

ASPETOS IMUNOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM LINHAGENS DE *BACTEROIDES FRAGILIS* SELECIONADAS EM CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE DROGAS ANTIMICROBIANAS

Mariana Silva Lopes Neves *
Michele Cristine Ribeiro de Freitas **
Ana Paula Ferreira ***
Jacy Gameiro ***
Cíntia Marques Coelho ****
Vânia Lúcia da Silva **
Cláudio Galuppo Diniz ***

RESUMO

Bacteroides fragilis é um anaeróbio Gram-negativo, membro da microbiota intestinal residente. Uma característica importante da sua biologia, não diretamente relacionada com a produção de doenças infecciosas, mas relacionada com a sua persistência, é o aumento da resistência aos antimicrobianos. Várias evidências mostram que os antimicrobianos podem interferir com a expressão de determinantes de virulência microbiana. Nosso objetivo foi investigar a interferência de antimicrobianos na patogenicidade de *B. fragilis* em camundongos BALB/c, após desafio experimental. Trinta animais foram desafiados intraperitonealmente com *B. fragilis* ATCC 25285 (parental) e quatro linhagens derivadas selecionados pela exposição a concentrações subinibitórias de ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam (AMS), clindamicina (CLI) e cloranfenicol (CLO). Os camundongos foram necropsiados, os níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ foram determinados por ELISA em seu intestino delgado e a histologia foi realizada, para avaliar o baço e fígado. Os camundongos inoculados com a linhagem *B. fragilis* AMS apresentaram um maior nível

* Bolsista PROBIC/FAPEMIG/UFJF.

** Doutoranda colaboradora da Universidade Federal de Juiz de Fora.

*** Professores colaboradores da Universidade Federal de Juiz de Fora.

**** Professor orientador do Instituto de Ciências Biológicas - UFJF.

Endereço Profissional do Professor Orientador:

Prof. Cláudio Galuppo Diniz. Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Campus Universitário, s/n – Bairro São Pedro Telefone: 2102-3213 – Fax: 2102-3213
Email: claudio.diniz@ufjf.edu.br

de TNF- α , IL-6 e IFN- γ quando comparados com os outros sete dias pós-infecção (pi), bem como os animais desafiados com a linhagem AMP, considerando os níveis de IL-6. No entanto, estes níveis de citocinas mostraram-se diminuídos após quatorze dias pi. Animais desafiados com as linhagens CLI e CLO não apresentaram níveis significativos de liberação de citocinas no intestino delgado. Alterações histológicas foram observadas no baço e no fígado dos animais desafiados com as diferentes linhagens bacterianas. Estes dados preliminares sugerem que, uma vez que estas drogas têm diferentes interações com a célula bacteriana, *B. fragilis* pode apresentar diferentes interações patógeno-hospedeiro, em resposta ao uso de antimicrobianos. Uma vez que essas interações podem ser prejudiciais para os hospedeiros, como observado através do aumento da liberação de mediadores inflamatórios, os resultados chamam a atenção para o risco de terapia inadequada. Mesmo em baixas concentrações, os antimicrobianos podem interferir com a patogenicidade de *Bacteroides* spp.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, alterações morfológicas, concentrações subinibitórias, citocinas.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias anaeróbias representam um grupo ecologicamente significativo da microbiota residente de seres humanos e outros animais. No trato gastrointestinal, estes microrganismos chegam a atingir, especialmente no cólon, a proporção de mil anaeróbios para cada aeróbio (FINEGOLD, 1995). Entre estes microrganismos, espécies do gênero *Bacteroides* são importantes constituintes da microbiota residente, e podem colonizar outros locais do corpo, como a superfície de mucosas (SALYERS, 1984; WEXLER, 2007). Algumas espécies do gênero *Bacteroides* se comportam como patógenos oportunistas, tais como a espécie *Bacteroides fragilis* (SALYERS, 1984).

B. fragilis é o anaeróbio mais encontrado em isolados de infecções do trato gastrointestinal humano, sendo capaz de colonizar outros sítios anatômicos, como a cavidade abdominal, cérebro, fígado, pulmões ou corrente sanguínea, podendo causar a formação de abscessos (PUMBWE et. al., 2007). Em contrapartida, o tratamento para as infecções causadas por este patógeno é dificultado devido a crescente resistência de *B. fragilis* a uma grande variedade de antimicrobianos (SALYERS, 1984; ULGER et. al., 2004), tais como os β -lactâmicos, clindamicina, metronidazol e cloranfenicol, que são amplamente utilizados para o tratamento de infecções causadas por microrganismos anaeróbios (RASMUSSEM et. al., 1997).

Drogas antimicrobianas podem interferir na microbiota residente quando são usadas de forma inadequada ou quando são incompletamente absorvidas. Estas substâncias podem induzir alterações na microbiota, selecionando organismos resistentes ou provocando outros tipos de alterações que podem interferir na relação droga-bactéria-hospedeiro. Bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, quando expostas a concentrações subinibitórias de antimicrobianos, podem apresentar alterações morfológicas, resultando em células mais alongadas e filamentosas. Além disso, outros aspectos também podem ser observados, como mudanças ultraestruturais e alterações na capacidade de adesão (SILVESTRO et. al., 2006).

Alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes da exposição a baixas ou altas concentrações de antimicrobianos tem sido observadas e descritas como indicativo de modificação nas propriedades

celulares frente a uma pressão seletiva, acarretando alterações no padrão de virulência dos microrganismos e sua relação com o sistema imunológico do hospedeiro (DINIZ et. al, 2000).

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar aspectos da relação droga-bactéria-hospedeiro, mediante desafio experimental em camundongos infectados com linhagens de *B. fragilis*, selecionadas após exposição a concentrações subinibitórias de ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol.

2. METODOLOGIA

2.1. AMOSTRA BACTERIANA E OBTENÇÃO DAS LINHAGENS EM CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DAS DROGAS:

Foi utilizada a amostra de referência *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, considerada como amostra parental (BfPAR), pertencente à coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A partir da exposição da amostra parental às concentrações subinibitórias das drogas ampicilina, ampicilina/sulbactam, clindamicina e cloranfenicol, foram obtidas as seguintes linhagens: BfAMP (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µg/mL), BfAMS (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µl/mL), BfCLI (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µl/mL) e BfCLO (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µl/mL), respectivamente.

As linhagens foram cultivadas em meio de cultura Brain Heart Infusion ágar (BHIIa) ou caldo (BHIIc) suplementado com L-cisteína, extrato de levedura, hemina e menadiona. Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração subinibitória mínima (CSI), foi utilizado o método de diluição em caldo, de acordo com o CLSI (2007).

Após a determinação da CSI, a linhagem BfPAR e as demais BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO foram submetidas a cultivos sucessivos em Caldo Brucela (BRUC), por 10 passagens na presença e na ausência dos antimicrobianos, em intervalos de 24 horas. A cada novo cultivo, foram feitos esfregaços para coloração pelo método de Gram e teste respiratório das culturas, para avaliação da pureza das mesmas. O teste respiratório consistia em cultivo das linhagens em placas de BHIIa em condições de anaerobiose e aerobiose para a detecção de possíveis colônias contaminantes.

Durante todos os experimentos, as linhagens bacterianas foram cultivadas em condições de anaerobiose mecânica, utilizando o método físico da jarra com atmosfera controlada (N₂ 90% e CO₂ 10%), a 37° C, em estufa bacteriológica.

2.2. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA:

Durante os 10 subcultivos na presença e na ausência dos antimicrobianos, foram realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram, e a observação foi feita em microscópio óptico, em aumento de 1000X, com posterior registro fotográfico de cada linhagem, inclusive da linhagem BfPAR.

Os registros fotográficos realizados após a coloração de Gram foram utilizados para o cálculo da área média das células bacterianas, em micrômetros quadrados (µ²), utilizando o *software Image Tool*. Foram medidas, em média, 30 células por campo microscópico.

A morfologia e a complexidade celular foram avaliadas também pelo método de citometria de fluxo. Suspensões bacterianas (700 µL) das 10 passagens na presença e na ausência de antimicrobianos,

correspondentes à 0,5 da escala McFarland em solução salina (NaCl 0,85%), após cultivo em BRUC, foram avaliadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson), utilizando-se os parâmetros FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*), para avaliação da percentagem de células alteradas e alteração na complexidade celular, de acordo com Andrade (2010).

2.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CAMUNDONGOS:

Camundongos BALB/c, machos, com 75 dias de idade, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram distribuídos em grupos experimentais, mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, onde foram alojados em gaiolas plásticas, em estantes ventiladas à temperatura ambiente, recebendo água filtrada e ração *ad libitum* por até 14 dias. Todo o experimento foi conduzido de acordo com Andrade (2002).

Os animais foram divididos em 6 grupos, infectados com: BfPAR (n=4), BfAMP (n=6), BfAMS (n=6), BfCLI (n=6), BfCLO (n=6) e um grupo controle, que recebeu somente o meio de cultura utilizado para a manutenção das linhagens acima (BH1c). A infecção experimental foi realizada intraperitonealmente com 200µL de suspensão bacteriana, relativa a uma cultura de 24 horas (aproximadamente 10⁸ células/mL). O grupo controle recebeu 200µL de BH1c.

Cinquenta por cento dos animais de cada grupo foram sacrificados e necropsiados no 7º e no 14º dia pós-infecção (pi). Os animais foram sacrificados para a excisão de órgãos como fígado e baço, posteriormente fixados em formalina (solução de formal a 10%), para análise histopatológica, enquanto o intestino e os linfonodos mesentéricos foram coletados separadamente para análise das citocinas pró-inflamatórias.

2.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO BAÇO E FÍGADO DOS CAMUNDONGOS:

Os órgãos foram desidratados em soluções alcoólicas de diferentes concentrações e foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de aproximadamente 4 µm foram obtidos em micrótomo (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemanha) para montagem de lâminas de microscopia, que foram então coradas com hematoxilina-eosina, para posterior análise microscópica. A análise das lâminas sem identificação dos tecidos foi feita pela professora Dra. Denise Carmona Cara, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foi atribuído um código para qualificar ausência de lesões, lesões discretas, moderadas e intensas nos cortes histológicos avaliados. Os parâmetros avaliados foram: (i) no fígado - degeneração hepática, comprometimento da arquitetura do tecido, necrose e dilatação dos sinusoides; (ii) no baço – hipertrofia e hiperplasia das polpas branca e vermelha.

2.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO INTESTINO DOS CAMUNDONGOS:

O intestino de cada camundongo foi macerado separadamente com solução de extração (0,4 de NaCl, 10mM de NaPO₄, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM de cloreto benzetônio, 10 mM de EDTA, 20 pM de aprotina, 0,05% de PBS tween 20) até a completa diluição dos tecidos e, em seguida, o macerado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram separados para as dosagens de TNF, IFN-γ, IL-6, IL-10 e IL-17.

A dosagem de citocinas foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se kits comerciais específicos para dosagem IL-6, IL-10, TNF-, IFN-γ (BD Opteia TM, San Diego/CA, USA)

e para IL-17 (eBioscience, San Diego/CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das placas de ELISA foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. A quantidade da citocina foi calculada a partir da curva-padrão, obtida por diferentes concentrações da citocina recombinante.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi baseada nos testes de análise de variância (*One-way Anova*), para comparação das médias; no teste do *t* pareado, para comparação entre médias e no teste de Tukey, para comparação múltipla, para os quais foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software *GraphPad Prism 5*.

3. RESULTADOS

3.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA

Após a seleção das linhagens em concentrações subinibitórias BfAMP (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µg/mL), BfAMS (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µl/mL), BfCLI (linhagem selecionada em concentração subinibitória 2µl/mL) e BfCLO (linhagem selecionada em concentração subinibitória 1µl/mL) e os cultivos sucessivos por 10 passagens na presença e na ausência de antimicrobianos das mesmas, foram observadas alterações morfológicas e na complexidade celular.

Mediante exposição aos antimicrobianos, principalmente para a linhagem BfAMS, as células bacterianas se mostraram filamentosas, e também observou-se a presença de bulbos centrais, alterações na largura e citoplasma densamente corado. Para a linhagem BfAMP, a área celular média aumentou em aproximadamente 2 vezes. Já para a linhagem BfCLO, não foi observada qualquer alteração.

Com os cultivos sucessivos na presença dos antimicrobianos, as alterações observadas na primeira exposição regrediram, e as células passaram a se assemelhar com a amostra parental, gradativamente.

Em relação à complexidade celular, a linhagem que apresentou porcentagem mais significativa de células com alterações na forma e complexidade foi a BfAMS, com 22%. As outras linhagens apresentaram alterações pouco significativas: BfAMP 6%, BfCLO 4% e BfCLI 2% (valores aproximados) (Fig.1).

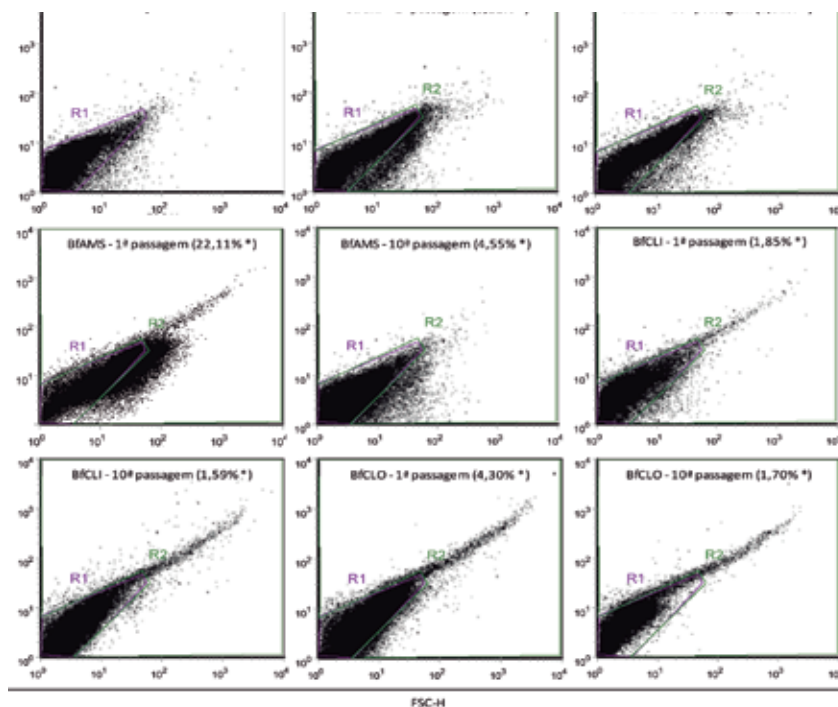


Figura 1. Representação gráfica do tipo *dot plot* da avaliação por citometria de fluxo das células de *Bacteroides fragilis* após a 1ª e a 10ª passagem das culturas na presença das CSI dos diferentes antimicrobianos. R1 - região de concentração das células de morfologia típica; R2 - região de concentração das células de morfologia alterada em relação ao controle Bf parental. FSC – eixo relacionado à alteração de morfologia; SSC – eixo relacionado à complexidade celular.

3.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Analisando o baço e o fígado dos camundongos desafiados com as diferentes linhagens bacterianas selecionadas em CSI dos antimicrobianos, foram observadas alterações em ambos os órgãos em todos os grupos do 7º dia pós-infecção (pi). Foram observadas lesões moderadas relacionadas a áreas de hiperplasia folicular linfóide, com centro germinativo, sugestivo de grande atividade imunológica, além de hipertrofia da polpa vermelha, no baço. Para o fígado, foi observado um quadro de degeneração hepática, com discreta desestruturação da arquitetura do órgão nos grupos controle e Bf parental, lesões moderadas no grupo BfCLI, lesões intensas nos grupos BfAMS e BfCLO, e nenhuma alteração aparente no grupo BfAMP.

No 14º dia pi, não foram observadas alterações significativas em relação ao observado no 7º dia pi para os dois órgãos na maioria dos grupos, exceto para a linhagem BfCLI, cuja lesão no baço se mostrou discreta neste momento, e para BfAMP, no qual somente no 14º dia pi foi observada lesão discreta do fígado, e grupos controle e Bf parental, nos quais não foi observada lesão aparente no mesmo órgão (Fig.2 e 3).

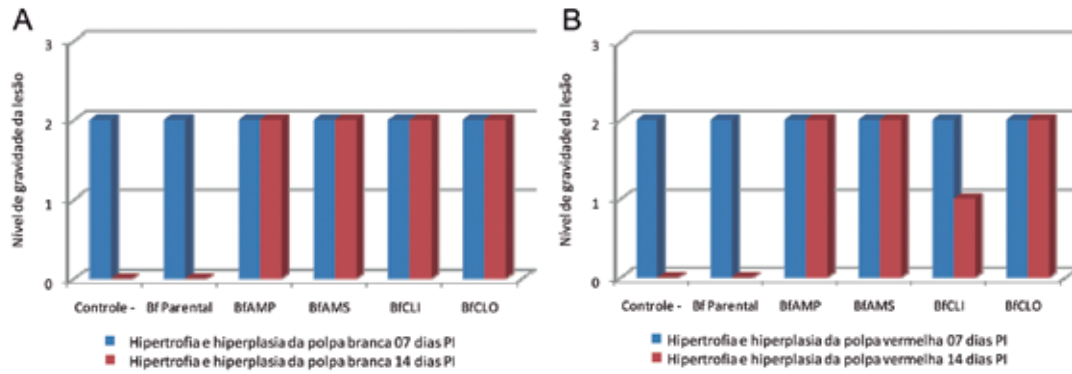


Figura 2- Representação gráfica da análise histopatológica do baço dos camundongos desafiados com as linhagens de BfPAR, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 – lesão moderada e 3 – lesão intensa. A: avaliação de polpa branca; B: avaliação de polpa vermelha.

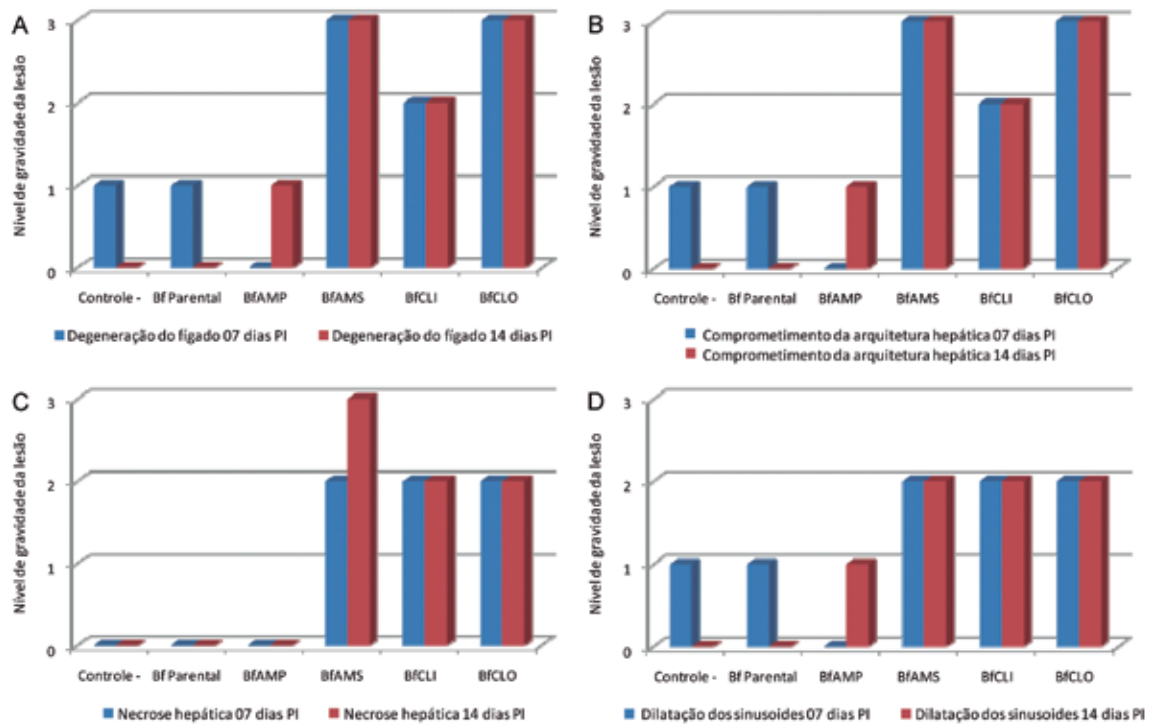


Figura 3- Representação gráfica da análise de parâmetros histológicos do fígado (A a D) dos camundongos desafiados com as linhagens de BfPAR, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO. 0 – lesão ausente, 1 – lesão discreta, 2 – lesão moderada e 3 – lesão intensa.

3.3. ANÁLISE DE CITOCINAS

Foi observada grande variação nos níveis das diversas citocinas quantificadas a partir do sobrenadante de macerado de intestino dos camundongos desafiados com as diferentes linhagens bacterianas selecionadas pela exposição a CSI dos antimicrobianos, como pode ser observado na Fig. 4.

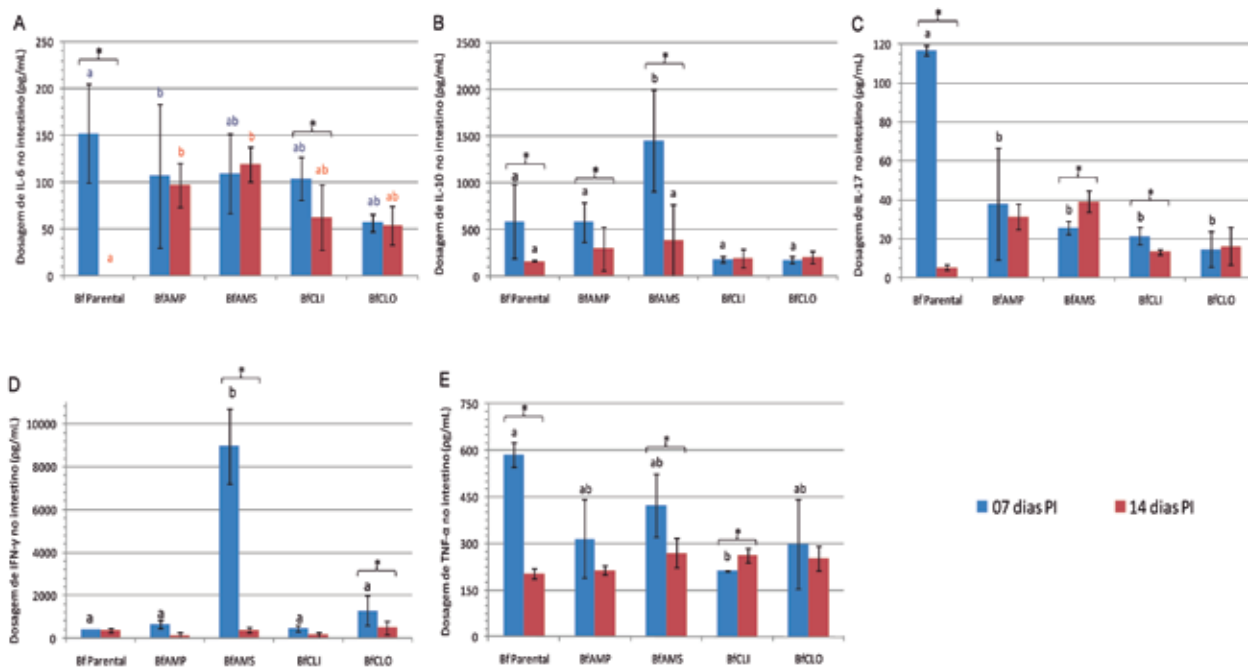


Figura 4 - Representação gráfica dos valores médios das dosagens de citocinas no sobrenadante dos intestinos dos camundongos desafiados intraperitonealmente com as linhagens de BfPAR, BfAMP, BfAMS, BfCLI e BfCLO após 7 ou 14 dias de infecção experimental. A: IL-6; B: IL-10; C: IL-17; D: IFN- γ ; E: TNF- α . *, **a** e **b** indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Bactérias do grupo *B. fragilis* são anaeróbios Gram-negativos que compõem grande parte da microbiota residente do cólon e algumas vezes do trato genital feminino, sendo também isolada de infecções intra-abdominais, podendo produzir bacteremias. Nos últimos anos, houve um aumento nas linhagens de *B. fragilis* relatadas pela literatura como resistentes a agentes antimicrobianos frequentemente usados para o tratamento de infecções intra-abdominais, sanguíneas e pélvicas (PAULA et. al., 2004).

Antimicrobianos podem induzir direta ou indiretamente alterações na síntese proteica, acarretando alongação de bacilos Gram-negativos, que passam algumas vezes, a assumir morfologia fusiforme. Além disso, a exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos desde β -lactâmicos a estreptomicina tem sido observada, provocando alterações na morfologia, nos perfis bioquímicos, na ultraestrutura e nas taxas de multiplicação em várias espécies bacterianas, incluindo alterações no número e localização dos ribossomos, alongação e alargamento celular, além de modificações no aspecto da parede celular. Todas estas alterações tem sérias consequências nos padrões de virulência, bem como na susceptibilidade às defesas imunológicas no hospedeiro (DINIZ et. al., 2000, SILVESTRO et. al., 2006).

Do exposto, no presente estudo a morfologia e a complexidade celular bacteriana foram avaliadas, bem como a resposta imunológica do hospedeiro frente a uma infecção causada por *B. fragilis* selecionada em concentrações subinibitórias de diferentes antimicrobianos, através da avaliação histopatológica *in vivo* do baço e do fígado de camundongos, e da quantificação das citocinas.

A filimentação observada neste estudo para as linhagens BfAMS e BfAMP já foi observada em outros estudos com a espécie *B. fragilis* exposta a outros antimicrobianos, como a cefoxitina (FANG et. al., 2002), clindamicina (SILVESTRO et. al., 2006) e metronidazol (DINIZ et. al., 2000).

Como observado pela análise morfológica, a linhagem BfAMS aumentou muitas vezes o seu volume celular, comparativamente à linhagem BfAMP, o que pode ter ocorrido devido ao sinergismo existente entre a ampicilina e o sulbactam.

Alterações morfológicas em células expostas a baixas concentrações de antimicrobianos podem levar ao diagnóstico errôneo na avaliação morfológica de materiais clínicos. As implicações clínicas da filimentação observada em bacilos Gram-negativos ainda necessitam ser melhor estudadas. Todavia, em laboratórios de análise microbiológica, os responsáveis devem estar atentos ao aparecimento de espécimes clínicos com aspecto filamentosos, para evitar confusão com outros organismos naturalmente filamentosos (WOJNICZ et. al., 2007).

Ainda no presente estudo, foi observada a capacidade de indução de alterações qualitativas e quantitativas de diferentes intensidades no hospedeiro, para todas as linhagens selecionadas em concentrações subinibitórias de antimicrobianos, como já observado na literatura para o metronidazol (DINIZ et. al., 2000). A presença das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α , relacionadas com a resposta inflamatória, evidencia a presença deste tipo de resposta nos órgãos analisados. Para os grupos BfAMP e BfAMS, onde foi observada a manutenção dos níveis de IL-6 e IL-17 no 14º dia pi, ao contrário do decréscimo observado para todos os outros grupos, sugere-se a manutenção do processo inflamatório e estímulo mediado por IL-6 e à produção de proteína de fase aguda nos hepatócitos, o que tem estreita relação com a lesão observada no órgão (HEINRICH, 1990).

Por sua vez, a citocina TNF- α tem importante papel na inflamação, induzindo a cascata inflamatória que resulta na produção de outros fatores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas destrutivas como a metaloproteinase e fatores angiogênicos (WILLIAMS et. al., 2008). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas entre níveis TNF- α entre os grupos, que somente se mostraram decrescentes para os grupos BfPAR e BfAMS no 14º dia pi, o que pode estar relacionado com o estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias IL-10, IL-6 e IL-8 e à produção de linfócitos, contribuindo para o processo inflamatório.

Principalmente para o grupo BfAMS, os níveis de IL-10 se mostraram elevados, sugerindo moderação da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados, visto que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e desempenha esta função para praticamente todos os tipos de doenças infecciosas e processos inflamatórios crônicos e agudos (O'SHEA & MURRAY, 2008). Para o mesmo grupo, os níveis de IFN- γ foram elevados no 7º dia pi, o que provavelmente está relacionado às funções de regulação do dano tecidual associado a inflamação que esta citocina exerce, e a lesão observada no grupo BfAMS (HU & IVASHKIV, 2009).

As lesões presentes no baço e no fígado e os níveis de citocinas observados indicam a interação diferencial bactéria-hospedeiro, ocasionada pelo aumento da virulência para as linhagens de *B. fragilis* selecionadas em concentrações subinibitórias de antimicrobianos, em comparação com o grupo BfPAR.

Dessa forma, sugere-se que esse fenômeno possa estar associado a alterações globais nos padrões de expressão gênica bacteriana, como resposta à exposição aos agentes antimicrobianos, e que o fenômeno da resistência bacteriana possa ter implicações na patogênese e na interação bactéria-hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Fisiologia e Genética Bacteriana da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde o trabalho foi realizado, à Dra. Denise Carmona Cara, do Departamento de Morfologia do

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela análise histopatológica, ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo suporte técnico, e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

**IMMUNOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL MICE
CHALLENGED WITH SELECTED STRAINS OF *BACTEROIDES FRAGILIS* IN SUBINHIBITORY
CONCENTRATIONS OF ANTIMICROBIAL DRUGS**

ABSTRACT

Bacteroides fragilis is an anaerobic Gram negative member of resident gut microbiota. An important feature of their biology not directly related to the production of infectious diseases, but related to their persistence, is the increased resistance to antimicrobial drugs. Several evidences show that antimicrobial may interfere with the expression of microbial virulence determinants. Our objectives were to investigate the interference of selected antimicrobials on the *B. fragilis* pathogenicity in BALB/c mice, after experimental challenge. Thirty animals were intraperitoneally infected with *B. fragilis* ATCC 25285 (parent wildtype) and four derived strains selected by exposure to subinhibitory concentrations of ampicillin (AMP), ampicillin/sulbactam (AMS), clindamycin (CLI) and chloramphenicol (CLO). The mice were necropsied, levels of TNF- α , IL-6 and IFN- γ were determined by ELISA in their small intestines and histology was performed to evaluate the spleen and liver of these animals. The mice challenged with the *B. fragilis* AMS strain showed an increased level of TNF- α , IL-6 and IFN- γ when compared to the others seven days post-infection (pi), as well as animals challenged with AMP strain, considering IL-6. However, these cytokines levels showed to be decreased, after fourteen days pi. Animals challenged with CLI and CLO strains did not show any significant levels of cytokine release in the small intestine. Histological alterations were observed at the spleen and at the liver from animals challenged with the different bacterial strains. These preliminary data may suggest that, once these drugs have different interactions with bacterial cell, *B. fragilis* may display different host-pathogen interactions in response to the use of antimicrobials. Since these interactions might be harmful to the hosts, as observed by increasing the release of inflammatory mediators, our results draw attention to the risk that inappropriate therapy, even with low concentrations of drugs, may affect the pathogenicity of *Bacteroides* spp.

Key words: *Bacteroides fragilis*, morphological changes, subinhibitory concentrations, cytokines.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro, 1ª edição, 388p, Ed. Fiocruz, 2002.

ANDRADE, J. P. **Efeito de concentração subinibitória de piperacilina-tazobactam na morfologia e fisiologia de *Escherichia coli*.** 2010, 127p. Dissertação (Mestrado – Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A7. 7th ed. Wayne, PA, EUA: **CLSI**.

DINIZ, C. G.; CARA, D.C; NICOLI, J.R; FARIAS, L.M; CARVALHO, M.A.R. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistance *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, EUA, v. 44, n. 9, p. 2419-2423, 2000.

FANG, H.; EDLUND, C.; HULTENBY, K.; HEDBERG, M. Effects of cefoxitin on the growth and morphology of *Bacteroides thetaiotaomicron* strains with different cefoxitin susceptibility. **Anaerobe**, Londres, Reino Unido, v. 8, n. 6, p. 55-61, 2002.

FINEGOLD, S.M. Anaerobic Infections in Humans: An Overview. **Anaerobe**, Londres, Reino Unido, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1995.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **The Biochemical Journal**, Londres, Reino Unido, v. 265, n. 3, p. 621-636, 1990.

HU, X.; IVASHKIV, L.B. Cross-regulation of signaling pathways by Interferon-g: implications for immune responses and autoimmune diseases. **Immunity**, Cambridge, Massachusetts, EUA, v. 31, n. 4, p. 539-550, 2009.

O'SHEA, J.J.; MURRAY, P.J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, Cambridge, Massachusetts, EUA, v. 28, n. 4, p. 477 – 487, 2008.

PAULA, G.R; FALCÃO, L.S; ANTUNES, E.N.F; AVELAR, K.E.S; REIS, F.N.A; MALUHY, M.A; FERREIRA, M.C.S ; DOMINGUES, R.M.C.P. Determinants of resistance in *Bacteroides fragilis* strains according to recent Brazilian profiles of antimicrobial susceptibility. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Londres, Reino Unido, v. 24, n. 1, p. 53–58, 2004.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J.; PIAZZA, R.M.F.; WEXLER, H.M. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. **Microbial Pathogenesis**, Marseille, França, v. 43, n. 2, p. 78-87, 2007.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K.; TALLY, F.P. Antimicrobial Resistance in Anaerobes. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, EUA, v. 24, n. 1, p. 110-120, 1997.

SALYERS, A.A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, Califórnia, EUA, v. 38, p. 293-313, 1984.

SILVESTRO, E.M.; NAKANO, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; MARQUES, M.V.; AVILA-CAMPOS M. J. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiology Letters**, Reading, Reino Unido, v. 257, n. 2, p.189 – 194, 2006.

ULGER, T.N.; CELIK, C.; CAKICI, O.; SOYLETIR, G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. **Anaerobe**, Londres, Reino Unido, v. 10, n. 5, p. 255-259, 2004.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, EUA, vol. 20, n. 4, p. 593–621. 2007.

WILLIAMS, L.M.; LALI, F.; WILLETS, K.; BALAGUE, C.; GODESSART, N.; BRENNAN, F.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B.M.J. Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF-kappaB. **Molecular Immunology**, Oxford, Reino Unido, v. 45, n. 9, p. 2446-2454, 2008.

WOJNICZ, D.; KLAK, M.; ADAMSKI, R.; JANKOWSKI, S. Influence of subinibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on morphology and adherence ability of uropathogenic strains. **Folia Microbiologica**, Praga, República Tcheca, v. 52, n. 4, p. 429-436, 2007.