁺	72,2		75,3	83	88,4	92,3	95,5	101,6	111,2	131,6	136,6	138,5		166	177,2		212,8	
FnCLO⁻	70,9			82,6			95,5	100,4		132,3			159	167,2				
FnMET⁺			77,3	83,5		89,8				133,5			158,2				192,9	
FnMET⁻	71,5			82,7	88,1		95,9						159,6	165,9				
FnLEV⁺		74,5		81,7		90,8		101,7	111,2			138,3						
FnLEV⁻		73,4		82,6	87,7	92,6	96,1	100,3	111			138,1						