

SCARLATHE BEZERRA DA COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS REGULADORES
TRANSCRICIONAIS BmoR E OxyR E
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CEPAS DE
*Bacteroides fragilis***



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do professor Leandro Araujo Lobo e coorientação de Felipe Lopes Teixeira.

CIP - Catalogação na Publicação

C838a Costa, Scarlathe Bezerra
Associação entre os reguladores transcricionais
BmoR e OxyR e características fenotípicas de cepas
de *Bacteroides fragilis* / Scarlathe Bezerra
Costa. -- Rio de Janeiro, 2016.
70 f.

Orientador: Leandro Araujo Lobo.
Coorientador: Felipe Lopes Teixeira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. *Bacteroides fragilis*. 2. Estresse
oxidativo. 3. Regulação da expressão gênica. 4.
Bactérias anaeróbias . I. Araujo Lobo, Leandro ,
orient. II. Lopes Teixeira, Felipe, coorient.
III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Scarlathe Bezerra da Costa**
 DRE: 113049705

BANCA EXAMINADORA: Profa. Marinella Silva Laport (Presidente)
 Dra. Heidi Pauer
 Dra. Karla Rodrigues Miranda
 Profª. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **“Associação entre os reguladores transcricionais
 BmoR e OxyR e características fenotípicas de cepas de *Bacteroides
 fragilis*”**

Local: Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de
 Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS/ UFRJ

Data e hora de início: 13 de dezembro de 2016 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2016.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>M. Marinella Silva Laport</u> Profa. Marinella Silva Laport
<u>10,0</u>	<u>Heidi Pauer</u> Dra. Heidi Pauer
<u>10,0</u>	<u>Karla Rodrigues Miranda</u> Dra. Karla Rodrigues Miranda
	_____ Profª. Raquel Regina Bonelli
Aluno:	<u>Scarlathe Bezerra da Costa</u> Scarlathe Bezerra da Costa
Orientador:	<u>Leandro Araujo Lobo</u> Prof. Leandro Araujo Lobo
Coorientador:	<u>Felipe Lopes Teixeira</u> Dr. Felipe Lopes Teixeira
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aos meus queridos avós Antônio, Helena,
Inácio e Maria José.

AGRADECIMENTOS

Palavras não são o suficiente para demonstrar minha gratidão a todas as pessoas que fizeram parte da minha jornada e que me apoiaram desde o início. Primeiramente gostaria de agradecer a melhor mãe que alguém poderia ter, você está ao meu lado desde o dia em que cheguei a esse mundo, me apoiando, me guiando, aguentando meu mau humor (o que não é fácil e eu bem sei disso), meu estresse (principalmente nos últimos quatro anos né mãe?) sem nunca reclamar e por isso e muito mais, obrigada mainha. A Deus por permitir chegar aonde cheguei e por todas as bênçãos que me foram concedidas.

À minha irmã, Vanessa (a cantora da família), por todo o amor, paciência, investimento financeiro, apertões de bochecha e abraços inesperados e por todas as horas sentada me ouvindo ensaiar algum trabalho um obrigada maior que o universo. Ao meu pai pela paciência e por todos os jogos de futebol assistidos no volume mínimo enquanto eu estudava. Ao Eduardo, meu cunhado, por toda alegria e musicalidade que aliviam o estresse do dia-a-dia. Aos meus amados avós, Antônio, Helena, Inácio e Maria José, sem vocês eu definitivamente não estaria aqui, apesar da distância sei que estou sempre no pensamento de vocês assim como vocês sempre estão nos meus. Às minhas tias Ivone e Nilda por sempre acreditarem em mim e por todo o carinho. Ao Pedro (nosso futuro enfermeiro), por ser o melhor primo que eu poderia ter e por compartilhar das angústias que é ser um universitário.

À dona Dorinha e a Edda (minha querida Tita) por toda a amizade e incentivo que vocês me dão, além é claro pelos maravilhosos quitutes que só dona Dorinha faz. À Mariana, que vem lá desde o ensino médio aturando minhas maluquices, companheira de balada e de conversas cultas, muito obrigada. Às minhas amigas queridas que a UFRJ me deu e que vou levar pra sempre, Luiza, pelas histórias repetidas, todas as dicas de livro (muito obrigada por A maldição do tigre), Tamires (a primeira noiva), por todos os papos de comida e pelas inúmeras rizadas, Quezia, por seu jeito de encarar as coisas com tanto otimismo e aguentar a gente, me desculpe por todas as vezes que te chamei de Kelsey e à Thais, nossa pequenininha, sinto saudades dos papos no 485, lembra quando achamos que tínhamos pegado o ônibus errado? Nunca vou esquecer o sincronismo do olhar de desespero. Meninas vocês são demais, parece que foi ontem que eu achei que a Luiza estava me seguindo e que a Quezia vivia desaparecendo, sério, AMO VOCÊS!

Ao Leandro, por ser o melhor orientador que eu poderia ter, obrigada por nunca desistir de mim, por toda a alegria que você traz ao laboratório, sem você os dias seriam muito chatos. Ao Felipe, o melhor coorientador!! Muito obrigada por tudo, por todas as horas gastas tentando me fazer entender biomol (um dia eu chego lá) e por todas as palavras de incentivo, essa monografia não existiria sem você. À Regina, uma das melhores pessoas que tive a sorte de conhecer, sempre bem humorada pronta para nos dar aquele empurrãozinho em direção ao caminho certo.

A todos os anaeróbios (que são muitos) em especial à Heidi (o cérebro de todos nós), Joaquim por sempre estar ali quando a gente precisa e Lili a melhor companheira de séries e socorrista nas horas de desespero. Um muito obrigado também a Dani, Renatinha, Karla, Eduardo, Leandro (o Carneiro e não o Lobo), Carla, Drika, Kelly (a Rainha), Mayara (obrigada pelas maravilhosas trufas), Camilla (próxima Lili), Temperini e Giovanna (Calouras mais lindas), Fernanda (que nos abandonou, mas mora no meu coração), Mariana Masello (me desculpe por te deixar no vácuo sempre que você espera que eu complete a letra da música que você está cantando), Juliana e Clara (Companheiras de *Bacteroides*), Kelvin (por toda a ajuda nesses últimos experimentos), Thiago (que já chegou me ajudando muito), Semiramis, Marcela, Laura, Rafael (agora é internacional, mas bem no comecinho me ensinou todos os truques), Karinne (depois da Camilla, você é a próxima na linha de sucessão para ser a Lili), enfim, muitas pessoas (tenho certeza que esqueci alguém) que de alguma forma me ajudaram muitos nesses últimos anos, obrigada!

Ao Bruno (companheiro de matérias externas) e à Carol por todos os macrófagos e camundongos cedidos. Ao André por sempre me ajudar com a burocracia, à Dilma por me perdoar sempre que eu entregava um livro atrasada, e todos os professores, em especial à Thaís Cristina Baeta Soares Souto Padrón, uma excelente profissional que deixou muita gente saudosa, e funcionários que mantêm esse instituto funcionando.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes nas pessoas da diretora Alane Beatriz Vermelho e da coordenadora de graduação Lúcia Maria Torres Peçanha.

Às instituições de apoio à pesquisa: CNPq, PIBIC, FAPERJ e CAPES.

RESUMO

SCARLATHE BEZERRA DA COSTA**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS REGULADORES TRANSCRICIONAIS BmoR E OxyR E
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CEPAS DE *Bacteroides fragilis*****Orientador: Leandro Araujo Lobo****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Bacteroides fragilis é um bacilo Gram-negativo anaeróbio que é encontrado predominantemente no trato gastrointestinal e é componente da microbiota anfibiônica do homem, mas pode se tornar um patógeno levando a quadros clínicos como bacteremias e endocardites. Essa bactéria é o anaeróbio estrito mais isolado de processos infecciosos de origem endógena, e, acredita-se que sua perpetuação em um quadro infeccioso se dê principalmente pela expressão de fatores de virulência e sua alta resistência ao estresse oxidativo. Dentre os anaeróbios, *B. fragilis* é uma das bactérias mais resistentes à exposição ao oxigênio, podendo sobreviver por até 72 horas em ambiente aeróbio. O oxigênio leva à formação de radicais livres de oxigênio que atuam de forma deletéria para a célula. *B. fragilis* possui uma resposta ao estresse oxidativo onde há a alteração da expressão de diversos genes codificantes de proteínas que vão atuar no combate desses radicais, como os que codificam as enzimas detoxificantes: superóxido dismutase e catalase. Grande parte da expressão desses genes é controlada pelo regulador OxyR, mas um outro regulador, o BmoR, que pertence à família de reguladores transcricionais MarR também participa dessa resposta. Já se sabe que a expressão de BmoR é independente de OxyR, porém, ainda não são claros quais os mecanismos envolvidos nessa resposta. Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a prevalência dos genes *bmoR* e *oxyR* em cepas de *B. fragilis*, assim como, as características fenotípicas das mesmas. Inicialmente, foi pesquisada a prevalência do gene *bmoR* e *oxyR* em um conjunto de cepas de *B. fragilis*, sendo observado que nem toda cepa deste microrganismo é portadora desses genes. Este mesmo conjunto de cepas foi submetido à exposição a agentes oxidantes como o O₂ atmosférico e ao Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. Observamos que o fenótipo dessas cepas varia entre os dois agentes testados, porém, não foi possível estabelecer uma relação causal entre a presença dos genes e o fenótipo observado. Ainda foram utilizadas cepas mutantes de *B. fragilis* para o gene *bmoR*, *oxyR* ou um mutante duplo para ambos em testes *in vitro* e *in vivo*. Quando essas cepas foram expostas a macrófagos peritoneais e medulares, percebeu-se que não há diferença na sobrevivência de nenhuma das mutantes quando comparadas a cepa selvagem independente da célula ao qual elas foram expostas. Já quando foi avaliada a capacidade de formar abscessos em camundongos C57BL/6 foi observado que a ausência do gene *oxyR* levou a uma diminuição na expressão desse fator de virulência. Esperamos que os resultados obtidos nesse estudo ajudem a esclarecer a influência dos reguladores BmoR e OxyR nas características fenotípicas de cepas de *B. fragilis* e de que forma esses reguladores estariam relacionados à capacidade de *B. fragilis* de prevalescer em processos infecciosos.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, regulação da expressão gênica, estresse oxidativo, bactérias anaeróbias.

ABSTRACT

SCARLATHE BEZERRA DA COSTA**ASSOCIATION BETWEEN BmoR AND OxyR TRANSCRIPTIONAL REGULATORS AND PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS OF *Bacteroides fragilis* STRAINS****Orientador: Leandro Araujo Lobo**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Bacteroides fragilis is a Gram negative rod that is found predominantly in the gastrointestinal tract and is part of human microbiota, but can become a pathogen leading to various clinical conditions. This bacterium is the strict anaerobe most commonly isolated from endogenous infections, and this may be due to the expression of virulence factors and its high resistance to oxidative stress. Among the anaerobes, *B. fragilis* is one of the most resistant to oxygen exposure and can survive for up to 72 hours in an aerobic environment. One of the consequences of oxygen exposure is the formation of free radicals of oxygen that are harmful to the microorganism. *B. fragilis* has a defense mechanism against this stress, a response that controls the expression of several genes such those encoding detoxifying enzymes like superoxide dismutase and catalase. Much of the expression of these genes is controlled by the regulator OxyR, but there is another regulator, BmoR, which belongs to the MarR family of transcriptional regulators, that also participate in this response and is expressed independently of OxyR. However, it is not clear what is the mechanism involved in this response. Therefore, the aim of this study is to evaluate the prevalence of *bmoR* and *oxyR* in *B. fragilis* strains as well as their phenotypic characteristics. Initially, the genes *bmoR* and *oxyR* were identified by PCR in a set of *B. fragilis*'s strains and it was observed that not all the strains carried those genes. These same strains were exposed to oxidants such as atmospheric O₂ and hydrogen peroxide (H₂O₂) however, it was not possible to establish a causal relationship between the presence of genes and the observed phenotype. Mutant strains of *B. fragilis* were used to perform *in vitro* and *in vivo* tests. When these strains were exposed to peritoneal and medullary macrophages, there were no difference in the survival of any of the mutants when compared to the wild-type strain independent of the cell to which they were exposed, but when we evaluated the ability to form abscesses in C57BL/6 mice it was observed that the absence of *oxyR* led to decrease the expression of this virulence factor. We hope that this study results helps to clarify how the BmoR and OxyR regulators acts on phenotypic characteristics of *B. fragilis* strains and how these regulators would be related to the ability of *B. fragilis* to prevail in infectious processes.

Key-words: *Bacteroides fragilis*, gene expression regulation, oxidative stress, anaerobic bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do locus <i>marem E. coli</i>	16
Figura 2: Representação da estrutura secundária e eletrostática de MarR em <i>E. coli</i>	17
Figura 3: Representação gráfica do tubo contendo meio semissólido após o crescimento bacteriano.....	29
Figura 4: Representação esquemática do teste de disco-difusão.....	29
Figura 5: Representação da semeadura em gotas das alíquotas obtidas no teste de sobrevivência a macrófagos peritoneais e medulares.....	31
Figura 6: Prevalência dos genes <i>bmoR</i> e <i>oxyR</i> em amostras de <i>B. fragilis</i>	33
Figura 7: Tolerância ao O ₂ atmosférico em meio semissólido.....	34
Figura 8: Resistência ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3% por meio de disco difusão	36
Figura 9: Sobrevivência de cepas mutantes de <i>B. fragilis</i> frente a macrófagos medulares e peritoneais.....	37
Figura 10: Formação de abscessos por cepas mutantes de <i>B. fragilis</i> em camundongos C57BL/6.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de <i>B. fragilis</i> isoladas de processos infecciosos.	25
Tabela 2: Cepas de <i>B. fragilis</i> isoladas da microbiota de indivíduos saudáveis.	26
Tabela 3: Cepas de <i>B. fragilis</i> isoladas do ambiente.	26
Tabela 4: Cepas de <i>B. fragilis</i> mutantes.	26
Tabela 5: Cepas mais resistentes ao O ₂ quando comparadas à média do grupo	34
Tabela 6: Cepas mais resistentes ao H ₂ O ₂ quando comparadas à média do grupo	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS	Sítio de ligação e ativação (<i>Activation Binding Site</i>)
APS	Persulfato de Amônio (<i>Ammonium persulfate</i>)
BBE	<i>Bacteroides</i> Bile Esculina
BFEL	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxin-like
BfPAI	Ilha de patogenicidade de <i>B. fragilis</i> (<i>B. fragilis</i> pathogenicity island)
BFT	Toxina de <i>Bacteroides fragilis</i> (<i>Bacteroides fragilis</i> toxin)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea (<i>Bone marrow-derived macrophage</i>)
BmoR	<i>Bacteroides MarR-like oxidative stress regulator</i>
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CPC	Complexo Polissacarídico Capsular
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxiribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMSA	Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
ETBF	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênico (<i>Enterotoxigenic Bacteroides fragilis</i>)
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 hidroximetil piperazina-1
HPLC	Cromatografia líquida de altaperformance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1 (<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
INF- β	Interferon beta
INF- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LB	<i>Lysogeny Broth</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
LTTR	<i>LysR-type transcriptional regulator</i>
M-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
OM	Membrana externa (<i>Outer membrane</i>)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBPs	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Salin</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFOR	<i>Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PMNs	Polimorfonucleares
PRAS	Pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (<i>Pre-reduced anaerobically sterilized</i>)
PSA	Polissacarídeo A
PSH	Polissacarídeo H
RBS	Sítio de ligação regulatório (<i>Regulatory binding site</i>)
REO	Resposta ao estresse oxidativo
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	Tetrametil-etilenadiazina
TGI	Trato Gastrointestinal
TLR-4	Receptor do tipo Toll 4 (<i>Toll Like Receptor 4</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Hidroximetil-aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ZPS	Polissacarídeos zwitterônicos (<i>Zwitterionic Polysaccharides</i>)

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Gênero <i>Bacteroides</i>	1
1.2 <i>Bacteroides fragilis</i>	3
1.3 Estresse oxidativo	8
1.4 Família de reguladores LysR	11
1.4.1 Regulador Transcricional OxyR.....	12
1.4.2 OxyR e <i>B. fragilis</i>	14
1.5 Família de Reguladores Transcricionais MarR	15
1.5.1 MarR e <i>B. fragilis</i>	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	24
4.2 Obtenção de DNA e avaliação da prevalência dos genes <i>bmoR</i> e <i>oxyR</i> em cepas de <i>B. fragilis</i>	27
4.3 Teste de tolerância ao estresse oxidativo: difusão de O ₂ em meio semissólido	28
4.4 Teste de resistência ao estresse oxidativo: disco difusão de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3%	29
4.5 Teste de sobrevivência do <i>B. fragilis</i> frente a macrófagos peritoneais e medulares	29
4.6 Indução de abscessos peritoneais por <i>B. fragilis</i> em camundongos C57BL/6.....	31
4.7 Análise estatística	32
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Detecção dos genes <i>bmoR</i> e <i>oxyR</i> em cepas de <i>B. fragilis</i>	33
5.2 Teste de tolerância ao estresse oxidativo: difusão de O ₂ atmosférico em meio semissólido.....	33

5.3	Teste de resistência ao estresse oxidativo: disco-difusão de peróxido de hidrogênio a 3%.....	35
5.4	Teste de sobrevivência do <i>B. fragilis</i> frente a macrófagos peritoneais e medulares .	37
5.5	Indução de abscessos peritoneais por <i>B. fragilis</i> em camundongos C57BL/6	37
6.	DISCUSSÃO.....	39
7.	CONCLUSÃO.....	45
8.	BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Bacteroides*

O corpo humano abriga mais de 100 trilhões (10^{14}) de células de microrganismos. Isso é o equivalente a cerca de 10^{11} - 10^{12} células por grama de fezes no cólon, com massa total maior que 1 kg (Chow *et al.*, 2010). A colonização do corpo humano começa no nascimento, onde a microbiota da mãe na hora do parto pode ser transferida ao filho. Espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* aparecem aproximadamente 10 dias após o nascimento devido ao contato da criança com o meio externo, através da comida, objetos, entre outras coisas.

O colón humano possui a maior diversidade de espécies bacterianas sendo sua maioria composta por bactérias anaeróbias, das quais cerca de 25% pertencem ao gênero *Bacteroides* (Wexler, 2007). O gênero *Bacteroides* é constituído por bacilos Gram negativos, anaeróbios estritos, resistentes à bile, não esporulantes, formadores de cápsula, fazem parte da microbiota anfibiótica do homem e são encontrados principalmente no intestino, onde os anaeróbios encontram-se em uma quantidade maior que as bactérias facultativas em uma proporção de 1000:1 (Willis, 1991).

Em 1984, o gênero *Bacteroides* possuía mais de 50 espécies catalogadas no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Holdeman, Kelley e Moore, 1984) e *Approved Lists of Bacterial Names* (Moore, Cato e Moore, 1985), porém, em 1989, Shah e Collins propuseram que o gênero *Bacteroides* deveria ser restrito a *Bacteroides fragilis* e a espécies relacionadas, enquanto outras espécies, que não faziam parte do “grupo” *B. fragilis*, deveriam ser reclassificadas. Inicialmente, faziam parte deste grupo as espécies: *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. merdae*, *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. vulgatus* e *B. stercoris* (Shah, 1992). Em 2006, houve uma reclassificação onde o *B. distasonis* e *B. merdae* foram transferidas para outro gênero com base na análise genética do rRNA 16S, passando a se chamar *Parabacteroides distasonis* e *Parabacteroides merdae* (Sakamoto e Benno, 2006). Os critérios utilizados para classificar bactérias no “grupo” *B. fragilis* foram as características químicas, bioquímicas e moleculares (Shah e Collins, 1989) que determinadas espécies tinham e tornavam esses microrganismos relativamente homogêneos e próximos a espécie *B. fragilis*. Em 2008 essa divisão em grupo foi extinta, e diversas novas espécies

passaram a pertencer ao gênero *Bacteroides*, contabilizando 28 espécies no total (Olsen e Shah, 2008).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacteroides* são encontradas no organismo do homem como componentes da microbiota, portanto, existem muitas interações benéficas entre esse microrganismo e seu hospedeiro (Lobo *et al.*, 2013). Por décadas já se sabe que as bactérias desempenham funções essenciais para o bom funcionamento do intestino humano como, por exemplo, o metabolismo de carboidratos complexos. As espécies do gênero *Bacteroides* são essenciais para essa função. Análises do genoma de espécies de *Bacteroides* que colonizam humanos mostram que existem inúmeras glicosidases para a degradação de carboidratos complexos. Esses carboidratos são fermentados por *Bacteroides* spp. e outras espécies presentes no intestino, resultando na produção de ácidos graxos que são absorvidos pelo intestino grosso e utilizados pelo hospedeiro como fonte energética. Além disso, microrganismos presentes na microbiota, mas que não possuem o mecanismo de utilização de açúcar que os *Bacteroides* spp. possuem, também podem se beneficiar utilizando subprodutos do metabolismo desses açúcares (Sonnenburg, Angenent e Gordon, 2004; Wexler, 2007).

A espécie *B. fragilis* possui um complexo de polissacarídeos em sua superfície que, além de proteger a bactéria, ajuda na interação desta com os tecidos do organismo e na modulação do sistema imune do hospedeiro (Wexler, 2007, Liu *et al.*, 2008). Isso impede que bactérias não-pertencentes à microbiota e que possam ser eventuais patógenos colonizem o intestino. Estudos anteriores já demonstram que *Bacteroides* spp. têm um papel importante na prevenção de infecções intestinais causadas por patógenos bacterianos como o *Clostridium difficile*. A administração de prebióticos compostos por oligossacarídeos não digestíveis permite a multiplicação de *Bacteroides* spp. impedindo a colonização por *C. difficile* (Hopkins e Macfarlane 2003). A espécie *B. thetaiotaomicron* pode estimular as células de Paneth a produzir peptídeos antimicrobianos que também previnem colonização por patógenos (Hooper, Stappenbeck e Gordon, 2003). Além disso, o complexo polissacarídico capsular (CPC) do *B. fragilis* estimula o sistema imune, mas também é responsável por formar abscesso que é um dos principais mecanismos de virulência dessa espécie (Gibson III *et al.*, 1998; Troy *et al.*, 2010).

Espécies do gênero *Bacteroides* normalmente se comportam como comensais no intestino, mas esses microrganismos podem também ser responsáveis por infecções, como já citado, com morbidade e mortalidade significativa (Wexler, 2007). Bacteremia causada por *B. fragilis*

está associada a uma mortalidade de 20% (Brook, 2010), sendo que esse microrganismo também é um dos principais isolados de endocardite infecciosa onde os anaeróbios são responsáveis por cerca de 2-16% de todos os casos (Brook, 2008). Em 1977, Finegold relatou o estudo de 204 casos de endocardite infecciosa onde 42 casos eram causados por bacilos anaeróbios Gram negativos, destes, 15 casos foram causados por *B. fragilis* (Finegold, 1977). Uma das complicações mais relatadas em endocardite causada por *B. fragilis* é a insuficiência cardíaca congestiva, 60-70% dos pacientes desenvolvem essa complicação, assim como 30-54% dos pacientes desenvolvem embolia periférica (Brook, 2008). Sabemos que muitas bactérias da microbiota intestinal tem a capacidade de adquirir genes de outras bactérias por transferência genética, mas o mesmo princípio não é necessariamente verdadeiro em relação a genes de virulência (Gilmore e Ferreti, 2003). Microrganismos como os *Bacteroides* spp., que possuem um amplo banco genético, podem simplesmente passar a expressar determinados genes de acordo com a demanda do ambiente, como os responsáveis por novas vias de obtenção energética, bombas de efluxo que irão eliminar substâncias tóxicas da célula, ou novos epítomos de superfície deixando de ser comensais e passando a ser patogênicos para o seu hospedeiro.

1.2 *Bacteroides fragilis*

Dentre as espécies do gênero *Bacteroides*, o *B. fragilis* possui maior importância médica por ser o mais isolado de processos infecciosos de origem endógena, apesar de constituir apenas menos de 1% da microbiota do cólon humano, sendo as infecções mais comuns as do trato gastrointestinal, trato genital feminino, trato respiratório e em tecidos moles (Giamarellou, 2000). Os quadros que estão mais comumente associados à espécie são: infecções intra-abdominais (Crabet *al.*, 1990), bacteremias (Goldstein e Citron, 1988), abscessos retroperitoneais (Brook e Frazier, 1998), cerebrais, hepáticos, pulmonares (Patrick, Lutton e Crockard, 1995), cutâneos (Brook e Finegold, 1981), endocardites (Brook, 2008) e pericardites (Brook, 2009).

Como as outras espécies do gênero, *B. fragilis* na maioria das vezes atua como comensal no hospedeiro, mas pode também se comportar como patógeno oportunista em parte devido a seus fatores de virulência (Wexler, 2007). O processo simbiótico entre um hospedeiro e sua microbiota é mantido por diversos parâmetros como barreiras físicas e processos

imunológicos. Quando essas barreiras são rompidas pode haver uma desregulação da microbiota, levando a alterações na diversidade das espécies que compõe essa comunidade, que chamamos de disbiose. No caso de *B. fragilis*, a ruptura da barreira física do trato gastrointestinal, seja por traumas acidentais ou cirúrgicos, pode levar a danos ao epitélio intestinal permitindo o escape dessa bactéria do intestino, e o seu estabelecimento em sítios aos quais ela não pertence (Wexler, 2007; Maier, Anderson e Roy, 2015). Em situações como essa, podem-se desenvolver diversas patologias, incluindo formação de abscessos em vários sítios do corpo e bacteremia. Os fatores de virulência de *B. fragilis* são muito versáteis, há aqueles que estão envolvidos em aderência tecidual como adesinas, os que estão envolvidos na proteção contra a resposta imune do hospedeiro, como o lipopolissacarídeo (LPS) e CPC, e os envolvidos na destruição de tecidos, como as enzimas histolíticas (Wexler, 2007).

Inicialmente, para fixação em um determinado sítio, *B. fragilis* utiliza-se de mecanismos de adesão como fimbrias, pili e adesinas. A adesão a tecidos do hospedeiro permite não só estabelecer um quadro infeccioso, mas também permite, por exemplo, o escape do sistema imune (Finlay e Falkow, 1997; Paueret *al.*, 2013). Uma vez fixado no tecido, *B. fragilis* necessita de nutrientes que irão mantê-lo viável no sítio. A produção de enzimas extracelulares como proteases, hialuronidases, DNases e condroitina sulfatase ajudam na degradação de compostos do tecido hospedeiro fornecendo uma fonte nutritiva e permitindo também a passagem da bactéria para outros sítios (Macfarlane e Gibson, 1988; Guzmán, Platé e Pruzzo, 1990; Macfarlane e Macfarlane, 1991; Chenet *al.*, 1995).

Um dos seus principais fatores de virulência é o CPC, o qual é responsável pela ligação da bactéria ao epitélio hospedeiro, pela formação de abscessos intra-abdominais e pela ativação do sistema imune. Já foram descritos pelo menos oito polissacarídeos diferentes que podem compor a cápsula, de PSA a PSH (Krinose *et al.*, 2001). A característica mais importante desses polissacarídeos é a presença de cargas positivas e negativas em cada unidade de repetição, o que se conhece como *zwitterion*, e é necessário para a capacidade de formar abscessos (Wexler, 2007). Sabe-se que o *B. fragilis* é capaz de induzir a formação de abscessos peritoneais em animais de laboratório, assim como sua cápsula purificada também é o suficiente para induzir esse processo (Tzianabos *et al.*, 1993). A cápsula é bastante heterogênea dentro do gênero, essa variabilidade de polissacarídeos é controlada por um mecanismo de inversão reversível de segmentos de DNA. Os genes que codificam enzimas necessárias para a síntese dos polissacarídeos individuais são organizados em operons distintos, cada um com seu promotor.

Essas inversões são mediadas por recombinases (Mpi) pertencentes à família das serinas que colocam os genes na orientação “correta” (ligado) ou na “incorreta” (desligado). Essa característica confere ao *B. fragilis* a capacidade de alterar suas estruturas de superfície tornando mais difícil o seu reconhecimento pelo sistema imune hospedeiro (Wexler, 2007; Troy *et al.*, 2010).

Ospolissacarídeos zwitteriônicos (ZPS) são capazes de mediar a proliferação de células TCD4⁺ *in vitro* (Brubaker *et al.*, 1999; Tzianabos e Kasper, 2002). Outros estudos demonstraram que a resposta imunológica ao PSA, que é conhecido por ser o mais imunogênico, é realizada apenas por células TCD4⁺ e não por células B ou outras células T (Tzianabos *et al.*, 1999). Essa célula T ativada controla a formação de abscessos intra-abdominais através da liberação de mediadores como Interleucina 8 (IL-8) e isso demonstra que o CPC de *B. fragilis* é capaz de recrutar leucócitos polimorfonucleares (PMNs) para o local da infecção. Dentro da cavidade peritoneal o sequestro e infiltração de PMNs, vai culminar na formação de abscessos intra-peritoneais. Ao mesmo tempo em que ocorre o recrutamento de PMNs, o CPC também estimula a produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e Interleucina 1 (IL-1) de macrófagos. Estas citocinas vão interagir com células do mesotélio e induzir a expressão de ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular 1) que é uma molécula de adesão. Essa molécula vai ajudar a manter os PMNs recrutados no tecido inflamado levando ao aumento do recrutamento dessas mesmas células (Tzianabos e Kasper, 2002).

Outra característica presente nesta bactéria é o LPS. O LPS é o principal glicolípido presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas. Há muitas funções atribuídas ao LPS, como, por exemplo, ativação de citocinas, agregação de plaquetas e endotoxina (Vermelho, Bastos e De Sá, 2008). A porção polissacarídica do LPS é composta pelo polissacarídeo cerne e pelo polissacarídeo O, e a porção lipídica é formada pelo lipídeo A. O LPS está presente na maior parte da porção externa da membrana externa, enquanto que a porção interna da membrana externa se assemelha mais à membrana citoplasmática. A toxicidade de bactérias Gram-negativas está associada à presença de LPS, particularmente ao lipídeo A, que é responsável pela característica de endotoxina. Algumas endotoxinas provocam distúrbios gastrointestinais como diarreia e vômito (Madigan *et al.*, 2010).

A atividade do LPS de *B. fragilis* é considerada pequena, sendo por muitos pesquisadores não considerada uma endotoxina (Pumbwe, Skilbeck e Wexler, 2006). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a endotoxicidade do LPS de *B. fragilis* é cerca de 10 vezes menor do que a de bactérias pertencentes à família das enterobactérias. Foi demonstrada que em subpopulações de *B. fragilis* há a presença de diferentes tipos de polissacarídeos em sua superfície gerando variação antigênica. A estrutura do lipídeo A de *B. fragilis* já foi elucidada, é uma estrutura monofosforilada que difere da estrutura encontrada em enterobactérias, pois, não contém ácido 3-hidroxitetradecanoico. Acredita-se que a baixa toxicidade do LPS desta espécie se dê por causa da estrutura do lipídeo A (Weintraub, Larsson e Lindberg, 1985; Poxton e Edmond, 1995). O LPS de *B. fragilis* é capaz de induzir a produção de TNF- α , quando reconhecido por receptores do tipo Toll 4 (TLR4), e citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 8 (IL-8) em monócitos humanos que possuam TLR4. Essa ativação de TLR4 por LPS de *B. fragilis* gera a expressão de um grande número de genes em várias células da resposta imune do hospedeiro humano como macrófagos, células dendríticas e mastócitos, assim como também há a indução da produção de interleucina-12 (IL-12), interferon beta (INF- β) e interferon gama (INF- γ) (Mancuso *et al.*, 2005).

Além da produção de cápsula e LPS que ajudam na perpetuação da espécie em infecções endógenas, há ainda algumas cepas de *B. fragilis* que tem a capacidade de produzir uma enterotoxina. Essa enterotoxina, chamada de *B. fragilis toxin*(BFT), é codificada pelo gene *bft* que está localizado em uma ilha de patogenicidade (BfPAI) de aproximadamente 6kb. As cepas produtoras desta enterotoxina foram inicialmente referidas como *B. fragilis enterotoxin-like*(BFEL) ao serem isoladas de fezes de carneiros com quadro de diarreia (Myers *et al.*, 1984). Depois essas cepas passaram a ser conhecidas como *Enterotoxigenic B. fragilis*(ETBF) (Ignacio *et al.*, 2015). Esta enterotoxina é uma metaloprotease dependente de zinco de 21 kDa. Existem três isoformas desta enterotoxina BFT-1, BFT-2 e BFT-3, que possuem uma identidade de 93-96% entre suas sequências (Chunget *et al.*, 1999; Goulas, Arolas e Gomis-Ruth, 2011). Cepas ETBF estão associadas a casos de diarreia, colite, doença inflamatória intestinal (Prindivill, Sheikh e Cohen, 2000; Sears, Islam e Saha, 2008) e câncer colorretal (Topraket *et al.*, 2006; Sears, 2009). A BFT cliva as junções celulares e, *in vivo*, o único alvo já descrito foi a E-caderina, que é uma molécula de adesão intercelular. A clivagem da E-caderina leva ao aumento da permeabilidade do epitélio levando a perda de fluidos, a

processos inflamatórios e facilitando a translocação bacteriana (Chunget *al.*, 1999; Goulas, 2011).

Uma das preocupações que vem aumentando em relação a esse microrganismo é sua resistência a antimicrobianos. O tratamento de infecções causadas por esse microrganismo muitas vezes é complicado, pelo fato de que, *B. fragilis* é intrinsecamente resistente aos aminoglicosídeos e à maioria das penicilinas e cefalosporinas (com exceção de carbapenemas) (Miyamae *et al.*, 1998). Cinco grupos de antimicrobianos são utilizados com maior frequência no tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias, são eles: nitroimidazóis, como metronidazol e tinidazol; carbapenemas, como imipenem e meropenem; fenicóis, como cloranfenicol e tianfenicol; β -lactâmicos combinados a inibidores de β -lactamases como tazobactam, sulbactam e clavulanato; e fluoroquinolonas, como trovafloxacina, clinafloxacina e moxifloxacino. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacteroides* são as que possuem maior resistência a antimicrobianos dentre as bactérias anaeróbias. Há antimicrobianos que possuem uma menor eficácia contra infecções anaeróbias, mas que ainda são usados é o caso da cefoxitina, clindamicina, e penicilinas de amplo espectro como a ticarcilina e piperacilina (Fanget *al.*, 2002).

A resistência do *B. fragilis* a antimicrobianos comumente prescritos está aumentando, principalmente à clindamicina, cefoxitina, metronidazol e desde 1994 notou-se também o aumento de resistência à fluoroquinolonas (Fille *et al.*, 2006). A disseminação de resistência a antimicrobianos está ligada diretamente a genes de resistência que são carregados em plasmídeos conjugativos e móveis, transpósons e elementos genéticos integrados. *B. fragilis* possui uma variedade de elementos genéticos móveis que podem ser usados na troca de genes de resistência entre cepas (Wexler, 2007). O aumento na resistência a metronidazol, um dos mais eficazes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *B. fragilis* e em profilaxia cirúrgica, está associada a muitos fatores como, por exemplo, o uso contínuo de metronidazol para tratar infecções causadas por outros anaeróbios, como infecções causadas por *C. difficile* e *Helicobacter pylori*. O metronidazol inicialmente foi desenvolvido para tratar infecções causadas por protozoários, mas agora é o mais usado no tratamento de bactérias anaeróbias. Este antimicrobiano é administrado em sua forma inativa. Para sua ativação, é necessário que ocorra a redução do grupo nitro, feito pelo sistema redox da célula, conferindo a forma ativada da droga que vai gerar compostos nitrosos tóxicos que impedem a síntese de DNA e promovem sua degradação (Veeranagouda *et al.*, 2014). Muitos

microrganismos não possuem o mecanismo necessário para ativação da droga e, portanto, são intrinsicamente resistentes (Husain *et al.*, 2013). Bactérias como as do gênero *Bacteroides* possuem tal mecanismo e são naturalmente susceptíveis ao metronidazol, exceto quando adquirem outras formas de resistência. O principal tipo de resistência a metronidazol em *B. fragilis* é causada pelo gene *nim* que codifica uma nitroimidazol-redutase que converte o grupo nitro da droga em um componente não tóxico (Veeranagouda *et al.*, 2014). Já foram descritos oito genes *nim* (*nimA-nimH*) em *B. fragilis* que podem ser localizados em plasmídeos ou no cromossomo da bactéria e também já foi descrita a presença de sequências de inserção que aumentam a expressão desses genes (Hecht, 2004). Outros mecanismos como aumento de efluxo, mudanças no mecanismo de reparo de DNA e mudanças metabólicas também podem ser responsáveis por esta resistência (Abratt, Zappe e Woods, 1993; Diniz *et al.*, 2004; Gal e Brazier 2004; Schaumann *et al.*, 2005; Pumbwe *et al.*, 2007; Steffens *et al.*, 2010).

B. fragilis é intrinsicamente resistente a aminoglicosídeos como gentamicina e canamicina, pois a absorção destas drogas requer uma cadeia transportadora de elétrons dependente de oxigênio ou nitrogênio que é ausente nestes microrganismos (Wexler, 2007). A presença de bombas de efluxo em espécies do gênero *Bacteroides* é muito comum, essas bombas são compostas por um transportador de membrana interna, uma lipoproteína periplasmática e um canal de membrana externa e são responsáveis por fazer o transporte de diversos antimicrobianos. Essas bombas podem agir em sinergia com a membrana externa, pois quando as bombas expelam o antimicrobiano, estes têm de passar novamente pela barreira criada pela membrana externa para entrar novamente na célula, tornando a chegada da droga no sítio alvo mais difícil. Entre os antimicrobianos expelidos por essas bombas estão as fluoroquinolonas, cloranfenicol e os β -lactâmicos que possuem cadeias lipofílicas (Ueda *et al.*, 2005). Pode-se notar que é grande o número de antimicrobianos aos quais o *B. fragilis* é resistente, e esse fato demonstra que é necessário a procura de mecanismos de combate a este microrganismo que possam ser adicionados ao tratamento de suas infecções e por este motivo é essencial que este microrganismo seja estudado detalhadamente, para com isso conhecer sua maquinaria de resistência às substâncias e fatores do ambiente e assim poder desenvolver formas de combatê-las.

1.3 Estresse oxidativo

Outra característica de *B. fragilis* que vem sendo extensamente estudada é sua aerotolerância. Dentre as bactérias anaeróbias, *B. fragilis* é uma das espécies que mais resiste ao oxigênio atmosférico, sendo capaz de sobreviver por até 72 horas, mas incapaz de se multiplicar na presença desse agente (21% O₂) (Sundet *al.*, 2008; Reottet *al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2013). Essa característica é muito importante, pois como já mencionado, *B. fragilis* é componente da microbiota humana que pode se tornar um patógeno oportunista. Essa transição implica a saída de sítios reduzidos e anaeróbios, como o cólon, para ambientes mais oxidados, como a cavidade peritoneal que tem uma concentração de cerca de 6% de O₂. Para conseguir se estabelecer e dar continuidade a infecção, *B. fragilis* precisa se adaptar a esse novo ambiente (Ndamukong, Gee e Smith, 2013) e ao estresse causado por mecanismos de ação de PMNs que são recrutados para o sítio de infecção (Betteken, Rocha e Smith, 2015).

A aerotolerância de *B. fragilis* já foi relacionada com a resposta ao estresse oxidativo (REO). O estresse oxidativo é causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH•). A produção de ROS é uma consequência inevitável da exposição aeróbica, além de ser um dos mecanismos de defesa de células do sistema imune como macrófagos (Herren, Rocha e Smith, 2003). Esses radicais são gerados endogenamente por oxidação de compostos próprios, como enzimas desidrogenase, flavoenzimas e oxidases, e de radicais tiol. Além disso, moléculas de H₂O₂ livre podem, através da reação de Fenton, reagir com íons metálicos como o ferro, gerando radical hidroxila que tem um poder de oxidação elevado. Os radicais de hidroxila podem causar dano ao DNA através de mutações pontuais e despolimerização do ácido nucleico, modificações em resíduos de aminoácidos, oxidação de grupos sulfidrilas em proteínas, quebra de ligações peptídicas, perda de metal nas metaloproteínas, oxidação de polissacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados (Rocha e Smith, 1995; Brioukhanov e Netrusov, 2004). Durante a REO vários genes que codificam enzimas detoxificantes como catalase (*katB*), superóxido dismutase (*sod*), alquil hidro-peróxido redutase (*ahpCF*), tiorredoxina (*trx*), citocromo-C peroxidase (*ccp*) e ferritina (*ftnA*) são expressos para atuar na resposta (Gregory, 1985; Rocha e Smith, 1995, 1999; Rocha, Owens e Smith, 2000; Herren, Rocha e Smith, 2003; Sund, Wells e Smith, 2006; Sundet *al.*, 2008).

Durante os estágios iniciais da REO, um regulador da família LysR, o OxyR, controla a expressão dos genes que codificam várias enzimas detoxificantes. Vários genes fazem parte do regulon OxyR (*katB*, *tpx*, *dps* e *ahpCF*) que vai regular positivamente a expressão destes

genes em resposta tanto ao O_2 quanto ao H_2O_2 (Rocha *et al.*, 2003). Experimentos mostraram que a resposta conduzida pelo OxyR leva a uma rápida detoxificação da célula quando esta é exposta ao H_2O_2 e que uma cepa mutante no OxyR é menos virulenta quando se trata da formação de abscessos (Sundet *et al.*, 2008).

Inicialmente a função da REO é eliminar os radicais de oxigênio da célula e restaurar os danos ocorridos. Nesse momento, as enzimas detoxificantes são essenciais. A enzima superóxido dismutase de *B. fragilis* é um homodímero codificada pelo gene *sod* que possui as subunidades unidas por ligações não covalentes e contém em sua composição ferro e zinco. Essa enzima é responsável por transformar o O_2^- em O_2 e H_2O_2 . Muitas espécies do gênero *Bacteroides* possuem o gene *katB* que codifica uma catalase. Sabe-se que mutantes para esse gene possuem maior sensibilidade ao H_2O_2 do que a cepa parental (Rocha e Smith, 1997). A catalase de *B. fragilis* é um homodímero que contém um grupo heme por enzima. Sua principal função é impedir a formação de H_2O_2 , para isso, ela catalisa uma reação que transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Brioukhanov e Netrusov, 2004). Ainda no combate aos peróxidos, há a enzima alquil hidro-peróxido redutase, que está relacionada ao combate a peróxidos orgânicos e é composta por duas subunidades, AhpC, que possui atividade de peroxidase, e AhpF, que possui atividade de flavoproteína e usa NADH e NADPH como doadores de elétrons. Há evidências de que AhpC possua uma maior importância na resistência ao estresse oxidativo, uma vez que quando essa subunidade é deletada a sensibilidade ao H_2O_2 aumenta (Rocha e Smith, 1999). Para evitar a formação de radicais livres e prevenir que o ambiente celular se torne tóxico, é feito o controle de metais intracelulares como o ferro por proteínas da família das ferritinas que removem excesso de ferro ferroso (Fe^{2+}) do citoplasma prevenindo, assim, danos decorrentes do radical hidroxila produzido a partir da oxidação do ferro pelo H_2O_2 (Betteken, Rocha e Smith, 2015).

Um dos mecanismos celulares que são alterados poucos minutos após a exposição ao oxigênio é o balanço redox tiol/dissulfeto com geração de ROS a partir da oxidação de grupamentos tiol. O ambiente intracelular reduzido é mantido pela presença de proteínas redox, como as tiorredoxinas (Trxs) e as glutarredoxinas (Grxs). Essas proteínas são pequenas tiol/dissulfeto oxidorreduções que atuam no balanço tiol/dissulfeto e estão relacionadas a vários processos biológicos, entre eles, o combate ao estresse oxidativo, reduzindo ligações dissulfeto produzidas pela oxidação de cisteínas, e também promovendo a eliminação de ROS. A redução intracelular dessas pontes dissulfeto é mediada por NADPH, que funciona

em conjunto com uma tioredoxina redutase (TrxB) na conversão de Trx oxidada na sua forma reduzida. As Trx estão mais associadas à eliminação de peróxidos gerados internamente, mas também atuam contra o O₂. Esse mecanismo é essencial para a adaptação e aerotolerância de microrganismos anaeróbios em ambientes oxidados (Herren, Rocha e Smith, 2003; Rocha, Tzianabos e Smith, 2007). Outro mecanismo utilizado pela célula é o reparo de DNA por meio de excisão de bases através da ação de endonucleases e glicosilases. Durante o estresse oxidativo pode haver muitas alterações na configuração de componentes celulares como os aminoácidos. A metionina é um aminoácido que possui muita facilidade em ser oxidada formando sulfóxido de metionina. O *B. fragilis* possui um mecanismo de reparo que é a expressão do gene *msrA* que codifica a proteína sulfóxido de metionina redutase que vai levar a redução do sulfóxido de metionina. As chaperonas também fornecem um mecanismo de correção do enovelamento de proteínas durante a REO (Sund *et al.*, 2008).

1.4 Família de reguladores LysR

A família de reguladores transcricionais LysR é composta de reguladores bem caracterizados que são bastante conservados entre bactérias e possuem ortólogos tanto em arqueas quanto em eucariotos. LysR é o ativador transcricional de *lysA*, um gene que codifica uma diaminopimelato descarboxilase importante na biossíntese de lisina. Esse regulador vem sendo objeto de estudo a nível molecular tornando-o o regulador mais bem caracterizado da família. Hoje, essa é uma das maiores famílias de proteínas ligantes de DNA descrita em procariotos, possuindo 800 membros identificados com base na sequência de aminoácidos (Schell, 1993; Maddocks e Oyston, 2008). Os reguladores transcricionais do tipo LysR (LTTR) são reguladores globais que podem atuar como ativador ou repressor de um único gene ou de um operon.

Os genes regulados por esses reguladores podem estar relacionados às mais diversas funções como metabolismo, divisão celular, *quorum sensing*, virulência, motilidade, fixação de nitrogênio, resposta ao estresse oxidativo, produção de toxinas, adesão e secreção entre outros (Kovacikova e Skorupski, 1999; Deghmane *et al.*, 2000, 2002; Cao *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2004; Byrne *et al.*, 2007; Lu, Takeuchi e Sato, 2007; Sperandio *et al.*, 2007; Maddocks e Oyston, 2008). Na estrutura dos LTTRs a região C-terminal, que atua como cofator e a região N-terminal, que é uma estrutura no formato hélice-volta-hélice alada e que

proporciona a ligação ao DNA, estão presentes em todas as proteínas da família LysR e em cerca de 95% das proteínas procarionotas que se ligam ao DNA (Pérez-Rueda e Collado-Vides, 2001; Huffman e Brennan, 2002; Aravind *et al.*, 2005). A maioria dos reguladores transcricionais que possuem domínio de hélice-volta-hélice são classificados ou como ativadores ou como repressores transcricionais. Geralmente, os ativadores transcricionais têm como característica apresentarem o domínio hélice-volta-hélice no C-terminal, enquanto que os repressores apresentam esse domínio no N-terminal (Pérez-Rueda e Collado-Vides, 2000; Maddocks e Oyston, 2008). Os LTTRs formam um grupo distinto que foi denominado de regulador duplo, uma vez que o domínio hélice-volta-hélice está localizado no N-terminal desses reguladores e ainda assim eles exercem função de ativar ou reprimir a eles mesmos ou genes sob sua regulação. Os genes que codificam reguladores da família LysR são conhecidos por possuírem alto conteúdo G+C, isso se deve pela relação de Lisina e Arginina que é comum às proteínas LTTR. Várias LTTRs são encontradas em regiões transmissíveis do DNA, e a distinta porcentagem de G+C permitiu que LTTRs que foram adquiridas por transferência horizontal fossem identificadas dentro do genoma de muitas bactérias (Henikoff *et al.*, 1988; Maddocks e Oyston, 2008).

1.4.1 Regulador Transcricional OxyR

O OxyR é um regulador transcricional da família de reguladores LysR que é sensível ao H₂O₂, esse regulador é geralmente encontrado em bactérias Gram-negativas, mas há ocorrência dele em algumas bactérias Gram-positivas (Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Oh, Shin e Roe, 2007). Assim como outros reguladores da mesma família, o OxyR possui um domínio de hélice-volta-hélice no N-terminal que se liga ao DNA, uma região de reconhecimento do co-indutor, e um C-terminal que é importante para multimerização e ativação (Schell, 1993; Kullick *et al.*, 1995a, b; Kona e Brinck, 2006; Wang *et al.*, 2006). O OxyR funciona inicialmente como regulador global de resposta ao estresse causado por H₂O₂ que mantém os níveis de H₂O₂ interno em um limite seguro para a célula (Antelmann e Helmann, 2011) e também está envolvido na resposta celular à depleção de radicais tiol (Aslund *et al.*, 1999). Em *Escherichia coli*, o regulon do OxyR possui mais de 20 genes, relacionados a detoxificação do H₂O₂ (*katE* e *ahpCF*), biossíntese de grupamentos heme (*hemH*), reparo do centro Fe-S (*sufA-E* e *sufS*) entre outros (Dubbs e Mongkolsuk, 2012). OxyR também regula a

expressão de OxyS, um RNA regulador que integra o estresse gerado pelo H₂O₂ a diversas vias metabólicas da célula (Zhang *et al.*, 1998; Gonzalez-Flecha e Demple, 1999).

O OxyR foi inicialmente descrito como um ativador transcricional sob circunstâncias de oxidação que age diretamente com a subunidade α da RNA polimerase (Storz, Tartaglia e Ames 1990; Kullik *et al.*, 1995b; Tao *et al.*, 1995), mas OxyR também pode atuar em condições reduzidas, tanto como ativador quanto repressor (Christiman, Storz e Ames, 1989; Toledano *et al.*, 1994; Seib *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2007; Leva *et al.*, 2008; Heo *et al.*, 2010). Em *E. coli*, o OxyR tetramérico se liga na região promotora 5' do gene alvo numa sequência conservada. O OxyR em sua forma oxidada e em sua forma reduzida possuem estado de conformação diferentes que pode alterar o modo como ele se liga ao DNA (Toledano *et al.*, 1994). Essas mudanças dependentes do estado redox da célula também podem interferir na afinidade por diferentes promotores e também na interação com a RNA polimerase (Storz, Tartaglia e Ames, 1990; Tartaglia *et al.*, 1992; Toledano *et al.*, 1994). A sensibilidade ao H₂O₂ ocorre pela oxidação de um resíduo de cisteína do OxyR. Em *E. coli* a concentração de H₂O₂ intracelular é de cerca de 20 nM, nesse caso OxyR se encontra reduzido, quando os níveis intracelulares de H₂O₂ alcançam cerca de 100 nM, concentração abaixo do valor que inibe crescimento que é cerca de 2 μ M, o OxyR sofre uma rápida oxidação (Gonzalez-Flecha e Demple, 1997; Seaver e Imlay; 2001). O OxyR é novamente reduzido por glutaredoxinas 1 que usam elétrons provenientes da redução de glutationas (Zheng, Aslund e Storz, 1998; Aslund *et al.*, 1999; Tao, 1999). OxyR não responde a um co-indutor clássico, sua ativação depende de uma alteração redox que modifica sua conformação e afinidade com o DNA. Mais especificamente, o OxyR na presença de H₂O₂, através da formação de uma ponte dissulfeto transiente, vai ter sua oligomerização alterada. Na forma reduzida o OxyR é dimérico, ocupando duas regiões de ligação do DNA, quando está oxidado ele passa a ter uma conformação tetramérica que ocupa quatro regiões de ligação do DNA (Kullik *et al.*, 1995 a, b). A oxidação de OxyR também influencia a interação com a RNA polimerase na região promotora, levando ao início da transcrição. A determinação de sua estrutura mostrou a presença de cisteínas redox-ativas nas subunidades RD1 e RD2 (Zaim e Kierzek, 2003). Estudos mutagênicos mostraram que há resíduos conservados que são importantes para a ligação do regulador ao DNA, a mutação nesses resíduos leva a perda dessa habilidade. Para o OxyR as mutações que levam a esse fenótipo são T31M e S33N (Kullik *et al.*, 1995 a; Lochowska *et al.*, 2004).

O mecanismo exato pelo qual ocorre a oxidação de OxyR ainda está sendo investigado, mas foram propostos dois modelos para esse evento. No primeiro, a oxidação do OxyR de *E. coli* ocorre pela formação de uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína C199 e C208 (Zheng, Aslund e Storz, 1998; Tao, 1999; Lee *et al.*, 2004). A ativação se dá por oxidação em dois passos, onde o H₂O₂ reage com o íon tiolato da cisteína C199 formando ácido sulfênico. Essa cisteína então reage com o grupo sulfidríla da cisteína C208 formando uma ponte dissulfeto (Lee *et al.*, 2004). Isso resulta numa mudança conformacional alterando a associação entre as subunidades do tetrâmero, que por consequência altera as propriedades de ligação do DNA e permite uma interação eficiente entre OxyR e RNA polimerase (Zheng, Aslund e Storz, 1998; Tao, 1999; Choi *et al.*, 2001). A segunda hipótese sugere que a modificação apenas no resíduo C199 já é suficiente para ativar OxyR sem a formação de ponte dissulfeto (Kim *et al.*, 2002).

Uma segunda classe estrutural de OxyR que contém apenas um resíduo de cisteína redox ativa foi encontrada em *Deinococcus radiodurans* (Chen *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2010). Duas novas proteínas DrOxyR e DrOxyR₂ foram encontradas nesse microrganismo, cada uma contém um resíduo de cisteína que correspondem ao resíduo C208 de *E. coli*, ambas as proteínas possuem resíduos conservados que estão relacionados à ligação do DNA, ativação e multimerização (Kullik *et al.*, 1995b; Wang *et al.*, 2006). Apesar de os resíduos necessários para formação de ácido sulfênico não terem sido observados nessa espécie, a complementação de mutantes de *E. coli* para o resíduo C208 com DrOxyR pode ser realizada, mostrando que há similaridades entre os dois reguladores (Chen *et al.*, 2008).

1.4.2 OxyR e *B. fragilis*

OxyR é uma proteína de 34,4 kDa de forma tetramérica. A detecção de OxyR em *B. fragilis* pela primeira vez ocorreu após a identificação de uma cepa resistente ao peróxido e que superexpressava KatB, AphC e Dps (Rocha e Smith, 1998; Rocha, Owens e Smith, 2000). A deleção de OxyR tanto na cepa selvagem quanto na cepa resistente levou ao aumento na sensibilidade ao H₂O₂, demonstrando assim, que o OxyR é responsável pela resistência ao H₂O₂ em *B. fragilis* (Rocha, Owens e Smith, 2000).

Em *B. fragilis*, o regulon OxyR é um dos primeiros a ser ativado e atua na manutenção da resposta aguda contra o estresse oxidativo. Esse regulon é composto por quatro unidades transcricionais: *katB*, *ahpCF*, *dps* e *tpx* que codificam enzimas que vão rapidamente eliminar a maior parte do peróxido, enquanto *dps* auxilia no controle de ferro que pode reagir com H_2O_2 e formar HO^\cdot . Esse regulon tem uma indução significativa quando há exposição a 10 μM de H_2O_2 , e tem sua máxima expressão quando exposto a 100 μM da mesma substância (Herren, Rocha e Smith, 2003). O regulon OxyR de *B. fragilis* possui algumas similaridades com regulons de resposta ao H_2O_2 em outras espécies, por exemplo, em *E. coli*, *katG*, *dps* e *ahpCF* são controlados por OxyR. Além de ser de extrema importância para o controle do estresse oxidativo em *B. fragilis*, o OxyR também é importante para a formação de abscessos. Mutantes em OxyR tiveram sua capacidade de formar abscessos diminuída quando comparadas à cepa selvagem. Isso mostra que a atuação de OxyR se estende a proteção contra peróxidos externos à célula, como aqueles liberados por células fagocíticas do sistema imune (Sund *et al.*, 2008).

Diferente do que acontece em *E. coli*, onde o OxyR se autorregula tanto em sua forma reduzida quanto oxidada, em *B. fragilis* isso não parece acontecer. Aparentemente, nessa espécie, esse regulador é expresso constitutivamente, com a presença de um nível basal mesmo na ausência de estresse oxidativo (Christman, Storz e Ames, 1989; Tao *et al.*, 1991; Rocha, Owens e Smith 2000).

Apesar de sua importância, o regulador OxyR não é o único relacionado a resposta ao estresse oxidativo. Em 2008, Sund e colaboradores através da análise do transcriptoma do *B. fragilis* observaram a presença de um gene putativo que tinha sua expressão aumentada mesmo quando o OxyR era inativado (Sund *et al.*, 2008). Em 2013, Teixeira e colaboradores caracterizaram este regulador como pertencente à família de reguladores transcricionais MarR, e o denominaram BmoR (*Bacteroides MarR-like oxidative stress regulator*) (Teixeira *et al.*, 2013).

1.5 Família de Reguladores Transcricionais MarR

Os reguladores pertencentes à família MarR estão presentes em bactérias e arqueas e estão envolvidos em diversos processos celulares como expressão de fatores de virulência, vias metabólicas, resposta ao estresse oxidativo, degradação e exportação de compostos nocivos como os compostos fenólicos, múltiplos antimicrobianos, detergentes entre outros (Perera e Grove, 2010).

MarR foi primeiramente descrito em *E. coli* *Salmonella enterica* sorovar Typhimurim. Em *E. coli* foi descrito como componente do locus *marRAB* onde atua regulando negativamente a expressão desse operon. Em ambas as espécies, o locus de múltipla resistência a antibióticos (*mar*) é constituído de duas unidades transcricionais que são *marC* e *marRAB* flanqueando o operador *marO*. O gene *marC* codifica uma proteína de membrana e *marRAB* codifica o repressor MarR, o ativador MarA, e uma proteína MarB (Figura 1) (Aleksun e Levv. 1997).

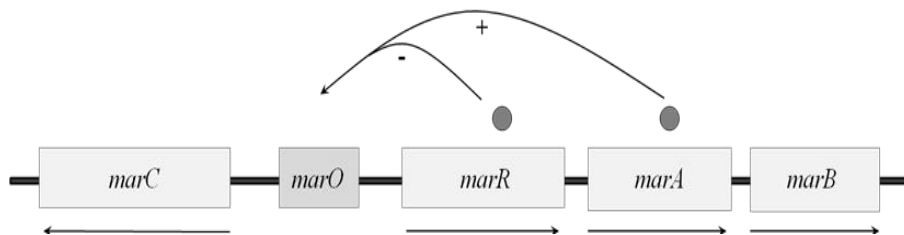


Figura 1: Organização do locus *mar* em *E. coli*. Em *E. coli* é composto por duas unidades: *marC* e *marRAB*. O repressor *marR* se liga ao promotor *marO* regulando negativamente a expressão de *marRAB*. *marA* se liga ao promotor *marO* regulando positivamente *marRAB*. *marC* tem sua expressão coordenada por um promotor diferente. Adaptado com permissão de Teixeira, 2012.

O gene *marC* é transcrito de modo divergente ao operon *marRAB* (Figura 1) e foi visto que o promotor de *marC* não possui sítios de ligação para MarR, logo, não tem sua transcrição reprimida por este repressor. Foi demonstrado que a deleção de *marC* não afeta a susceptibilidade da célula em relação a antimicrobianos de diversas classes, portanto, foi sugerido que *marC* não seja classificado como gene de resistência a múltiplas drogas (McDermott *et al.*, 2008). MarC possui homólogos em outras espécies como *S. typhimurium* e *Methanococcus jannaschii* (Aleksun e Levy, 1997).

O gene *marR* codifica o repressor de *marRAB*, na ausência de uma molécula indutora, MarR regula negativamente a transcrição do lócus ao se ligar no promotor *marO*. Já foi visto que a região N-terminal de MarR é essencial para sua característica de repressor, uma vez que ao deletar 19 aminoácidos de sua sequência, esta capacidade é perdida. A estrutura do MarR consiste em um dímero (**Figura 2**) no formato hélice-volta-hélice alada que se liga ao DNA para controlar vários processos biológicos. Já foram identificadas cerca de 12.000 proteínas homólogas a MarR, sendo que destas, aproximadamente, 100 já foram estudadas quanto a seu papel fisiológico (Perera e Grove, 2010).

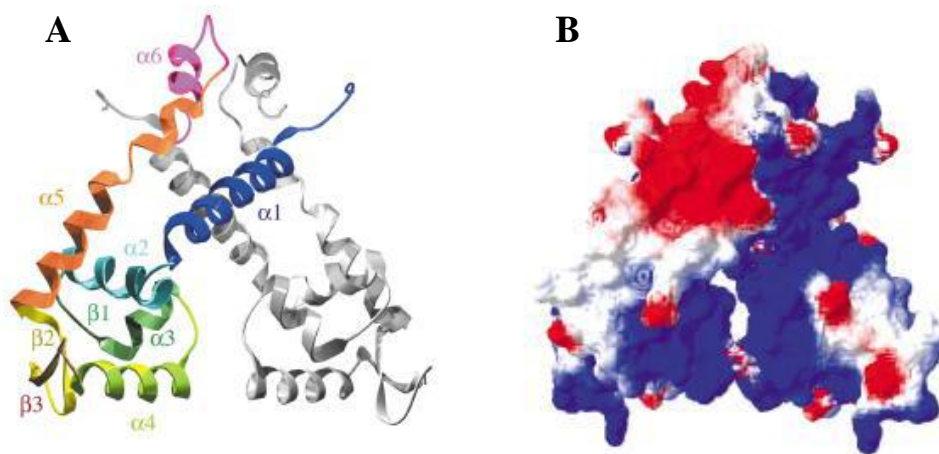


Figura 2: Representação da estrutura secundária e eletrostática de MarR em *E. coli*. **A**, Representação do dímero MarR em fita. **B**, Representação eletrostática da superfície do dímero MarR. Fonte: Alekshun *et al.*, 2001.

MarA é um fator de transcrição que ativa a expressão do operon *marRAB* e regula a expressão de mais de 60 genes cromossômicos. Muitas cepas de *E. coli* de origem clínica albergam o gene *marA* e a expressão constitutiva desse regulador está ligada diretamente a resistência a antimicrobianos, especialmente às fluoroquinolonas. Foi o primeiro regulador global descrito que está relacionado à resistência intrínseca a múltiplas drogas (Alekshun *et al.*, 2001; Ruiz e Levy, 2010). MarA é composta de sete α -hélices que são organizadas em dois subdomínios de estruturas similares. Esses dois subdomínios interagem entre si através de ligações de ponte de hidrogênio e forças de Van der Waals. A proteína MarA se liga ao DNA por inserção de hélices próximo a região do sulco maior onde os eixos das hélices de reconhecimento estão quase paralelas as bases do DNA (Rhee *et al.*, 1998). Assim como

MarR, MarA possui homólogos em diversos gêneros bacterianos e de arqueas (Aleksun e Levy, 1997).

MarB é uma proteína periplasmática que tem a capacidade de inibir MarA, mais especificadamente a formação de seus transcritos, mas também pode atuar na estabilidade destes (Vinué, McMurry e Levy, 2013). O modo como MarB atua ainda não está elucidado, mas estima-se que há dois meios pelos quais essa proteína possa atuar. O primeiro seria a emissão de um controle indireto provavelmente através de sinal químico que alteraria direta ou indiretamente a atividade de reguladores citoplasmáticos do operon *marRAB*. Outra forma seria atuação em conjunto com outra proteína periplasmática ou membrana para criar um sinal ou responder a um estresse (Vinué, McMurry e Levy, 2013).

1.5.1 MarR e *B. fragilis*

Diversas proteínas homólogas à proteína MarR já foram descritas em diversas espécies bacterianas. Em *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, há a proteína MexR que regula negativamente o operon responsável por codificar uma bomba não ATPase de efluxo a múltiplos substratos e que está relacionada a resistência intrínseca a múltiplas drogas. *Neisseria gonorrhoeae* possui FarR que medeia a resistência a antimicrobianos hidrofóbicos (Lee *et al.*, 2003). *Xanthomonas campestris* possui OhrR que está envolvida na proteção a peróxidos orgânicos (Sukchawalit *et al.*, 2001; Mongkolsuk *et al.*, 2002). *Bacillus subtilis* possui o mesmo regulador que *X. campestris*, porém ao contrário dessa espécie, em *B. subtilis* o gene que codifica essa proteína não se auto-regula (Fuangthong *et al.*, 2001; Fuangthong and Helmann, 2002). Uma das primeiras espécies, assim como *E. coli*, a ter a família MarR descrita foi *S. Typhimurium*. O regulador SlyA é um homólogo para a família MarR de *S. Typhimurium* e funciona tanto como repressor quanto ativador, regulando sua própria expressão e de mais 23 genes, incluindo os que estão envolvidos com a resposta ao estresse oxidativo e resistência a antimicrobianos (Wilkinson e Grove, 2006). Outros exemplos em patógenos humanos são a proteína RovA de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* (Revell e Miller, 2000; Nagel, Lahrz e Dersch, 2001) e MgrA de *Staphylococcus aureus* (Ingavale *et al.*, 2005). Os homólogos da família MarR também estão presentes em patógenos de plantas como a proteína PecS de *Dickeya*

dadantii(Reverchon, *et al.*, 2002) e em bactérias do solo como a proteína ExpG da fixadora de nitrogênio *Sinorhizobium meliloti*(Becker *et al.*, 1997; Rüberg, Pühler e Becker, 1999; Bartels *et al.*, 2003).

Diversas respostas a estímulos ambientais são controladas pelos homólogos pertencentes à família de reguladores transcricionais MarR, entre elas a resposta ao estresse oxidativo. A resposta gerada por proteínas pertencentes à família MarR são independentes do regulador OxyR (Sukchawalit *et al.*, 2001; Perera e Grove, 2010), demonstrando que existem outras vias para os microrganismos reagirem a situações como essa. Muitos homólogos de MarR possuem resíduos de cisteína sensíveis à oxidação que estão presentes no C/N terminal das hélices que compõem a proteína. Aparentemente essas cisteínas atenuam a ligação de repressores da família MarR ao DNA quando sob estado de estresse oxidativo. Resíduos de cisteína presentes em proteínas como MgrA e SarZ de *S. aureus* e OhrR de *X. campestris*, por exemplo, são oxidados a ácido sulfênico, que sofre reação com moléculas de tiol gerando pontes dissulfeto entre elas. Essa oxidação de cisteínas leva a uma mudança na conformação da proteína reduzindo a ligação ao DNA e por consequência leva a expressão do regulon em questão permitindo que as proteínas codificadas por esses regulons atuem em resposta ao estresse (Perera e Grove, 2010).

Em 2009, Rungrassamee e colaboradores caracterizaram um regulador pertencente à família MarR em *P. aeruginosa* chamado de PqrR, que possui um grupamento de ferro-enxofre formado por quatro resíduos de cisteína. Esse grupamento está conservado em diversos homólogos de MarR, sugerindo que proteínas do tipo MarR possam conter esse grupamento ferro-enxofre e que estes sejam sensíveis ao estresse oxidativo (Rungrassamee *et al.*, 2009; Perera e Grove, 2010).

Em *B. fragilis* já foi descrito um homólogo da família MarR, o BmoR (Teixeira *et al.*, 2013). Foi visto que esse regulador tem sua expressão aumentada em quase cinco vezes em condições de estresse oxidativo quando comparada a condições normais, a comparação também foi observada com relação a mutantes do regulador OxyR onde a sua expressão foi um pouco maior que cinco vezes (Sund *et al.*, 2008). Já se sabe também que a inativação deste gene leva ao aumento da sensibilidade ao oxigênio atmosférico e ao H₂O₂ em *B. fragilis*. O aumento da expressão do gene *bmoR* independente do regulador OxyR, indica que o BmoR possui um regulon distinto, mas os genes que são regulados por este repressor ainda não foram totalmente elucidados (Teixeira *et al.*, 2013). A capacidade de regular

genes que estejam relacionados ao combate dos efeitos causados pelo estresse oxidativo é importantíssima para bactérias como o *B. fragilis*, que possui propriedades patogênicas e que se encontram em ambientes com poder oxidativo maior que podem atrapalhar a colonização e a perpetuação de quadros infecciosos.

2. JUSTIFICATIVA

B. fragilis é um microrganismo muito versátil. Esta bactéria, que faz parte da microbiota humana, é também um patógeno em potencial que pode vir a causar doenças ao seu hospedeiro. Este microrganismo é dotado de muitos fatores de virulência, que o ajudam a sobreviver no ambiente do trato gastrointestinal, porém, quando há uma ruptura de barreiras teciduais e este microrganismo se vê em ambientes naturalmente oxidados como o peritônio, é necessário que ele se adapte a essas novas condições. Nesse ambiente, o microrganismo também se encontra enfrentando o mecanismo de defesa do organismo, como macrófagos que utilizam a geração de radicais de oxigênio como uma maneira de combater o agente causador da infecção. Já se sabe que a aerotolerância do *B. fragilis* é um dos principais mecanismos que parece contribuir para esta adaptação, o que culmina na sua perpetuação em quadros infecciosos que ocorrem em locais onde microrganismos anaeróbios geralmente não tem a capacidade de se manter. A regulação gênica de mecanismos de resistência ao estresse oxidativo deve ser minuciosa para que todos os mecanismos de defesa da bactéria resultem na sua sobrevivência. Já se sabe que o regulador OxyR é um dos primeiros mecanismos ativados pela célula para eliminar e prevenir a formação de radicais oxidativos, atuando principalmente contra o H₂O₂ (Sund *et al.*, 2008).

Trabalhos anteriores do grupo do Laboratório de Biologia de Anaeróbios, mostraram que o regulador BmoR está relacionado a regulação da resposta ao estresse oxidativo causado pelo oxigênio atmosférico e pelo H₂O₂ e que mutantes para esse gene apresentam maior sensibilidade frente a esses agentes e tem uma taxa de recuperação de crescimento menor após a exposição a eles (Teixeira *et al.*, 2013). Devido ao aumento da resistência do *B. fragilis* aos atuais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo, assim como o número de cepas multirresistentes, deve-se buscar outras maneiras de intervir no processo de infecção por esta bactéria. Tendo em vista que a sobrevivência ao estresse oxidativo em *B. fragilis* é eficiente e importante durante processos infecciosos, os mecanismos que permitem essa sobrevivência se tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de novos métodos de intervenção e controle de infecções. Portanto, este trabalho visa caracterizar com mais afinco a relação entre os reguladores OxyR e BmoR e a relação de ambos com a resistência ao estresse oxidativo em *B. fragilis*, focando

principalmente na caracterização fenotípica de cepas de *B. fragilis* que contenham ou não esses reguladores.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o papel dos reguladores transcricionais OxyR e BmoR e características fenotípicas de cepas de *Bacteroides fragilis*.

As metas específicas deste estudo são:

1. Pesquisar a presença dos genes *bmoR* e *oxyR* através do PCR específico e correlacionar a sua presença à susceptibilidade a exposição ao oxigênio e peróxido de hidrogênio em cepas de *B. fragilis*;
2. Avaliar o impacto dos genes *bmoR* e *oxyR* para a sobrevivência de *B. fragilis* frente a macrófagos peritoneais e medulares através de análises comparativas de cepas selvagens e mutantes;
3. Avaliar a relevância de *bmoR* e *oxyR* na capacidade de *B. fragilis* induzir abscessos peritoneais em camundongos C57BL/6 através de análises comparativas de cepas selvagens e mutantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Para cultivo das cepas de *B. fragilis* de diferentes origens pertencentes a coleção de cultura do Laboratório de Biologia de Anaeróbios (**Tabelas 1, 2 e 3**) foi utilizado o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (PRAS) suplementado com menadiona (10 µg/mL – Sigma) e hemina (0,5 mg/mL – Sigma) (Jousimies-Somer *et al.*, 2002) sob fluxo de CO₂. As cepas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Com o auxílio da alça bacteriológica, o cultivo bacteriano foi semeado em placas de Petri com meio *Bacteroides* Bile Esculina (BBE) contendo gentamicina (100 µg/mL). O objetivo foi caracterizá-las parcialmente, uma vez que este meio possui em seus componentes a esculina que, quando degradada gera um composto chamado de esculetina que reage com o ferro presente no meio, formando um precipitado negro. Este também possui bile a qual o *Bacteroides* é intrinsicamente resistente, e ainda o antibiótico ao qual sabe-se que o *B. fragilis* é resistente. As amostras foram incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (80% de N₂; 10% de H₂; 10% de CO₂) por 24 h (Jousimies-Somer *et al.*, 2002; Ferreira, Domingues e Uzeda, 2003). As cepas foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF) com o objetivo de ter a identidade do microrganismo confirmada. Em seguida, as amostras foram inoculadas em caldo BHI sob fluxo de CO₂ e incubadas a 37°C por 24 h, com o objetivo de mantê-las viáveis para os experimentos, em seguida foram centrifugadas (10.000 x g / 5 min) e o sedimento de células foi suspenso em caldo *Lysogeny Broth* (LB) com 20% de glicerol para manter um estoque viável que foi congelado a -80°C.

O cultivo das cepas mutantes de *B. fragilis* foi realizado em caldo BHI (PRAS), suplementado com menadione (10 µg/mL) e hemina (0,5 mg/mL) (Jousimies-Somer *et al.*, 2002) sob fluxo de CO₂, porém, para cada cepa foram adicionados os antibióticos necessários para a sua seleção (**Tabela 4**). As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h em anaerobiose.

Tabela 1: Cepas de *B. fragilis* isoladas de processos infecciosos.

Amostra	Origem	Ano de isolamento
ATCC 25285	Abscesso	-
SBF1	Abscesso	1997
SBF2	Pus	1997
SBF3	Fenda operatória	1994
SBF6	Bacteremia	2005
SBF7	Pus	2003
SBF10	Otite média crônica	1984
SBF11	Diarreia	-
SBF13	Bacteremia	2000
SBF14	Osteomielite	1988
SBF15	Abscesso	1981
SBF16	Líquido ascítico	2002
SBF17	Bacteremia	2000
SBF18	Clínico	2006
SBF19	Bacteremia	2015
SBF20	Bacteremia	-
SBF22	Bacteremia	2000
SBF25	Líquido ascítico	2002
SBF26	Clínico	2006
SBF27	Bacteremia	2006
638R	Bacteremia	-

(-) Não consta em nosso banco de dados

Tabela 2: Cepas de *B. fragilis* isoladas da microbiota de indivíduos saudáveis.

Amostra	Origem	Ano de isolamento
SBF4	Microbiota fecal de indivíduo saudável	1997
SBF8	Microbiota fecal de indivíduo saudável	-
SBF9	Microbiota fecal de indivíduo saudável	1980
SBF12	Microbiota fecal de indivíduo saudável	2001
SBF21	Microbiota fecal de indivíduo saudável	1980
SBF24	Microbiota fecal de indivíduo saudável	2000

(-) Não consta em nosso banco de dados

Tabela 3: Cepas de *B. fragilis* isoladas do ambiente.

Amostra	Origem	Ano de isolamento
SBF5	Água de poço artesiano	1996
SBF23	Água de poço artesiano	1997

Tabela 4: Cepas de *B. fragilis* mutantes.

Mutação	Característica	Referência
Δ BmoR	RIF ^r , CFX ^r	Teixeira, 2016
Δ OxyR	RIF ^r , TET ^r	Teixeira, 2016
Δ BmoR Δ OxyR	RIF ^r , CFX ^r , TET ^r	Teixeira, 2016

RIF^r: resistente à rifampicina; CFX^r: resistente à cefoxitina; TET^r: resistente à tetraciclina;

4.2 Obtenção de DNA e avaliação da presença dos genes *bmoRe oxyR* em cepas de *B. fragilis*

A obtenção de DNA das amostras de *B. fragilis* foi feita por lise térmica, segundo Assumpção (2013) com algumas modificações e pela técnica de extração por lise de sacarose segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) com algumas modificações. Para a obtenção por lise térmica, um mililitro e meio de uma amostra crescida em caldo BHI por 24 h a 37°C em anaerobiose foi centrifugado (16.000x g/2 min), o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com 150µL de água HPLC. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi suspenso em 150 µL de água HPLC. A amostra foi colocada em água fervente por 5 min, em seguida, colocada em gelo por 5 min, após repetir a incubação em água fervente e em gelo, a amostra foi centrifugada (10.000 xg /10 min). Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante com o DNA obtido. Para a obtenção do DNA pela técnica de lise de sacarose, foram centrifugados (3.500x g /10 min) um mililitro e meio de uma amostra crescida em caldo BHI por 24 h a 37 °C em anaerobiose, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 300 µL de tampão de lise de sacarose (sacarose 0,75 M; EDTA 10 mM; Tris 50 mM, pH 8,0). Em seguida, a suspensão foi incubada a 37 °C / 10 min e foram adicionados 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20% em TE (Tris-EDTA; Tris 10 mM, EDTA 1 mM), os microtubos foram agitados manualmente e incubados em temperatura ambiente por 5 min. Após a incubação, foi adicionado 1µL de RNase (10 mg/ mL; Invitrogen) e fez-se uma incubação por 10-20 min em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 300 µL de fenol saturado em TRIS e 300 µL de clorofórmio-isoamílico (24:1), depois o conteúdo dos microtubos foi agitado em vortéx. Os microtubos foram centrifugados (3.500 x g /10 min) e a fase aquosa superior foi transferida a um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se acetato de potássio 5 M correspondente a 0,1x do volume total e, etanol P.A gelado correspondente a 2,5x o volume total. Incubou-se a - 20 °C por 20 min e centrifugou-se (3.500 xg /15 min), descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e novamente foi centrifugado (3.500 xg / 10min). O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados secando para evaporar qualquer resquício de etanol. Em seguida, o precipitado foi suspenso em 50 µL de tampão TE.

Com o DNA extraído, foi realizado aPCR para confirmar a presença dos genes *bmoRe oxyR* nas amostras. Para investigar a presença de *bmoR* foi utilizado o par de iniciadores

MarR3, cuja sequência é *Foward*: 5' TGG CGT TTG TCT ACT TCA CC3' e *Reverse*: 5'AAT GGT GCT ATG TGC GTT3'. O ciclo utilizado para este experimento foi: desnaturação inicial a 94°C/4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C/30 s, anelamento a 50°C/30 s, extensão a 72°C/2 min, extensão final a 72°C/10 min. Para investigar a presença de *oxyR* foi utilizado o par de primers OxyR cuja sequência é *Foward*: 5' GGC CCG TAA GAT TCT TTC GG 3' e *Reverse*: 5' CGT CGG TAA CAC TGC CAA TC 3' que geram um fragmento de 100 pb. O Ciclo utilizado para este experimento foi: desnaturação inicial a 95 °C/4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C/20 s, anelamento a 48 °C/20 s, extensão a 68 °C/1 min, extensão final a 68 °C/10 min. Ambas as reações foram realizadas em termociclador Mastercycler® nexus da Eppendorf. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% para analisar o produto da PCR. A eletroforese foi realizada a 100 V por aproximadamente 25 min. A marcação utilizada para visualizar o resultado foi *GelRed500X* (Bioscience) e o gel foi observado em transiluminador MiniBis Pro da Bio-Imaging Systems por luz ultravioleta. Como controle positivo de ambas as reações de PCR foram utilizadas as cepas ATCC 25285 e 638R que sabe-se possuir ambos os genes.

4.3 Teste de tolerância ao estresse oxidativo: difusão de O₂ em meio semissólido

Este teste foi realizado segundo Rocha, Tzianabos e Smith (2007), com algumas modificações. Uma alíquota de 200 µL de uma cultura de *B. fragilis* crescida por 24 h em caldo BHI a 37°C em anaerobiose foi inoculada em 5 mL de BHI semissólido sem cisteína, contendo 0,5% de ágar a 40°C em tubos 10x70 mm. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h em aerobiose. A área do topo do ágar até a borda do crescimento bacteriano visível foi medida e considerada a zona de inibição do crescimento pelo oxigênio (**Figura 3**). O teste foi realizado em triplicata e foi utilizada a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 como controle e a análise dos resultados foi realizada em comparação a média total e em comparação a cepa controle.

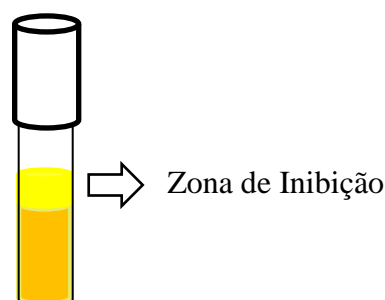


Figura 3: Representação gráfica do tubo contendo meio semissólido após o crescimento bacteriano.

4.4 Teste de resistência ao estresse oxidativo: disco difusão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%

Este teste foi realizado segundo Sund e colaboradores (2008), com algumas modificações. As cepas foram cultivadas em caldo BHI por 24 h a 37 °C em anaerobiose e depois foram semeadas com o auxílio de um *swab* em placas contendo o meio BHI com 1,5% de ágar sem cisteína. Dez microlitros de H_2O_2 a 3% foram aplicados em discos de filtro estéreis de 6 mm e colocados sobre o ágar. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose por 48 h a 37 °C. Após a incubação, foi feita a comparação entre o diâmetro das zonas de inibição do crescimento entre cada cepa (**Figura 4**). O teste foi realizado em triplicata, a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 foi utilizada como controle e a análise dos resultados foi realizada em comparação a média total e em comparação a cepa controle.

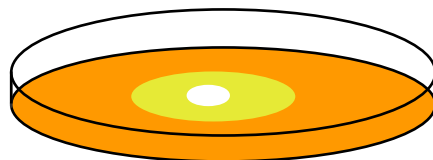


Figura 4: Representação esquemática do teste de disco-difusão com H_2O_2 a 3%.

4.5 Teste de sobrevivência do *B. fragilis* frente a macrófagos peritoneais e medulares

Este teste foi realizado segundo Ferreira (2007) com algumas modificações. Inicialmente para a obtenção de macrófagos peritoneais foi injetado 1 mL de tioglicolato a 3% no peritônio de camundongos C57BL/6 machos com idade entre 6-8 semanas após três dias estes camundongos foram sacrificados em câmara de CO_2 . Injetou-se 3 mL de tampão fosfato-salina (PBS) 1X concentrado, em seguida, foi feita a homogeneização e a coleta de cerca de 2,5 mL.

O material coletado foi centrifugado (200x g / 5 min), o sobrenadante foi coletado e suspenso em meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) com 10% de soro fetal bovino inativado. As células foram contadas em microscópio invertido e semeadas em placas de 24 poços (TPP®), 5x10⁵ células por poço. A placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por cerca de 18 h. Para a obtenção de macrófagos de medula óssea, ossos como bacia, fêmur e tíbia foram cortados e o conteúdo interno foi centrifugado. O precipitado é lavado e as células foram cultivadas em placas de Petri não tratadas para BMDM (macrófagos derivados de medula óssea) a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ na presença de 30% de meio condicionado de células L929 com M-CSF em RPMI 1640 (Meio *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado, penicilina 100 mg/mL, estreptomicina 100 mg/mL e piruvato de sódio 1 mM. Após 3 dias de incubação, adicionou-se 10 mL de meio novo, após 7 dias de incubação (final de diferenciação), as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (10⁶ células por poço).

Para o preparo da suspensão bacteriana, as amostras 638R, ΔBmoR, ΔOxyR e ΔBmoRΔOxyR foram cultivadas em BHI caldo por 24 h, a 37°C sob anaerobiose. Em seguida, foram centrifugados 1,5 mL da cultura (16.000x g / 3 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 200 µL de tampão Blanks [Solução de sais 200 mL (cloreto de cálcio anidro 200 µg/mL, sulfato de magnésio anidro 200 µg/mL ou sulfato de magnésio hepta-hidratado 48 mg/mL, fosfato bipotássio 1 mg/mL, fosfato monopotássio 1 mg/mL, bicarbonato de sódio 10 mg/mL, cloreto de sódio 2 mg/mL), gelatina 0,8g, resazurina 1,6 mL, água destilada 200 mL]. Foi realizada a diluição das amostras para 3x10⁸ UFC/mL correspondente a escala 1 de McFarland em 5 mL de tampão Blanks.

Para a execução do teste, o meio presente nos poços foi descartado e substituído por 300 µL da suspensão bacteriana em DMEM com 10% de soro fetal bovino inativado por poço. A placa foi incubada por 1 h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Os poços foram lavados 2 vezes separadamente com tampão PBS 1X que foi coletado. Esse lavado foi centrifugado (16.000x g / 3 min) e o sedimento formado foi suspenso em 300 µL de tampão Blanks. Ambos os precipitados referentes as duas lavagens foram reunidos, diluídos e semeados em ágar sangue suplementado com hemina (0,5 mg/ mL) e menadiona (10 µg/mL) (**Figura 5**). Posteriormente, foi adicionado meio DMEM com 10% de soro fetal bovino em cada poço contendo metronidazol (200 µg/mL) para eliminar qualquer bactéria que não tenha sido fagocitada e que possa ter ficado após as lavagens. A placa foi incubada por 2 h em estufa de

CO₂ a 37°C. Os poços foram lavados com PBS e, em seguida, feita a lise das células com digitonina a 20nM em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. Após 2 minutos os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X e em cada lavagem foi recolhido o sobrenadante. Esses sobrenadantes foram centrifugados (16.000 x g / 2 min) e suspensos em 300 µL de tampão Blanks e depois foram semeados em ágar sangue suplementado. Para a semeadura em ágar sangue suplementado de todos os lavados do processo foram feitas gotas de 10µL da suspensão concentrada e das diluições (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) feitas a partir dela para cada amostra. Foram semeados o inóculo, a primeira lavagem e o conteúdo lisado. Todas as placas foram incubadas a 37 °C em anaerobiose por 48 h.

O experimento seguiu as orientações do comitê de ética institucional e foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética no uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob inscrição IBCCF 132.

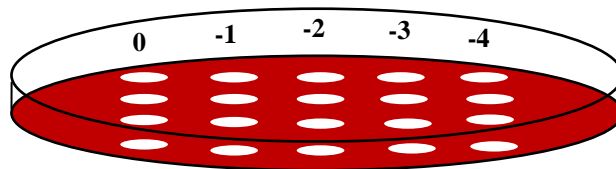


Figura 5: Representação da semeadura em gotas de 10 µL das alíquotas obtidas no teste de sobrevivência a macrófagos peritoneais e medulares.

4.6 Indução de abscessos peritoneais por *B. fragilis* em camundongos C57BL/6

Esse experimento foi realizado segundo Coyne e colaboradores (2001) com algumas modificações. As amostras 638R, ΔbmoR, ΔOxyR, e ΔbmoRΔOxyR foram inoculadas em meio BHI caldo sob anaerobiose e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o tempo esperado, foi feita uma diluição à 3x10⁸ UFC/mL correspondente a escala 1 de McFarland das amostras em tampão PBS 1X. Em seguida, essas amostras diluídas foram misturadas a um adjuvante, o conteúdo cecal estéril, em uma concentração final de 1x10⁸ UFC/mL. Uma alíquota de 200µL contendo 1x10⁸ UFC/mL foi injetada no peritônio de camundongos C57BL/6 machos com idade entre 6-8 semanas. Após 7 dias, foi feito o sacrifício dos animais em câmara de CO₂ para realizar a contagem dos abscessos formados. Os abscessos presentes no peritônio foram quantificados e medidos em milímetros, após a medida os abscessos foram classificados dentro de 5 grupos para a obtenção de um *score*: PP até 1mm (*score* 1), P até 2 mm (*score* 2),

M até 3 mm (*score* 3), G até 4 mm (*score* 4), e GG a partir de 4 mm (*score* 5). A fórmula utilizada para a obtenção do *score* total foi: $PP (n \times 1) + P (n \times 2) + M (n \times 3) + G (n \times 4) + GG (n \times 5)$. O experimento seguiu as orientações do comitê de ética institucional e foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética no uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob inscrição IBCCF 132.

4.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 7. Os dados foram analisados por Teste t de Student ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Detecção dos genes *bmoR* e *oxyR* em cepas de *B. fragilis*.

Para avaliar a presença do gene *bmoR* e *oxyR*, foram analisadas amostras de *B. fragilis* de três origens: clínica, microbiota e ambiental. Na análise da presença de *bmoR* foram analisadas 28 amostras das quais 20 das cepas eram provenientes de algum quadro clínico, 6 foram amostras de microbiota de indivíduos saudáveis e 2 amostras ambientais. Dentre as amostras clínicas testadas, 50% apresentaram o gene *bmoR*, entre as amostras de microbiota, 33,3% possuíam o gene. Dentre as amostras de origem ambiental 50% tinham o gene *bmoR* (Figura 6 A). Na análise da presença do gene *oxyR*, dentre as amostras clínicas, 80% possuíam o gene, dentre as de microbiota 66,6% possuíam e, dentre as amostras do ambiente todas possuíam o gene *oxyR* (Figura 6 B).

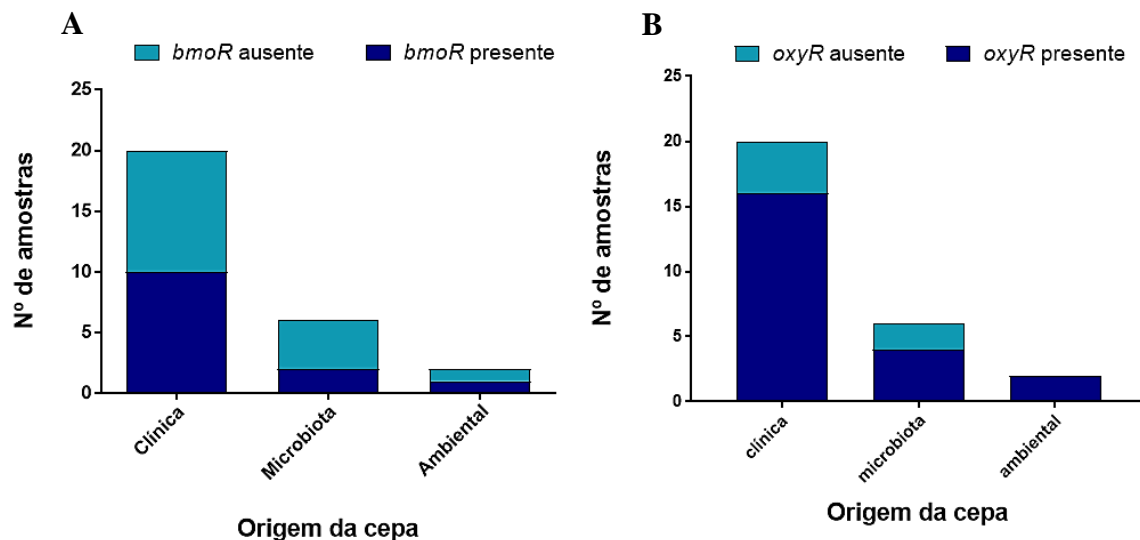


Figura 6: Detecção dos genes *bmoR* e *oxyR* em amostras de *B. fragilis*. A-Foi investigada a presença do gene *bmoR* em 28 amostras: 20 de origem clínica; 6 de microbiota de indivíduos saudáveis e 2 do ambiente. A presença do gene não foi detectada em todas as amostras da espécie testadas. B-A mesma proporção de amostras foi analisada quanto a presença do gene *oxyR*, e assim como para o gene *bmoR*, este gene não parece ser encontrado de forma igualitária dentro da espécie.

5.2 Teste de tolerância ao estresse oxidativo: difusão de O₂ atmosférico em meio semissólido

A tolerância de cepas de *B. fragilis* ao O₂ atmosférico foi analisada através da difusão de oxigênio em tubos contendo meio BHI semissólido. O ágar presente no meio permite a formação de um gradiente de concentração do O₂ onde quanto mais perto da borda do meio, maior a concentração do O₂. Entre as amostras testadas, 14 amostras se apresentaram mais resistentes ao O₂(**Figura 7; Tabela 5**). Todas as amostras com exceção da amostra SBF1(p=1,673),ao serem comparadas com a cepa controle ATCC 25285 mostraram ter diferença significativa em seu resultado (p<0,05).A fim de determinar o perfil de tolerância dentro da população testada, também foi feita a comparação entre a zona de inibição de cada amostra e a média do grupo (9,14 mm).Quando comparadas a essa média, 14 amostras se mostraram mais tolerantes ao oxigênio, sendo as 11 mais tolerantes, todas de origem clínica e, 12 amostras se mostraram mais sensíveis ao oxigênio.

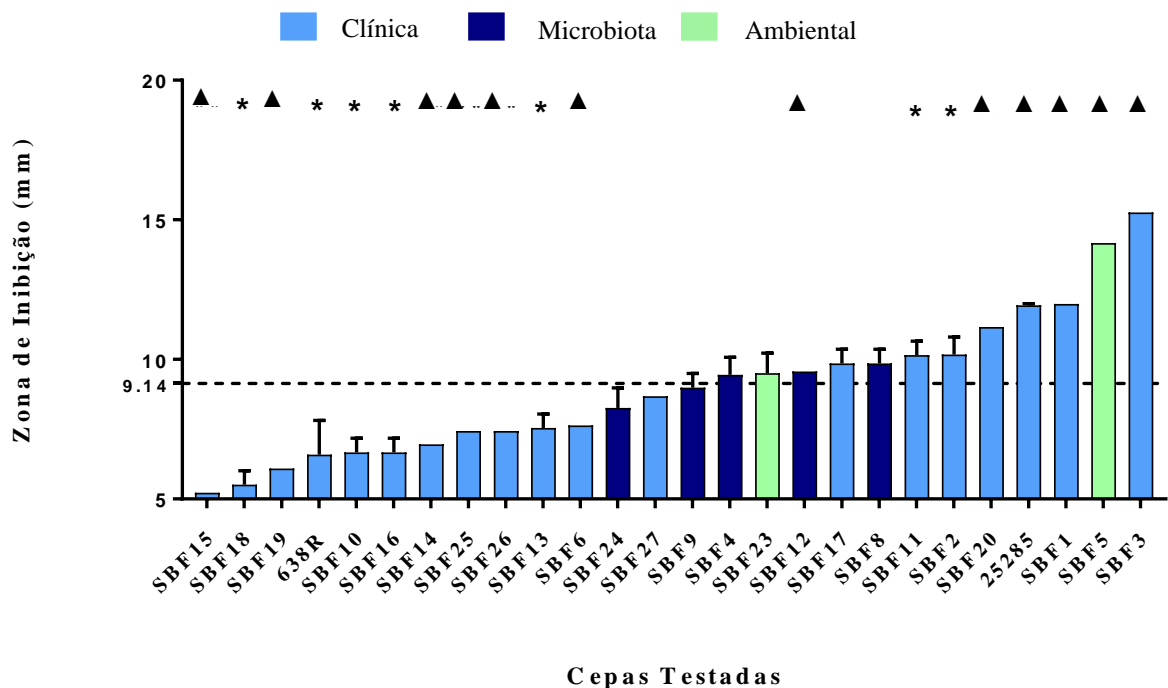


Figura 7: Tolerância ao O₂ atmosférico em meio semissólido. A zona de inibição do crescimento formada no ágar foi medida em milímetros e depois os resultados obtidos foram analisados por Teste T (p<0,05). Os asteriscos (*) indicam quais amostras quando comparadas como a média, apresentaram diferença significativa p<0,05, o triângulo(▲) indica quais amostras quando comparadas como a média, apresentaram diferença significativa p<0,01. Quando comparadas a média (9,14), 11 amostras se mostraram mais resistentes, sendo estas de origem clínica. Os resultados são a média do tamanho da zona de inibição em mm obtidos de um experimento em triplicata.

Tabela 5: Cepas mais resistentes ao O₂ quando comparadas à média do grupo

Cepa	Origem	<i>bmoR</i>	<i>oxyR</i>	Média
------	--------	-------------	-------------	-------

638R	C	+	+	6,59
SBF6	C	+	+	7,63
SBF9	M	+	-	8,99
SBF10	C	-	+	6,67
SBF13	C	-	+	7,54
SBF14	C	-	+	6,96
SBF15	C	+	+	5,22
SBF16	C	+	+	6,67
SBF18	C	+	-	5,51
SBF19	C	-	+	6,09
SBF24	M	-	+	8,26
SBF25	C	-	+	7,44
SBF26	C	-	+	7,44
SBF27	C	-	+	8,26

C: Clínica; M: Microbiota; A: Ambiental; (+) A cepa possui o gene; (-) A cepa não possui o gene; Os valores apresentados representam a média de cada cepa em um experimento em triplicata; As amostras que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à média estão escritas em **vermelho**.

5.3 Teste de resistência ao estresse oxidativo: disco-difusão de peróxido de hidrogênio a 3%

A resistência de cepas de *B. fragilis* ao agente oxidante H_2O_2 a 3% foi medida por meio do teste de disco difusão. Algumas amostras se mostraram mais resistentes do que outras ao estresse causado pelo H_2O_2 , e quando comparadas ao controle, a amostra ATCC 25285, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) (**Figura 8; Tabela 6**). A fim de determinar o perfil de tolerância dentro da população testada, também foi feita a comparação entre o halo de sensibilidade de cada amostra e a média do grupo (46,29 mm). Quando comparadas a essa média, oito amostras se mostraram mais resistentes ao H_2O_2 , entre elas, cinco eram de origem clínica, e seis amostras se mostraram mais sensíveis ao H_2O_2 .

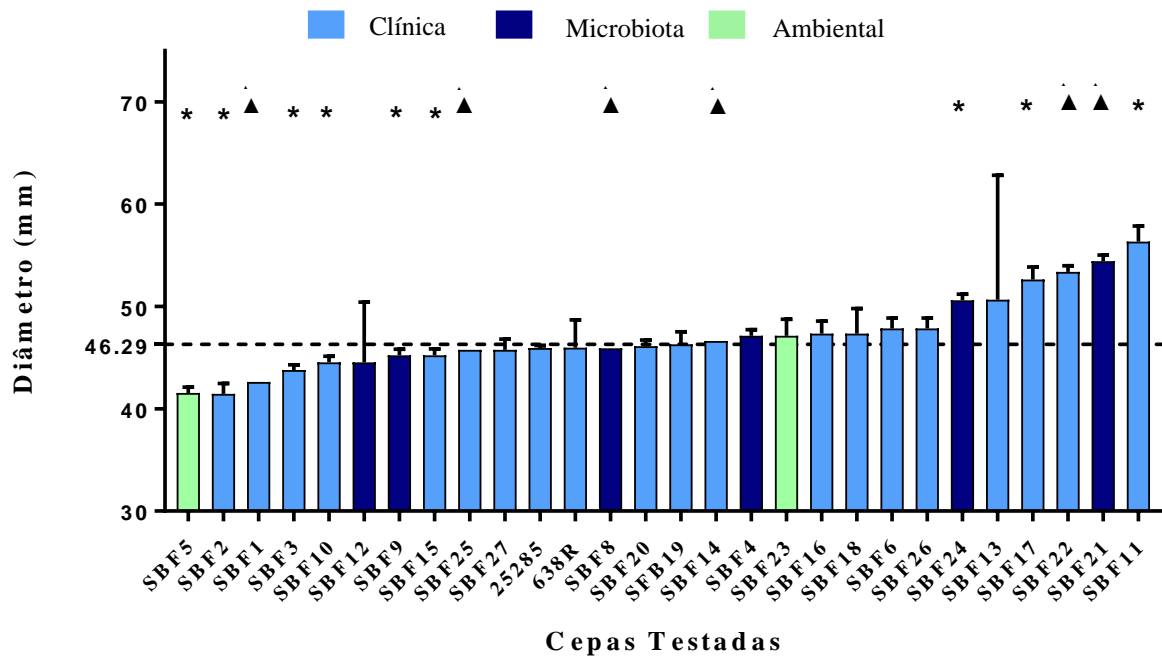


Figura 8: Resistência ao H₂O₂ a 3% por meio de disco difusão. Os asteriscos (*) indicam quais amostras quando comparadas com a média apresentaram diferença significativa $p < 0,05$. O triângulo (▲) indicam quais amostras quando comparadas a média apresentaram diferença significativa $p < 0,01$. Através dessa análise, oito amostras se mostraram mais resistentes ao H₂O₂ e seis amostras se mostraram mais sensíveis. Os resultados são a média do tamanho do diâmetro dos halos em mm obtidos de um experimento em triplicata.

Tabela 6: Cepas mais resistentes ao H₂O₂ quando comparadas à média do grupo

Cepa	Origem	<i>bmoR</i>	<i>oxyR</i>	Média
SBF1	C	+	+	42,63
SBF2	C	+	-	41,47
SBF3	C	+	-	43,79
SBF5	A	+	+	41,54
SBF9	M	+	-	45,22
SBF10	C	-	+	44,54
SBF12	M	-	+	44,54
SBF15	C	+	+	45,22

C: Clínica; M: Microbiota; A: Ambiental; (+) A cepa possui o gene; (-) A cepa não possui o gene; Os valores apresentados representam a média de cada cepa em um experimento em triplicata; As amostras que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à média estão escritas em **vermelho**.

5.4 Teste de sobrevivência do *B. fragilis* frente a macrófagos peritoneais e medulares

As amostras que foram submetidas a macrófagos medulares não demonstraram nenhuma diferença significativa quando comparadas ao controle selvagem (**Figura 9A**). O resultado obtido da análise do experimento com macrófagos peritoneais também não mostrou nenhuma diferença significativa para nenhuma das amostras mutantes quando comparados ao controle (**Figura 9B**).

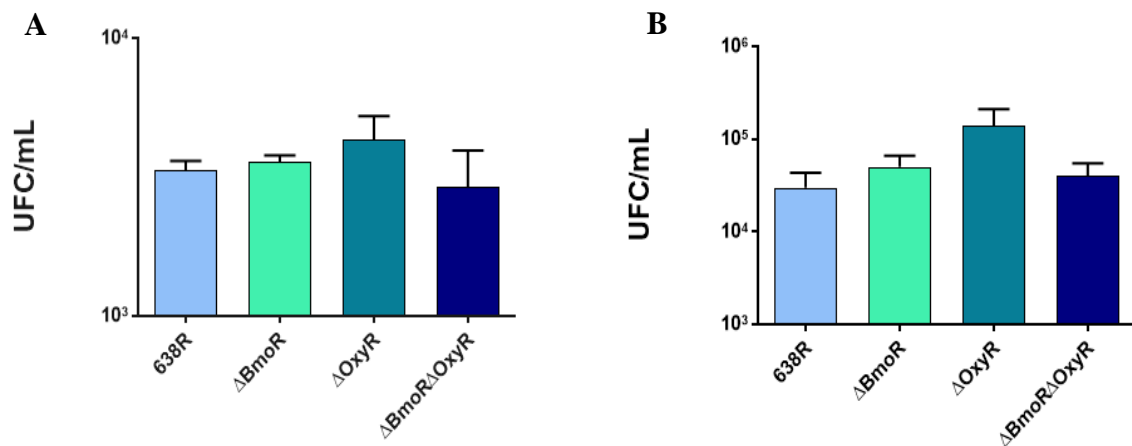


Figura 9: Sobrevivência de cepas mutantes de *B. fragilis* frente a macrófagos medulares e peritoneais. Cepas mutantes de *B. fragilis* para os genes *bmoR* e *oxyR* não mostraram nenhuma diferença significativa na sobrevivência frente a macrófagos medulares (**A**) e peritoneais (**B**). Os resultados são a média de UFC recuperadas após o tratamento com metronidazol (200 μg/mL) e representam um experimento realizado em triplicata.

5.5 Indução de abscessos peritoneais por *B. fragilis* em camundongos C57BL/6

As cepas mutantes de *B. fragilis* para os genes *bmoR* e *oxyR* foram avaliadas quanto a sua capacidade de induzir a formação de abscessos *in vivo*. Todas as cepas com mutação tiveram sua capacidade de levar a formação de abscessos diminuída quando comparadas a cepa selvagem 638R, ou seja, tanto a ausência de *bmoR* quanto de *oxyR* afeta a virulência da espécie. Dentre as mutantes, as que foram mais afetadas pela ausência do gene foram a mutante *oxyR* (Δ OxyR) e a mutante dupla (Δ BmoR Δ OxyR) que demonstraram maior perda da expressão desse fator de virulência (**Figura 10**).

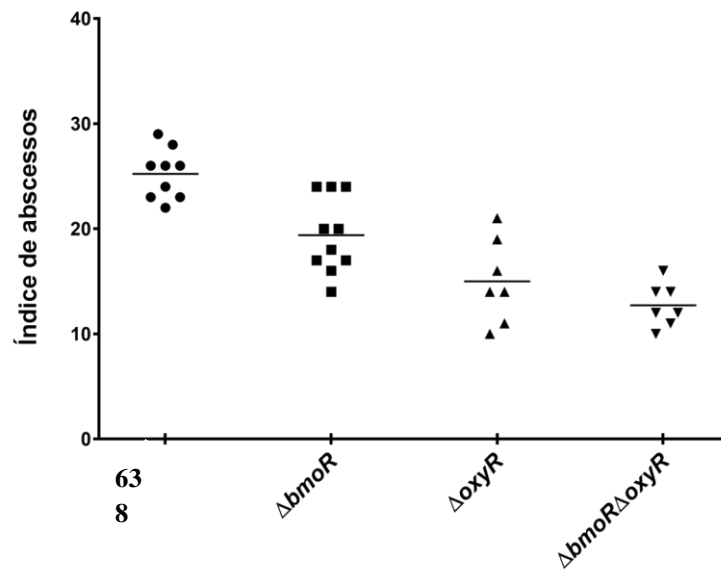


Figura 10: Formação de abscessos por cepas mutantes de *B. fragilis* em camundongos C57BL/6. Foi avaliada a capacidade de indução da formação de abscessos das cepas mutantes de *B. fragilis* para os genes *bmoR* e *oxyR* em camundongos. Tanto a ausência de *bmoR* quanto de *oxyR* levou a uma diminuição na capacidade desses microrganismos em induzir a formação de abscessos em camundongos. As cepas mais afetadas foram a mutante *OxyR* ($\Delta OxyR$) e a mutante dupla ($\Delta BmoR\Delta OxyR$) que tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) na formação de abscessos.

6 DISCUSSÃO

O *B. fragilis* é uma bactéria anaeróbia estrita que faz parte da microbiota anfibiótica do homem, mas que é um potencial patógeno e é a bactéria anaeróbia mais encontrada em processos infecciosos de origem endógena (Willis, 1991; Giamarellou, 2000; Lobo *et al.*, 2013). Esse microrganismo é muito bem sucedido durante processos infecciosos e isso em grande parte se deve a capacidade de resistir a ambientes oxidados como é o caso da cavidade peritoneal. A resistência ao estresse oxidativo é um dos mecanismos de sobrevivência mais fascinantes desse microrganismo e, quem sabe, até o mais crucial para sua permanência e sobrevivência no organismo hospedeiro. Muitos mecanismos relacionados a esta resposta nesta espécie vem sendo descritos, mas ainda há muito para se descobrir principalmente com relação à regulação dessa resposta (Rocha *et al.*, 1996; Rocha e Smith, 1999, 2004; Rocha, Owens e Smith, 2000; Baughn e Malamy, 2004; Sund *et al.*, 2008; Reott *et al.*, 2009; Ndamukong, Gee e Smith, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Betteken, Rocha e Smith, 2015). Diversos reguladores devem estar associados ao combate ao estresse oxidativo em *B. fragilis*, dentre eles os reguladores OxyR, um dos mais bem caracterizados na espécie e que está envolvido principalmente no combate a peróxidos, e BmoR, que vem sendo estudado quanto a sua função e participação nessa resposta, mas que estima-se que esteja mais envolvido na resposta ao oxigênio, uma vez que sua expressão aumenta durante a exposição a esse agente (Sund *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2013).

Embora saiba-se que ambos os reguladores sejam de grande importância para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular, seus genes codificadores não puderam ser detectados em todas as cepas que foram utilizadas no nosso estudo (**Figura 6**). Nossos resultados, ainda que não tenham sido obtidos de um grande número de amostras, demonstraram que a distribuição desses genes não parece ser homogênea. Ainda assim, apesar de não termos detectado os genes em todas as amostras, não significa que de fato eles estejam ausentes. O polimorfismo genético é um fenômeno que ocorre com bastante frequência na natureza (Fernández-Calero *et al.*, 2016; Chuet *et al.*, 2016). Portanto, o resultado observado pode ser devido a pequenas mutações que alteram partes da sequência dos genes, o que impediria o anelamento eficiente dos iniciadores utilizados. O fenômeno do polimorfismo já foi observado previamente na cepa IB263 de *B. fragilis*, que possui uma mutação no gene que codifica o regulador OxyR. O sequenciamento do operon do OxyR nesta cepa revelou uma mutação pontual no gene *oxyR* onde ocorreu a mudança de um nucleotídeo (A para G) no

códon 202 (GAT para GGT) levando a mudança de aminoácidos (aspartato para glicina) na proteína OxyR. Essa mutação fez com que o OxyR permanecesse permanentemente ativado, permitindo a expressão constitutiva de genes como o da catalase (*katB*) que torna a cepa resistente a peróxidos (Rocha e Smith, 1998; Rocha, Owens e Smith, 2000). Para investigar mais a fundo essa questão, seria necessário fazer uma análise da sequência dos genes nessas cepas, comparando as mesmas com sequências de cepas de *B. fragilis* cujos genomas já tenham sido sequenciados, desse modo poderíamos ter uma estimativa da frequência com que isso ocorre na espécie. No entanto, é possível também que as cepas que não apresentaram os genes em nosso experimento realmente não os tenham. A presença de outros reguladores que atuem na resposta ao estresse oxidativo e que poderiam compensar a ausência dos referidos genes é possível. Um exemplo é o caso do gene que codifica o regulador PerR, que já foi descrito em bactérias Gram negativas e Gram positivas atuando em conjunto com OxyR ou substituindo-o (Dubbs e Mongkolsuk, 2012). Em *B. fragilis*, há indicação de que esse regulador controle a expressão de uma rubreritina, uma enzima detoxificante da superfamília de proteínas similares à ferritina que está relacionada à detoxificação do H₂O₂ (Andrews, 2010; Teixeira, 2016). Outra possibilidade que tem que ser levada em conta é que a presença de pelo menos um regulador seja essencial para a sobrevivência do microrganismo, pois durante nossa análise todas as amostras apresentam *bmoR*, *oxyR*, ou ambos.

Estudos anteriores demonstraram que a ausência do gene *bmoR* leva ao aumento da sensibilidade de cepas de *B. fragilis* ao O₂ atmosférico, enquanto que a ausência de *oxyR* leva a diminuição da resistência ao H₂O₂ (Teixeira, 2016). Em nossos resultados foi possível observar que amostras de *B. fragilis* expostas ao oxigênio apresentam fenótipos diferentes. Dentre o grupo de amostras avaliadas, quatorze se mostraram mais tolerantes a esse agente, (**Figura 7**) quando comparadas a média. Dentre estas, em duas amostras detectamos apenas o gene *bmoR*, nas demais foram detectados ou ambos os genes ou apenas o gene *oxyR*. A presença dos dois reguladores em uma mesma cepa deveria favorecer a eliminação de compostos derivados do oxigênio que sejam tóxicos para a célula, mas a detecção apenas de OxyR não necessariamente indica que esta cepa será mais sensível ao O₂. A redução desse composto na célula dá origem ao O₂⁻, que ao ser catalizado pela enzima superóxido dismutase gera H₂O₂ e O₂. O OxyR regula a expressão de genes como o *katB*, que codifica uma catalase que elimina o peróxido formado. A presença de uma fonte de ferro (hemina) no meio de cultura utilizado pode favorecer a formação de HO• um dos radicais mais nocivos na célula através da reação de Fenton, onde o H₂O₂ formado reage com o ferro disponível (Rocha e

Smith, 1995). A regulação eficiente por OxyR contribui para a eliminação de compostos danosos como o H_2O_2 e previne a formação de outros ainda mais nocivos como o $OH\bullet$ podendo portanto, permitir a sobrevivência da célula mesmo durante a exposição ao O_2 . Ainda, em *B. fragilis* há outros homólogos da família MarR (Teixeira, Domingues e Lobo, 2016). Esses homólogos ainda estão sendo estudados quanto sua função, mas é possível que assim como BmoR, possam estar atuando no combate ao estresse oxidativo gerado pela presença de O_2 .

Ao expor as mesmas amostras a outro agente oxidante, o H_2O_2 , notamos que o fenótipo entre elas também varia. Entre as oito amostras mais resistentes, em duas foi detectado apenas o gene *oxyR*, nas demais foram detectados ambos os genes ou apenas o gene *bmoR* (**Figura 8**). Novamente a não detecção do OxyR nessas amostras não significa que, de fato, ele esteja ausente, como foi dito anteriorente, pode se tratar de um gene com alguma mutação (Rocha e Smith, 1998; Rocha, Owens e Smith, 2000). Em caso de a cepa não possuir o gene *oxyR* que codifica o regulador com resposta contra o H_2O_2 , há a possibilidade de que presença de outros reguladores como o PerR (Teixeira, 2016) estejam atuando contra peróxidos podem suprimir a falta de *oxyR*, evitando a formação de compostos tóxicos derivados desse agente que são nocivos à célula.

A aerotolerância de *B. fragilis* parece ser um dos seus mais importantes fatores de virulência. Como componente da microbiota humana, este microrganismo geralmente está localizado no trato gastrointestinal do hospedeiro onde os níveis de O_2 são baixos, mas a ocorrência de traumas que rompam a barreira física do trato gastrointestinal pode levar ao extravasamento desse microrganismo para outros sítios (Maier, Anderson e Roy, 2015). Nesse novo sítio, onde a tensão de O_2 pode ser maior do que a de seu nicho natural, esta bactéria precisa encontrar meios de sobreviver. Naturalmente, *B. fragilis* vai utilizar da expressão de seus fatores de virulência para conseguir se manter e muitas vezes, esse processo acarreta no estabelecimento de um quadro clínico infeccioso (Lobo *et al.*, 2013). De fato, em nossos resultados podemos observar que a prevalência de amostras mais resistentes tanto ao O_2 quanto ao H_2O_2 são de amostras provenientes de algum caso clínico. A capacidade de dispersão dessa bactéria permite que ela atinja diversos sítios do organismo humano e que cause diversos tipos de doença. Em termos evolutivos, as cepas mais bem sucedidas são aquelas que conseguem se adaptar melhor ao ambiente em que se encontram, portanto, as cepas que são recuperadas de quadros clínicos tendem a ser mais resistentes a diversos fatores entre eles, o estresse oxidativo.

Nosso banco de amostras conta com bactérias que foram isoladas dos mais diversos sítios anatômicos como, por exemplo, corrente sanguínea, peritônio, ouvido médio, entre outros. A presença do microrganismo nesse sítio não necessariamente significa que se trata de uma bactéria resistente às condições do ambiente, o estado do paciente pode influenciar nesse quesito. Microrganismos isolados de pacientes imunocomprometidos podem ser estirpes comuns que circulam normalmente na comunidade, mas que nesses pacientes são o suficiente para estabelecerem um quadro infeccioso crítico (Kierzkowska, *et al.*, 2014). O tratamento com antimicrobianos também é uma variável que deve ser levada em consideração, uma vez que pode exercer seleção de microrganismos mais resistentes que não representam uma realidade epidemiológica (Oz *et al.*, 2014; Willmann *et al.*, 2015). As amostras que chegam ao nosso grupo, no entanto, não vêm acompanhadas da ficha médica do indivíduo do qual a amostra foi coletada, dificultando a correlação entre o fenótipo observado e a condição do paciente.

Sabendo da capacidade de *B. fragilis* em expressar fatores de virulência e do quão efetivo esses mecanismos podem ser, nós buscamos avaliar se a ausência dos reguladores alvo deste estudo iriam influenciar o fenótipo de cepas de *B. fragilis* com relação à capacidade de expressar um dos seus fatores de virulência. Amostras mutantes para os genes *bmoR*, *oxyR* ou ambos foram avaliadas quanto a capacidade de formar abscessos em camundongos machos C57BL/6. Em 2008, Sund e colaboradores demonstraram que amostras de *B. fragilis* com mutação em *oxyR* tinham a capacidade de formar abscessos diminuída em até 3 graus de magnitude quando comparadas a cepa selvagem (Sund *et al.*, 2008). Em nosso estudo observamos que de fato todas as amostras mutantes tiveram os níveis de formação de abscessos diminuída, mas entre elas a mais afetada foi a mutante dupla seguida da mutante $\Delta oxyR$ (**Figura 10**), isso mostra que para que a cepa possua total virulência é necessário que o *oxyR* esteja presente. A formação de abscessos depende não somente que a bactéria expresse moléculas que irão dar início a esse evento, mas também de fatores do hospedeiro como, por exemplo, a resposta imune (Gibson III *et al.*, 1998). Durante a formação de abscessos ocorre o recrutamento de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (Tzianabos e Kasper, 2002). Neutrófilos utilizam de diversos mecanismos para combater microrganismos, entre eles o *burst* oxidativo, comum a outras células do sistema imune. Durante o *burst* ocorre a formação de diversas espécies reativas de oxigênio, entre elas o H_2O_2 , O_2^- e OH^\bullet . A ausência dos reguladores em cepas mutantes de *B. fragilis* levaria possivelmente, a uma resposta ineficiente

contra esses agentes, uma vez que em nossas observações, foi visto que todas as cepas mutantes tem a capacidade de formar abscessos diminuída.

A produção de H_2O_2 é tóxica à célula e ainda pode dar origem ao $OH\cdot$ através da reação de Fenton que é ainda mais tóxico, mas essa não é a única forma de gerar $OH\cdot$ através do H_2O_2 . Os neutrófilos tem a capacidade de produzir ácido hipocloroso (HOCl) usando o H_2O_2 como substrato, esse HOCl ao reagir com O_2^- gera mais $OH\cdot$. Sendo assim, a não eliminação do H_2O_2 presente pode levar a danos muito graves para o *B. fragilis*. Sem a presença do regulador que atua diretamente no controle da eliminação do H_2O_2 , as células microbianas seriam mais facilmente eliminadas pelo neutrófilo (Manda-Handzlik e Demkow, 2015). Ainda deve ser levado em consideração que ao sair do seu local habitual que é o trato gastrointestinal onde o ambiente é reduzido o *B. fragilis* entra em contato com o O_2 e todas as espécies reativas geradas a partir dele, novamente a deficiência na resposta leva a diminuição da sobrevivência da bactéria. Somando-se a pressão do meio e a resposta de fagócitos como o neutrófilo a viabilidade desse microrganismo diminui. Sem a replicação bacteriana, diminuiu-se também a ativação de células T que é estimulada pela cápsula do *B. fragilis* e consequentemente a produção de citocinas. Essas citocinas recrutam polimorfonucleares ao sítio da inflamação levando ao depósito de células e de fibrina que culmina na formação do abscesso (Tzianabos e Kasper, 2002).

Em estudos prévios, foi demonstrado que a cepa deficiente no gene *oxyR* era mais susceptível a morte por macrófagos em quase duas ordens de grandeza após um período de interação de 24 horas em relação a cepa selvagem (Ferreira, 2007). Nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas em relação à sobrevivência em nenhuma das cepas mutantes em comparação a cepa parental independente do macrófago utilizado no experimento (**Figura 9**). Com relação a macrófagos medulares esse resultado já era esperado, pois esse tipo de macrófago é menos ativo que macrófagos peritoneais, uma vez que recebem menos estímulos. Em relação ao macrófago peritoneal o esperado era de que houvesse menos células viáveis no fim do experimento. Já se sabe que o mecanismo de oxidação do macrófago é menos eficiente do que o de neutrófilos (Iles e Forman, 2002) o que pode ser uma das causas para a alta taxa de sobrevivência das amostras neste experimento, assim como o número de bactérias colocadas em contato com o macrófago. No experimento onde foi visto diferença na sobrevivência com relação à cepa mutante em *oxyR*, foi utilizado 10^7 células bacterianas para cada 5×10^5 de macrófagos, enquanto que em nosso experimento foram utilizadas 3×10^7 de células bacterianas para cada 5×10^5 macrófagos, é possível que tenha

ocorrido uma “saturação” dessas células interferindo no resultado. Ainda, em nosso experimento o tempo de interação bactéria:Macrófago foi de uma hora, enquanto que no experimento com diferença na sobrevivência houveram dois tempos de interação, 5 e 24 horas, esse fator também pode ter influenciado em nossos resultados.

Estudar um dos mecanismos de sobrevivência mais importantes para o *B. fragilis* é de extrema importância uma vez que se trata do microrganismo anaeróbio mais isolado de infecções endógenas. A resposta ao estresse oxidativo nessa bactéria é bastante complexa e aos poucos vem sendo desvendada, mas ainda é preciso percorrer um longo caminho até que se tenha completo entendimento dela. Nesse estudo foi possível aprender um pouco mais sobre os reguladores BmoR e OxyR, ambos envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Ao que parece não se tratam de genes predominantes em todas as cepas da espécie, mas apesar disso são extremamente importantes à espécie como um todo, uma vez que são capazes de influenciar até mesmo na expressão de fatores de virulência. Os fenótipos observados nos mostraram também que esses genes podem estar sendo expressos de maneira diferente na espécie e que talvez essa seja uma maneira para selecionar cepas mais resistentes, tendo em vista que a maioria das amostras que se mostraram mais resistentes aos agentes oxidantes utilizados vem de origem clínica. Muitas outras dúvidas foram geradas a partir desse trabalho, fornecendo mais combustível a nossa curiosidade, mas apesar disso pudemos ter uma melhor compreensão da importância desses reguladores para essa bactéria, e esperamos, que em um futuro próximo esses dados somados a muitos outros possam ser utilizados na melhor compreensão dessa espécie e de seus fatores de virulência.

7 CONCLUSÃO

- A detecção dos genes *bmoR* e *oxyR* em cepas de *B. fragilis* foi realizada e, vimos que a detecção dos genes não foi uniforme dentro da espécie, e pode ser que a expressão dos mesmos esteja variando entre as cepas, uma vez que o fenótipo observado varia frente a diferentes agentes oxidantes.

- Não houve diferença significativa na sobrevivência de nenhuma das cepas mutantes frente a macrófagos medulares e peritoneais de camundongos C57BL/6.

- A presença de ambos os reguladores influenciam a indução da formação de abscessos em camundongos C57BL/6.

8 BIBLIOGRAFIA

- Abratt, V. R., Zappe, H., e Woods, D. R. (1993). **A reporter gene vector to investigate the regulation of glutamine synthetase in *Bacteroides fragilis* Bf1.** J. Gen. Microbiol. 139, 59-65.
- Alekshun, M. N. e Levy, S. B. (1997). **Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon.** Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2065-2075.
- Alekshun, M. N., Levy, S. B., Mealy, T. R., Seaton, B. A. e Head, J. F. (2001). **The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution.** Nat. Struct. Biol. 8, 710-714.
- Andrews, N.C. (2010). **Ferritin (in) ing out new mechanisms in iron homeostasis.** Cell Metab. 12, 203-204.
- Antelmann, H., Helmann, J. D. (2011). **Thiol-based redox switches and gene regulation.** Antioxid. Redox Signal. 14, 1049–1063.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M. e Iyer, L. M. (2005). **The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond.** FEMS Microbiol. Rev. 29, 231–262.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. e Storz, G. 1999. **Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 6161– 6165.
- Assumpção, G. L. H. (2013). **Avaliação dos padrões de susceptibilidade antimicrobianas e sorogrupos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de bovinos leiteiros, portadoras e não portadoras dos genes *stx1*, *stx2e* e *eae*.** Dissertação (mestrado em Biologia) –Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.
- Bartels, F.W., Baumgarth, B., Anselmetti, D., Ros, R., e Becker, A. (2003). **Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti*-a combined molecular biology and force spectroscopy investigation.** J. Struct. Biol. 143, 145–152.
- Baughn, A. D. e Malamy, M. H. (2004). **The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen.** Nature 427, 441-444.
- Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A.A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H.P., Walker, G.C., e Pühler, A. (1997). **The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products.** J. Bacteriol. 179, 1375–1384.
- Bettekken, M. I., Rocha, E. R., e Smith, C. J. (2015). **Dps and DpsL mediate survival *in vitro* and *in vivo* during the prolonged oxidative stress response in *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 197, 3329-3338.
- Brioukhanov, A. L. e Netrusov, A. L. (2004). **Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes.** Biochemistry. 69, 949-962.
- Brook, I. (2008). **Infective Endocarditis caused by anaerobic bacteria.** Arch Cardiovasc. Dis. 101, 665-76.
- Brook, I. (2009). **Pericarditis caused by anaerobic bacteria.** J Antimicrob. Agents. 33, 297-300.
- Book, I. (2010). **The role of anaerobic bacteria in bacteremia.** Anaerobe 16, 183-189.
- Brook, I. e Finegold, S. M. (1981). **Aerobic and anaerobic bacteriology of cutaneous abscesses in children.** Pediatr. 67, 891-895.

- Brook, I. e Frazier, E. H. (1998). **Aerobic and anaerobic microbiology of retroperitoneal abscesses.** Clin. Inf. Dis. 26, 938-941.
- Brubaker, J. O., Li, Q., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L., e Finberg, R. W. (1999). **Mitogenic activity of purified capsular polysaccharide A from *Bacteroides fragilis*: differential stimulatory effect on mouse and rat lymphocytes *in vitro*.** J. Immunol. 162, 2235-2242.
- Byrne, G. A., Russell, D. A., Chen, X. e Meijer, W. G. (2007). **Transcriptional regulation of the *virR* operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*.** J. Bacteriol. 189, 5082–5089.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. e Rahme, L. G. (2001). **A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98, 14613–14618.
- Chen, Y., Kinouchi, T., Kataoka, K., Akimoto, S. e Ohnishi, Y. (1995). **Purification and characterization of a fibrinogen-degrading protease in *Bacteroides fragilis* strain YCH46.** Microbiol. Immunol. 39, 967-977.
- Chen, H., Xu, G., Zhao, Y., Tian, B., Lu, H., Yu, X., Xu, Z., Ying, N., Hu, S. e Hua, Y. (2008). **A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*.** PLoS One, 3, 1602.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. e Ryu, S. E. (2001). **Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor.** Cell. 6, 103-113.
- Chow, J., Lee, M. S., Shen, Y., Khosravi, A. e Mazmanian, S. K. (2010). **Host-Bacterial Symbiosis in Health and Disease.** Adv. Immunol. 107, 243-274.
- Chung, G. T., Franco, A. A., Wu, S., Rhie, G.E., Cheng, R., Oh, H. B. e Sears, C. L. (1999). **Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*.** Infect. Immun. 67, 4945-4949.
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I. P., Kwon, A. H. K., Vasconcelos, A. C., Cunha, L. D., Mayer, A. E., Shen, Y., Wu, W., Kambal, A., Targan, S. R., Xavier, R. J., Ernst, P. B., Green, D. R., McGovern, D. P. B., Virgin, H. W., e Mazmanian, S. K. (2016). **Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease.** Science, 352.
- Coyne, M. J., Tzianabos, A. O., Mallory, B. C., Carey, V. J., Kasper, D. L. e Comstock, L.E. (2001). **Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*.** Infection and immunity. 69, 4342-4350.
- Crab, J. H., Findberg, R., Onderdonk, A. B. e Kasper, D. L. (1990). **T cell regulation of *Bacteroides fragilis* induced intraabdominal abscesses.** Rev. Infec. Dis. 12, S178-184.
- Christman, M. F., Storz, G. e Ames, B. N. (1989). **OxyR, a positive regulator of Hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3484-3488.
- Deghmane, A. E., Petit, S., Topilko, A., Pereira, Y., Giorgini, D., Larribe, M. e Taha, M. K. (2000). **Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator.** EMBO. J. 19, 1068– 1078.
- Deghmane, A. E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J. M. e Taha, M. K. (2002). **Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein.** Mol. Microbiol. 43, 1555–1564.

- Diniz, D.G., Farias, L.M., Carvalho, M.A., Rocha, E. R. e Smith, C. J. (2004). **Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutante.** J. antimicrob. Chemother. 54, 100-108.
- Dubbs, J. M. e Mongkolsuk, S. (2012). **Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria.** J. Bacteriol. 194, 5495-5503.
- Ezezika, O. C., Collier-Hyams, L. S., Dale, H. A., Burck, A. C. e Neidle, E. L. (2006). **CatM regulation of the benABCDE operon: functional divergence of two LysR-type paralogs in *Acinetobacter baylyi* ADP1.** Appl. Environ. Microbiol. 72, 1749-1758.
- Ezezika, O. C., Haddad, S., Clark, T. J., Neidle, E. L., e Momany, C. (2007). **Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activator by BenM, a LysR-type regulator.** J. Mol. Biol. 367, 616-629.
- Fang, H., Edlund, C., Hedberg, M. e Nord, C. E. (2002). **New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group.** Int. J. Antimicrob. Agents. 19, 361-370.
- Fernández-Calero, T., Cabrera-Cabrera, F., Ehrlich, R. e Marín, M. (2016). **Silent polymorphisms: can the tRNA explain changes in protein properties?** Life. 6, 10.3390.
- Ferreira, Livia Queiroz. (2007). **Interferência do regulador transcricional OxyR e da enzima catalase na capacidade de sobrevivência e virulência de *Bacteroides fragilis* em condições *in vitro* e *in vivo*.** Dissertação de mestrado em Ciências (microbiologia). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Ferreira, M. C. S., Domingues, R. M. C. P. e Uzeda, M. (2003). In: **Manual de bacteriologia de anaeróbios.** (Rio de Janeiro).
- Fille, M., Mango, M., Lechner, M. e Schaumann, R. (2006). ***Bacteroides fragilis* group: Trends in resistance.** Current Microbiology. 52, 153-157.
- Finegold, S. M. (1977). **Anaerobic bacteria in human disease.** Academic Press; 201—217.
- Finlay, B. B. e Falkow, S. (1997). **Common themes in microbial pathogenicity revisited.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 136-169.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. e Helmann, J.D. (2001). **OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*.** J. Bacteriol. 183, 4134–4141.
- Fuangthong, M. e Helmann, J.D. (2002). **The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 6690–6695.
- Gal, M. e Brazier, J. S., (2004). **Metronidazole resistance in *Bacteroides spp.* carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants.** J. Antimicrob. Chemother. 54, 109-116.
- Giamarellou, H. (2000). **Anaerobic infection therapy.** J. Antimicrob. Agents. 16, 341-346.
- Gibson III, F. C., Onderdonk, A. B., Kasper, D. L. e Tzianabos A. O. (1998). **Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*.** Journal of Immunology 160, 5000-5006.
- Gilmore, M. S. e Ferreti, J.J. (2003). **The thin line between gut commensal and pathogen.** Science 299, 1999-2002.
- Goldstein, E.J. e Citron, D.M. (1988). **Annual incidence, epidemiology, and comparative *in vitro* susceptibilities to cefoxitin, cefotetan, cefmetazole and ceftizoxime of recent community-acquired isolated of the *Bacteroides fragilis* group.** J. Clin. Microbiol. 26, 2361-2366.

- Gonzalez-Flecha, B. e Demple, B. (1997). **Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* 179, 382–388.
- Gonzalez-Flecha, B. e Demple, B. (1999). **Role for the *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* 181, 3833.
- Goulas, T., Arolas, J. L. e Gomis-ruth, F. X. (2011). **Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 1856-1861.
- Gregory, E. M. (1985). **Characterization of the O₂-induced manganese-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis***. *Arch. Biochem. Biophys.* 238, 83-89.
- Guzmán, C. A., Platé, M. e Pruzzo, C. (1990). **Role of neuraminidase-dependent adherence in *Bacteroides fragilis* attachment to human epithelial cells**. *FEMS Microbiol. Lett.* 59, 187-192.
- Hecht, D. W. (2004). **Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments**. *Clin. Infect. Dis.* 39, 92-97.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M., e Wallace, J. C. (1988). **A large family of bacterial activator proteins**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6602-6606.
- Heo, Y. J., Chung, I. Y., Cho, W. J., Lee, B. Y., Kim, J. H., Choi, K. H., Lee, J. W., Hassett, D. J. e Cho, Y. H. (2010). **The major catalase gene (*kataA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide**. *J. Bacteriol.* 192, 381-390.
- Herren, C. D., Rocha, E. R. e Smith, C. J. (2003). **Genetic analysis of an important oxidative stress locus in the anaerobe *Bacteroides fragilis***. *Gene*. 316, 167- 175.
- Holdeman, L. V., Kelley, R. W. e Moore, W. E. C. (1984). **Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL}**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 604–631. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hooper, L. V., Stappenbeck, C. V. e Gordon, J. I. (2003). **Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity**. *Nat. Immunol.* 4, 269-273.
- Hopkins, M. J. e Macfarlane, G. T. (2003). **Nondigestible Oligosaccharides Enhance Bacterial Colonization Resistance Against *Clostridium difficile* in vitro**. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1920-1927.
- Huffman, J. L. e Brennan, R. G. (2002). **Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 98–106.
- Husain, F., Veeranagouda, Y., Hsi, J., Meggersee, R., Abratt, V. e Wexler, H. M. (2013). **Two multidrug-resistant clinical isolates of *Bacteroides fragilis* carry a novel metronidazole resistance nim gene (nimJ)**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3767-3774.
- Ignacio, A., Fernandes, M. R., Avila-campos, M. J. e Nakano, V. (2015). **Enterotoxigenic and non-toxigenic *Bacteroides fragilis* from fecal microbiota of children**. *Braz. J. Microbiol.* 46, 1141-1145.
- Iles, K. E. e Forman, H. J. (2002). **Macrophage signaling and respiratory burst**. *Immunol. Res.* 26, 95-105.
- Ingavale, S., Van wamel, W., Luong, T. T., Lee, C. Y. e Cheung, A. L. (2005). **Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus***. *Infect. Immun.* 73, 1423-1431.

- Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D.M., Baron, E.J., Wexler, H.M. e Finegold, S.M. (2002). **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 6th ed. National Public Health Institute (KTL). Department of Bacteriology. Anaerobe Reference Laboratory. Helsinki, Finland.
- Kierzkowska, M., Majewska, A., Sawicka-Grzelak, A., Mlynarczyk, A., Chmura, A., Durlik, M., Deborska-Materkowska, D., Paczek, L. e Mlynarczyk, G. (2014). **Specific character of anaerobic bacterial infections in patients treated in transplantation wards at one of the clinical hospitals in Warsaw**. *Transplant Proc.* 46, 2586-2588.
- Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A. e Stamler, J. S. (2002). **OxyR: a molecular code for redox-related signaling**. *Cell.* 109, 383-396.
- Kim, J., Kim, J. G., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T. e Hwang, I. (2004). **Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae***. *Mol. Microbiol.* 54, 921–934.
- Kona, J. e Brinck T. (2006). **A combined molecular dynamics simulation and quantum chemical study on the mechanism for activation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide**. *Org. Biomol. Chem.* 4, 3468 –3478.
- Kovacikova, G. e Skorupski, K. (1999). **A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression. Of the ToxR virulence cascade**. *J. Bacteriol.* 181, 4250-4256.
- Krinos, C. M., Coyne, M. J., Weinacht, K. G., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L. e Comstock, L. E. (2001). **Extensive surface diversity of commensal microorganism by multiple DNA inversions**. *Nature* 414, 555-558.
- Kullik, I., Toledano, M. B., Tartaglia, L. A. e Storz, G. (1995a). **Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation**. *J. Bacteriol.* 177, 1275–1284.
- Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M. B. e Storz, G. (1995b). **Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization**. *J. Bacteriol.* 177, 1285–1291.
- Lee, E. H., Rouquette-Loughlin, C., Folster, J. P. e Shafer, W. M. (2003). **FarR regulates the *farAB*-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism**. *J. Bacteriol.* 185, 7145-7152.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G. e Ryu, S. E. (2004). **Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1179-1185.
- Leva, R., Roncarati, D., Metruccio, M. M., Seib, K. L., Scarlato, V. e Delany, I. (2008). **OxyR tightly regulates catalase expression in *Neisseria meningitidis* through both repression and activation mechanisms**. *Mol. Microbiol.* 70, 1152-1165.
- Liu, H. L., Lee, S. M., Vanlare, J. M., Kasper, D. L. e Mazmanian, S. K. (2008). **Regulation of Surface Architecture by Symbiotic Bacteria Mediates Host Colonization**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105.
- Lobo, L. A., Jenkins, A. L., Jeffrey, S. C. e Rocha, E. R. (2013). **Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model**. *Microbiology open* 2, 326-27.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Zaim, J., Witkowska-Zimny, M. e Hryniewicz, M. M. (2004). **Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter**. *Mol. Microbiol.* 53, 791–806.

- Lu, Z., Takeuchi, M. e Sato, T. (2007). **The LysR-type transcriptional regulator YofA controls cell division through the regulation of expression of ftsW in *Bacillus subtilis***. J. Bacteriol. 189, 5642–5651.
- Macfarlane, C. e Gibson, S. A. W. (1988). **Characterization of proteases formed by *Bacteroides fragilis***. J. Gen. Microbiol. 134, 19-27.
- Macfarlane, G. T. e Macfarlane, S. (1991). **Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis***. FEMS Microbiol. Lett. 77, 289-294.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. e Clark, D. P. (2010). **Microbiologia de Brock**. Tradução: Kyaw, C. M., Maranhão, A. Q., Lima, B. D., 12ª Edição, Porto Alegre, Brasil. Ed. Artmed.
- Maddocks, S. E. e Oyston, P. C. (2008). **Structure and function of the LysR-Type transcriptional regulator (LTTR) family proteins**. Microbiology 154, 3609-3623.
- Maier, E., Anderson, R. C. e Roy, N. C. (2015). **Understanding how commensal obligate anaerobic bacteria regulate immune functions in the large intestine**. Journal List Nutrients. 7, 45-73.
- Mancuso, G., Midiri, A., Biondo, C., Beninati, C., Gambuzza, M., Macri, D., Bellantoni, A., Weintraub, A., Espevik, T. e Teti, G. (2005). ***Bacteroides fragilis* derived lipopolisaccharide produces cell activation and lethal toxicity via toll-like receptor 4**. Infect. Immun. 73, 5620-5627.
- Manda-Handzlik, A. e Demkow, U. (2015). **Neutrophils: the role of oxidative and nitrosative stress in health and disease**. Adv. Exp. Med. Biol. 857, 51-60.
- Mcdermott, P. F., Mcmurry, L. M., Podglajen, I., Dzik-fox, J. L., Schneiders, T., Draper, M. P. e Levy, S. B. (2008). **The *marC* gene of *Escherichia coli* is not involved in multiple antibiotic resistance**. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 382-383.
- Miyamae, S., Nikaido H., Tanaka Y. e Yoshimura F. (1998). **Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis***. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2119–2121.
- Mongkolsuk, S., Panmanee, W., Atichartpongkul, S., Vattanaviboon, P., Whangsuk, W., Fuangthong, M., Eiamphungporn, W., Sukchawalit, R. e Utamapongchai, S. (2002). **The repressor for an organic peroxide-inducible operon is uniquely regulated at multiple levels**. Mol. Microbiol. 44, 793–802.
- Moore, W. E. C., Cato, E. P. e Moore, L. V. H. (1985). **Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the *International Journal of Systematic Bacteriology* since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1985)**. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 382–407.
- Mukhopadhyay, A., Redding, A. M., Joachimiak, M. P., Arkin, A. P., Borglin, S. E., Dehal, P. S., Chakraborty, R., Geller, J. T., Hazen, T. C., He, Q., Joyne, D. C., Martin, V. J., Wall, J. D., Yang, Z. K., Zhou, J. e Keasling, J. D. (2007). **Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough**. J. Bacteriol. 189, 5996-6010.
- Myers, L. L., Firehammer, B. D., Shoop, D. S. e Border, M. M. (1984). ***Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs**. Infect. Immun. 44, 241-244.
- Nagel, G., Lahrz, A. e Dersch, P. (2001). **Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family**. Mol. Microbiol. 41, 1249-1269.
- Ndamukong, I. C., Gee, J. e Smith, C. J. (2013). **The extracytoplasmic function sigma factor EcfO protects *Bacteroides fragilis* against oxidative stress**. J. Bacteriol. 195, 145-155.

- Oh, S. Y., Shin, J. H. e Roe, J. H. (2007). **Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxide in *Streptomyces coelicolor***. J. Bacteriol. 189, 6284-6292.
- Olsen, I. e Shah, H.N. (2008). **International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods**. Int. J. System. Evol. Microbiol. 58, 1051-1055.
- Oz, T., Guvenek, A., Yildiz, S., Karaboga, E., Tamer, Y. T., Mumcuyan, N., Ozan, V. B., Senturk, G. H., Cokol, M., Yeh, P. e Toprak, E. (2014). **Strenght of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution**. Mol. Biol. Evol. 31, 2387-2401.
- Patrick, S., Lutton, D. A. e Crockard, A.D. (1995). **Immune reactions of *Bacteroides fragilis* populations with three different types of capsule in a model of infection**. Microbiol. 141, 1969-1976.
- Pauer, H., Cavalcanti, S. N., Teixeira, F. L., Santos-Filho, J., Vommaro, R. C., Oliveira, A. C., Ferreira, E. O. e Domingues, R. R. (2013). **Inactivation of a fibronectin-binding TonB-dependent protein adhesion properties of *Bacteroides fragilis***. J. Med. Microbiol. 62, 1524-30.
- Perera, I. C. e Grove, A., (2010). **Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR Family transcriptional regulators**. J. Mol. Cell Biol. 2, 243-254.
- Pérez-Rueda, E. e Collado-Vides, J. (2000). **The repertoire of DNA binding in transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12**. Nucleic Acids Res. 28, 1838-1847.
- Pérez-Rueda, E. e Collado-Vides, J. (2001). **Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria**. J. Mol. Evol. 53, 172-179.
- Poxton, I. R. e Edmond, D. M. (1995). **Biological activity of *Bacteroides* lipopolysaccharidereappraisal**. Clin. Infect. Dis. 20, 149-153.
- Prindiville, T. P., Sheikh, R. A. e Cohen, S. H. (2000). ***Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease**. Emerg. Infec. Dia. 6, 171-174.
- Pumbwe, L., Skillbeck, C. A. e Wexler, H. M. (2006). **The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach-or all three?** Anaerobe 12, 211-220.
- Pumbwe, L., Wareham, D. W., Aduse-Opoku, L., Brazier, J. S. e Wexler, H. M. (2007). **Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis***. Clinical Microbiology and Infection 13, 183-189.
- Reott, M. A., Parker, A. C., Rocha, E. R. e Smith, C. J. (2009). **Thioredoxins in redox maintenance and survival during oxidative stress of *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol. 191, 3384-3391.
- Revell, P. A. e Miller, V. L. (2000). **A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence**. Mol. Microbiol. 35, 677-685.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. e Nasser, W. (2002). **Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity**. J. Bacteriol. 184, 654-665.
- Rhee, S., Martin, R. G., Rosner, J. L. e Davies, D. R. (1998). **Anovel DNA-binding mitf in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 10413-10418.
- Rocha, E. R. e Smith, C. J. (1995). **Biochemical and genetic analyses of catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol. 177, 3111-3119.
- Rocha, E. R., Selby, T., Coleman, J. P. e Smith, C. J. (1996). **Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide**. J. Bacteriol. 178, 6895-6903.

- Rocha, E. R. e Smith, C. J. (1997). **Regulation of *Bacteroides fragilis* katB mRNA by oxidative stress and carbon limitation.** J. Bacteriol. 179, 7033-7039.
- Rocha, E. R. e Smith, C. J. (1998). **Characterization of a peroxide resistant mutant of the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 180, 5906-5912.
- Rocha, E. R. e Smith, C. J. (1999). **Role of the alkyl hydro-peroxide reductase (*ahpCF*) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 181, 5701-5710.
- Rocha, E. R., Owens, G., Jre Smith, C. J. (2000). **The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 182, 5059-5069.
- Rocha, E. R., Herren, C. D., Smalley, D. J. e Smith, C. J. (2003). **The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression.** Anaerobe 9, 165-173.
- Rocha, E. R. e Smith, C. J. (2004). **Transcriptional regulation of the *Bacteroides fragilis* ferritin gene (*ftnA*) by redox stress.** Microbiology 150, 2125-2134.
- Rocha, E. R., Tzianabos, A. O. e Smith, C. J. (2007). **Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 189, 8015-8023.
- Rüberg, S., Pühler, A. e Becker, A. (1999). **Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR.** Microbiology 145, 603-611.
- Ruiz, C. e Levy, S. B. (2010). **Many chromosomal genes modulate MarA-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli*.** Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2125-2134.
- Runggrassamee, W., Ryan, K. C., Maroney, M. J. e Pomposiello, P. J. (2009). **The PqrR transcriptional repressor of *Pseudomonas aeruginosa* transduces redox signals via an iron-containing prosthetic group.** J. Bacteriol. 191, 6709-6721.
- Russell, D. A., Byrne, G. A., O'Connell, E. P., Boland, C. A. e Meijer, W. G. (2004). **The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701.** J. Bacteriol. 186, 5576-5584.
- Sakamoto M. e Benno Y. (2006). **Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. Nov., *Parabacteroides goldsteinii*. comb. Nov. and *Parabacteroides merdae* comb. Nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1599-605.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**, Volume 2. 2nd ed. (Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schaumann, R., Petzold, S., Fille, M. e Rodloff, A. C. (2005). **Inducible metronidazole resistance in *nim*-positive and *nim*-negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing Columbia agar plates.** Infection 33, 368-372.
- Schell, M. A. (1993). **Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators.** Ann. Rev. Microbiol. 47, 597-626.
- Sears, C. L., Islam, S. e Saha, A. (2008). **Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea.** Clin. Infect. Dis. 47, 797-803.
- Sears, C. L. (2009). **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes.** Clin. Microbiol. Rev. 22, 349-369.
- Seaver, L. C. e Imlay, J. A. (2001). **Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 183, 7182-7189.

- Seib, K. L., Wu, H. J., Srikhanta, Y. N., Edwards, J. L., Falsetta, M. L., Hamilton, A. J., Maguire, T. L., Grimmond, S. M., Apicella, M. A., McEwan, A. G. e Jennings, M. P. (2007). **Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae***. *Mol Microbiol.* 63, 54-68.
- Shah, H. N. e Collins, M. D. (1989). **Proposal to Restrict the Genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and Closely Related Species**. In *J of Sistemat Bacteriol* 39, 85-87.
- Shah, H.N. (1992). **The genus *Bacteroides fragilis* and related species**. In: **The procaryotes**. Balows A., Truper HG., Dworkin M., Harder W., Scheleifer KH. 2nd Ed. SpringerVerlag, New York. 3593-3607.
- Sonnenburg, J. L., Angenent, L. T. e Gordon, J. I. (2004). **Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine?** *Nat. Immunol.* 5, 569-573.
- Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D. S., Renault, P., Martin-Verstraete, I. e Gue'don, E. (2007). **Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans***. *J. Bacteriol.* 189, 7032-7044.
- Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M. M., Neumann, P., Wilkison, A. J., Brzozowski, A. M., Verma, C. S., Zaim, J., Wysochi, S. e Bujacz, G. D. (2006). **Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator**. *J. Mol. Biol.* 364, 309-322.
- Steffens, L., Nicholson, S., Paul, L., Nord, C., Patrick, S. e Abratt, V. (2010). ***Bacteroides fragilis* RecA protein overexpression causes resistance to metronidazole**. *Research in microbiology* 161, 346-354.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., e Ames, B. M. (1990). **Transcriptional regulator of oxidative stress inducible genes: direct activation by oxidation**. *Science* 248, 189-194.
- Sukchawalit, R., Loprasert, S., Atichartpongkul, S. e Mongkolsuk, S. (2001). **Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (*ohr*) from *Xanthomonas* involves OhrR, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modifications**. *J. Bacteriol.* 183, 4405-4412.
- Sund, C. J., Wells, W. G. e Smith, C. J. (2006). **The *Bacteroides fragilis* P20 scavengase homolog is important in the oxidative stress response but is not controlled by OxyR**. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 211-217.
- Sund, C. J., Rocha, E. R., Tzianabos, A. O., Wells, W. G., Gee, J. M., Reott, M. A., O'rourke, D. P. e Smith, C. J. (2008). **The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence**. *Mol. Microbiol.* 67, 129-142.
- Tao, K., Makino, K., Yonei, S., Nakata, A. e Shinagawa, H. (1991). **Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon**. *J. Biochem.* 109, 262-266.
- Tao, K., Zou, C., Fujita, N. e Ishihama, A. (1995). **Mapping of the OxyR protein contact site in the C-terminal region of RNA polymerase subunit**. *J. Bacteriol.* 177, 6740-6744.
- Tao, K. (1999). **In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli***. *FEBS Lett.* 457, 90-92.
- Tartaglia, L. A., Gimeno, C. J., Storz, G. e Ames, B. N. (1992). **Multidegenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator**. *J. Biol. Chem.* 267, 2038-2045.
- Teixeira, F. L. (2012). **Caracterização do regulador transcricional BmoR, membro da família MarR, em *Bacteroides fragilis***. Projeto (Doutorado em Microbiologia e Imunologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 36f.
- Teixeira, F. L., Silva, D. N., Pauer, H., Ferreira, L. Q., Ferreira, E de O., Domingues, R. M. e Lobo, L. A. (2013). **The role of BmoR, a MarR Family regulator, in the survival of *Bacteroides fragilis* during oxidative stress**. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 443-448.

- Teixeira, F. L. (2016). **Regulação gênica na resposta ao estresse oxidativo de *Bacteroides fragilis***. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 123f.
- Teixeira, F. L., Domingues, R. M. C. P. e Lobo, L. A. (2016). **Regulation of oxidative stress-related genes implicated in the establishment of opportunistic infections by *Bacteroides fragilis***. In: Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria. (Hoboken: Wiley-Blackwell), *in press*.
- Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D. e Storz, G. (1994). **Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection.** *Cell* 78, 897–909.
- Toprak, N. U., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T., Soyletir, G. (2006). **A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer.** *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 782-786.
- Troy, E. B., Carey, V. J., Kasper, D. L. e Comstock, L. E. (2010). **Orientation of the *Bacteroides fragilis* Capsular Polysaccharide Biosynthesis Locus Promoter During Symbiosis and Infection.** *J. of Bacteriology* 192, 5832-5836.
- Tzianabos, A. O., Onderdonk A. B., B. Rosner, R. L. C. e Kasper D. L. (1993). **Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses.** *Science* 262, 416–419.
- Tzianabos, A. O., Russell, P. R., Onderdonk, A.B., Gibson, F.C., 3rd, Cymes, C., Chan, M., Finberg, R. W. e Kasper, D. L. (1999). **IL-2 mediates protection against abscess formation in an experimental model of sepsis.** *J. Immunol.* 163, 893-897.
- Tzianabos, A. O. e Kasper, D. L. (2002). **Role of T cells in abscess formation.** *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 92-96.
- Ueda, O., Wexler, H. M., Hirai, K., Shibata, Y., Yoshimura, F. e Fujimura, S. (2005). **Sixteen homologs of the mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2807-2815.
- Veeranagouda, Y., Husain, F., Boente. R., Moore, J., Smith, C. J., Rocha, E. R., Patrick, S. e Wexler, H. M. (2014). **Deficiency of the ferrous iron transporter FeoAB is linked with metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis*.** *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2634-2643.
- Vermelho, A. B., Bastos, M. F., DeSá, M. H. B. (2008). **Bacteriologia Geral**, Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara Koogan 46-47.
- Vinué, L., Mcmurry, L. M. e Levy, S. B. (2013). **The 216 bp *marB* gene of the *marRAB* operon in *Escherichia coli* encodes a periplasmatic protein which reduces the transcription of *marA*.** *FEMS Microbiol.Lett.* 345, 49-55.
- Wang, X., Mukhopadhyay, P., Wood, M. J., Outten, F. W., Opdyke, J. A. e Storz, G. (2006). **Mutational analysis to define an activating region on the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR.** *J. Bacteriol.* 188, 8335-8342.
- Weintraub, A., Larsson, B. E. e Lindberg, A. A. (1985). **Chemical and Immunochemical Analyses of *Bacteroides fragilis* Lipopolisaccharides.** *Infect. Immun.* 49, 197-201.
- Wexler, H.M. (2007). ***Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty.** *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593-621.
- Wilkinson, S. P. e Grove, A. (2006). **Ligand-responsive transcriptional Regulation by members of the MarR family of winged helix proteins.** *Curr. Issues Mol. Biol.* 8, 51-62.
- Willis, A. (1991). **Abdominal sepsis.** In: **Anaerobes in Human Diseases**, 197-223. Edited by B. I. Duerden & Drasar. B. S., Edward Arnold.

Willmann, M., El-Hadidi, M., Huson, D. H., Schutz, M., Weidenmaier, C., Autenrieth, I. B. e Peter, S. (2015). **Antibiotic selection pressure determination through sequence-based metagenomics.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7335-7345.

Yin, L., Wang, L., Lu, H., Xu, G., Chen, H., Zhan, H., Tian, B. e Hua, Y. (2010). **DRA0336, another OxyR homolog, involved in the antioxidation mechanisms in *Deinococcus radiodurans*.** *J. Microbiol.* 48, 473-479.

Zaim, J. e Kierzek, A. M. (2003). **The structure of full-length LysRtype transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer.** *Nucleic Acids Res.* 31, 1444–1454.

Zeller, T., Mraheill, M. A., Moskvina, O. V., Li, K., Gomelsky, M. e Klug, G. (2007). **Regulation of hydrogen peroxide-dependent gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*: regulatory functions of OxyR.** *J. Bacteriol.* 189, 3784 –3792.

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. e Storz, G. (1998). **The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein.** *EMBO J.* 17, 6061– 6068.

Zheng, M., Aslund, F. e Storz, G. (1998). **Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.** *Science* 279, 1718 –1721.