

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOSYEL OLSZEWSKI

POTENCIAL PATOGÊNICO DE CEPAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE
Herbaspirillum spp

PONTA GROSSA
2016

JOSYEL OLSZEWSKI

POTENCIAL PATOGÊNICO DE CEPAS AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE
Herbaspirillum spp.

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Katia Sabrina Paludo
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Weigert Galvão

PONTA GROSSA
2016

Olszewski, Josyel
O52 Potencial patogênico de cepas ambientais e clínicas de *Herbaspirillum* spp. /
Josyel Olszewski. Ponta Grossa, 2016.
80 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo.

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 2. Citotoxicidade. 3. Pneumonia. 4.
Calu-3. I. Paludo, Katia Sabrina. II. Galvão, Carolina Weigert. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à
Farmácia. IV.T.

CDD: 615

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 10/2016, DO MESTRANDO JOSYEL
OLSZEWSKI REALIZADO NO DIA 18 DE JULHO DE 2016, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias de julho de dois mil e dezesseis, às 14h00min, no Hall Tecnológico, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Kátia Sabrina Paludo reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Josyel Olszewski na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professor Doutor Rafael Bertoni da Silveira e o Professor doutor Fernando Hitomi Matsubara. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: Potencial Patogênico de Cepas Ambientais e Clínicas de *Herbaspirillum spp.* Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se -
FAVORÁVEL A APROVAÇÃO a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☐

Novo título:

Kátia Sabrina Paludo 1 - (DEBIOGEM - UEPG)- Presidente

Rafael Bertoni da Silveira
Rafael Bertoni da Silveira 2- (DEBIOGEM - UEPG) – Titular

Fernando Hitomi Matsubara
Fernando Hitomi Matsubara 3- (UFPR - CURITIBA) – Titular

Ponta Grossa, 18 de Julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Katia Sabrina Paludo por todo o conhecimento passado, pela compreensão, positividade e alegria, mesmo frente aos inúmeros contratempos superados. Sua maneira de dialogar e a sensação de que tudo vai dar certo é confortante. Você é inspiradora.

Agradeço à minha co-orientadora, Dra. Carolina Weigert Galvão, pelas indicações dos caminhos aos quais deveria seguir e disposição diárias.

Ao graduando em biologia e companheiro de laboratório Felipe Biscaia pelas divisões de tarefas.

A colega farmacêutica Rafaela Furmam por todos os ensinamentos no começo deste mestrado, e a companheira de laboratório Silvia Aparecida Ferreira Albuquerque por toda a dedicação na identificação molecular.

Ao Prof. Dr. John LiPuma, do departamento de Pediatria da Universidade de Michigan e a profa. Cyntia Maria Fadel-Telles Picheth, do departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná agradeço por cederem as estirpes clínicas e pelos trabalhos publicados que foram de grande auxílio.

Ao prof. Emanuel Maltempi de Souza da bacterioteca do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná por ceder estirpes isoladas do solo.

À Dra. Regina Sordi, pelos ensinamentos transmitidos e tempo dedicado ao meu auxílio durante os procedimentos com os animais. Trabalhar com alguém com tamanho amor pela pesquisa me fez um pouco mais sábio.

A todos meus amigos e amigas, vocês foram meu porto seguro durante este ano. Rir dos meus lamentos durante as conversas de bar fez tudo parecer mais fácil e simples.

Aos meus pais e família, que sempre vão ao meu socorro nas horas que mais necessito.

Aos meus gatos Merlin e Pudim, que me acompanharam ao lado do computador durante toda a escrita desta dissertação.

*Sure as I'm breathing
Sure as I'm sad
I'll keep this wisdom
In my flesh
I leave here believing
More than I had
And there's a reason I'll be
Reason I'll be back*

– Eddier Vedder, “No Ceiling”

RESUMO

Bactérias fixadoras de nitrogênio estão sendo cada vez mais utilizadas como fertilizantes biológicos (biofertilizantes) em substituição aos fertilizantes químicos. O gênero *Herbaspirillum* foi inicialmente isolado de gramíneas de interesse agrícola no Brasil e devido a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, tem sido testada como biofertilizante de algumas culturas como a cana de açúcar e o milho. Porém, mesmo sendo considerado um gênero não-patogênico, seus mecanismos de interação com as plantas são semelhantes aos mecanismos de infecção de uma bactéria patogênica e, recentemente, foram relatados casos de isolamento dessa bactéria em pacientes hospitalizados, geralmente imunocomprometidos e/ou com doenças graves como leucemia e principalmente fibrose cística. Considerando isso, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o potencial patogênico das seguintes cepas do gênero *Herbaspirillum*: cepa ambiental *H. seropedicae* SmR1 e suas formas modificadas (RAM GFP e ds RED) e as cepas de isolados clínicos *H. frisingense* AU14559 e *H. huttiense* AU11883. Testes *in vitro* utilizando os reagentes MTT e VN foram realizados para avaliar a viabilidade de células pulmonares Calu-3 após exposição ao sobrenadante estéril das culturas bacterianas com 8 ou 18 h de crescimento, evidenciando a citotoxicidade das diferentes cepas da espécie *H. seropedicae*. Ensaio de morfologia celular utilizando os mesmos sobrenadantes induziram alterações morfológicas nas células Calu-3 com todas as cepas testadas. A metodologia de adesão mostrou que as cepas isoladas de infecções em humanos, *H. huttiense* AU11883 e *H. frisingense* AU14559, são capazes de aderir sobre as células Calu-3, sendo consideradas bactérias de baixa adesão. Nos ensaios *in vivo*, utilizando um modelo de indução de pneumonia em camundongos, a cepa *H. seropedicae* SmR1 foi capaz de induzir perda severa de peso desses animais, aumento na contagem total de leucócitos e proporção de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA), além de alterações histopatológicas nos pulmões, como infiltrado perivascular e peribronquiolar. A cepa isolada de infecções pulmonares, *H. huttiense* AU11883, apresentou citotoxicidade e adesão *in vitro*, além de alterações histológicas no pulmão dos animais inoculados intratraquealmente, mas não houve perda de peso ou alterações significativas no LBA. Esses resultados demonstram que a cepa ambiental *H. seropedicae* SmR1 apresentou indícios que confirmam seu potencial patogênico, mas ainda são necessários testes com um número maior de cepas para avaliar o potencial patogênico deste gênero bacteriano.

Palavras-chave: Bactérias fixadoras nitrogênio. Citotoxicidade. Pneumonia. Calu-3

ABSTRACT

Nitrogen fixing bacteria are being widely used as biological fertilizers (biofertilizers) as a substitute to chemical compounds. *Herbaspirillum* genus was first isolated from grasses of agricultural interest in Brazil and, due to their ability to fix atmospheric nitrogen, has been tested as a biofertilizer in some agricultural crops such as sugar cane and corn. However, even being considered a non-pathogenic genus, their interaction mechanism with plants are similar to mechanism of infections from a pathogenic bacterium and recently there have been reports of isolation of these bacteria in hospitalized patients, usually in immunocompromised patients and/or with severe diseases like leukemia and mainly cystic fibrosis. Regarding this, the objective of this study was to evaluate the pathogenic potential of the strains of the genus *Herbaspirillum*: environmental strain *H. seropedicae* SmR1 and their modified forms (RAM GFP and ds RED) and the clinical isolated strains *H. frisingense* AU14559 e *H. huttiense* AU11883. *In vitro* tests using reagents MTT and Neutral Red were performed to evaluate lung cells Calu-3 viability following exposure to sterile supernatant of bacterial cultures with 8 and 18 h of growth, showing cytotoxic effect of all different strains of the species *H. seropedicae* used. Morphology cell tests using the same supernatants induced alterations in Calu-3 cells with all bacterium strains used. Cell adhesion methodology showed that the human isolated strains *H. huttiense* AU11883 and *H. frisingense* AU14559 are capable of adhering on Calu-3 cells, being considered low adhesion bacteria. In *in vivo* assays, using a pneumonia induced model in mice, *H. seropedicae* SmR1 strain was able to induce severe weight loss in those animals, as well as a rise in total leukocytes count and neutrophils on bronchoalveolar lavage (LBA) and histopathological changes on the lungs, like perivascular and peribronchial infiltrates. The clinical isolated strain from infected lungs, *H. huttiense* AU11883, showed cytotoxicity and adhesion *in vitro*, and also histopathological changes on the lungs of intratracheal inoculated animals, but they didn't show weight loss or significant alterations on LBA. Those results shows that the environmental strain *H. seropedicae* SmR1 presented evidence confirming its pathogenic potential, but are still required further tests with a larger number of strains to evaluate the pathogenic potential of this bacterial genus.

Keywords: Nitrogen fixing bacteria. Cytotoxicity. Pneumonia. Calu-3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>H. seropedicae</i> contendo um, dois e três flagelos visto em microscopia de transmissão de elétrons (BALDANI et al, 1986).....	16
Figura 2 - Valores do poder do teste em relação ao tamanho amostral.....	37
Figura 3 - Curva de crescimento durante 24 h de diferentes cepas de <i>Herbaspirillum</i>	43
Figura 4 - Fluorescência das cepas geneticamente modificadas SmR1 GFP e SmR1 dsRed.....	46
Figura 5 - Ensaio de citotoxicidade com MTT.....	47
Figura 6 - Ensaio de citotoxicidade com VN.....	48
Figura 7 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe SmR1 por 6 h.....	52
Figura 8 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe SmR1 GFP por 6 h.....	53
Figura 9 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe SmR1 Red por 6 h.....	54
Figura 10 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de <i>Herbaspirillum frisingense</i> estirpe AU14559 por 6 h.....	55
Figura 11 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de <i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe AU11883 por 6 h.....	56
Figura 12 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de <i>Herbaspirillum</i> quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland.....	57
Figura 13 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de <i>Herbaspirillum</i> quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland.....	58
Figura 14 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de <i>Herbaspirillum</i> quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland.....	59
Figura 15 - A – Porcentagem de perda de peso entre o primeiro e o último dia de observação. B – Porcentagem de perda de peso ao longo dos dias de observação..	65
Figura 16 - Número absoluto de leucócitos no LBA.....	67
Figura 17 - Contagem diferencial do lavado broncoalveolar.....	68
Figura 18 - Achados histopatológicos.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de <i>Herpirillum</i> utilizadas.....	30
Tabela 2 - Sistema de escore de fatores físicos e comportamentais de camundongos analisados no ensaio de infecção intrapulmonar.....	39
Tabela 3 - Escore quantitativo das alterações pulmonares observadas nas lâminas histológicas de pulmão.....	40
Tabela 4 - Número de bactérias por célula infectada (BCI), porcentagem de proporção de células infectadas (PCI) e número de bactérias por célula (BC), realizada após 18 h de incubação.....	60
Tabela 5 - Média do escore dos dados físicos e comportamentais.....	62
Tabela 6 - Porcentagem de peso dos animais em relação ao primeiro dia de tratamento (procedimento cirúrgico de infecção intratraqueal).....	64
Tabela 7 - Mediana do escore para cada parâmetro histológico analisado nas lâminas de pulmão processadas 7 dias após a inoculação intratraqueal das cepas bacterianas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	Bactérias por células
BCI	Bactérias por células infectadas
H	Hora
IP	Intraperitoneal
LBA	Lavado bronco-alveolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil tetrazólio
PBS	Do inglês " <i>Phosphate-buffered saline</i> ". Solução salina tamponado com fosfato
PCI	Proporção de células infectadas
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro fetal bovino
TSA	Do inglês " <i>Trypticase soy agar</i> ". Ágar triptona de soja
TSB	Do inglês " <i>Trypticase soy broth</i> ". Caldo triptona de soja
VN	Vermelho neutro, -3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazino cloridrato
WBC	Do inglês " <i>White blood cell</i> ". Contagem diferencial de leucócitos
OD600	Do inglês " <i>Optical density</i> ". Densidade óptica a 600 nm
LPS	Lipopolissacarídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 AGRICULTURA E NITROGÊNIO.....	14
2.2 RIZOSFERA E MICRORGANISMOS.....	15
2.3 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>HERBASPIRILLUM</i>	16
2.3.1 Características das espécies <i>H. seropedicae</i> , <i>H. huttiense</i> e <i>H. frisingense</i>	17
2.3.2 Bactérias do Gênero <i>Herbaspirillum</i> isoladas de infecções humanas.....	18
2.3.3 Possíveis fontes infectantes de <i>Herbaspirillum</i>	21
2.3.4 Mecanismos de patogenicidade.....	22
2.3.5 Genes relacionados a patogenicidade em bactérias do gênero <i>Herbaspirillum</i>	23
2.4 MODELO DE INFECÇÃO PULMONAR.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.1.1 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 CEPAS BACTERIANAS.....	30
4.2 CULTIVO, ESTOCAGEM E PREPARO DAS BACTÉRIAS.....	30
4.2.1 Curva de Crescimento.....	31
4.2.2 Confirmação do gênero pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	31
4.3 LINHAGEM CELULAR Calu-3.....	32
4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	32
4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico utilizando o reagente MTT.....	32
4.4.2 Avaliação do potencial citotóxico utilizando o corante VN.....	33
4.4.3 Ensaio de morfologia celular utilizando células Calu-3.....	34
4.4.4 Ensaio de adesão bacteriana utilizando células Calu-3.....	35
4.5 EXPERIMENTOS <i>IN-VIVO</i>	35
4.5.1 Cultura Bacteriana.....	35
4.5.2 Animais e planejamento estatístico.....	35
4.5.3 Modelo de infecção pulmonar.....	37
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	42
5.1.1 Identificação por sequenciamento parcial do gene 16s rRNA.....	42
5.1.2 Curva de crescimento.....	42
5.1.3 Identificação das cepas <i>H. seropedicae</i> SmR1 GFP e <i>H. seropedicae</i> SmR1 dsRed por microscopia de fluorescência.....	44
5.2 ENSAIOS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	46
5.2.1 Ensaios de citotoxicidade utilizando vermelho neutro e MTT.....	46
5.2.2 Ensaio de morfologia celular utilizando células Calu-3.....	51
5.2.3 Ensaio de adesão bacteriana utilizando células Calu-3.....	56
5.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	61
5.3.1 Dados físicos e comportamentais.....	63
5.3.2 Pesagem.....	63

5.3.3 Análise do lavado broncoalveolar – LBA.....	66
5.3.4 Achados histopatológicos.....	69
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO.....	80

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum* spp. pertence a classe BetaProteobacteria e compreende espécies fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) e colonizadoras endofíticas de plantas, e ainda isolados clínicos e ambientais. Bactérias desse gênero já foram testadas como biofertilizante (fertilizante biológico) em algumas culturas vegetais como cana-de-açúcar (SCHMIDT *et al.*, 2012) e milho (ALVES *et al.*, 2015) e demonstraram potencial para a redução do uso de fertilizantes químicos e/ou aumento da produtividade. A utilização de bactérias diazotróficas na adubação gera uma redução da quantidade de nitrogênio mineral adicionado, o que concede uma redução de custos ao produtor (FERNANDES *et al.*, 2012).

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* fazem parte do grupo de Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas indicadas na adubação pela EMBRAPA (SCHMIDT *et al.*, 2012). Além disso, o sequenciamento do genoma completo de *H. seropedicae* já foi elucidado (PEDROSA *et al.*, 2011), estimulando novos trabalhos na área.

Herbaspirillum seropedicae, a primeira espécie identificada deste gênero, têm sido extensivamente isolada de plantas, particularmente de cereais da família *Poaceae*, como arroz, milho, cana de açúcar e sorgo (BALDANI *et al.*, 1986). Originalmente isolada em Seropédica no Rio de Janeiro, cidade que deu nome a espécie, foram descritas como bactérias microaeróbias, com motilidade, vibrióides, gram-negativas, em forma de bastão, não-patogênicas e com habitat natural sendo o solo e raízes de plantas da família das Gramíneas (BALDANI *et al.*, 1986).

Mais recentemente, porém, foram isoladas espécies do gênero *Herbaspirillum* em infecções envolvendo humanos. Uma criança de 2 anos diagnosticada com leucemia linfoblástica aguda que recebeu transplante de células tronco hematopoiéticas e terapia imunossupressora, apresentou febre alta e episódios recorrentes de diarreia por dois dias. Amostras de sangue foram colhidas e culturas realizadas para identificação da bactéria e, após sequenciamento do DNA concluiu-se que se tratava de uma infecção causada por *H. seropedicae* (ZIGA; DRULEY; BURNHAM, 2010). Outro caso envolveu um paciente de 26 anos diagnosticado com fibrose cística, o qual encontrava-se em estado infeccioso primeiramente por co-infecção de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, as quais foram tratadas com antibioticoterapia durante 20 dias. O paciente respondeu bem ao tratamento, porém 3 dias após o

término da medicação ele evoluiu para quadro febril e tremores convulsivos. Nova cultura de sangue foi feita e a bactéria foi erroneamente identificada como *Burkholderia cepacia*, posteriormente identificada corretamente através de sequenciamento de DNA como *Herbaspirillum putei* (SPILKER *et al.*, 2008), atualmente reclassificada como *H. huttiense subsp. putei* (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010). Outro caso de *H. seropedicae* isolado de paciente com cirrose propõe o contato e a associação da infecção de bactérias do gênero através do contato com a água doce (TAN; OEHLER, 2005).

Através da técnica de sequenciamento de DNA, pacientes com diversos tipos de câncer e que tiveram infecções identificadas como *Burkholderia cepacia*, tiveram seus isolados de cultura novamente identificados. Desses pacientes, oito tiveram a infecção corretamente identificada como causadas por diferentes espécies do gênero *Herbaspirillum* (CHEMALY *et al.*, 2015).

Até o momento de publicação deste trabalho, somente um caso de infecção em um paciente sem doença prévia foi descrito, o de um fazendeiro com pneumonia que foi identificada inicialmente como *Burkholderia spp.* mas, após suspeita devido a irregularidade da resistência à antibióticos, foi levada a laboratório de referência e identificada através de espectrômetro de massa como *Herbaspirillum huttiense* ou *Herbaspirillum aquaticum* (REGUNATH *et al.*, 2015).

Apesar desses relatos, o gênero *Herbaspirillum* raramente tem sido associado a infecções em humanos e não existem dados sobre a possível patogenicidade de suas espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGRICULTURA E NITROGÊNIO

O agronegócio é uma das principais atividades econômicas no Brasil, sendo responsável por 22% do Produto Interno Bruto da economia brasileira no ano de 2014 (cerca de R\$1,1 trilhão). Deste valor, 70% é representado somente pela atividade agrícola. Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pesquisas demonstram que avanços na tecnologia de cultivo, mesmo com impactos climáticos fortes em algumas regiões, como geadas, secas ou excesso de chuva, têm aumentado continuamente a produtividade, garantindo o crescimento do setor a longo prazo (BRASIL, 2014).

A adubação com fontes minerais de nitrogênio é amplamente utilizada principalmente nos cereais de interesse econômico no país, pois as plantas respondem com um crescimento positivo a essa prática, gerando uma maior produtividade (FERNANDES *et al.*, 2012). Um estudo feito em plantações de milho em 2001, calcula que o custo para uma produtividade de 4500 kg por hectare é de US\$ 355,27 e que, somente o custo da adubação por nitrogênio mineral por hectare, é de US\$ 149,21, ou seja, praticamente 42% do valor investido. Além do custo elevado, a utilização de nitrogênio mineral como fertilizante gera danos ao meio ambiente, como a poluição de aquíferos e uso de recursos não-renováveis (ROESCH, 2003).

A biotecnologia moderna consolidou-se como uma grande influência para a agricultura e todos os setores agrícolas a partir dos anos 70, devido à descoberta da tecnologia de DNA recombinante. Essa técnica permitiu a introdução de novos fertilizantes e sementes geneticamente modificadas, que aumentaram a produção agrícola e diminuíram a incidência de pestes e pragas nas plantações (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN, 2005).

Mais recentemente, a partir dos anos 80, a utilização de bactérias diazotróficas vem sendo utilizada para aumentar a produção na agricultura, principalmente em países tropicais. Bactérias diazotróficas, ou fixadoras de nitrogênio, são capazes de transformar o nitrogênio gasoso (N_2), elemento que compõe 80% da atmosfera, em amônia (NH_3). Esse processo é importante para as plantas, pois elas são incapazes de assimilar o N_2 , mas podem utilizar o NH_3 para a formação de

aminoácidos e outros compostos. Plantas leguminosas atuam em simbiose com estas bactérias, suprindo baixas quantidades de oxigênio (O_2) no solo para que a bactéria diazotrófica gere o ATP necessário para o processo de fixação de N_2 em NH_3 (DÖBEREINER, 1997). A utilização de bactérias diazotróficas na adubação gera uma redução da quantidade de nitrogênio mineral adicionado aos fertilizantes químicos, o que concede uma redução de custos ao produtor (ROESCH, 2003; FERNANDES *et al.*, 2012).

2.2 RIZOSFERA E MICRORGANISMOS

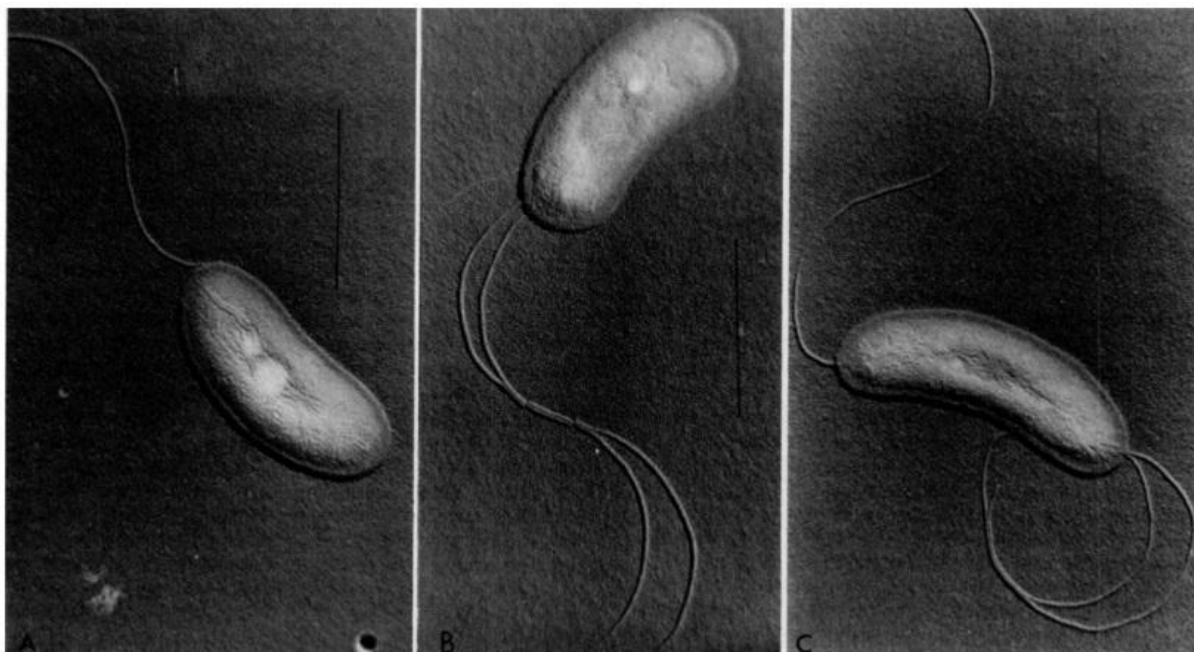
A rizosfera é a área do solo diretamente relacionada com a raiz da planta e conta com uma grande diversidade de microrganismos. Isso se deve ao fato de que uma grande quantidade de carbono é excretada pela raiz da planta na forma de fotossintatos e este é um nutriente muito utilizado pelas populações bacterianas. Essa área da rizosfera é tão rica em nutrientes que a população bacteriana é de 100 a 1000 vezes superior à do solo comum, e até 15% da área de superfície das raízes das plantas são cobertas por colônias de diversas espécies bacterianas (BONILLA, 2011).

Vários gêneros de bactérias possuem cepas relacionadas à colonização da rizosfera, como *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*. Essa variada gama de espécimes promove a competição pela colonização do espaço entre as bactérias, gerando mecanismos antagonistas de defesa e mecanismos de capacidade de colonização da planta (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005).

Nesse pequeno espaço pode ocorrer transferência lateral de genes através da troca de plasmídeos conferindo aquisição de funções como, por exemplo, a resistência a diversos tipos de antibióticos para espécies geralmente suscetíveis (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005). Além disso, a capacidade das bactérias de colonizar as raízes das plantas tem sido descrita como similar ou até mesmo idêntica aos mecanismos de virulência encontrados em bactérias envolvidas em infecções humanas, e a similaridade do genoma dessas bactérias com cepas ambientais sugerem que sua virulência está apenas na regulação de determinados genes (MARQUES, 2011).

2.3 BACTÉRIAS DO GÊNERO *HERBASPIRILLUM*

Figura 1 - *H. seropedicae* contendo um, dois e três flagelos visto em microscopia de transmissão de elétrons.



Fonte: BALDANI, J. I. *et al.* Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisulbalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802–810, 1996.

Herbaspirillum é um gênero classificado na subdivisão Beta das proteobactérias, descrito pela primeira vez como promotor do crescimento vegetal (BALDANI *et al.*, 1986). As primeiras pesquisas a serem realizadas tiveram como foco a espécie *H. seropedicae* a qual foi isolada de diversos cereais de interesse econômico (BALDANI *et al.*, 1986). Após a identificação do gênero outras espécies foram reclassificadas, como a espécie *H. rubrisulbalbicans*, identificada como o agente causador da doença foliar em variedades de cana de açúcar suscetíveis (GALLI, 1978). Mais tarde, foi descrita a espécie *H. frisingense* isolada a partir de amostras de capim, tais como *Pennisetum purpureum* e de *Miscanthus sinensis* (KIRCHHOF *et al.*, 2001).

Atualmente, este gênero é composto por diversas espécies, dentre elas *H. aquaticum* (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010), *H. autotrophicum* (RORTHBALLER *et al.*, 2006), *H. chlorophenolicum* (IM *et al.*, 2004), *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001), *H. hiltneri*, *H. huttiense* (DING; YOKOTA 2004), *H. lusitanum*

(VALVERDE *et al.*, 2003), *H. magnetovibrio*, *H. massiliense*, *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007), *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1996), sendo algumas isoladas de ambientes aquáticos ou solos poluídos (MONTEIRO *et al.*, 2008) e a partir de tecidos de seres humanos (LAGIER *et al.*, 2012). O genoma completo ou o genoma parcial de várias dessas espécies já foi anotado e encontra-se disponível no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Bactérias desse gênero já foram testadas como biofertilizante (fertilizante biológico) em algumas culturas vegetais como cana-de-açúcar (SCHMIDT *et al.*, 2012) e milho (ALVES *et al.*, 2015) e demonstraram potencial para a redução do uso de fertilizantes químicos e/ou aumento da produtividade.

O gênero *Herbaspirillum* contém bactérias Gram-negativas de morfologia vibróide ou helicoidal, não fermentadoras de açúcares e móveis (um a três flagelos em uma ou ambas as extremidades). São positivos para as provas de oxidase e urease e variáveis para prova de catalase e possuem temperatura de crescimento entre 30 a 37 °C. Usam preferencialmente como fonte de carbono sais orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato e citrato, podendo também utilizar glicerol, manitol, D-glucose e sorbitol (BALDANI *et al.*, 1996).

2.3.1 Características das espécies *H. seropedicae*, *H. huttiense* e *H. frisingense*

H. seropedicae foi a primeira espécie do gênero a ser identificada e foi originalmente isolada em Seropédica (Rio de Janeiro, Brasil), cidade que deu nome à espécie. A *H. seropedicae* é endofítica, isto é, tem pouca viabilidade quando livre no solo, necessitando de plantas para realizar simbiose. É fixadora de nitrogênio, positiva para a prova de catalase, com temperatura de crescimento ideal de 34°C e apresentam dois flagelos em uma ou nas duas extremidades (BALDANI *et al.*, 1986).

A estirpe SMR1 de *H. seropedicae* utilizada nesse trabalho é um mutante espontâneo da estirpe Z78 (ATCC 35893), sendo resistente ao antibiótico estreptomicina, foi isolada da raiz do sorgo, e teve seu genoma sequenciado e anotado (PEDROSA *et al.*, 2011). Esta bactéria coloniza as plantas e apresenta potencial para a promoção do crescimento vegetal através de diversos mecanismos, incluindo a fixação de nitrogênio, a produção de ácido indoacético e sideróforos, e a redução da geração de etileno pela planta (ZHU *et al.*, 2012).

O *H. huttiense* era classificado como membro do gênero *Pseudomonas* até sua re-classificação através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Possui como características ser negativo na prova de catalase, não ser fixador de nitrogênio e possuir de 1 a 3 flagelos em ambos os polos. Suas estirpes não são capazes de fixar nitrogênio (DING; YOKOTA, 2004).

O *H. frisingense* é positivo para catalase, fixador de nitrogênio em condições de microaerofilia, cresce em temperaturas de 30 a 37°C e apresenta de 1 a 3 flagelos em apenas um dos polos. São encontradas em associação com raízes, caules e folhas de gramíneas. São endofíticas e promovem o crescimento dos vegetais pela secreção de fitohormônios (KIRCHHOF *et al.*, 2001).

2.3.2 Bactérias do Gênero *Herbaspirillum* isoladas de infecções humanas

Com a evolução das técnicas de extração de DNA e do Banco de Dados Genético, várias bactérias isoladas de pacientes hospitalares estão sendo re-categorizadas para melhor identificação e geração de banco de dados bacteriano dos próprios hospitais, através da amplificação do gene 16S rRNA, e, com isso, casos de infecção em humanos causados por diversas bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram descobertos (CHEMALY *et al.*, 2015; SPILKER *et al.*, 2008; ZIGA; DRULEY; BURNHAM, 2010).

O primeiro caso de uma espécie de *Herbaspirillum* causando uma bacteremia em humanos foi reportada na Flórida, com um paciente de 49 anos sem teto, com histórico de hipertensão, hepatite C e abuso de álcool e cigarro. Constatado sinais de infecção, o paciente iniciou terapia antibiótica e foi realizada uma hemocultura. Após 48 h, a cultura revelou uma bactéria em forma de bastão, gram negativa, oxidase positiva e não fermentadora de lactose. A cultura isolada foi enviada para um laboratório de referência (Quest Diagnostics, San Juan Capistrano, CA) o qual realizou identificação por sequenciamento de 16S rDNA e identificou o microrganismo como *Herbaspirillum seropedicae* (TAN; OEHLER, 2005).

Outro caso envolveu um paciente de 26 anos diagnosticado com fibrose cística, o qual encontrava-se em estado infeccioso primeiramente por co-infecção de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, as quais foram tratadas com antibioticoterapia durante 20 dias. O paciente respondeu bem ao tratamento, porém 3 dias após o término da medicação ele evoluiu para quadro febril e tremores convulsivos. Nova cultura de

sangue foi feita e a bactéria foi erroneamente identificada como *Burkholderia cepacia*. Estudos posteriores identificaram corretamente a bactéria através de sequenciamento de DNA como *Herbaspirillum putei* (SPILKER *et al.*, 2008), atualmente reclassificada como *H. huttiense subsp. putei* (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010).

Mais recentemente, uma criança de 2 anos diagnosticada com leucemia linfoblástica aguda que recebeu transplante de células tronco hematopoiéticas e terapia imunossupressora, apresentou febre alta e episódios recorrentes de diarreia por dois dias. Amostras de sangue foram colhidas e culturas realizadas para identificação da bactéria, dando como resultado *Burkholderia cepacia*. Realizado o antibiograma, observaram que a cultura era suscetível a colistina, resultado consistente com *B. cepacia*, porém era suscetível a vários outros antibióticos naturalmente resistentes por espécies de *Burkholderia*. Testes bioquímicos mostraram-se inconsistentes com bactérias conhecidas. A identificação só pode ser feita através de sequenciamento do 16s DNA, chegando-se a conclusão de que se tratava de uma infecção causada por *H. seropedicae* (ZIGA; DRULEY; BURNHAM, 2010).

Através da técnica de sequenciamento de DNA, pacientes com diversos tipos de câncer e que tiveram infecções identificadas como *Burkholderia cepacia* compreendendo o período de 1 janeiro de 2006 até 15 de outubro de 2013, tiveram seus isolados de cultura novamente identificados. Como resultado, oito desses pacientes tiveram a infecção confirmada por espécies de *Herbaspirillum*. Destes oito pacientes, três tinham diagnóstico de tumor sólido, três de leucemia, um de linfoma e um de anemia aplástica (CHEMALY *et al.*, 2015).

Todos estes casos de infecção ocorreram em pacientes com alguma patologia já instalada, o que poderia sugerir que as bactérias do gênero *Herbaspirillum* sejam oportunistas, porém, um trabalho publicado em setembro de 2015 por Regunath e colaboradores, relata o caso de um fazendeiro que deu entrada no hospital com pneumonia e posterior bacteremia. O paciente não possuía nenhum histórico médico recente e não fazia o uso contínuo de nenhum medicamento, mantinha contato direto com animais de fazenda e alegou início dos sintomas após pescar em um dia chuvoso. Exames convencionais identificaram a bactéria como *Burkholderia cepacia*, mas houve divergências na identificação pois não houve melhora com os antibióticos usados, os quais essa bactéria seria usualmente suscetível. Após mudança de tratamento e melhora do paciente, a cepa isolada foi enviada a um laboratório de

referência que a identificou através de espectrômetro de massa como *Herbaspirillum huttiense* ou *Herbaspirillum aquaticum* (REGUNATH *et al.*, 2015).

Considerando essas informações é possível inferir que casos isolados e números de infecções por *Herbaspirillum* podem estar sendo subestimados, uma vez que frequentemente cepas desse gênero tem sido identificadas erroneamente como espécies de *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus pauculus*, *Ochrobactrum anthropi* pelos testes de rotina tradicionais (LIPUMA, 2010; MARQUES *et al.*, 2015).

Após a identificação da infecção causada por *H. huttiense subsp. putei* em um paciente de fibrose cística, Spilker e colaboradores (2008) realizaram um extenso trabalho de identificação através de sequenciamento de DNA em vários outros pacientes com fibrose cística, e mais 28 casos foram confirmados como infecções por diversas espécies de *Herbaspirillum*. Outro estudo demonstrou a identificação de 29 pacientes com fibrose cística e que apresentavam quadro infeccioso por bactérias do gênero *Herbaspirillum* (LIPUMA, 2010).

Apesar dos relatos na literatura da presença de espécies de *Herbaspirillum* sendo isoladas de amostras clínicas, ainda não há trabalhos que confirmem o potencial patogênico desse gênero. O primeiro estudo comparando características entre cepas humanas e ambientais de *Herbaspirillum* e os efeitos da interação com células humanas foi publicada recentemente (MARQUES *et al.*, 2015), utilizando ensaios *in vitro* e células de carcinoma de útero (HeLa).

2.3.3 Possíveis fontes infectantes de *Herbaspirillum*

Apesar da grande quantidade de episódios infecciosos causados por bactérias do gênero *Herbaspirillum* e seu isolamento e identificação pelos hospitais, a fonte de contaminação é apenas especulada pelos autores. No ambiente, as espécies desse gênero são encontradas no solo próximo a raiz, na própria raiz ou no caule de plantas e em água doce (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010).

O trabalho mais extenso realizado até o momento sobre uma possível fonte de infecção desse gênero é o de Chemaly e colaboradores (2015) onde foram identificados oito casos de infecção por *Herbaspirillum*, sendo que três pacientes haviam dado entrada no hospital com a infecção enquanto outros 5 haviam adquirido a infecção no ambiente hospitalar. Isso levantou a suspeita de que a bactéria poderia

estar no sistema de água do hospital, e por isso foram feitas culturas de várias possíveis fontes: salina de preparação de injetáveis, equipamento de proteção individual do pessoal técnico, torneiras, chuveiros, fonte de água da entrada do hospital, entre outras. Nenhuma dessas fontes indicou resultado positivo para *Herbaspirillum*, e os autores sugeriram uma possível contaminação por ingestão de produtos contaminados crus, por alguma injúria na pele, pelo trato respiratório ou possível contato com plantas contaminadas no caso de pacientes imunocomprometidos. Outros autores também sugerem que a contaminação possa vir da água, mas que demais estudos devem ser realizados (TAN; OEHLER, 2005).

Outros estudos suspeitam que seus pacientes tenham adquirido a infecção devido ao contato direto com a terra. Ziga e colaboradores (2010) relatam um estudo de caso no qual a paciente, uma criança de dois anos com histórico de baixa imunidade, poderia ter adquirido a infecção através do contato direto com a terra, pois vivia em uma grande fazenda com seus pais. Regunath e colaboradores (2015) relatam que seu paciente era um fazendeiro e mantinha contato direto com o solo e animais, mas não especula sobre nenhuma fonte de contágio específica.

Apesar dos relatos, a fonte de contaminação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* ainda é desconhecida e mais estudos direcionados a essa área são necessários.

2.3.4 Mecanismos de patogenicidade

Ao encontrar um hospedeiro humano, um agente patogênico bacteriano pode desencadear mecanismos de infecção e iludir as defesas do hospedeiro. Os componentes bacterianos que interagem com o hospedeiro incluem as cápsulas que atuam para escapar da fagocitose e proteger-se de macrófagos e neutrófilos; o lipopolissacarídeo (LPS) e os componentes da parede celular que podem causar choque séptico; as toxinas que podem servir para danificar as células hospedeiras e auxiliar na invasão, e as adesinas, que facilitam a ligação do agente patogênico a superfície da célula hospedeira. O grau para o qual estes diferentes mecanismos desempenham um papel na patogênese de uma infecção depende da espécie ou estirpe bacteriana, do local de entrada do patógeno e do estado imunitário do hospedeiro, entre outros fatores (WILSON *et al.*, 2002).

Uma vez que a bactéria adere a superfície do hospedeiro, essa pode invadir outros tecidos do mesmo. Patógenos podem invadir de forma mais efetiva um tecido por expressar e segregar proteases e glucanases que digerem proteínas da matriz extracelular e polissacarídeos. Além disso, um agente patogênico também pode invadir as células do tecido e obter acesso ao ambiente intracelular através de mecanismos naturais de fagocitose de macrófagos e neutrófilos ou por absorção induzida, processo em que o agente patogênico sinaliza a célula hospedeira para endocitar bactérias aderidas. Uma estratégia comum para agentes patogênicos para induzir sua internalização é a utilização de um sistema de secreção de tipo III que injeta proteínas bacterianas na célula hospedeira (WILSON *et al.*, 2002), cujas funções incluem biogênese de organelas, tais como os pili e flagelos, aquisição de nutrientes, virulência, e fluxo de drogas (STATHOPOULOS *et al.*, 2000).

A secreção proteica extracelular pode ser um desafio para as bactérias Gram-negativas, porque estas proteínas devem cruzar duas (e, em alguns casos, três) membranas fosfolipídicas, a fim de atingir o seu destino final. Algumas proteínas são secretadas em um de dois passos, através do mecanismo Sec- ou Tat-dependente. Estas proteínas atravessam a membrana interna com a ajuda da via Sec ou Tat de secreção e depois são transportadas através da membrana externa, utilizando um segundo sistema de secreção. O sistema de secreção do tipo II (T2SS) e V (T5SS) secretam proteínas desta maneira. Além disso, vários sistemas de secreção de proteínas Gram-negativas transportam seus substratos através de ambas as membranas bacterianas em um só passo, um processo Sec- e Tat-independente. Estes incluem o sistema de secreção do tipo I (T1SS), III (T3SS), IV (T4SS) e VI (T6SS). Apesar de todas estas vias formarem canais que atravessam o periplasma e secretarem proteínas a partir do citoplasma para fora da célula, seus mecanismos de secreção de proteínas são bastante diferentes entre si. Três destes sistemas de secreção, a T3SS, T4SS, e T6SS podem também transportar proteínas através da membrana da célula hospedeira, fazendo com que a proteína secretada chegue diretamente ao citosol da célula alvo (GREEN; MECSAS, 2016).

Um trabalho de revisão de literatura financiado pelo Ministério da Defesa do Reino Unido sobre a relação de espécies patogênicas de *Burkholderia* atuando em infecções pulmonares e seus mecanismos de infecção foi publicado em 2015. Este trabalho analisa o material genético das espécies altamente patogênicas *B.*

pseudomallei e *B. mallei*, causadoras da melioidose e mormo, doenças de altas taxas de letalidade (DAVID; BELL; CLARK, 2015).

Genes responsáveis pela adesão foram encontrados: a adesina *boaA* expressados pelo *B. mallei* e *boaA* e *boaB* expressados pelo *B. pseudomallei*, além de um gene tipo IV de pili para *B. pseudomallei* (DAVID; BELL; CLARK, 2015). *B. pseudomallei* e *B. mallei* também apresentaram um gene de secreção T3SS, responsável pela secreção de proteínas através da membrana celular, o que afeta a função das células pulmonares (DAVID; BELL; CLARK, 2015).

2.3.5 Genes relacionados a patogenicidade em bactérias do gênero *Herbaspirillum*

Uma vez que o genoma completo ou parcial de várias bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram sequenciados, é possível realizar uma comparação do potencial metabólico das diferentes espécies e cepas, avaliando genes relacionados com a interação planta-bactéria assim como genes relacionados com a patogenicidade, como os sistemas de secreção.

O T3SS é tipicamente utilizado por bactérias patogênicas para administrar proteínas efetoras nas células hospedeiras de plantas, mas também é usado em interações benéficas (VIPREY *et al.*, 1998). *Herbaspirillum* endofíticos de gramíneas e colonizadores de álamo, *H. seropedicae* SMR1, *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* Os34/ Os45, *Herbaspirillum* sp. CF444, e *Herbaspirillum* sp. YR522, apresentam esse sistema, enquanto *H. frisingense* GSF30 e *H. huttiense* subsp. *putei* IAM 15032 não apresentam os genes *hrp* / *hrc* do T3SS. Esse sistema é conhecido por ser crítico para a patogenicidade, e também para a invasão em processos endofíticos. As regiões flangeadoras dos genes do T3SS também estão parcialmente conservadas entre estirpes *Herbaspirillum*, sugerindo que T3SS foi eliminada em algumas estirpes, incluindo entre elas *H. frisingense* GSF30 (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Nenhuma estirpe de *Herbaspirillum* apresenta o T4SS, que está envolvida na virulência e a transferência horizontal de genes porém todas elas contêm a máquina completa para exportação e funcionamento do flagelo. Além disso, um conjunto reduzido de genes relacionados com secreção de pili e fimbrias estão presentes. Genes membros do T2SS, foram identificados em *H. frisingense* GSF30, *Herbaspirillum* sp. GW103 e *H. huttiense* subsp. *putei* IAM 15032 (JUHAS *et al.*, 2008).

Os genes do T6SS que estão envolvidos na interação bactérias-hospedeiro, tanto nas relações patogênicas e simbióticas (FILLOUX *et al.*, 2008), também estão presentes na maioria das estirpes *Herbaspirillum*, incluindo *H. frisingense* GSF30 e *H. seropedicae* SMR1. Algumas estirpes *Herbaspirillum*, incluindo *H. frisingense* GSF30, *H. seropedicae* SMR1 e *H. huttiense* subsp. *putei* IAM 15032 contem proteínas do T1SS (STRAUB *et al.*, 2013).

Hemaglutininas/hemolisinas são proteínas citotóxicas implicados na patogênese animal, mas um grande número de genes que codificam para tais proteínas têm sido encontrados em patógenos de plantas e em bactérias que interagem com plantas. Vinte genes relacionados com a hemaglutinina/hemolisina estão presentes no genoma de *H. seropedicae* SMR1, e nove genes codificam proteínas acessórias adicionais para hemaglutinina/hemolisina como transportador e ativadores (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Outros genes candidatos à adesão que estão potencialmente envolvidos na colonização da planta são os envolvidos na formação de lipopolissacarídeo (LPS). Os LPS são macromoléculas altamente complexas encontradas exclusivamente na membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS; FERRIER, 1995). Estes glicoconjugados são compostos por três regiões: o lipídeo A que ancora a molécula na membrana celular externa, o núcleo oligossacarídeo e o antígeno O (SUTHERLAND, 1985; RAETZ; WHITFIELD, 2002). Esses genes diferem entre estirpes de *Herbaspirillum* (MONTEIRO *et al.*, 2012).

A identificação em *H. rubrisubalbicans* M1 de uma proteína de membrana envolvida na exportação de O-antígeno e de proteínas envolvidas com a biogênese do envelope em *H. seropedicae* SMR1, incluindo uma glicosiltransferase e um determinante de comprimento de cadeia de polissacarídeo, sugerem diferenças estruturais no envelope das duas espécies. (SERRATO, 2014). Diversas evidências mostram um papel importante do LPS nas interações planta-bactéria. Muitos estudos mostraram que a ausência ou a modificação do O-antígeno reduz a colonização da planta por bactérias gram-negativas (ORRILO *et al.*, 2008; BALSANELLI *et al.*, 2010). Mutantes LPS descritos nos principais gêneros de fitopatógenos gram-negativos apresentam virulência reduzida (NEWMAN *et al.*, 2007). O LPS também pode contribuir para a resistência de bactérias endofíticas a compostos antimicrobianos da planta (ORRILO *et al.*, 2008; BALSANELLI *et al.*, 2010). Balsanelli *et al.* (2010) mostraram que estirpes mutantes de *H. seropedicae* que não possuem a O-antígeno

foram menos eficientes na ligação e colonização interna do sistema radicular do milho. A diferença na estrutura LPS entre *H. seropedicae* SMR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 sugere que estas moléculas podem ter um papel importante na associação com plantas.

Muitas estruturas de superfície e proteínas da membrana externa podem contribuir para a fixação e a agregação de células bacterianas sobre uma superfície da planta ou outro hospedeiro, incluindo as adesinas, LPS e exopolissacarídeos. Além disso, a regulação da formação de biofilme também pode estar envolvida na fixação de bactérias a superfície do hospedeiro (ROMANTSCHUK, 1992). As diferenças genéticas entre *H. seropedicae* SMR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 sugerem que os determinantes moleculares da superfície da célula bacteriana podem contribuir fortemente para o comportamento contrastante de um endófito neutro e de um fitopatógeno durante a colonização da planta.

O metabolismo de fixação de nitrogênio, produção/degradação de hormônios vegetais, celulose, entre outros, também foram analisados a partir do conteúdo genético das várias espécies e estirpes de *Herbaspirillum* cujo genoma foi totalmente ou parcialmente sequenciado. Os genes da fixação de nitrogênio estão presentes apenas nas cepas *H. seropedicae* e *H. frisingense* GSF30, e ambos apresentam a região dos genes *nif* muito semelhante (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Não há evidência de que a parede da célula da planta é afetada por *H. frisingense* durante sua colonização (ROTHBALLER *et al.*, 2008), mas *H. frisingense* GSF30, *H. seropedicae* Os34 / Os45, *Herbaspirillum* sp. GW103 / YR522 e *H. huttiense* subsp. *putei* IAM 15032 estão equipados com uma endo-1,4-D-glucanase que podem decompor a celulose. Duas quitina-desacetilases estão presentes em todas as estirpes *Herbaspirillum*, enquanto que *H. seropedicae* SMR1 e *Herbaspirillum* sp. JC206 possuem duas enzimas adicionais. Em *H. rubrisubalbicans* M1, um grande operon envolvido na síntese de celulose (ou degradação) parece crucial para a colonização. Todo esse operon está presente em *H. frisingense* GSF30, *H. seropedicae* Os34/Os45, *Herbaspirillum* sp. GW103 e *H. huttiense* subsp. *putei* IAM 15032, mas está ausente em *H. seropedicae* SmR1, *Herbaspirillum* sp. IP6-12/ YR522/ CF444/ JC206 (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Todas as estirpes *Herbaspirillum*, exceto *Herbaspirillum* isolado a partir de flora fecal humana, estão equipadas para utilizar o nitrato como um nutriente e reduzi-lo a amônio. Esta característica não é comumente vista em endófitos de plantas. A

capacidade de respiração anaeróbica utilizando nitrato como um aceptor final de elétrons em *H. frisingense* GSF30, *H. seropedicae* SmR1 e *H. seropedicae* Os45/Os34 se correlaciona com a presença de genes da fixação de nitrogênio, sugerindo que estas estirpes podem adaptar-se a disponibilidades de baixo teor de nitrogênio e de oxigênio. Isso também é reforçado pela tendência que estas estirpes têm um maior número de genes que codificam oxidases terminais (MONTEIRO *et al.*, 2012).

2.4 MODELO DE INFECÇÃO PULMONAR

Nos Estados Unidos, as infecções são responsáveis por cerca de 210 mil mortes anualmente. Além disso, a nível global, ela é a maior causa de mortalidade em pacientes cirúrgicos e/ou vítimas de trauma (GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004). A necessidade de estudos de processos infecciosos é crescente, e a suscetibilidade de camundongos à um amplo espectro de bactérias que causam infecções em humanos permite a esse modelo animal ser o principal para pesquisas dos mecanismos de infecção e imunidade (BUER; BALLING, 2003).

Os modelos animais de sepse são amplamente utilizados devido à sua viabilidade econômica, disponibilidade de espécimes, prática e estudo fundamentados e, principalmente, por aceitabilidade ética, sendo os roedores os mais utilizados em estudos pré-clínicos (GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004). Existem várias maneiras de se induzir a sepse em um animal, como a injeção de um bolus bacteriano via endovenosa, ou aspiração de solução bacteriana via pulmonar ou a via intraperitoneal (MARRA *et al.*, 2012).

A pneumonia é a maior causa de sepse no mundo, sendo responsável por 50% de todas as causas de infecção (SORDI *et al.*, 2013). Existem modelos animais de infecção pulmonar bem elaborados e estudados, principalmente em camundongos, sendo divididos em relação à infecção nas vias aéreas superiores ou nas vias aéreas inferiores.

O modelo de infecção pulmonar nas vias aéreas superiores é realizado através da completa sedação do camundongo e seu posicionamento em posição deitada. Um fórceps plástico é usado para manter a boca do animal aberta e uma microgota de solução bacteriana é colocada no final da garganta, próxima à faringe,

onde a respiração normal do animal realiza a inalação da cultura, que se instala em toda a via aérea superior e posteriormente nos pulmões (PIÑEYRO; ZHOU; ORFE 2010; ORIHUELA *et al.*, 2004).

O modelo de infecção pulmonar das vias aéreas inferiores é realizado através da sedação do animal seguida de uma incisão na pele do pescoço, aonde é localizada a traqueia, e injeta-se, via intratraqueal, a solução de cultura bacteriana (JOHNSON; KEHL-FIE; KLEIN, 2015; SORDI *et al.*, 2013).

Para a realização deste trabalho, utilizamos o modelo de infecção via intratraqueal. Ambas as técnicas são capazes de permitir a progressão de uma possível pneumonia a uma sepse ou meningite, porém a infecção via inalação necessita de uma quantidade maior de bactérias em uma menor microgota inoculada, pois há o risco do animal afogar-se. Além disso, a progressão da doença é mais lenta, pois a bactéria necessita primeiramente colonizar a via aérea superior, progredindo então para uma possível pneumonia (ORIHUELA *et al.*, 2004). A escolha do método foi ainda levada em consideração devido à existência de métodos padronizados de infecção intratraqueal em camundongos com bactérias patogênicas, o que levou a uma maior facilidade de comparação da capacidade patogênica das bactérias do gênero *Herbaspirillum* utilizadas neste experimento (SORDI *et al.*, 2013).

Considerando a falta de informações na literatura que demonstram o potencial patogênico do gênero *Herbaspirillum*, os crescentes relatos de identificação desse gênero em infecções humanas e as evidências de possíveis genes patogênicos, o presente trabalho se propôs a avaliar o potencial patogênico de cepas do gênero *Herbaspirillum* isoladas de infecções em pacientes e também do ambiente (solo). Esse estudo envolveu experimentos *in vitro*, utilizando linhagens de células humanas oriundas de epitélio pulmonar, e ensaios *in vivo*, utilizando um modelo experimental de infecção pulmonar em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial patogênico de bactérias do gênero *Herbaspirillum* utilizando testes *in vitro* em uma linhagem de cultura de células oriundas de epitélio pulmonar humano e testes *in vivo* em um modelo de infecção pulmonar em camundongos.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico de bactérias do gênero *Herbaspirillum* sobre a linhagem humana Calu-3 utilizando ensaios bioquímicos;
- Avaliar as alterações morfológicas desencadeadas pelas de cepas do gênero *Herbaspirillum* sobre células da linhagem humana Calu-3;
- Verificar a ocorrência ou não de adesão das cepas de *Herbaspirillum* sobre células da linhagem humana Calu-3 e quantificar essa adesão quando ela ocorrer;
- Acompanhar o processo infeccioso em camundongos infectados com cepas do gênero *Herbaspirillum* em diferentes concentrações via intratraqueal;
- Diferenciar e quantificar a linhagem de células brancas no lavado broncoalveolar dos animais após sete dias da infecção;
- Realizar e analisar cortes histológicos dos pulmões dos camundongos após sete dias da infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS BACTERIANAS

Nesse estudo foi utilizada uma cepa de *Herbaspirillum seropedicae* (cepa SmR1) isolada do ambiente e cedida gentilmente pelo prof. Emanuel Maltempi de Souza, a partir da bacterioteca do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, UFPR. Além dessa, outras duas cepas geneticamente modificadas a partir da estirpe SmR1, que expressam as proteínas fluorescentes GFP e dsRed, foram cedidas pela Prof^a Carolina Weigert Galvão, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG. Também foram utilizadas nesse trabalho duas cepas de *Herbaspirillum* obtidas de isolados clínicos, gentilmente cedidas e identificadas pelo professor Dr. John LiPuma, do departamento de pediatria da Universidade de Michigan: *H. frisingense* cepa AU14559 e *H. huttiense* cepa AU11883. A Tabela 1 resume as informações de todas as cepas utilizadas.

Tabela 1 - Cepas de *Herbaspirillum* utilizadas.

Espécie	Estirpe	Fonte	Fonte
<i>H. seropedicae</i>	SmR1	Ambiental – solo	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
<i>H. seropedicae</i>	SmR1 RAM10 – GFP	Ambiental modificada	Dep.de Bioq. e Biol. Mol. UFPR.
<i>H. seropedicae</i>	SmR1 RAM4 – dsRED	Ambiental modificada	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008.
<i>H. frisingense</i>	AU14559	Escarro – paciente com fibrose cística	SPIPKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. huttiense</i>	AU11883	Escarro – paciente com fibrose cística	SPIPKER <i>et al.</i> , 2008

Fonte: o Autor

4.2 CULTIVO, ESTOCAGEM E PREPARO DAS BACTÉRIAS

As cepas foram cultivadas em meio ágar triptona de soja (TSA) (Newprov, Pinhais, PR), por técnica de semeadura em placa, incubadas por 48 h a 37°C, e depois armazenadas em geladeira por um período máximo de 15 dias. Para a realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio líquido caldo triptona de soja (TSB) (Newprov, Pinhais, PR) e incubadas a 37°C pelos tempos de 8 e 18 h sob

agitação, em 120 rpm (rotações por minuto). Todos os processos foram realizados em câmara de fluxo laminar e, para garantir a esterilidade do experimento, foram realizadas incubações de placas e tubos controles contendo somente o meio TSA ou TSB por 72 h em estufa a 37°C apresentando crescimento negativo. As cepas geneticamente modificadas (SmR1 GFP e SmR1 dsRED) foram fixadas em lâminas de vidro e visualizadas em microscópio de fluorescência para garantir que estavam com produção adequada de sua respectiva proteína fluorescente (Figura 4).

4.2.1 Curva de Crescimento

Culturas foram feitas por meio de inoculação de uma colônia da placa de TSA de cada cepa em 3mL de meio TSB, seguida de incubação a 37°C por 24 h sob agitação. Logo após, procedeu-se a coleta de 50µL da cultura, os quais foram inoculados em 3mL de TSB por 24 h sob agitação. No momento da inoculação e posteriormente em intervalos de 3 em 3 horas, foi retirado 1 mL das amostras de 25 mL, colocados em uma cubeta e a turvação mensurada em espectrofotômetro a 600 nm, previamente “zerado” com uma leitura do meio TSB estéril. Esses valores foram inseridos em um gráfico para posterior análise. Valores de densidade óptica (OD600) maiores que 0,4 eram diluídos, lidos novamente, recalculados e o valor inserido no gráfico (WIDDEL, 2010).

4.2.2 Confirmação do gênero pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A confirmação do gênero das bactérias foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, gentilmente realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em conjunto com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.3 LINHAGEM CELULAR Calu-3

Para os ensaios de citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular de origem humana Calu-3, linhagem epitelial obtida de adenocarcinoma de pulmão (ATCC HTB-

55). Essa linhagem foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ (Duque de Caxias, RJ).

As células Calu-3 foram cultivadas em meio RPMI (Cultilab, São Paulo, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, SP), 100 mg/L de estreptomicina e 100 U/L de penicilina (GIBCO, Califórnia, Carlsbab, USA). A manutenção da linhagem foi realizada com auxílio de solução contendo EDTA e tripsina (Biosystems, Curitiba, PR).

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS “*IN VITRO*”

4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico utilizando o reagente MTT

O método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil tetrazólio) (MTT), descrito por Mosman (1983), mede indiretamente a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial da célula. Enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria celular são capazes de agir sobre o MTT reduzindo-o e formando cristais de formazan, que possuem coloração púrpura. Os cristais são então solubilizados com isopropanol em meio ácido (HCl 0,1M) e a coloração formada é medida através de espectrofotometria em 550 nm.

Para a realização do ensaio, células da linhagem Calu-3 cultivadas em garrafa foram soltas de seu substrato utilizando uma solução contendo tripsina e colocadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 15 a 20 minutos. As células foram então centrifugadas a 3000 rpm por 3 min, o sedimento ressuspensado em 1 mL de Meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (MOORE; GERNER; FRANKLIN, 1967), e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, foram adicionadas uma quantidade de 15.000 células para cada poço em placa de 96 poços já contendo 200 µL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram novamente incubadas em estufa por 24 h para aderirem aos poços. Após esse período, o meio RPMI foi substituído por 100 µL de meio RPMI fresco e foram adicionados 70 µL dos sobrenadantes bacterianos das diferentes cepas listadas na tabela 1, que foram cultivadas durante 8 ou 18 horas. Estes sobrenadantes foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos e filtrados em membrana de poro 0,22 µm antes do tratamento para garantir a sua esterilidade. Cada cepa foi testada em quadruplicata e poços contendo células incubadas apenas com o meio RPMI ou

incubadas com meio RPMI e meio TSB foram utilizados como controles. As células foram incubadas com os sobrenadantes bacterianos por 6 e 24 h.

Após o tratamento, os poços foram esgotados e adicionados 70 µL de uma solução contendo 0,5 µg/mL de MTT dissolvido em solução salina tamponada (PBS). A placa foi então deixada em estufa por 2 horas para que ocorresse a formação dos cristais de formazan pelas células viáveis. Passado este tempo, a placa foi observada em microscópio para avaliar se a reação de fato ocorreu e os poços então foram esgotados e 200 µL de solução solvente de isopropanol em meio ácido (HCl 0,1 M) foram adicionados. Após a solubilização dos cristais de formazan, a coloração formada foi mensurada em espectrofotômetro a 570nm.

4.4.2 Avaliação do potencial citotóxico utilizando o corante VN

O ensaio de coloração utilizando Vermelho Neutro (VN) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazino cloridrato) é um dos métodos mais utilizados para testes de citotoxicidade e é baseado na habilidade de células viáveis em incorporar e fixar a molécula de vermelho neutro em seus lisossomos, sendo um teste mais sensível que outros testes citotóxicos, como o MTT (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). A solução de VN foi preparada no momento do ensaio para evitar a degradação do corante, e consistia na solubilização de 20 mg do corante em pó em 2,5 mL de PBS (solução mãe). A partir dessa solução era preparada a solução de uso, utilizando-se 5 µL da solução mãe para cada mL de meio RPMI (sem SFB ou antibióticos), obtendo-se uma concentração final de 40 µg/mL.

Para efetuar o ensaio, as células foram plaqueadas e tratadas com os sobrenadantes bacterianos de acordo com o item 4.5.1. Após 6 ou 24 h, os poços foram esgotados e lavados com 100 µL de PBS. Após a lavagem, os poços foram adicionados 200 µL da solução de uso contendo VN. A placa foi colocada em estufa por 2 h para que a internalização do VN ocorresse. Os poços então foram esvaziados e lavados duas vezes com 100 µL de solução fixadora (formol 10% em 0,1M de CaCl₂). Só então o VN internalizado era solubilizado com 200 µL de solução eluente (ácido acético 10% + etanol 50%) e a coloração formada lida em espectrofotômetro a 540 nm.

4.4.3 Ensaio de morfologia celular utilizando células Calu-3

Para a realização do ensaio, células da linhagem Calu-3 cultivadas em garrafa foram soltas de seu substrato utilizando uma solução contendo tripsina e colocadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 15 a 20 minutos. As células foram então centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, o sedimento ressuspensão em 1 mL de RPMI, e as células contadas em câmara de Newbauer. Após a contagem, foram adicionadas 25.000 células para cada poço em placa de 24 poços contendo uma lamínula de vidro redonda e 200 µL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram novamente incubadas na estufa por 24 h para aderirem às lamínulas de vidro. Após 24 h as células foram lavadas três vezes com PBS estéril. Aos poços contendo as lamínulas com as células foram adicionados 200 µL de RPMI e 140 µL do sobrenadante bacteriano das diferentes cepas listadas na tabela 1, que foram cultivadas durante 8 e 18 horas. Estes sobrenadantes foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos e filtrados em membrana de poro 0,22 µm para garantir a esterilidade. Cada cepa foi testada em duplicata. Poços contendo células incubadas apenas com o meio RPMI e poços contendo células incubadas com meio RPMI e meio de cultivo bacteriano TSB, foram utilizados como controles. As células foram incubadas por 6 h.

Após 6 h de incubação a 37°C, as culturas foram lavadas quatro vezes com PBS estéril e então fixadas com 2% de formol por 10 minutos e submetidas à coloração de May Grünwald-Giemsa segundo SILVA e colaboradores (2009). Após a coloração, as lamínulas foram montadas em lâmina, seladas com esmalte e posteriormente analisadas em microscópio óptico Olympus EX-41 com sistema de captura de imagem acoplado (DP72).

4.4.4 Ensaio de adesão bacteriana utilizando células Calu-3

O mesmo procedimento do item 4.4.3 foi realizado, entretanto no lugar do sobrenadante estéril das culturas de cepas de *Herbaspirillum*, as células foram incubadas com culturas íntegras dessas cepas padronizadas na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/mL).

Para a mensuração do ensaio de adesão (Figuras 7, 8 e 9) foi utilizada metodologia adaptada segundo Grey e Kirov (1993), na qual contou-se,

aleatoriamente, células normais e infectadas até um total de 100 células, calculando a proporção de células infectadas (PCI).

Foram contadas o número de bactérias em 100 células infectadas, calculando-se a quantidade de bactérias por célula infectada (BCI).

Calculou-se então o número de bactérias por célula (BC), o qual foi obtido através da multiplicação do número de BCI pela PCI. A PCI e a BCI foram feitas em triplicata, e a BC foi encontrada através da média obtida (Tabela 4).

4.5 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.5.1 Cultura Bacteriana

Considerando que a cepa ambiental *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 apresentou maior citotoxicidade frente às células Calu-3 e a cepa não ambiental *Herbaspirillum huttiense* AU11883 a maior capacidade de adesão a essas células, essas duas cepas foram selecionadas para os ensaios *in vivo*.

4.5.2 Animais e planejamento estatístico

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da raça Swiss, machos, obtidos do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC, Curitiba, Paraná. Os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, número 021/2016.

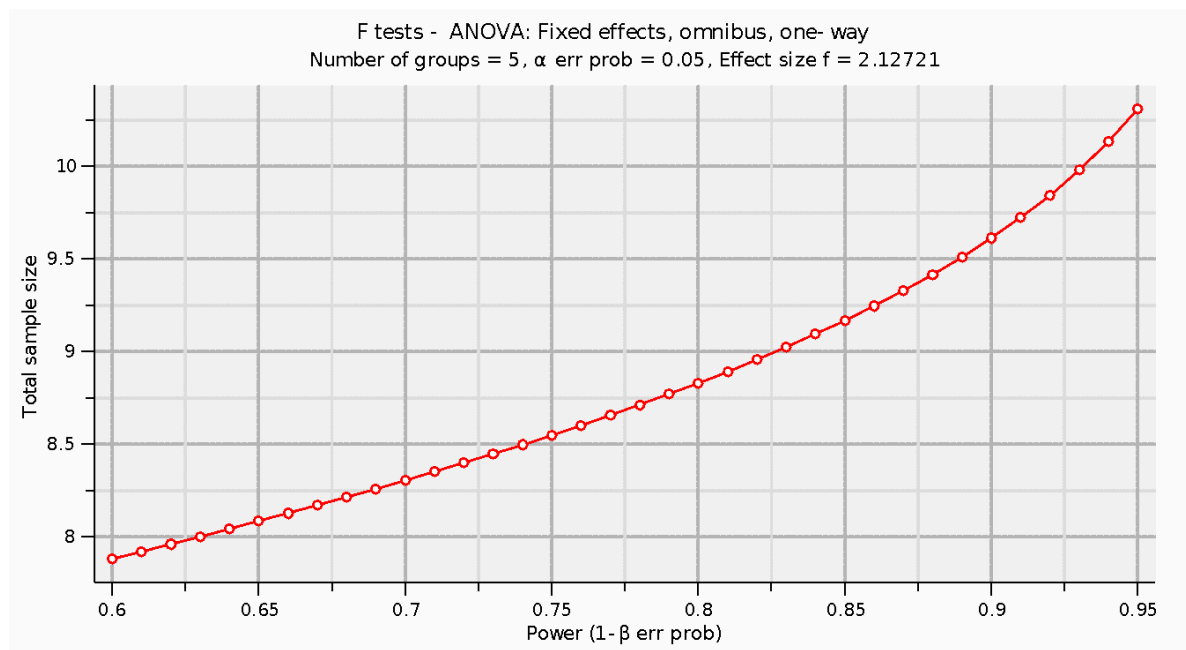
Os animais foram adaptados durante 7 dias no biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa sendo mantidos em caixas moradia, com ciclos de luz claro-escuro de 12h e com água e comida *ad libitum*.

Para o experimento, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=6): Controle, SmR1 10⁹, SmR1 10⁸, 11883 10⁹ e 11883 10⁸. Os sobrescritos em cada grupo correspondem ao número de bactérias inoculadas intratraquealmente em cada animal.

Os animais foram separados em grupos (n=6) e deixados nas gaiolas durante no mínimo 3 dias para ambientalização.

Para a determinação do N foi utilizado o programa G*Power 3.1.9.2 (FAUL *et al.*, 2007). Foi utilizado um ensaio piloto contendo 3 animais por grupo, e a variável escolhida para a análise foi a perda de peso dos animais após 7 dias de inoculação das bactérias. Foi adotado um nível de significância de $\alpha=0,05$. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecido um poder do teste em 80%. Assim foi obtido com $n=3$ /grupo (tamanho do efeito de 2,12) o poder do teste foi de 93% (Figura 2). Dessa forma optamos por um tamanho amostral de 6 animais, considerando a possibilidade de redução do N durante os procedimentos, devido aos procedimentos anestésicos ou cirúrgicos.

Figura 2 Valores do poder do teste em relação ao tamanho amostral. Gráfico gerado pelo programa GPower 3.1.



Fonte: O autor.

4.5.3 Modelo de infecção pulmonar

No dia do experimento, os animais foram pesados, e sedados/anestesiados com xilazina/quetamina via intraperitoneal (IP), 15 e 80 mg/Kg, respectivamente. Quando se constatou a ausência de resposta a estímulos, os animais tiveram a pelagem da região do pescoço tricotomizada e limpa com algodão embebido em álcool 70% e outro algodão embebido em solução de iodo 2%. Uma tesoura cirúrgica estéril foi utilizada para realizar a incisão na pele do animal, e uma pinça estéril para localizar a traquéia.

As cepas foram incubadas em meio TSB durante 18 h, sendo então centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm (VAN DEN BERG; LAMAN; BOON, 2013). O pellet resultante foi ressuspensionado em solução salina estéril e diluído até a proporção desejada (10^8 e 10^9 bactérias/ animal) para o inóculo, utilizando a Escala de McFarland como referência.

Com a traqueia animal devidamente localizada, injetou-se, via intratraqueal, 50 μ L de solução bacteriana (ou salina para animais controle). A injeção foi administrada lentamente para evitar que o animal se afogasse, com auxílio de uma seringa de insulina.

A incisão foi suturada com um fio de nylon estéril e o animal permaneceu na gaiola contendo lâmpada incandescente até sua recuperação da anestesia. Quando todos os animais estavam recuperados da sedação, foram levados ao biotério e receberam água e comida *ad libitum*.

Diariamente, os animais foram pesados e observados por um período mínimo de 15 minutos procurando sinais físicos e comportamentais característicos de infecção. Se uma característica severa fosse detectada, o animal seria sacrificado por overdose de anestésico para evitar sofrimento do mesmo, porém esse procedimento não foi necessário para nenhum animal deste experimento. Aspectos físicos e comportamentais dos animais foram avaliados através de um sistema de escore conforme a tabela 2, e uma média do escore foi realizada para cada grupo e dispostos na tabela 5.

A variação do peso dos animais foi representada em porcentagem. A primeira pesagem, anterior ao processo cirúrgico, foi considerada como 100%. Uma média da variação percentual do peso dos animais de cada grupo e em cada dia da pesagem foi então realizada.

Após 7 dias os animais foram sacrificados através de overdose de anestésico (xilazina e quetamina) via IP. Constatado o óbito, 1 mL de solução salina estéril era injetada rapidamente na traqueia e retirada dos pulmões para a obtenção do lavado broncoalveolar.

Logo após a sua coleta, 15 µl do lavado broncoalveolar foi depositado sobre uma câmara de Neubauer para a contagem total de leucócitos. Após a contagem, o lavado foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min e o sedimento utilizado na confecção de uma extensão sobre lâmina, posteriormente corado com a coloração de May Grünwald Giemsa. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em microscópio ótico.

Após a coleta do lavado broncoalveolar, os pulmões íntegros de cada animal foram retirados e fixados em solução de ALFAC (80% de álcool etílico 85%, 10% de formol e 5% de ácido acético) por 16 h. Depois desse período o ALFAC foi trocado por solução de álcool 70% e posteriormente submetidas a técnica tradicional de processamento histológico (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Tabela 2 Sistema de escore de fatores físicos e comportamentais de camundongos analisados no ensaio de infecção intrapulmonar. Cada aspecto encontrado no animal é somado com base no valor do escore, e se o total for 6 ou mais, o animal é imediatamente eutanasiado. Se constatado fatores críticos como a diminuição maior que 30% do peso ou a paralisia dos animais, estes eram imediatamente eutanasiados. Escore obtido a cada 24 h, durante 7 dias.

Parâmetro	Aspecto do Animal	Escore
Aparência Geral	Normal	0
	Sujidade nos pelos	1
	Pelos eriçados	2
	Postura “corcunda”	3
Comportamento	Normal	0
	Mudanças leves	1
	Agressivo ou menos móvel	2
	Muito agressivo ou isolado	3
Peso	Normal	0
	Diminuição 10%	1
	Diminuição 20%	2
	Diminuição 30%	3
Outras características	Respiração pesada, sonora	Sim/Não
	Sangramento área da lesão	Sim/Não
	Diminuição peso >30%	Eutanásia
	Paralisia	Eutanásia

Fonte: O autor.

Após o processamento histológico, as lâminas foram analisadas de forma cega e randomizada. Cinco parâmetros foram analisados: congestão, hemorragia, presença de fibrina intra-alveolar, arquitetura pulmonar, infiltrado peribronquiolar e infiltrado perivascular. As alterações foram computadas seguindo-se uma tabela de escore (Tabela 3), seguindo os modelos apresentados por Cimolai *et al.* (1992), Matute-Bello *et al.* (2001) e Beck *et al.* (2001):

Tabela 3 Escore quantitativo das alterações pulmonares observadas nas lâminas histológicas de pulmão.

Parâmetro	Graduação	Escore
A - Congestão	Septos alveolares finos e delicados	0
	Congestão alveolar em 1/3 dos alvéolos em 400x	1
	Congestão alveolar em 2/3 dos alvéolos em 400x	2
	Congestão alveolar > 2/3 dos alvéolos em 400x	3
B – Hemorragia	Sem hemorragia	0
	5 eritrócitos/ 1 a 5 alvéolos em 400x	1
	5 eritrócitos / 5 a 10 alvéolos em 400x	2
	5 eritrócitos / < 10 alvéolos em 400x	3
C – Fibrina	Sem fibrina intra-alveolar	0
	Fibrina intra-alveolar em 1/3 dos alvéolos em 400x	1
	Fibrina intra-alveolar em 2/3 dos alvéolos em 400x	2
	Fibrina intra-alveolar > 2/3 dos alvéolos em 400x	3
D – Infiltrado Peribronquiolar/ peribronquial	Sem infiltrado	0
	Colar interrompido de infiltrado leucocitário	1
	Colar completo de infiltrado leucocitário com espessura < 5 células	2
	Colar completo de infiltrado leucocitário com espessura > 5 células	3
D – Infiltrado perivascular	Sem infiltrado	0
	Infiltrado leucocitário ao redor das veias intrapulmonares	1
	Infiltrado leucocitário em aproximadamente 25 a 50% do parênquima pulmonar	2
	Infiltrado leucocitário > 50% do parênquima pulmonar	3

Fonte: O autor.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Foi considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o software *Graphpad* versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

5.1.1 Identificação por sequenciamento parcial do gene 16s rRNA

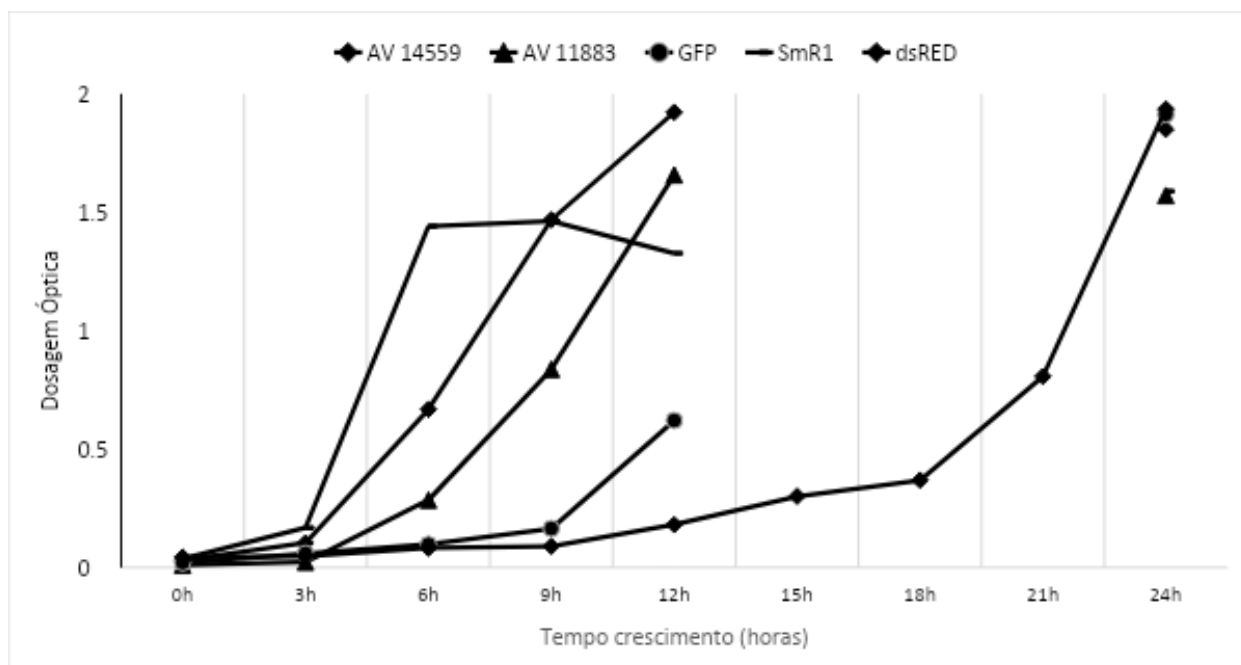
A sequência do gene 16S rRNA das cepas utilizadas nesse trabalho foi comparada com as presentes no banco do *Ribosomal Database Project* (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005) e no banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria/Archaea)” do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Tais análises permitiram identificar todas as cepas como sendo do gênero *Herbaspirillum*.

A confirmação do gênero das bactérias utilizadas através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA é importante devido à grande dificuldade de identificação deste gênero através de meios convencionais, como a série bioquímica, que para estas bactérias são identificadas incorretamente como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (TAN; OEHLER, 2005; SPILKER *et al.*, 2008; ZIGA; DRULEY; BURNHAM, 2010; CHEMALY *et al.*, 2015; REGUNATH *et al.*, 2015).

5.1.2 Curva de crescimento

O crescimento bacteriano é um processo complexo que envolve a síntese de metabólitos e constituintes celulares e sua posterior degradação no mesmo meio de cultura. A obtenção de uma curva de crescimento é necessária para a identificação das fases de lag, crescimento exponencial, estacionária e de morte de cada cepa (MAIER, 2009).

Figura 3 - Curva de crescimento durante 24 h de diferentes cepas de *Herbaspirillum*. Os pontos foram obtidos através de densidade óptica (OD) a 600nm em espectrofotômetro, a cada 3 h durante o período de um dia. AU14559 – *H. frisingense*; AU11883 – *H. huttiense*; GFP – *H. seropedicae* RAM 10; SmR1 – *H. seropedicae*; dsRed – *H. seropedicae* RAM 4.



Fonte: O autor.

As cepas de *Herbaspirillum* utilizadas nesse trabalho apresentaram resultados diferenciados (Figura 3). A cepa *H. seropedicae* SmR1 isolada do solo obteve um rápido crescimento exponencial após 3 h de incubação, atingindo a fase estacionária em torno de 6 h. As cepas isoladas clínicas *H. frisingense* AU14559 e *H. huttiense* AU11883 tiveram um crescimento semelhante uma à outra, com a fase de crescimento exponencial iniciando em torno das 3 h de incubação e atingindo a fase estacionária em torno das 12 h (MAIER, 2009; WIDDEL, 2010).

As cepas geneticamente modificadas para a produção de proteínas fluorescentes tiveram um crescimento mais lento em comparação com a cepa SmR1. A fase de crescimento exponencial foi atingida em torno de 9 h de incubação, e estendeu-se até 24 h, sendo esta a última medição registrada no experimento. Essa diferença de tempo de crescimento pode ser explicada pois as bactérias, para a produção de proteínas, dentre elas as fluorescentes, tendem a consumir nutrientes do meio, levando a bactéria a proliferar mais lentamente e/ou diminuindo a produção de outras proteínas não essenciais (HEBISCH *et al.*, 2013).

A curva de crescimento é necessária para se conhecer o tempo de crescimento máximo específico de cada cepa no meio de cultura utilizado e outras características fenotípicas. Conhecer o tempo de crescimento de uma cepa é fundamental para sua utilização, possibilitando a utilização em experimentos de uma massa bacteriana em que se encontrem células viáveis que ainda não entraram na fase de morte em uma cultura (HALL; ACAR; NANDIPATI, 2013; MAIER, 2009).

Com base na curva de crescimento e no trabalho de Marques (2011), que utilizou em seus estudos as mesmas cepas de isolados clínicos utilizadas nesse trabalho, selecionamos os tempos de crescimento de 8 e 18 h para a realização dos testes *in vitro*.

A partir de análises comparativas da sequência do genoma de *H. seropedicae* SMR1, *H. frisingense* GSF30 e *H. huttiense subsp. putei* IAM 15032 foi possível identificar diferenças em diversos metabolismos. Apenas *H. seropedicae* SMR1 apresenta o sistema de secreção do tipo III (T3SS), o qual é tipicamente utilizado por bactérias patogênicas para administrar proteínas efetoras nas células hospedeiras de plantas, mas também é usado em interações benéficas (VIPREY *et al.*, 1998). Apesar disso, Chaves *et al.* (2009) não detectou proteínas T3SS no secretoma de *H. seropedicae* SMR1 crescido até a fase exponencial tardia (OD600 = 1.0), sugerindo que podem ser necessárias condições fisiológicas específicas para a expressão e a atividade do T3SS e síntese de proteínas efetoras nesse microrganismo. No presente trabalho, *H. seropedicae* SMR1 foi avaliado após ter atingido a fase estacionária (8 e 18h), fase essa que não foi avaliada por Chaves *et al.* (2009) que pode, portanto, conter no seu secretoma as proteínas T3SS.

5.1.3 Identificação das cepas *H. seropedicae* SmR1 GFP e *H. seropedicae* SmR1 dsRed por microscopia de fluorescência

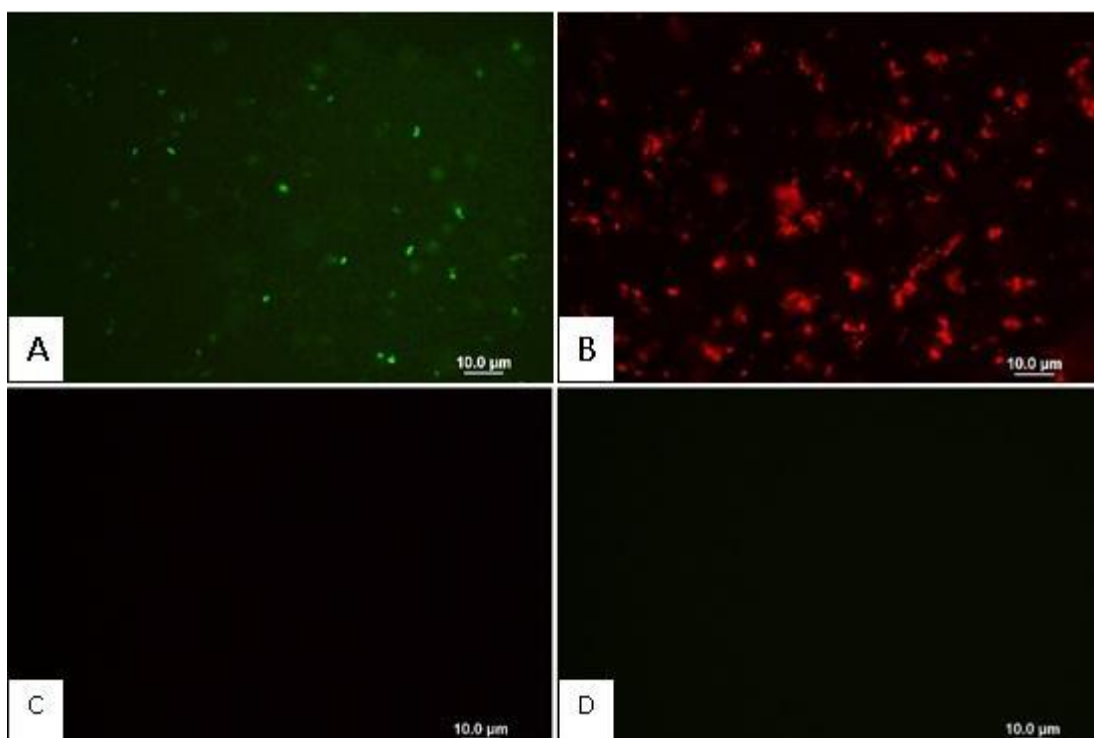
As cepas geneticamente modificadas SmR1 GFP e SmR1 dsRed foram observadas em microscópio de fluorescência para identificar a produção de suas respectivas proteínas fluorescentes (Figura 4).

Como esperado, as cepas *H. seropedicae* SmR1 GFP e *H. seropedicae* SmR1 dsRed (Figuras 4A e 4B) emitiram fluorescência em seus respectivos comprimentos de onda. A cepa *H. seropedicae* SmR1 sem modificação genética não emitiu nenhuma

fluorescência como esperado, mesmo testada nos comprimentos de ondas 540 e 580 nm (Figuras 4C e 4D).

A utilização das cepas com produção de proteínas fluorescentes é interessante para o rastreamento da bactéria em trabalhos com plantas, facilitando a visualização e identificação das mesmas nos diferentes tecidos dos vegetais (BALSANELLI, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2011). Da mesma forma, essas cepas podem ser utilizadas para rastreamento das cepas em culturas de células ou tecidos biológicos.

Figura 4 Fluorescência das cepas geneticamente modificadas SmR1 GFP e SmR1 dsRed. A - *H. seropedicae* SmR1 GFP a 540 nm. B - *H. seropedicae* SmR1 dsRed a 580 nm. C - *H. seropedicae* SmR1 a 540 nm. D- *H. seropedicae* SmR1 a 580 nm.



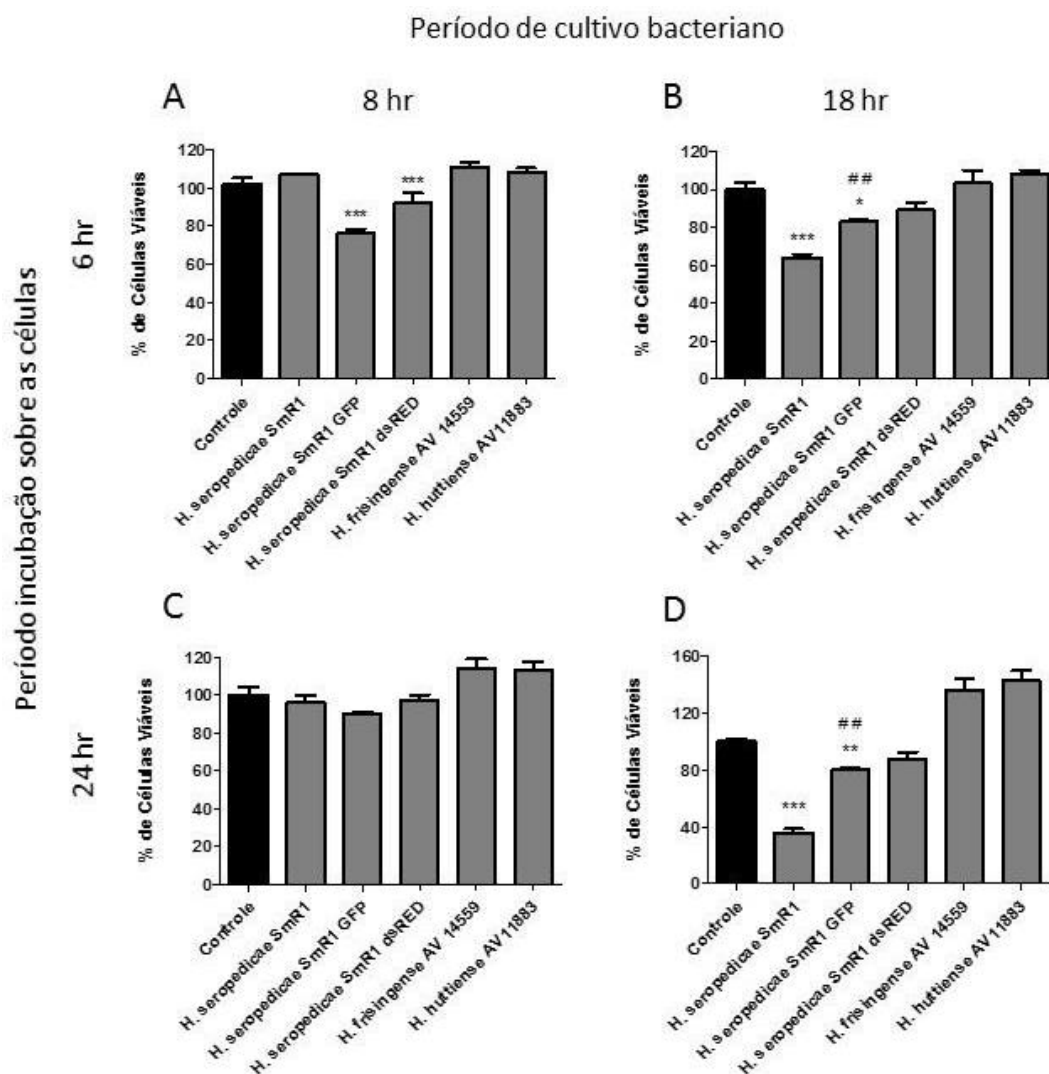
Fonte: O autor.

5.2 ENSAIOS “IN VITRO”

5.2.1 Ensaios de citotoxicidade utilizando vermelho neutro e MTT

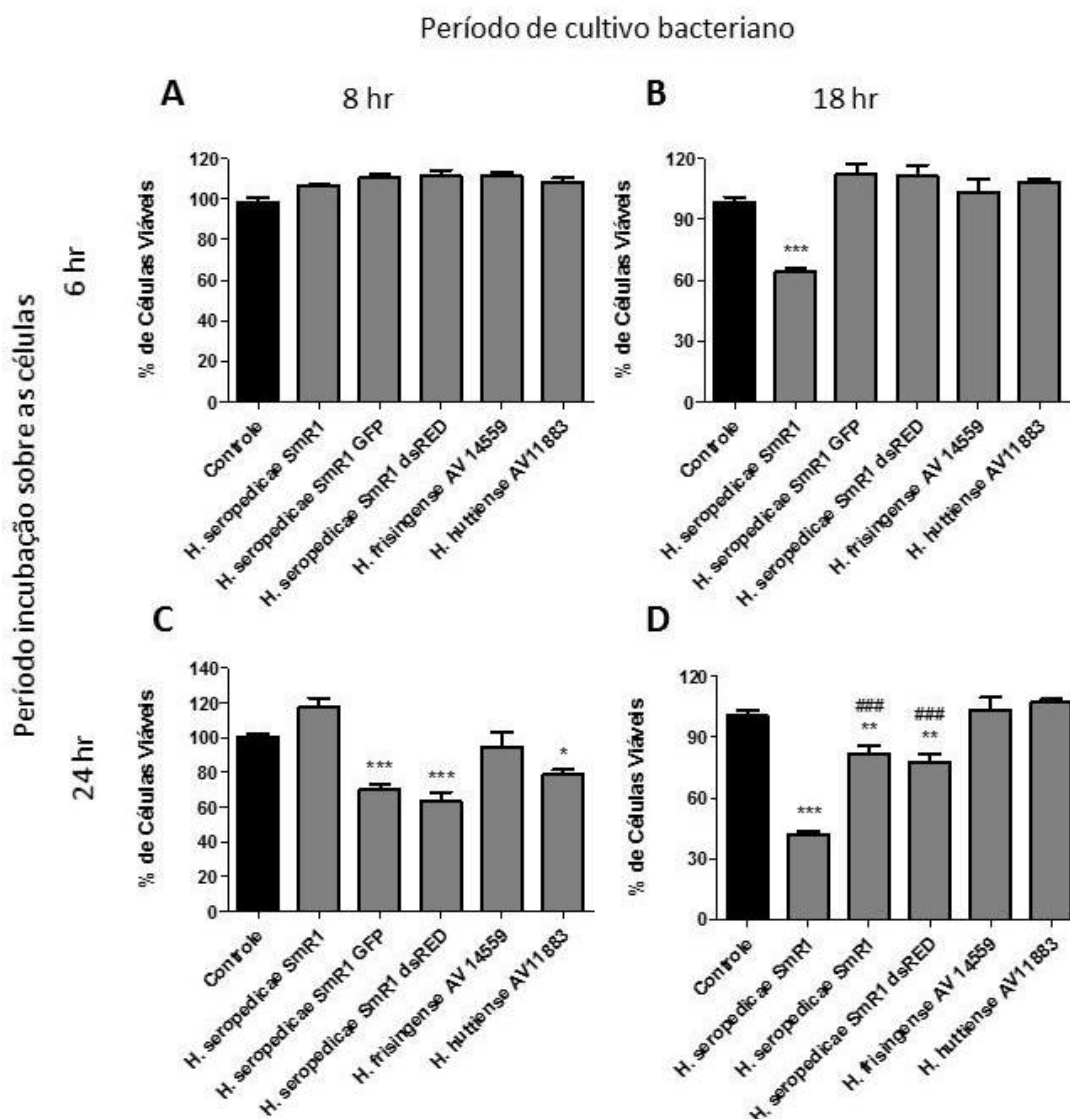
Os resultados dos ensaios de MTT (Figura 5) e VN (Figura 6) demonstraram que o sobrenadante da cepa *H. seropedicae* SmR1 apresentou efeito citotóxico em relação ao controle apenas com um crescimento de 18 h das colônias, indiferente do tempo de incubação com as células pulmonares utilizadas no teste (6 ou 24h). Essa cepa foi originalmente isolada de raízes de plantas, e esperava-se que não fosse capaz de causar efeitos sobre as células, mas os testes indicam que com um crescimento de 18 h essa cepa é capaz de produzir algum elemento citotóxico às células Calu-3 de forma solúvel no sobrenadante.

Figura 5 Ensaio de citotoxicidade com MTT. As células da linhagem Calu-3 foram incubadas por 6 (A e B) e 24 h (C e D) com os sobrenadantes das cepas de *Herbaspirillum* com crescimento de 8 (A e C) e 18 h (B e D). ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação controle, ## $p < 0,01$ em relação a cepa *H. seropedicae* SmR1.



Fonte: O autor.

Figura 6. Ensaio de citotoxicidade com VN. As células da linhagem Calu-3 foram incubadas por 6 (A e B) e 24 h (C e D) com os sobrenadantes das cepas de *Herbaspirillum* com crescimento de 8 (A e C) e 18 h (B e D).. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação controle, ### $p < 0,001$ em relação a cepa *H. seropedicae* SmR1.



Fonte: O autor.

O único trabalho na literatura que testou o efeito citotóxico de cepas de *Herbaspirillum* sobre linhagens celulares demonstrou que a cepa *H. seropedicae* SmR1 reduziu de forma significativa a viabilidade de células da linhagem de adenocarcinoma cervical humano – HeLa, incubadas com sobrenadante da cultura bacteriana por 6, 18 e 24 h (MARQUES *et al.*, 2015). Nesse mesmo trabalho as cepas ambientais de *H. frisingense* (GSF-30), *H. rubrisubalbicans* (M4), *H. lusitanum* (P6-12) e *H. seropedicae* (Z67) também apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem HeLa utilizando ensaio de MTT.

A cepa *H. seropedicae* SmR1 GFP apresentou efeito citotóxico em relação ao controle com o sobrenadante de 18 h para o teste de MTT, indiferente do tempo de incubação com as células, ao passo que no teste do VN os sobrenadantes de 8 h e 18 h mostraram diferença na incubação com as células em 24 h. A cepa *H. seropedicae* SmR1 dsRed foi estatisticamente significativa somente no teste do VN, com diferença no tempo de incubação de 24 h com sobrenadantes de 8 h e 18 h.

As duas cepas fluorescentes utilizadas nos testes foram originalmente isoladas de raízes de plantas, sendo modificadas geneticamente para a produção de proteínas fluorescentes (BALSANELLI, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2011). Os sobrenadantes destas cepas induziram redução significativa da viabilidade das células em ambos os testes (MTT e VN), porém esperava-se que as cepas fluorescentes tivessem comportamento similar à cepa original. Esses resultados podem ter sido diferentes, pois as proteínas fluorescentes produzidas pelas bactérias geneticamente modificadas podem diminuir a velocidade de crescimento das culturas (HEBISCH *et al.*, 2013). Além disso, os sobrenadantes bacterianos foram coletados nos tempos de 8 e 18 h de crescimento. Nesses períodos a cepa SmR1 encontra-se no início e fim da fase estacionária, enquanto as cepas modificadas ainda estão na fase exponencial (Figura 3). Estes fatores podem explicar a diferença de resultados obtidos entre as cepas utilizadas no trabalho.

Outras duas espécies foram testadas. A *H. huttiense* AU11883 apresentou resultado estatisticamente significativo somente no teste do VN, com incubação de 24 h no sobrenadante de 8 h. A bactéria *H. frisingense* AU14559 não obteve nenhum resultado diferente do controle.

Segundo a literatura, os LPS, macromoléculas altamente complexas encontradas exclusivamente na membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS; FERRIER, 1995), são liberados quando ocorre morte celular ou lise celular e o mesmo serve de gatilho para a sepse (WILSON *et al.*, 2002). Sabendo-se que na fase estacionária está ocorrendo morte celular, é possível que tenha sido registrada uma maior citotoxicidade ao utilizar bactérias crescidas por 18h por conta de um incremento na liberação de LPS.

As cepas AU11883 e AU14559 foram originalmente isoladas de infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística (SPILKER *et al.*, 2008), por isso, esperava-se que causasse uma maior redução na viabilidade das células. Provavelmente essas bactérias se utilizam de outros mecanismos para produzir

infecção, necessitando da bactéria em estado íntegro para que ocorra a inviabilidade celular.

Outra hipótese é que essas cepas possam produzir alguma substância citotóxica que não seja excretada no meio extracelular, ou que as substâncias sejam degradadas ou não solúveis na metodologia utilizada. Além disso, é sabido que as bactérias são econômicas, sendo a sua expressão gênica regulada por inúmeros fatores do meio. Mudanças na expressão gênica desempenham um papel importante nas adaptações e modificações necessárias para o desenvolvimento de uma infecção bem-sucedida (DOW; DANIELS, 2000). Fatores que regulam a expressão de genes respondem a sinais específicos, ambientais ou celulares, para estimular ou inibir a transcrição, e/ou tradução de modo a modificar adequadamente a taxa de síntese dos produtos gênicos, importantes para adaptação fisiológica e bioquímica necessárias (STARON *et al.*, 2009). Genes de virulência ou associados à virulência bacteriana também sofrem esse tipo de regulação (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

Considerando isso, o crescimento bacteriano realizado na ausência de células eucarióticas pode justificar a ausência ou baixa citotoxicidade encontrada nos ensaios bioquímicos, devido à falta de estímulo do meio para a síntese de componentes citotóxicos. No trabalho de Marques e colaboradores (2015) o sobrenadante dessas duas cepas foram testadas sobre células da linhagem HeLa, não apresentando redução de viabilidade.

Ainda no trabalho de Marques e colaboradores (2015) nenhuma das cepas testadas de bactérias do gênero *Herbaspirillum* apresentaram resultados citotóxicos sobre a linhagem renal Vero, nem mesmo a cepa *H. seropedicae* SmR1. Isso sugere que as bactérias possam ter possíveis mecanismos seletivos para as células de linhagem pulmonar (Calu-3), porém estudos com outras linhagens celulares seriam necessários.

Provavelmente a realização de ensaios de MTT e VN em células incubadas por tempos superiores aos testados neste trabalho (24 h) poderiam apresentar resultados de citotoxicidade mais evidentes. Tempos de incubação dos sobrenadantes sobre as células por 48 e 72 h foram realizados nos ensaios de MTT e VN, mas foi verificado sofrimento das células do controle (alterações morfológicas), o que inviabilizou a realização dos testes.

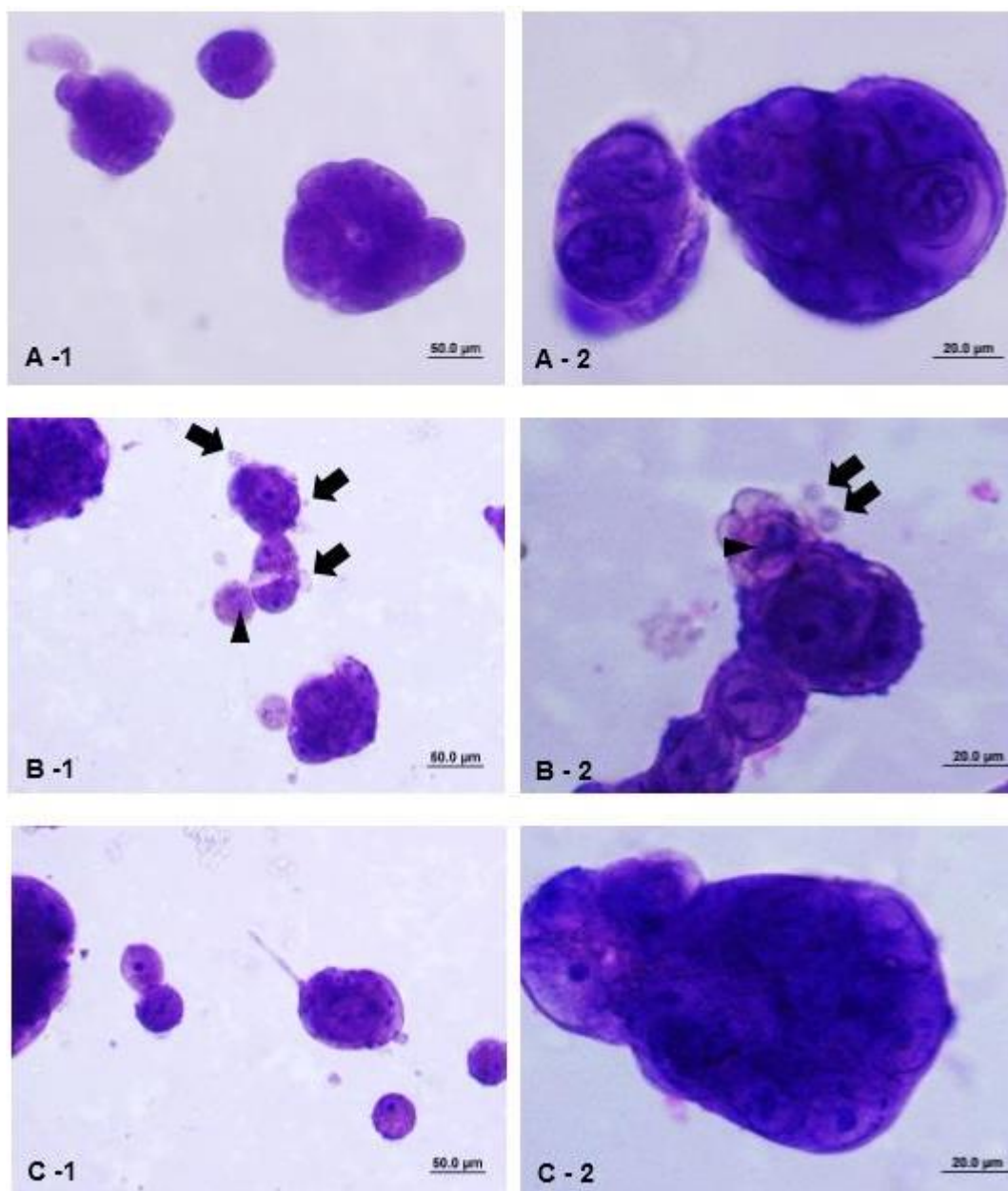
5.2.2 Ensaio de morfologia celular utilizando células Calu-3

Os ensaios de morfologia tiveram seus resultados expressos através da visualização de alterações morfológicas nas células causadas pela adição do sobrenadante bacteriano com 8 e 18 h de crescimento, durante 6 h.

Como esperado, as células controle, incubadas apenas com caldo TSB apresentaram morfologia normal (Figura 7). Todos os sobrenadantes bacterianos utilizados induziram nas células Calu-3 a formação de *blebs*, abcessos celulares vistos comumente em processos apoptóticos (Figuras. 7, 8, 9, 10 e 11). A *H. seropedicae* SmR1 induziu a condensação de cromatina de algumas células (Figura 7). Com exceção da *H. seropedicae* SmR1, pode-se observar em todas as outras lâminas com sobrenadante a formação de prováveis corpos apoptóticos nas células Calu-3 (Figura 8, 9, 10 e 11).

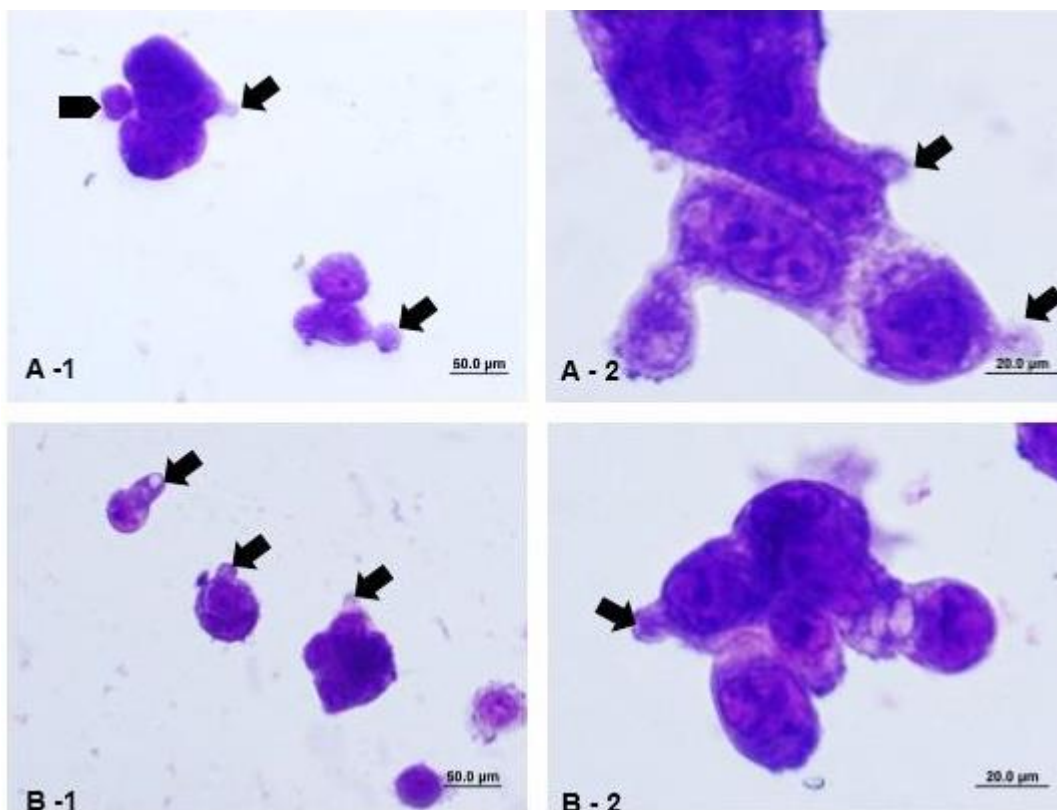
A observação da morfologia celular é um ensaio importante para a avaliação da citotoxicidade celular. Alterações morfológicas clássicas do processo apoptótico, como arredondamento celular, condensação de cromatina e formação de *blebs*, são eventos iniciais e podem ser verificadas antes mesmo de serem determinadas por ensaios bioquímicos como o MTT e o VN (ELMORE, 2007). Alterações morfológicas podem estar ocorrendo em uma célula em processo de apoptose que ainda apresenta bom funcionamento de suas organelas como mitocôndrias e lisossomos (com funções verificadas pelos ensaios de MTT e VN respectivamente). Todas as cepas testadas induziram algum grau de citotoxicidade sobre as células da linhagem Calu-3, embora nem todas tenham apresentado citotoxicidade nos ensaios bioquímicos.

Figura 7 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 por 6 h. A – Controle, células incubadas com caldo TSB. B- Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 após 8 h de crescimento. C – Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 após 18 h de crescimento. Alterações morfológicas: □blebs, ►condensação de cromatina. Aumento de 400x (imagens 1), aumento de 1000x (imagens 2).



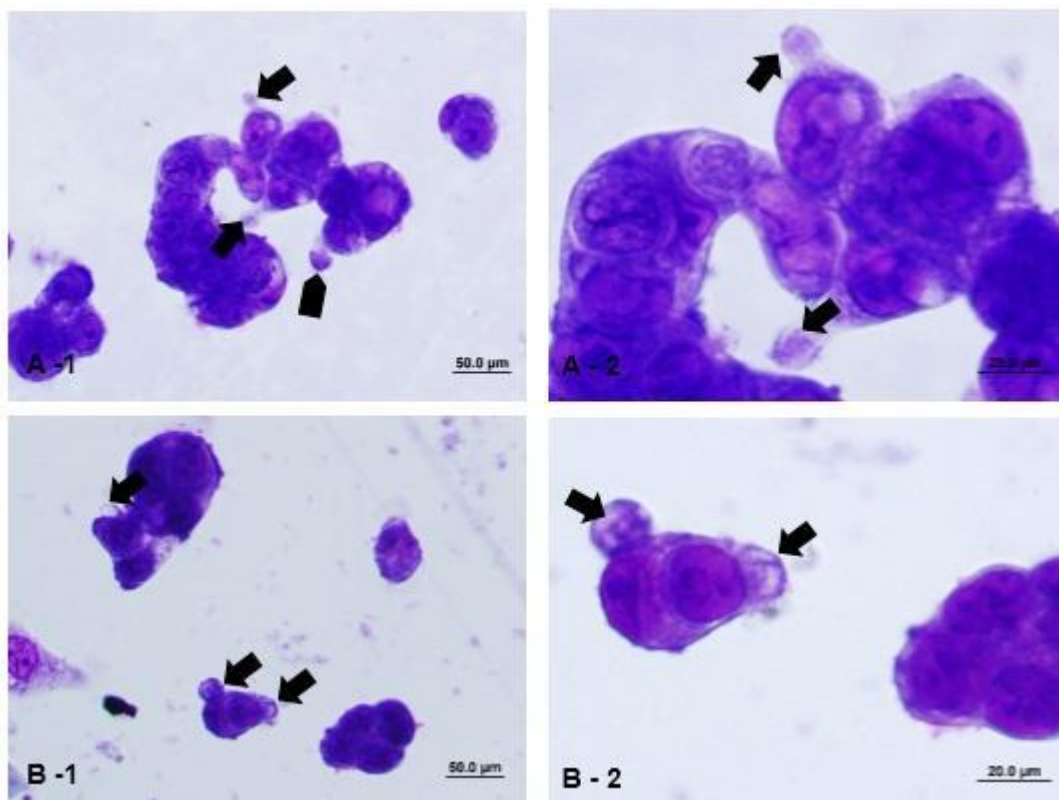
Fonte: O autor.

Figura 8 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 GFP por 6 h. A - Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 GFP após 8 h de crescimento. B – Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 GFP após 18 h de crescimento. Alterações morfológicas: $\blacksquare$ blebs, $\blacksquare$ provável corpo apoptótico. Aumento de 400x (imagens 1), aumento de 1000x (imagens 2).



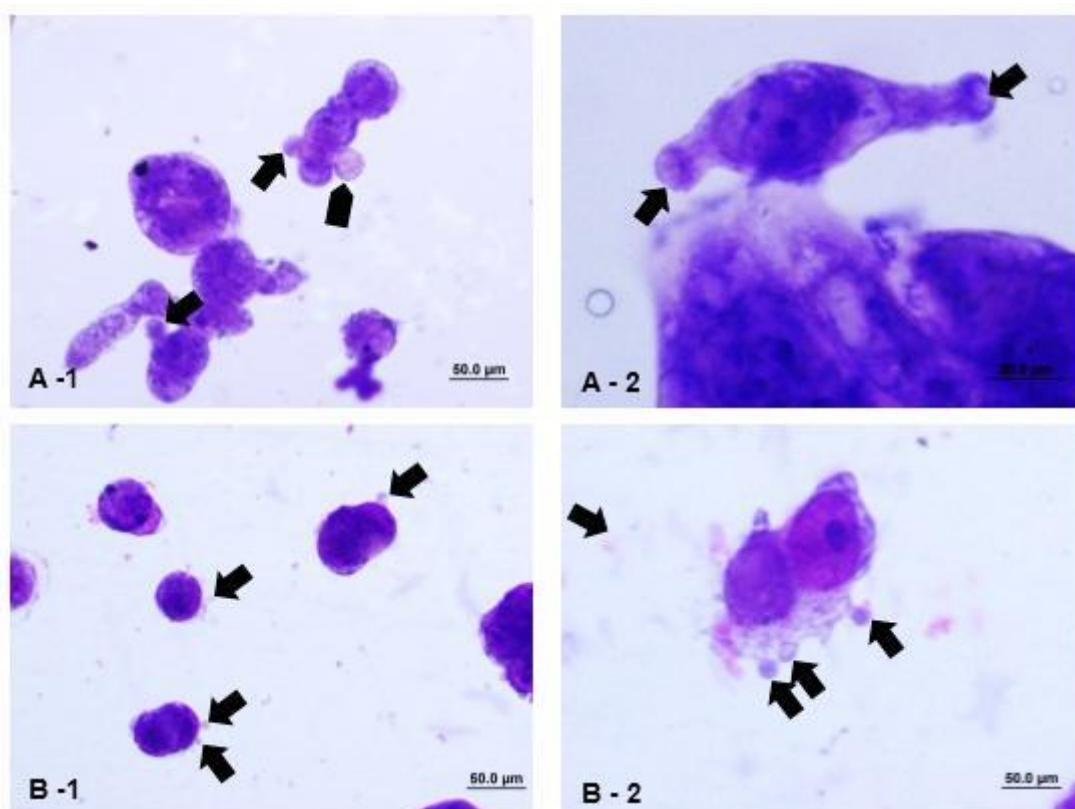
Fonte: O autor.

Figura 9 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 Red por 6 h. A- Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 Red após 8 h de crescimento. B – Células incubadas com o sobrenadante de *H. seropedicae* SmR1 Red após 18 h de crescimento. Alterações morfológicas: ▯blebs, ▯provável corpo apoptótico. Aumento de 400x (imagens 1), aumento de 1000x (imagens 2).



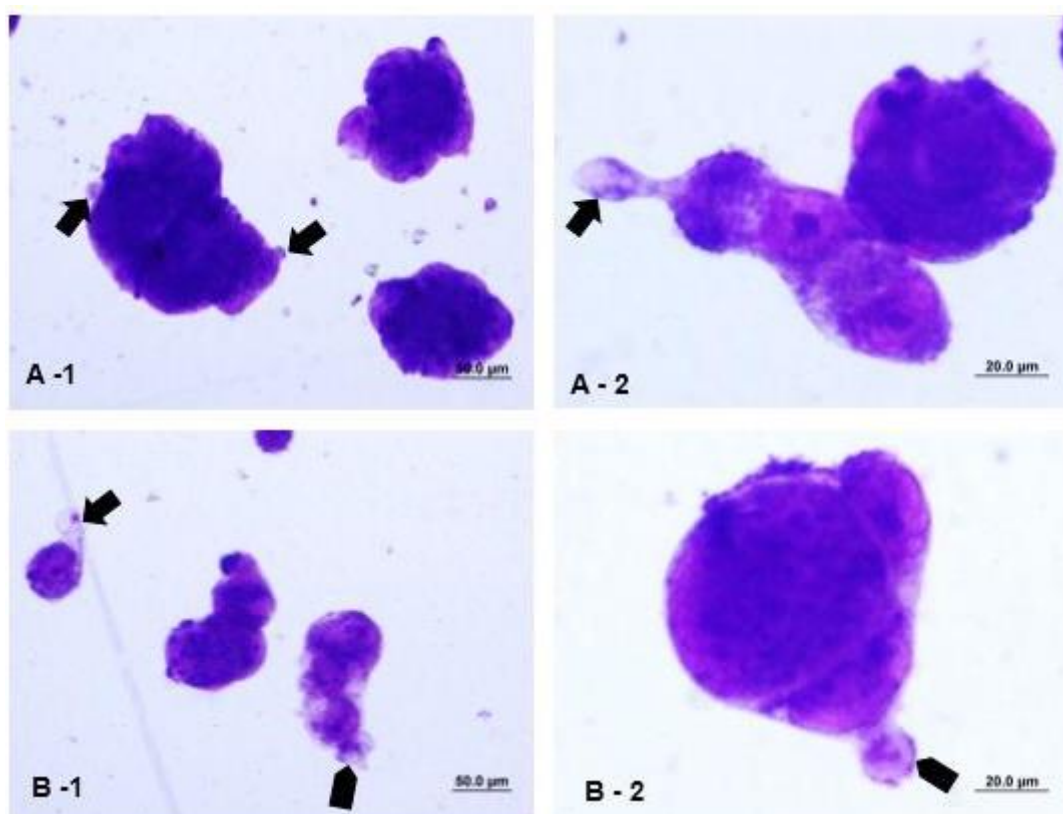
Fonte: O autor.

Figura 10 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de *Herbaspirillum frisingense* estirpe AU14559 por 6 h. A - Células incubadas com o sobrenadante de *H. frisingense* AU14559 após 8 h de crescimento. B – Células incubadas com o sobrenadante de *H. frisingense* AU14559 após 18 h de crescimento. Alterações morfológicas: ▣blebs, ▣provável corpo apoptótico. Aumento de 400x (imagens 1), aumento de 1000x (imagens 2).



Fonte: O autor.

Figura 11 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com os sobrenadantes das culturas de *Herbaspirillum huttiense* estirpe AU11883 por 6 h. A - Células incubadas com o sobrenadante de *H. huttiense* AU11883 após 8 h de crescimento. B – Células incubadas com o sobrenadante de *H. huttiense* AU11883 após 18 h de crescimento. Alterações morfológicas: $\square$ blebs, $\square$ provável corpo apoptótico. Aumento de 400x (imagens 1), aumento de 1000x (imagens 2).



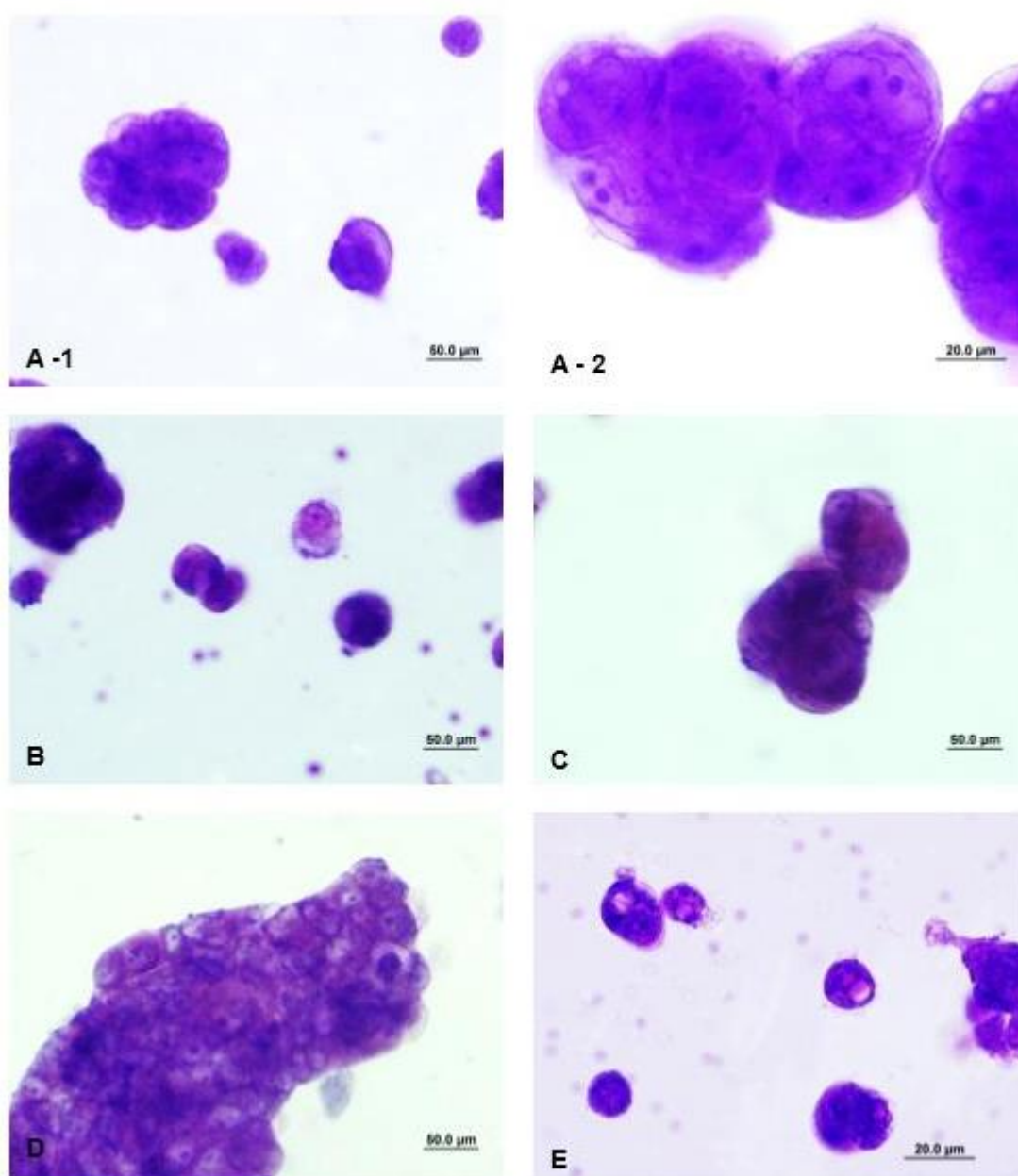
Fonte: O autor.

5.2.3 Ensaio de adesão bacteriana utilizando células Calu-3

O ensaio de adesão mostrou que as bactérias *H. seropedicae* SmR1, *H. seropedicae* SmR1 GFP e *H. seropedicae* SmR1 dsRed (Figuras 12 e 13) não foram capazes de aderir nas células Calu-3.

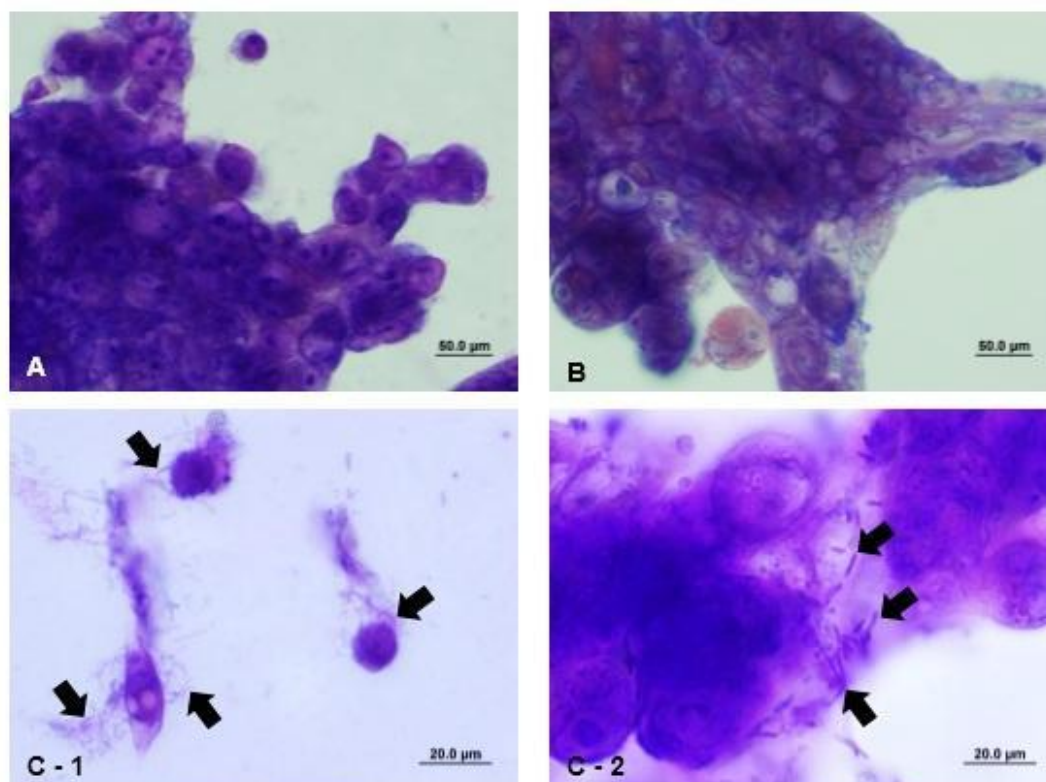
Já as bactérias *H. frisingense* AU14559 (Figura 13) e *H. huttiense* AU11883 (Figura 14) apresentaram adesão nas células Calu-3 e foram quantificadas quanto aos parâmetros de BCI, PCI e BC (Tabela 4).

Figura 12 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de *Herbaspirillum* quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland. A – Controle, células incubadas com PBS (1– aumento de 400x, 2- aumento de 1000x). B e C - Células incubadas com a estirpe de *H. seropedicae* SmR1 após 8 e 18 h de crescimento, respectivamente, 400x. D e E– células incubadas com a estirpe de *H. seropedicae* SmR1 GFP após 8 e 18 horas de crescimento, respectivamente, 400x.



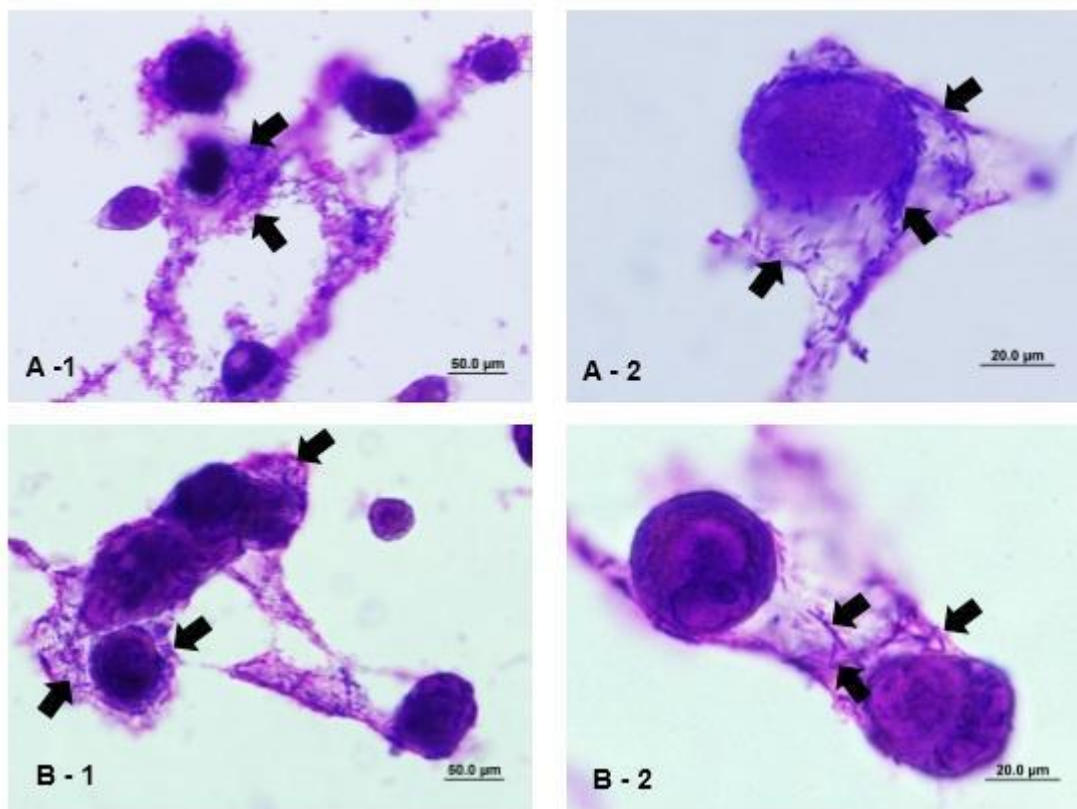
Fonte: O autor.

Figura 13 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de *Herbaspirillum* quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland. A e B - Células incubadas com *H. seropedicae* estirpe SmR1 Red após 8 e 18 h de crescimento, respectivamente, 400x. C – células incubadas com *H. frisingense* estirpe AU14559 após 8 h de crescimento (1 – aumento de 400x, 2 – aumento de 1000x). □Cepas bacterianas aderidas às células.



Fonte: O autor.

Figura 14 - Células da linhagem Calu-3 incubadas com as cepas de *Herbaspirillum* quantidade padronizada na escala de 0,5 de McFarland. A - Células incubadas com *H. huttiense* estirpe AU11883 após 8 h de crescimento (1 – aumento de 400x, 2 – aumento de 1000x). B – células incubadas com *H. huttiense* estirpe AU11883 após 18 h de crescimento (1 – aumento de 400x, 2 – aumento de 1000x). □Cepas bacterianas aderidas às células.



Fonte: O autor.

Tabela 4 - Número de bactérias por célula infectada (BCI), porcentagem de proporção de células infectadas (PCI) e número de bactérias por célula (BC), realizada após 18 h de incubação. Os resultados foram apresentados como a média de uma triplicata. NA – não se aplica.

Cepas	BCI (Bactéria por célula infectada)	PCI (Proporção célula infectada, %)	BC (Bactéria por célula)
<i>H. seropedicae</i> SmR1	0	0	NA
<i>H. seropedicae</i> SmR1 GFP	0	0	NA
<i>H. seropedicae</i> SmR1 dsRed	0	0	NA
<i>H. frisingense</i> AU14559	10,07	28,66	2,81
<i>H. huttiense</i> AU11883	6,97	45,33	3,13

Fonte: O autor

Marques e colaboradores (2015) também demonstraram adesão das cepas AU14559 e AU11883 em células humanas, mas para a linhagem HeLa, mas nesse trabalho a adesão não foi quantificada. O ensaio de adesão é uma etapa importante na caracterização da patogenicidade de uma cepa bacteriana uma vez que a adesão é uma etapa fundamental para o estabelecimento de um patógeno no seu hospedeiro e subsequente desenvolvimento de infecção (SALYERS; WHITT, 2002).

Não há um critério adotado universalmente para quantificar a adesão bacteriana. Segundo Grey e Kirov (1993), as duas bactérias que apresentaram adesão estariam no grau de “baixo nível de adesão”. Alguns autores mais recentes como Surek (2014) discursam sobre a dificuldade de se padronizar resultados sobre adesão bacteriana pois cada autor utiliza condições distintas de meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, concentração do inóculo, linhagens celulares e tempo de incubação célula-bactéria e, dependendo de qual e como o método é selecionado, o resultado da adesão pode ser positivo ou negativo, o que dificulta a análise efetiva dos dados.

O ponto mais interessante desse ensaio é o fato de as cepas ambientais não terem sido capazes de aderir sobre as células pulmonares humanas enquanto os dois isolados clínicos sim. Isso sugere que as cepas clínicas possam ser dotadas de mecanismos de interação patógeno-hospedeiro ausentes nas cepas ambientais. Fatores de aderência, também conhecidos como fatores de colonização, adesinas ou

antígenos de aderência, são componentes estruturais das células bacterianas que as capacitam a colonizar, sobreviver e multiplicar-se em um dado tecido. Praticamente todos os patógenos possuem estratégias de adesão aos tecidos de seus hospedeiros. Essa adesão é particularmente importante em órgãos como mucosa oral, intestino delgado, bexiga e pulmão, uma vez que a superfície dessas mucosas é constantemente banhada por fluidos. Além disso, é difícil para as bactérias em geral sobrepor-se à repulsão formada pela rede de carga negativa das células epiteliais. Assim a ligação bacteriana não ocorre a menos que fímbrias, adesinas, pili ou outras proteínas monoméricas ligadas a adesão estejam presentes (OFEK; DOYLE, 1994; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2006).

5.3 ENSAIOS *IN VIVO*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, visando a utilização consciente e garantindo a redução do número desnecessário de animais, foram selecionadas duas cepas bacterianas com base nos resultados dos ensaios *in vitro*: a cepa *H. seropedicae* SmR1, a qual apresentou resultados distintos nos testes de MTT e VN, e a cepa *H. huttiense* AU11883, a qual apresentou maior número de bactérias por célula (BC) no teste de adesão celular e, até a data de publicação deste trabalho, foi a única espécie com possível registro de infecção em um humano saudável (REGUNATH et al, 2015). Além disso, somente foi utilizado o tempo de crescimento bacteriano de 18 h, o qual mostrou possuir maior efeito citotóxico.

As cepas geneticamente modificadas, GFP e ds Red, apesar de terem mostrado resultados citotóxicos frente às células Calu-3, necessitavam de um tempo de crescimento em meio de cultura superior ao da cepa ambiental, o que inviabilizou os testes em animais.

5.3.1 Dados físicos e comportamentais

A avaliação do comportamento e dados físicos de animais podem ser associados ao desconforto, dor, estresse e outros quadros clínicos. A dificuldade de constatar a dor e o sofrimento animal levou os pesquisadores a criarem um sistema de escore que permite a visualização e evolução de um quadro clínico no animal (MORTON; GRIFFITS, 1985). Sabendo-se dos vastos efeitos deletérios causados por

uma infecção, o sistema de escore é amplamente utilizado em modelos animais de infecções para evitar o sofrimento excessivo do animal em casos onde a doença evolui a uma septicemia (VAN DEN BERG; LAMAN; BOON, 2013; FULLNER; BOUCHER; HANES, 2002).

Pesquisadores concordam que um sistema de escore único pode ser inespecífico e impreciso, necessitando então a adaptação do sistema para cada experimento realizado, visando sinais e sintomas relacionados com a área a qual o animal está sendo submetido (HAWKINS, 2002; CARTENS; MOBERG, 2000; LLOYD; WOLFENSOHN, 1999).

Para a realização deste trabalho, a metodologia de escore foi adaptada especificamente para avaliar a sintomatologia dos animais derivados do processo incisivo na região do pescoço e de possíveis sintomas patológicos causados por uma infecção pulmonar (OGLESBEE, 2011; FULLNER; BOUCHER; HANES, 2002; LLOYD; WOLFENSOHN, 1999).

Tabela 5 - Média do escore dos dados físicos e comportamentais. Animais avaliados a cada 24h durante 7 dias. Nenhum animal necessitou ser eutanasiado, pois não apresentou escore de 6 ou mais de um total de 9, e não apresentaram características de debilitação como paralisia ou perda de peso >30%.

Grupo	Escore (Média)	Apresentou problemas respiratórios?
Controle	0,5	Não.
11883 10 ⁸	0,4	Não.
11883 10 ⁹	2,1	Sim, 2 animais.
SmR1 10 ⁸	0,6	Não.
SmR1 10 ⁹	2,6	Sim, 3 animais.

Fonte: o Autor

Lloyd e Wolfensohn (1999), em um modelo animal de enfisema em que relacionam o sistema de escore adaptado à evolução da doença, demonstram que o animal deve ser eutanasiado quando se obtém um escore de 70% ou mais do total. A tabela 5 demonstra que nesse experimento a média do escore dos animais demonstra ausência de sinais de dor, desconforto ou estresse a níveis suficientes para que fosse realizada a eutanásia de nenhum animal.

O teste de escore não permite a avaliação da severidade de uma doença. Um trabalho de caracterização da infecção via nasal com *Campylobacter jejuni*, um organismo conhecidamente patógeno, infectando os animais com a mesma potência bacteriana utilizada neste trabalho, obteve resultados de uma infecção leve com o teste de escore, apesar de comprovada a bacteremia sistêmica no organismo do animal em testes posteriores (AL-BANNA *et al.*, 2008).

É de interesse notar a presença de problemas respiratórios, como a respiração audível e espirros, encontrados em dois animais do grupo 11883 10⁹ e em três animais do grupo SmR1 10⁹, que são sinais característicos de infecções do trato respiratório em camundongos (OGLESBEE, 2011; STOREY, 1998).

5.3.2 Pesagem

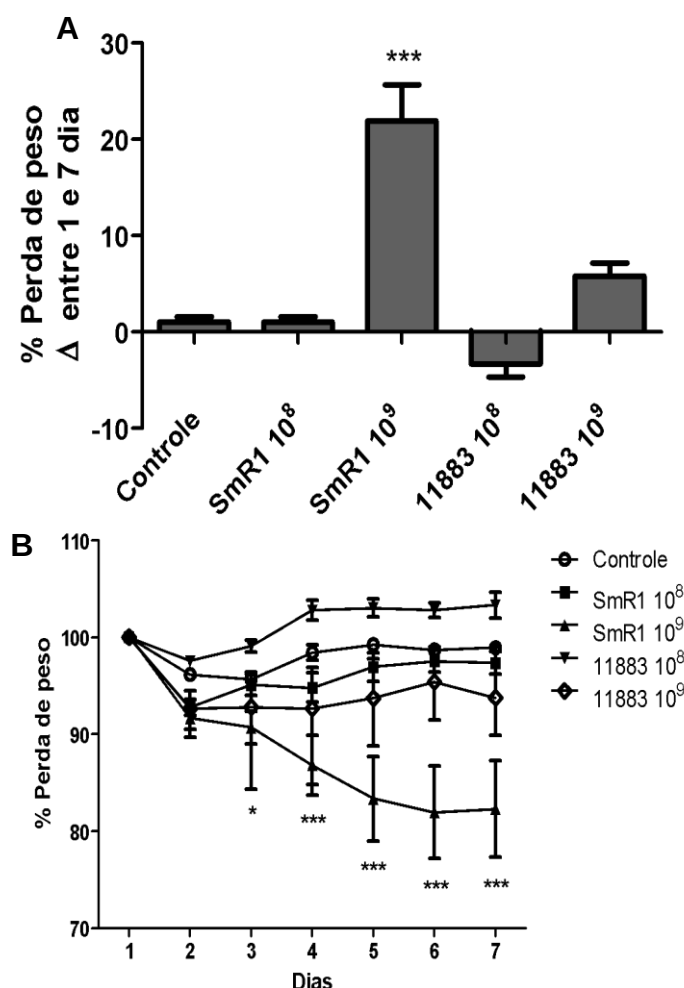
Vários estudos relacionam a perda de peso do animal após uma infecção com a taxa de sobrevivência e severidade do processo infeccioso. Autores indicam que animais que morrem devido ao processo infeccioso perdem mais peso que animais que eventualmente sobreviveram (VAN DEN BERG; LAMAN; BOON, 2013). Estudos com bactérias causadoras de infecções pulmonares relacionam a perda de peso com um significativo aumento na patologia pulmonar (DAMJANOVIC *et al.*, 2014), e diminuição da taxa de sobrevivência dos animais (VAN DEN BERG; LAMAN; BOON, 2013; DAMJANOVIC *et al.*, 2014). Um modelo de infecção intranasal por *Burkholderia pseudomallei* analisou diferentes linhagens de camundongos quanto a sua resposta frente ao agente patológico, e concluiu que animais que perdiam mais peso eram mais suscetíveis a infecção (EMERY; PARVATHAREDDY; PANDEY, 2014).

Tabela 6 - Porcentagem de peso dos animais em relação ao primeiro dia de tratamento (procedimento cirúrgico de infecção intratraqueal). Os números representam a média $\pm$ sd. Cada grupo possui 6 animais. Teste de Anova de uma via e pós teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Dias	Controle	SmR1 10^8	SmR1 10^9	11883 10^8	11883 10^9
1	100	100	100	100	100
2	96,15 $\pm$ 0,94	92,78 $\pm$ 1,85 *	90,48 $\pm$ 2,18 **	97,56 $\pm$ 0,88	92,43 $\pm$ 1,74 *
3	95,65 $\pm$ 1,09	95,10 $\pm$ 2,47	89,68 $\pm$ 3,33 *	99,10 $\pm$ 1,22	90,90 $\pm$ 4,73
4	98,48 $\pm$ 1,72	94,80 $\pm$ 3,37	83,85 $\pm$ 4,65 ***	102,78 $\pm$ 2,09	91,72 $\pm$ 4,63
5	99,23 $\pm$ 0,79	96,93 $\pm$ 3,27	79,62 $\pm$ 6,33 ***	103,02 $\pm$ 1,87	93,93 $\pm$ 3,19
6	98,67 $\pm$ 0,97	97,53 $\pm$ 2,50	77,32 $\pm$ 7,14 ***	102,80 $\pm$ 1,53	95,33 $\pm$ 2,53
7	98,93 $\pm$ 1,06	97,35 $\pm$ 2,62	78,07 $\pm$ 8,33 ***	103,32 $\pm$ 2,70	94,22 $\pm$ 3,12

Fonte: O autor.

Figura 15 - A – Porcentagem de perda de peso entre o primeiro e o último dia de observação. B – Porcentagem de perda de peso ao longo dos dias de observação. As barras (A)/pontos (B) representam a média $\pm$ SEM. Cada grupo possui 6 animais. Teste de Anova de uma via e pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.



Fonte: O autor.

Os grupos SmR1 10^8 e 11883 10^9 apresentaram diferença significativa apenas no dia 2 (Tabela 6). Essa perda de peso foi recuperada nos dias seguintes, os quais não mostraram diferença estatística significativa. Trabalhos de modelos animais de infecção via intranasal de *Burkholderia pseudomallei* e de Influenza H1N1 apresentaram resultados semelhantes e explicam a perda de peso inicial destes animais pelo fator de estresse causado pelo procedimento invasivo e líquido inserido nos pulmões, e também pelo fator medicamentoso causado pela anestesia geral, não sendo um indicativo de evolução da infecção (EMERY; PARVATHAREDDY; PANDEY, 2014; NEDELKO; KOLLMUS; KLAWONN, 2012).

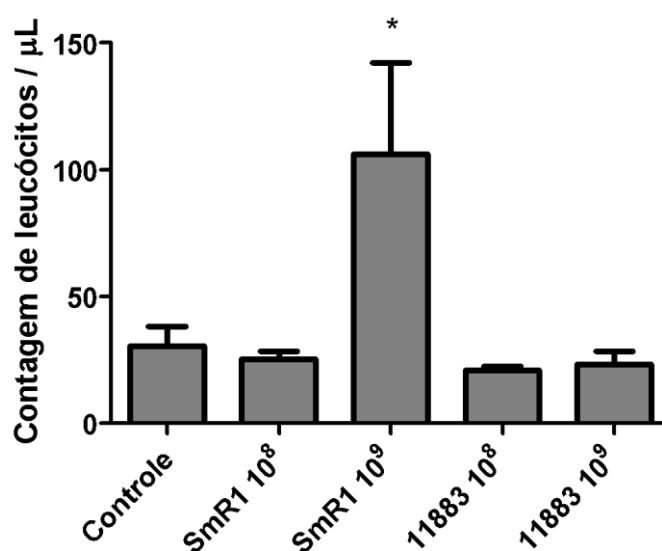
Os animais do grupo SmR1 10⁹ apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todas as pesagens realizadas após a realização do modelo de infecção intratraqueal. A diferença em torno de 20% do peso inicial registrada pelos animais (Tabela 6 e Figura 15) deste grupo corrobora com outros estudos de modelos de infecção realizados com microrganismos sabidamente patogênicos. Infecções por *Streptococcus pneumoniae* via intranasal avaliados por sete dias (GHONEIM; THOMAS; MCCULLERS, 2013) e de sepse intravenosa resultaram na redução de peso com consequente morte dos animais (KADIOGLU; CUPPONE; TRAPPETTI; 2011). Resultados semelhantes foram encontrados com a co-infecção de *S. pneumoniae* e vírus Influenza A inoculados em camundongos por via intratraqueal (REPPE *et al.*, 2015). Um modelo de pneumonia aguda via intratraqueal utilizando *Klebsiella pneumoniae* obteve uma redução de peso em torno de 20% nos animais em dois dias (SHAYER *et al.*, 2016).

5.3.3 Análise do lavado broncoalveolar – LBA

A contagem total de leucócitos no LBA é um procedimento padrão para uma avaliação do aspecto geral do tecido pulmonar (MEYER, 2007). A análise do lavado broncoalveolar (LBA) é utilizada clinicamente desde 1980, sendo útil para a identificação de várias doenças (MEYER, 2007; HERON *et al.*, 2011). O LBA explora uma grande área do pulmão pois inclui todos os compartimentos alveolares, fornecendo constituintes celulares e não-celulares do trato respiratório inferior (BAUGHMAN, 2001).

Técnicas modernas como a imunofenotipagem podem ser aplicadas no LBA para o diagnóstico de doenças raras, porém, para o diagnóstico de infecções, a simples análise do fluido e a contagem total e diferencial de leucócitos (WBC) são suficientes (MEYER, 2007; HERON *et al.*, 2011; BAUGHMAN, 2001)

Figura 16 - Número absoluto de leucócitos no LBA. Cada barra representa a média $\pm$ SEM. Teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

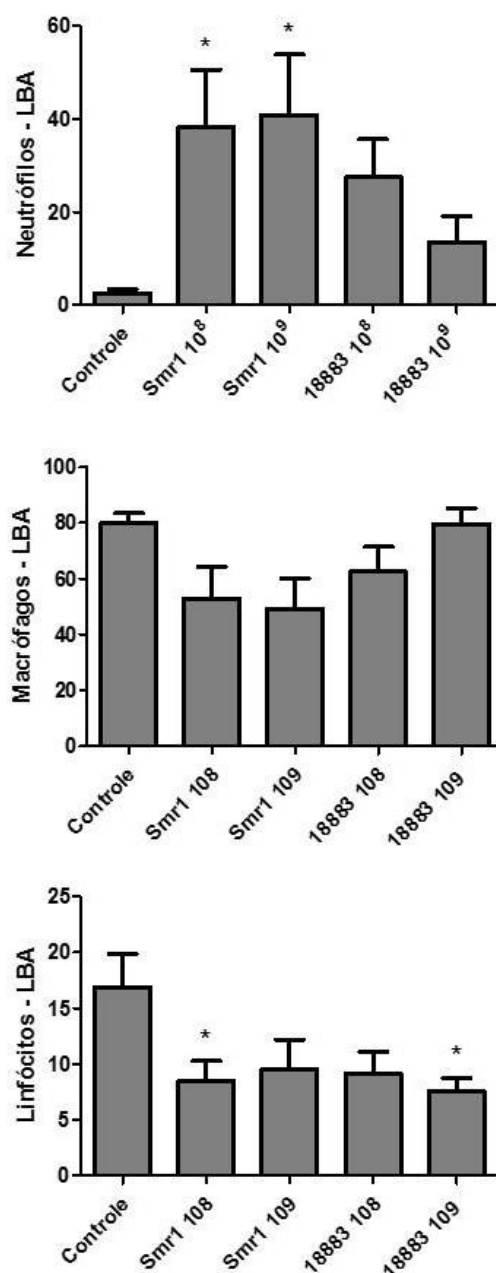


Fonte: O autor.

Analisando o resultado da figura 16 podemos perceber que houve um aumento significativo na contagem total de leucócitos no LBA dos animais apenas para o grupo SmR1 10^9 . Não houve diferença estatística para os grupos SmR1 10^8 , 11883 10^8 e 11883 10^9 em relação ao grupo controle.

Estudos similares na literatura, utilizando espécies bacterianas sabidamente patogênicas como *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* em modelos de infecção pulmonar em camundongos via intranasal apresentaram uma contagem total de leucócitos com uma média em torno de $1 \times 10^5/\text{mL}$ (ou $100/\mu\text{L}$) em animais onde a pneumonia era confirmada (HARRIS *et al.*, 2013; SHAVER *et al.*, 2016).

Figura 17 - Contagem diferencial do lavado broncoalveolar. Os animais (n=6) foram infectados via intratraqueal 7 dias antes da contagem. As barras representam a média $\pm$ SEM. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. * $p < 0,5$.



Fonte: O autor.

No experimento realizado com os camundongos, a WBC (contagem diferencial) do LBA do grupo controle apresentou uma média da quantidade de linfócitos de 16%, macrófagos 80% e neutrófilos 2,5% (Figura 17), mostrando uma relação similar a WBC de humanos saudáveis (MEYER, 2007; HERON *et al.*, 2011). Avaliações em humanos saudáveis mostram que a WBC no LBA é composta principalmente de macrófagos alveolares (80-90%), alguns linfócitos (5-15%) e muito

poucos neutrófilos (<3%) e eosinófilos (<1%) (MEYER, 2007; HERON *et al.*, 2011), variando com um leve aumento de macrófagos e diminuição de linfócitos para pacientes fumantes (HERON *et al.*, 2011).

Os animais infectados com a cepa *H. seropedicae* SmR1, em ambas concentrações, demonstraram resultados significativamente diferentes do grupo controle (Figura 17). A média da WBC do LBA do grupo SmR1 na concentração de 10^9 foi de 9,5% linfócitos, 49,4% de macrófagos e 40,9% de neutrófilos; já para o grupo SmR1 na concentração de 10^8 , a média foi de 8,5% linfócitos, 53% de macrófagos e de 38,2% de neutrófilos. Esses resultados corroboram com um prognóstico de uma infecção bacteriana aguda (MEYER, 2007).

O aumento de neutrófilos no LBA encontrado neste trabalho foi similarmente observado em um experimento utilizando *Klebsiella pneumoniae* em um modelo animal de infecção pulmonar em camundongos (SORDI *et al.*, 2013). A quantidade elevada de neutrófilos no LBA em relação ao grupo controle é uma característica comum em estudos de modelos experimentais de pneumonia, indicando que a infecção foi instaurada, como encontrado por estudos utilizando *Acinetobacter baumannii* (HARRIS *et al.*, 2013) e estudos utilizando *Streptococcus pneumoniae* (KADIOGLU; CUPPONE; TRAPPETTI, 2011; REPPE *et al.*, 2015).

O LBA da cepa *H. huttiense* AU11883 não exibiu uma quantidade de células leucocitárias significativamente diferente do controle em nenhuma das concentrações utilizadas, embora seja possível observar uma forte tendência no aumento de neutrófilos.

5.3.4 Achados histopatológicos

Não foram verificadas, para nenhum grupo, alterações histológicas severas para nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 7). Nenhuma alteração em relação a congestão, hemorragia ou presença de fibrina intra-alveolar foram verificadas.

Tabela 7 - Mediana do escore para cada parâmetro histológico analisado nas lâminas de pulmão processadas 7 dias após a inoculação intratraqueal das cepas bacterianas. *p<0,5 em relação a mediana do controle. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Parâmetro	Control e	SmR1 10 ⁸	SmR1 10 ⁹	11883 10 ⁸	11883 10 ⁹
A - Congestão	0	0	0	0	0
B – Hemorragia	0	0	0	0	0
C - Fibrina	0	0	0	0	0
D – Infiltrado Peribronquiolar/ peribronquial	0,5	0,5	2*	1	1,5*
E – Infiltrado perivascular	0,5	0	2*	0	1,5*

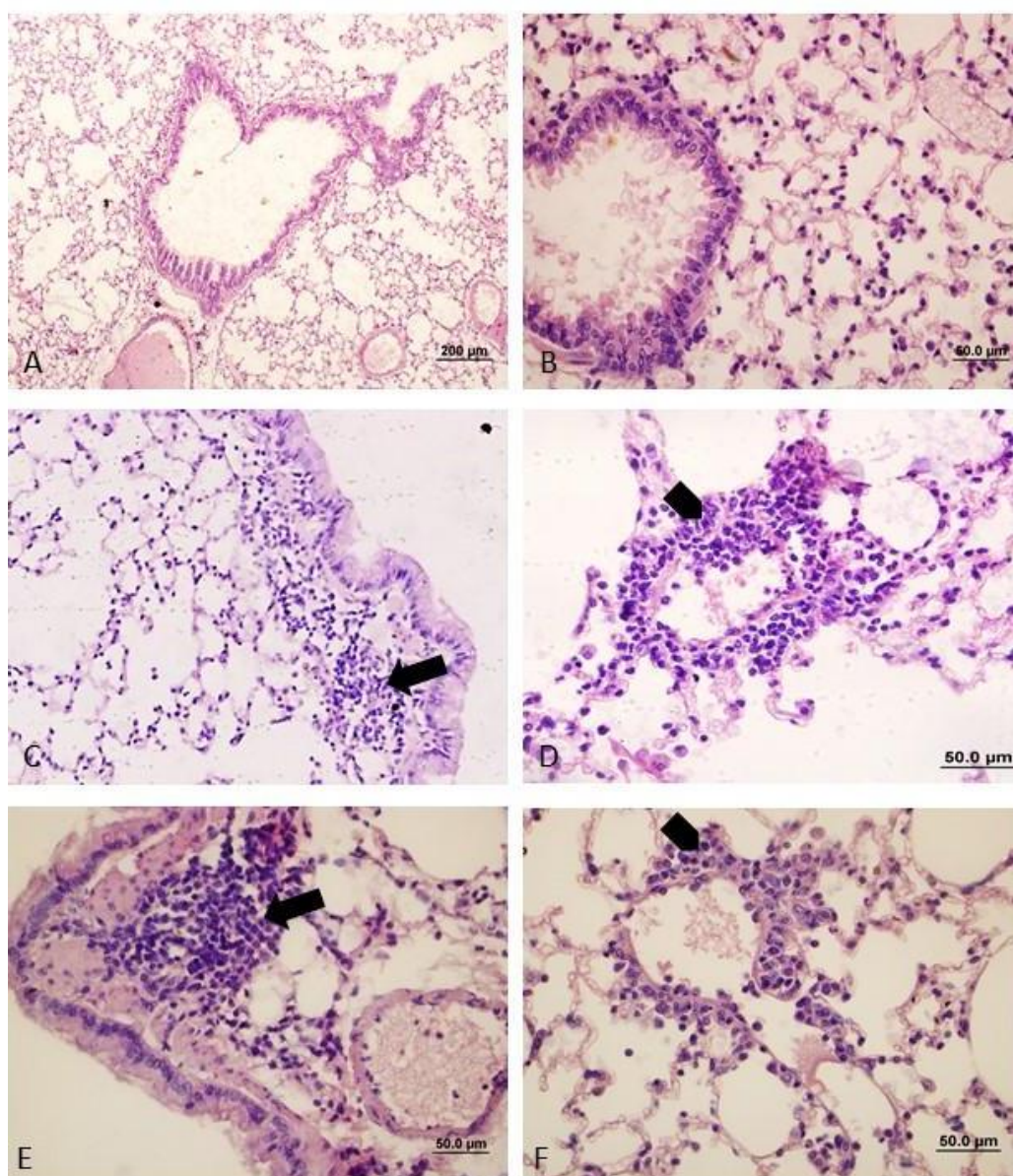
Fonte: O autor.

A análise histológica dos grupos SmR1 10⁹ e 11883 10⁹ demonstrou infiltrado inflamatório discreto a moderado com predomínio de linfócitos em região peribronquial e perivascular por campo com escore significativo em relação ao controle. O controle apresentou anatomia preservada, sem alterações inflamatórias, característico de animais saudáveis.

Infiltrados perivasculares e peribronquiais são encontrados em lâminas histológicas de infecções pulmonares causadas por vários microrganismos patogênicos como *Mycoplasma pneumoniae* (CIMOLAI *et al.*, 1992), influenza vírus (BECK *et al.*, 2001), *Klebsiella pneumonia* (SORDI *et al.*, 2013), embora tais microrganismos induzam outras alterações importantes como hemorragia, congestão alveolar e perda da arquitetura do parênquima pulmonar.

É interessante notar que nenhuma das cepas utilizadas nesse trabalho tiveram passagem *in vivo* antes de serem inoculadas para a ativação dos genes de virulência das bactérias, como preconizado por vários autores (FIELD *et al.*, 1991; AL-BANNA *et al.*, 2008; SORDI *et al.*, 2013; BAQAR *et al.*, 1996). Trabalhos posteriores utilizando esta metodologia podem apresentar resultados mais acentuados.

Figura 18 - Achados histopatológicos. A e B – grupo controle, C e D – grupo SmR1 10^9 e E e F – grupo 11883 10^9 . □ - infiltrado peribronquiolar, ▣ -infiltrado perivascular.



Fonte: O autor.

6 CONCLUSÃO

Apesar de todas as cepas de *Herbaspirillum* testadas apresentarem algum nível de citotoxicidade sobre as células da linhagem pulmonar Calu-3 (ensaios morfológicos), todos os ensaios demonstraram um destaque para a cepa ambiental *H. seropedicae* SmR1. Essa cepa apresentou citotoxicidade nos ensaios *in vitro* e em todos os ensaios *in vivo*, com resultados importantes para a caracterização do estabelecimento de uma infecção bacteriana como perda de peso do animal, aumento significativo no número de leucócitos totais e neutrófilos, e a presença de infiltrados periobronquiolares e periovasculares nos cortes histológicos pulmonares. Por isso, consideramos que essa cepa apresenta potencial patogênico, embora mais estudos precisem ser realizados para determinar os meios utilizados para tal.

As cepas clínicas *H. frisingense* AU14559 e *H. huttiense* AU11883 apresentaram fracos indícios que indicam um potencial patogênico, como as alterações morfológicas e a adesão sobre as células da linhagem pulmonar Calu-3. A *H. huttiense* AU11883 ainda apresentou infiltrados nos cortes histológicos pulmonares. Resultados mais consistentes eram esperados, uma vez que essas cepas foram isoladas do material biológico do pulmão de pacientes com pneumonia. É possível que a manutenção dessas cepas em laboratório, utilizando meios de cultura convencionais, possa ter suprimido a expressão de características associadas à patogenicidade.

Considerando os resultados obtidos para a cepa *H. seropedicae* SmR1 tornou-se interessante a realização dos ensaios *in vivo* para as cepas modificadas geneticamente *H. seropedicae* SmR1 RAM GFP e *H. seropedicae* SmR1 dsRED como ferramentas de rastreamento.

REFERÊNCIAS

- AL-BANNA, N. A. *et al.* Histopathological and ultrastructural studies of a mouse lung model of *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 210–217, 1 fev. 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.
- ALVES, G. C. *et al.* Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1–2, p. 307–321, fev. 2015.
- BAUGHMAN, R. P. **Interpretation of bronchoalveolar lavage fluid cytology: Respiratory Medicine**. 1st edition. Neatherland: Ildcare Foundation, 2001. 39 p. Disponível em: http://www.ildcare.eu/Downloads/informatie/bal_cd.pdf. Acesso em: 15 dez 2015.
- BALDANI, J. I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a root-associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I. *et al.* Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisulbalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802–810, 1996.
- BALSANELLI, E. *et al.* Exopolysaccharide Biosynthesis Enables Mature Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110392, 13 out. 2014.
- BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; BAURA, V.A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ. Microbiol.** V. 12, p. 2233–2244, 2010.
- BAQAR, S. *et al.* Murine intranasal challenge model for the study of *Campylobacter* pathogenesis and immunity. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 4933–4939, dez. 1996.
- BECK, M. A. *et al.* Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 8, p. 1481–1483, jun. 2001.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, 2005.

BONILLA, G.A.E. **Seleção de Bactérias Diazotróficas Solubilizadoras de Fósforo e seu Efeito no Desenvolvimento de Plantas de Arroz**. Dissertação (Mestrando em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

BOYLE, M. P. Adult Cystic Fibrosis. **JAMA**, v. 298, n. 15, p. 1787, 17 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Produto interno bruto da agropecuária deve ser de R\$1 trilhão**. Notícias, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/produto-interno-bruto-da-agropecuaria-deve-ser-de-rs-1-trilhao>. Acesso em 11 dez 2015.

BUER, J.; BALLING, R. Mice, microbes and models of infection. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 3, p. 195–205, mar. 2003.

CAPUTO, L. F. G.; MOLINARO, E. M.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. v. 2. 254 p.

CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 62–71, 1 jan. 2000.

CHAVES, D.F.S. *et al.* A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 50-56, 2009.

CIMOLAI, N. *et al.* Definition and application of a histopathological scoring scheme for and animal model for acute *Mycoplasma pneumoniae* pulmonary infection. **Microbiol Immunol**. V. 36, p. 465-478, 1992.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**. Chichester ; New York: Wiley & Sons, 1995. 574 p.

DAVID, J.; BELL, R. E.; CLARK, G. C. Mechanisms of Disease: Host-Pathogen Interactions between Burkholderia Species and Lung Epithelial Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 80, 2015.

DAMJANOVIC, D. *et al.* Type 1 interferon gene transfer enhances host defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection via activating innate leukocytes. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 1, p. 5, 2014

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2223–2230, 2004.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 1, n. 1, 1997.

DOBRITSA, A., P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1418-1426, 2010.

DOWN, J. M.; DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **PLOS One**. V. 17, n. 4, p 263-271, 2000

EMERY, F. D. *et al.* Genetic control of weight loss during pneumonic *Burkholderia pseudomallei* infection. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 2, p. 249–264, jul. 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

FAUL, F. *et al.* G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, n. 2, p. 175–191, maio 2007.

FERNANDES, M.F. *et al.* Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar para a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Embrapa**, 2012. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: Anais. Viçosa, MG: SBCS, 2010. 1 CD-ROM. FERTBIO, 2010

FIELD, L. H. *et al.* Virulence of *Campylobacter jejuni* for chicken embryos is associated with decreased bloodstream clearance and resistance to phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 4, p. 1448–1456, abr. 1991.

FILLOUX, A.; HACHANI, A.; BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**. V. 154, p. 1570-1583, 2008.

FULLNER, K. J. *et al.* The contribution of accessory toxins of *Vibrio cholerae* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary cholera model. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1455–1462, 3 jun. 2002.

GALLI, J. *Sobre as causas do GESSO em arroz*. **Lavoura Arrozeira, Porto Alegre**, v.31, n.309, p.22-26, 1978.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F. P. DE; SILVA, M. R. E. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 82–88, abr. 2004.

GHONEIM, H. E.; THOMAS, P. G.; MCCULLERS, J. A. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 3, p. 1250–1259, 1 ago. 2013.

GREY, P. A.; KIROV, S. M. Adherence to HEp-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas spp.* **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 2, p. 279–287, 1993.

HALL, B. G. *et al.* Growth Rates Made Easy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 232–238, 1 jan. 2014.

HARRIS, G. *et al.* A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3601–3613, ago. 2013.

HAWKINS, P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. **Laboratory Animals**, v. 36, p. 378–395, 2002.

HEBISCH, E. *et al.* High variation of fluorescence protein maturation times in closely related *Escherichia coli* strains. **PLOS One**. V. 8, Issue 10, e75991, 2013.

HERON, M. *et al.* Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 3, p. 523–531, mar. 2011.

IM, W.-T. *et al.* *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. Nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 851–855, 2004.

JUHAS, M.; CROOK, D.W.; HOOD, D.W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. **Cell. Microbiol.** V.10, p. 2377–2386, 2008.

JOHNSON, M.D.L. *et al.* Role of copper efflux in pneumococcal pathogenesis and resistance to macrophage mediated immune clearance. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1684–1694, 2015.

JUNG, S.-Y. *et al.* *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victoriakis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.2284–2288, 2007.

KADIOGLU, A. *et al.* Sex-Based Differences in Susceptibility to Respiratory and Systemic Pneumococcal Disease in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 12, p. 1971–1979, dez. 2011.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative sigma factor and their roles in bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 69, p. 527–543, 2005.

KIRCHHOF, G. *et al.* *Herbaspirillum frisingense* a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157–168, 2001.

LIPUMA, J. J. The changing microbial Epidemiology in cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 23, n. 2, p. 299–323, 2010.

LAGIER, J.-C. *et al.* Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 15 dez. 2012.

LLOYD, M.H.; WOLFENSOHN, S.E. **Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints**. Humane endpoints in animal experiments for biomedical research. London, Royal Society of Medicine Press, p. 48-53, 1999.

MAIER, R. M. **Environmental microbiology**. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2009. 705 p.

MARRA, A. *et al.* Effect of linezolid on the 50% lethal dose and 50% protective dose in treatment of infections by Gram-negative pathogens in naive and immunosuppressed mice and on the efficacy of ciprofloxacin in an acute murine model of septicemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4671–4675, set. 2012.

MARQUES, A.C.Q. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados humanos e ambientais de *Herbaspirillum* spp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MARQUES, A. C. Q. *et al.* Bioquémichal characteristics, adhesion and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 53, n. 1, p. 302-308, 2015.

MATUTE-BELLO, G. *et al.* Fas (CD95) induces alveolar Epithelial cell apoptosis *in vivo*. **Am J Pathol**. V. 158, p. 153-161, 2001.

MEYER, K. C. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 28, n. 5, p. 546–560, out. 2007.

MONTEIRO, A.R. *et al.* Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, *Poaceae*) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (*Burkholderiales*, *Oxalobacteriaceae*). **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, n.4, São Paulo, 2008.

MOORE, G. E.; GERNER, R. E.; FRANKLIN, H. A. Culture of normal human leukocytes. **JAMA**, v. 199, n. 8, p. 519–524, 20 fev. 1967.

MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. **The Veterinary Record**, v. 116, n. 16, p. 431–436, 20 abr. 1985.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, M.-A. *et al.* Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. **Journal of Endotoxin Research**, v. 13, n. 2, p. 69–84, 2007.

OFEK, I.; DOYLE, R. J. **Bacterial Adhesion to Cells and Tissues**. Boston, MA: Springer US, 1994. 590 p.

OGLESBEE, B. L. **Blackwell's five-minute veterinary consult: small mammal**. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. 705 p.

ORIHUELA, C. J. et al. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1661–1669, 1 nov. 2004.

ORRILO, E.O. et al. Mutations in lipopolysaccharides biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environ. Microbiol.** V.10, p.1271–1284, 2008.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002064, maio 2011.

PEDROSA, F. O. et al. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n. 5/6, p. 843-846, 1997.

PIÑEYRO, P. et al. Development of two animal models to study the function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4551–4559, nov. 2010.

PIZARRO-CERDA, J.; COSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**. v. 124, n. 4, p. 715–727, 2006.

RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Rev. Biochem.** V. 71, p.635–700, 2002.

REGUNATH, H. et al. Severe Community-Acquired Pneumonia with Bacteremia Caused by *Herbaspirillum aquaticum* or *Herbaspirillum huttiense* in an Immune-Competent Adult. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 3086–3088, set. 2015.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

REPPE, K. et al. Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p. 4617–4629, dez. 2015.

ROESCH, L.F.W. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 727–733, jun. 2007.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review Phytopathol.** V. 30, p. 225-243, 1992.

ROTHBALLER, M. et al. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1341–1348, 2006.

ROTHBALLER, M. *et al.* Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiol. Ecol.** V. 66, p. 85-95, 2008.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. 2ed. Washinton: ASM press, 2002. p. 539.

SCHLOSS, P. D., HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.1501–1506, 2005.

SCHMIDT, M.A. *et al.* Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 44, p-182-185, 2011.

SCHMIDT, M. A. *et al.* The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC microbiology**, v. 12, p. 98, 6 jun. 2012.

SERRATO, R. V. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 3 set. 2014.

SHAVER, C. M. *et al.* Myeloid tissue factor does not modulate lung inflammation or permeability during experimental acute lung injury. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22249, abr. 2016.

SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H.B. **Hematologia Laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; BUAINAIN, A.M. Biotecnologia e Agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19, n. 2, p. 101-114, 2005.

SIMMONDS, N. J. Cystic fibrosis in the 21st century. **Respiratory Medicine**. v. 24, p.85-96, 2010.

SORDI, R. *et al.* Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 144–155, abr. 2013.

SPIPKER, T. *et al.* Recovery of *Herbaspirillum* Species from Persons with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2774-2777, 2008.

STARON, A. *et al.* The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. **Molecular Microbiology**. v. 74, p. 557-581, 2009.

STOREY, A. **Respiratory diseases in rats and mices**. National Fancy Rat Society, 1998. Disponível em: <http://www.nfrs.org/respdisease.html>. Acesso em: 22 jun 2016.

STATHOPOULOS, C. *et al.* Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. **Microbes Infect.** V. 2, p.1061–1072, 2000.

STRAUB, D. *et al.* The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30(T) identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 168, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Annual Rev. Microbiol**, v. 39, p. 243–270, 1985.

SUREK, M. **Aspectos de adesão de *Aeromonas* a linhagens celulares imortalizadas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

TAN, M. J.; OEHLER, R. L. Lower extremity cellulitis and bacteremia with *Herbaspirillum seropedicae* associated with aquatic exposure in a patient with cirrhosis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 13, n. 5, p. 277-279, 2005.

VALVERDE, A. *et al.* *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN DEN BERG, S. *et al.* Distinctive cytokines as biomarkers predicting fatal outcome of severe *Staphylococcus aureus* bacteremia in mice. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e59107, 2013.

VIPREY, V. *et al.* Symbiotic implications of Type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

WANG, Q. *et al.* Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WIDDEL, F. Theory and measurement of bacterial growth. **Grundpracticum Mikrobiologie**, 4, Universitat Bremen, 2010.

WILSON, J. W. *et al.* Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216–224, abr. 2002.

ZHANG, Z. *et al.* A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, p. 203–214, 2000.

ZHU, B. *et al.* Genome sequence of the pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* strain Os34, isolated from rice roots. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6993–6994, dez. 2012.

ZIGA, E. D.; DRULEY, T.; BURNHAM, C. A. D. *Herbaspirillum* Species Bacteremia in Pediatric Oncology Patient. **Journal of Clinical Microbiology**. V.48, n. 11, p. 4320-4321, 2010.

ANEXO A



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 021/2016

Protocolo UEPG – 5774/2016

Título - Projeto de pesquisa Projeto de Pesquisa – “Avaliação da Patogenicidade de Bactérias do Gênero *Herbaspirillum*

Interessada: Prof. Dra Kátia Sabrina Paludo

Data de Entrada – 14/04/2016

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 03/06/2016 a 03/06/2018

Considerações

Prezada Professora Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de 36 camundongos heterogênicos de 35 a 40 gramas, machos.

Ponta Grossa, 03 de junho de 2016.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dra. Maria Marta Loddi
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria, anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264