



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Concurso Público para provimento efetivo de vagas no cargo de
Professor da Carreira de Magistério Superior

Edital UFRJ nº 54, de 30 de janeiro de 2024 (Consolidado com
seus editais de retificação) Versão inicial publicada no DOU em:
02/02/2024 | Edição: 24 | Seção: 3 | Página: 71 a 80, código
MC-055 – área Bacteriologia Médica, do Departamento de
Microbiologia Médica – Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes – CCS – UFRJ.

P R O V A E S C R I T A

CANDIDATO: 697399

1

Questão 1: métodos fenotípicos e moleculares aplicados a identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas (tema 3)

A identificação e diagnóstico de bactérias patogênicas pode ser realizada através de diferentes abordagens. Classicamente são empregados métodos fenotípicos, como a visualização de estruturas, como por exemplo flagelos, morfologia (ex: esboço de bacilos) de coloração diferencial, como por exemplo a diferenciação através da coloração de Gram que evidencia alterações na estrutura da parede celular de peptidoglicano (mais espessa no caso das bactérias Gram positivas ou mais fina no caso de bactérias classificadas como Gram negativas). Aliado a essas abordagens, também são utilizados testes bioquímicos e funções enzimáticas, assim como o isolamento e cultivo em meios seletivos e diferenciais que permitem a identificação de determinados grupos de patógenos. Outra estratégia amplamente utilizada é a aplicação de imunodiagnósticos, que visam identificar antígenos específicos do patógeno, como por exemplo, antígenos da estrutura sacrociliar dos lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas; Antígeno H do flagelo e antígeno K do capsulo. Dentro da estratégia de imunodiagnóstico, também podem ser identificados anticorpos específicos para patógenos, como estratégia de diagnóstico e identificação. No entanto, com o advento de ferramentas moleculares, cada vez mais as mesmas são sendo empregadas no contexto de identificação, diagnóstico, ou mesmo epidemiologia. A identificação de genes específicos como fatores de virulência ou genes de resistência

o antimicrobianos através de técnicas como a técnica de PCR (Reação em cadeia do polímero) ou o sequenciamento de genomas completos, possível com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), constituem importantes estratégias moleculares de diagnóstico e epidemiologia.

No contexto epidemiológico, a identificação de patógenos de interesse de saúde pública tem sido feita pela caracterização de ~~tipos~~^{cepos} específicos com características patogênicas distintas. Quando empregadas técnicas de imunodiagnóstico, como por exemplo a serotipagem, são determinadas serotipos de ~~tipos~~ ^{cepos} para rastreio. Também são empregadas estratégias moleculares de genotipagem para identificar cepos de cepos de interesse com elevada importância epidemiológica. Por exemplo, o rastreio do cepo patogênico de Escherichia coli enterohemorrágica do serotipo O157:H7, causadora de diarreia sangüínea lenta, com potencial evolução para a complicação de síndrome hemolítico urêmica, é crucial para vigilância e prevenção da ocorrência de casos.

Nesse exemplo em especial, classicamente é empregada a serotipagem por meio da identificação do antígeno O e H, mas cada vez mais tem se utilizado técnicas moleculares de genotipagem ou PCR para identificação de seu gene do fator de virulência do toxina Shiga, os genes *stx1* e *stx2*, ou mesmo vem sendo empregado o sequenciamento completo de genoma.

No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos, o emprego de abordagens clássicas como métodos fenotípicos ainda apresentam bastante

Vantagens e são ainda amplamente utilizadas, principalmente por serem mais simples e baratas.

Conforme já citado, dentre das abordagens fenotípicas de identificação e diagnósticas, o exame microscópico de estruturas, morfologia e coloração diferencial são técnicas relativamente rápidas. A diferenciação através da coloração de Gram, principalmente, ainda apresenta grande valor clínico. No contexto de micobactérias, por exemplo, como a hanseníose, a observação de bacilos álcool ácidos resistentes (BAARs) em esfregaços de pele e biópsias de pele através do emprego da coloração de ~~de~~ Ziehl-Neelsen é ainda hoje um dos métodos mais utilizados para diagnóstico.

Ainda assim, dentre das abordagens fenotípicas a caracterização bioquímica é extremamente importante e em muitos casos diferenças específicas bioquímicas tem valor diferencial e diagnóstico. Por exemplo, para ser citado o teste de catalase para a diferenciação de cocos ^{Gram positivos} patogênicos, em que testes catalase positivo apontam para espécies do gênero *Staphylococcus*, enquanto espécimes catalase negativo sugerem *Streptococcus* ou *Enterococcus* spp. Dedicando-se, a identificação de fermentação de tipos diferentes de carboidratos é crucial para a identificação de diferentes tipos de enterobactérias. Dentre os testes bioquímicos, podem ser observada a atividade de determinadas enzimas; redução de compostos (como por exemplo o tiosulfato de ferro); produção de gás; fermentação de carboidratos; motilidade; utilização de O_2 ; dentre outros fatores. Usualmente a combinação de testes fenotípicos e bioquímicos tem valor diagnóstico importante.

Um fator importante para a realização de muitos fenotípicos é o isolamento e cultivo do agente patogênico, dessa forma apresentando como uma limitação em casos de patógenos não cultiváveis in vitro como o caso do *Mycobacterium tuberculosis* ~~tuberculosis~~ lipae. O próprio cultivo com a utilização de meios seletivos e diferenciais também ~~tem~~ é amplamente utilizado dentro de estratégias de diagnóstico e identificação. Meios seletivos permitem inibir o crescimento de determinados grupos, favorecendo outros, enquanto meios diferenciais apresentam indicadores que permitem diferenciação de determinados grupos. Um exemplo de meio seletivo e diferencial muito empregado no contexto de diferenciação de enterobactérias seria o ~~meio~~ meio MacConkey, utilizado como estratégia de enriquecimento de enterobactérias gram negativas e diferenciação do perfil de fermentação de lactose. Esse meio apresenta sais biliares e cristais violeta que inibem o crescimento de bactérias gram positivas e também apresenta indicador de pH ~~para~~ alteração da coloração plasmática quando ocorre fermentação de lactose (por exemplo no caso de *E. coli*), enquanto patógenos não fermentadores de lactose, como *Salmonella* spp. apresentarão colônias brancas.

Conforme comentado, muitos desses elementos podem ser conjugados para permitir a identificação dos patógenos, é o exemplo do meio TSI (Triple sugar iron) que conjugue a observação da fermentação de açúcares como glicose, lactose e sacarose; redução do ferro e produção de gás.

Dentro das abordagens fenotípicas, também pode ser realizado o rastreamento de resistência à antimicrobianos através de estratégias como MIC (concentração inibitória mínima), teste de difusão em disco e E-teste, que apresentam elevada importância clínica e epidemiológica para rastreamento de cepas resistentes.

Abordagens de imunodiagnóstico também são amplamente utilizadas devido ao baixo custo e rapidez dos métodos. Conforme já citado, as abordagens de imunodiagnóstico podem envolver a busca por anticorpos anti-patógenos específicos ou mesmo busca por estruturas antigênicas características de cada patógeno. Podem ser empregados métodos como ELISA, imunoensaio enzimático (EIA), imunofluorescência, ensaios de neutralização e aglutinação. Uma grande vantagem dessa abordagem é que pode ser aplicada diretamente em amostras clínicas, sem necessidade de isolamento e cultivo, sendo muito útil no caso de patógenos não cultiváveis in vitro ou mesmo no caso de organismos fastidious e crescimento lento, cujo isolamento e cultivo é mais demorado. As abordagens de imunodiagnóstico também apresentam grande uso dentro do contexto epidemiológico, sendo ainda amplamente utilizadas para identificação de cepas de importância epidemiológica.

Dentro das abordagens moleculares, pode se destacar ~~as~~ estratégias de tipagem molecular, que são amplamente utilizadas dentro do contexto epidemiológico por permitir avaliar alterações interspecíficas e identificação de cepas patogênicas e de grande

relevância médica. Dentre as estratégias de tipagem molecular, as mais utilizadas incluem 1) sequenciamento de unidade membranar, que sequencia o rRNA 16S, avaliando as diferenças entre espécies e dando ao método de subtyping que avalia padrões de bandas diferentes entre isolados em gel de agarose após digestão do genoma, permite identificar diferenças de cepas; 2) a técnica de RFLP (restriction ~~length~~ fragment length polymorphism) que também digere o genoma com enzimas de restrição e avalia o padrão de bandas em gel de agarose; podendo incluir algumas variações como a AFLP, que utiliza ^{uma} enzima de corte raro e outra mais abundante; ou mesmo o PCR-RFLP, que ~~clona~~ o perfil de bandas de um gene previamente amplificado e submetido à digestão; 3) PFGE (pulse field gel electrophoresis), eletroforese em gel de campo pulsado, em que o genoma é digerido com uma enzima de restrição de corte raro e submetido a um campo elétrico pulsado para observação dos padrões de bandas; 4) MLVA (multiple loci variation analysis), que se baseia na observação de regiões ~~repet~~ repetitivas no genoma como regiões microsatélites com VNTRs; algumas variações são empregadas para patógenos específicos, como o caso do spoligotyping para *Mycobacterium tuberculosis*; e 5) MST (multiple loci sequence typing), em que 7 a 8 genes endógenos são amplificados por PCR e sequenciados, gerando um perfil molecular. Muitas dessas estratégias são utilizadas no contexto epidemiológico, com destaque para o MST e PFGE, em última

7

Questões 1

inclusive contando com base de dados como o PULSENET para vigilância epidemiológica.

Outras estratégias moleculares inclui a técnica de FISH (fluorescence in situ hybridization), que utiliza sondas fluorescentes para identificação do material genético do patógeno diretamente em amostras clínicas ou a técnica amplamente utilizada nos dias atuais, o PCR, que permite identificar a espécie do patógeno através da detecção de genes específicos do mesmo; se mesmo alguns determinantes importantes, como determinadores genes de virulência. Essa técnica tem sido amplamente empregada, inclusive no contexto epidemiológico, principalmente quando multiplexada, permitindo identificar mais de um alvo. No entanto, ela requer um conhecimento prévio do alvo a ser buscado, não sendo em casos mais desafiadores e sem indicativos; principalmente no contexto epidemiológico; cada vez mais o emprego de sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido fundamental para identificação e diagnóstico de patógenos. Os associados com NGS podem incluir a técnica de cgMLST (congenome MLST), que amplia o conceito do MLST para a identificação e sequenciamento de centenas a milhares de genes endógenos, sendo cada vez mais utilizados no contexto epidemiológico; também pode ser realizado o sequenciamento completo do genoma, que apresenta a grande vantagem de identificar juntamente importantes elementos como genes de virulência e elementos genéticos móveis. Além disso, com os avanços dos elementos de NGS e de

Análise bioinformática, a metodologia de metagenômica e metatranscriptômica, que permitem sequenciar o total conteúdo de DNA e RNA, respectivamente, diretamente da amostra, sem a necessidade de isolamento, posteriormente por análise bioinformática sendo possível identificar os diferentes grupos taxonômicos, genes de importância, entre outros, tendo cada vez mais sido empregada no contexto epidemiológico e mesmo clínico. A grande vantagem envolve a não necessidade de um direcionamento prévio para um alvo específico. No entanto, ainda é uma tecnologia relativamente cara e requer um maquinário específico e treinamento, limitando sua ampla utilização.

Dentre as abordagens ditas ômicas, como transcriptômica, proteômica, metabolômica também vem sendo empregadas para identificar marcadores diagnósticos e biomarcadores no contexto de interação patógeno-hospedeiro, em abordagens de diagnóstico utilizadas para as alterações no hospedeiro. Dentro do contexto epidemiológico, o olhar para o hospedeiro também tem um papel relevante. No entanto, o uso de espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF também vem sendo utilizado para diagnóstico direto do patógeno, através de diferenças estruturais no espectro de massas, no entanto necessitando de um banco de dados de referência.

Dessa forma, é possível compreender que a escolha de ~~as diferentes~~ abordagens, tanto fenotípicas como moleculares, aplicadas ao diagnóstico, identificação e epidemiologia depende de muitos fatores.

que engloba desde o custo; ao tempo e precisão de rapidez da identificação; a disponibilidade do método; maquinário e pessoal treinado para aplicação de determinado método, mas principalmente ~~isto~~ ^{relacionado} as diferentes exigências e características de cada patógeno. Patógenos não cultiváveis in vitro vão exigir métodos alternativos para identificação que não necessitem de isolamento e cultura, por exemplo. Assim como suspeitas de um patógeno específico pode direcionar para a aplicação de testes bioquímicos específicos.

Além disso, é importante ressaltar que mesmo com a grande tendência atual em aplicar cada vez mais estratégias moleculares, potencialmente cada vez mais empregando abordagens "ômicas", cada estratégia é complementar e informativa dentro do contexto ~~de~~ ^{do} não só clínico, como também epidemiológico.

Questão 2: Bactérias Gram-negativas de importância médica: caracterização fenotípica e molecular, patogenicidade e controle (tema 7)

Bactérias Gram negativas ~~se~~ englobam as bactérias que apresentam uma estrutura de peptidoglicano ~~mais~~ mais fina, com poucas lamadas, e além da membrana interna, apresentam uma lamada de membrana externa. Entre a membrana externa e o peptidoglicano se encontra o espaço periplasmático. As bactérias gram negativas incluem uma variedade de morfologia, como cocos, bacilos ou vibrios, por exemplo, e o principal grupo, ~~que~~ onde são encontradas a maioria dos patógenos e bactérias de importância médica, são o grupo das Proteobactérias.

Dentre as principais bactérias gram negativas de importância médica podemos encontrar ~~os~~ patógenos clássicos, como Escherichia coli ~~patógena~~, Salmonella enterica; Shigella spp.; Vibrio cholerae; Bordetella pertussis; Yersinia pestis; Fransisella tularensis & Bruella spp. Também são encontrados patógenos oportunistas, associados a infecções em indivíduos imunocomprometidos e infecções em ambiente hospitalar, que cada vez mais vêm ganhando importância devido à extensa resistência a antimicrobianos. Dentre esses, podem ser destacados: Klebsiella pneumoniae; Pseudomonas aeruginosa; Acinetobacter baumannii e bactérias do grupo Enterobacter spp. Esses incluem em compor o grupo atualmente conhecido como ESKA, que apresentam elevada relevância clínica pela extensa resistência antimicrobiana.

A caracterização fenotípica e molecular desses patógenos envolvem técnicas clássicas de microbiologia, coloração

e observação de estruturas, bem como estratégias fenotípicas de isolamento e cultivo aliada a testes bioquímicos. Por exemplo, a diferenciação de fermentação de diferentes lacticobactérias é muito utilizada para diferenciação entre enterobactérias, assim como a combinação de testes bioquímicos é amplamente utilizada para identificação e diagnóstico. Um exemplo é o emprego do agar TSI (Triple Sugar Iron) que com concentrações diferentes entre os açúcares glicose (1%), lactose (1%) e sacarose (1%) avalia a fermentação desses de forma diferencial uma vez que a fermentação de glicose ~~resulta~~ resulta na acidificação do meio apenas no fundo e aliada à presença de tiosulfato de sódio, observa a redução do mesmo à H_2S , evidenciada pelo aparecimento do borboim (por exemplo no caso de Salmonella spp., mas não Shigella spp.), assim como a produção no agar são indicadores de produção de gás. Além disso, alguns meios seletivos e diferenciais são empregados para a identificação específica de determinados patógenos, como por exemplo o agar SS (Salmonella-Shigella).

Alado aos métodos fenotípicos clássicos, o uso de imunodiagnóstico é amplamente utilizado principalmente para caracterização do antígeno O, do lipopolissacarídeo (LPS), estrutura específica e característica da parede de bactérias gram negativas assim como também de antígenos K da capsula e H do flagelo quando presentes.

Identificação do antígeno O também pode ser abordada ~~de~~ pelo viés molecular, por exemplo através do emprego da técnica de PCR. Outra estratégia

moleculares amplamente utilizados incluem a tipagem molecular através de métodos como PFGE e MLST, ou mesmo o emprego de sequenciamento de novo genótipo (NOS) em estratégias de cgMLST ou WGS (whole genome sequencing). O sequenciamento completo do genoma vem cada vez mais sendo crucial no contexto de estudos de genes de resistência, principalmente considerando os patógenos oportunistas citados anteriormente.

Por englobar um grande grupo de potenciais patógenos, diferentes mecanismos de patogenicidade são encontrados entre bactérias gram negativas, com diferentes genes de virulência. Um importante mecanismo de patogenicidade e virulência intimamente associado a todos os patógenos gram negativos é a presença de LPS (ou sua variação LOS, lipooligosacarídeos), que é uma endotoxina com alta especificidade inflamatória, principalmente por conta de sua porção de lipídio A, em sua estrutura. Outra característica conferida pela presença da membrana externa é a reduzida permeabilidade à alguns antimicrobianos, conferindo uma resistência natural a penicilinas, por exemplo, e a outros antimicrobianos que agem na síntese da parede, como glicopeptídeos (vancomicina).

Outros fatores de virulência importante encontrados em diferentes patógenos gram negativos incluem a presença de capsula, flagelo, formação de biofilme (como no caso de Pseudomonas aeruginosa) e toxinas, afimbriação, bem como pili e fimbrias. Muitos patógenos desse grupo também apresentam

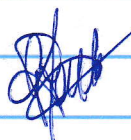
sideróforos para captação de ferro, como por exemplo a aerobactina, presente em *E. aeruginosa*, bem como canais que permitem a captação de micronutrientes, importante para a permeabilidade pela membrana externa.

Muitos outros mecanismos de patogenicidade desse grupo incluem a evasão da resposta imunológica, outras por exemplo do evasão da fagocitose e opsonização pela presença de capsula, ou proteínas que modulam a resposta imune. Outro fator muito associado a patogenicidade nesse grupo é a produção de toxinas. No caso de *E. coli* patogênicos por exemplo, alguns patótipos estão intimamente associados à produção de toxinas, como o caso do tipo enterohemorrágico (EHEC) com a produção de toxina Shiga (STx) ou o tipo enterotoxigênico (ETEC) com a produção das toxinas termolábil e termolábil.

Outro fator extremamente associado à patogenicidade desse grupo é a presença e expressão de sistemas de secreção. De modo geral, embora apresentem diferentes tipos e mecanismos, estão associados à liberação de fatores através da parede celular e membrana externa, que muitas vezes vão atuar promovendo mecanismos de patogenicidade. Um exemplo é o Sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) presente em *E. coli* enteropatogênico (EPEC) responsável por liberar no citoplasma da célula humana fatores associados a ~~causar~~ promoção da lesão em pedestal e manutenção da adesão da bactéria à mucosa intestinal como o fator *hu*.

De modo geral os sistemas de secreção podem injetar fatores dentro no citoplasma do célula como o T3SS e T6SS, ou liberarem para o meio, mas podem contribuir com a liberação de enzimas, fatores de virulência e outros fatores que vão modular a ~~et~~ resposta imune.

O controle dessas infecções em alguns casos pode incluir a vacinação como no caso do Haemophilum influenzae, mas essencialmente está envolvido com a vigilância dos principais patógenos, restrição de resistência e uso adequado de antimicrobianos.



1

Questão 3: Mecanismos genéticos de evolução de patógenos bacterianos (tema) 697399

O genoma bacteriano, tanto de organismos não patogênicos, como patogênicos, é extremamente plástico, permitindo uma evolução essencialmente rápida, o que permite a existência de uma grande diversidade entre os procariotos. Muitos elementos estão associados a essa rápida evolução genômica como a ocorrência de mutações, recombinações genéticas, existência de pressão seletiva, mas um dos principais fatores responsáveis pela elevada plasticidade genômica é a transferência genética horizontal que ocorre entre procariotos e a existência de múltiplos elementos genéticos móveis. Cada fator será abordado em detalhes a seguir, mas antes é importante ressaltar que a plasticidade genômica também é possível pela estrutura do genoma bacteriano e sua composição.

Nesse tópico, pode-se caracterizar o genoma bacteriano composto por um cromossomo circular formado por uma molécula de DNA circular, bem como por elementos ~~extra~~ ^{ex} cromossômicos que podem incluir plasmídeos, ~~que~~ ^{isto} que são moléculas de DNA extracromossômicas, circulares ou lineares, que apresentam maquinaria de replicação independente do DNA cromossômico. Dessa forma, diferentes tipos de plasmídeos existem, podendo variar de ~~representar~~ ^{representar} poucas ou muitas cópias e podem carregar importantes genes ~~ex~~ ^{extra} cromossômicos, porém determinantes como genes de virulência e resistência a antimicrobianos. Cada bactéria pode apresentar um tipo de plasmídeo, ou vários desde que de grupos de compatibilidade distintos, isto é, não compartilham a mesma

2

Questão 3

maquinaria de replicação. As diferentes possibilidades de composição do genoma, com possíveis diferentes plasmídeos e genes importantes para o fitness da bactéria, leva a uma grande variabilidade genética mesmo intra espécie. Dessa forma, atualmente existem dois conceitos importantes, o conceito de core genoma, isto é, a composição genética essencial que define uma dada espécie, presente em todos os cepos e o conceito de pan genoma, isto é, todo o possível composição genética já observada para uma dada espécie.

Se considerarmos os mecanismos de evolução, um dos potenciais mecanismos é a ocorrência de mutações. Mutações genéticas podem ser induzidas por agentes mutagênicos, como por exemplo a ocorrência de quebras na dupla fita por espécies reativas de oxigênio ou dímeros de timina por exposição à luz UV, ou podem ser espontâneos, decorrentes de erros intrínsecos no processo de replicação do DNA e falha nos mecanismos de reparo. As mutações podem ser pontuais, isto é, em uma única base, onde a troca de uma purina por outra purina ou pirimidina por outra pirimidina é conhecida como transição, enquanto a troca entre uma purina por uma pirimidina ou vice-versa é conhecida como transversão. ~~ou em~~ nesses casos, as trocas pontuais podem não ter efeito no ~~pro~~ aminoácido a ser produzido (mutação silenciosa) ~~ou podem~~ no caso de ^{novos codons codando} ~~o mesmo aminoácido~~ ~~o mesmo~~ aminoácido, ou no contexto da estrutura motéica geral pode não alterar tanto assim o novo codon codifique o mesmo ^{amino} aminoácido (por exemplo;

a troca de um aminoácido com carga positiva, arginina por outro, lisina). A mutação pontual, pode no entanto, alterar o classe de aminoácido a ser traduzido ou mesmo gerar um códon de terminação que pode resultar em uma proteína truncada, ocasionando repercussões maiores na proteína resultante. As mutações em vários nucleotídeos podem com isso chegar a alterar o fitness da bactéria, tanto positivo, como negativamente, com isso sendo um importante mecanismo evolutivo. De fato, dentro do contexto molecular, em alguns casos a observação de polimorfismos únicos de sequência (SNPs) é utilizada para caracterização de epis de patógenos, como o caso do patógeno *Mycobacterium leprae*. Outros tipos de mutações também incluem inserções e deleções (mutações tipo indel) que afetam maiores do genoma são afetadas, podendo alterar o quadro de leitura na tradução molecular, com grande potencial de impacto no fitness bacteriano.

A ocorrência de mutações é tão relevante dentro do processo de evolução do genoma que alguns patógenos apresentam mecanismos de ~~taxa~~ favorecimento da ocorrência de mutações com a expressão de polimerases de baixa ^{uma prova} proof reading (capacidade de correção) ou fidelidade, em condições de estresse metabólico, como estratégia de gerar variabilidade gênica. Como mutações podem alterar negativamente o fitness bacteriano, é importante ressaltar ~~que~~ a existência de mecanismos de reparo do DNA na presença de erros ou quebras do dupla fita, justamente para preservação do genoma, mas que podem falhar.

4. Questão 3

Um exemplo de relevância de mutações dentro do contexto patogênico seria a mutação em aloos de antimicrobianos, como por exemplo a mutação no *rna235 A2088G* que confere maior resistência a macrolídeos, e assim contribuindo para aumento do ~~potencial de virulência~~ ^{potencialidade do potencial} patogênico.

Um fator importante da evolução genômica de bactérias é a pressão seletiva ambiental e os próprios mecanismos de seleção natural que podem selecionar genes ~~mais favorecidos~~ ^{mais favorecidos} fitness bacteriana. No contexto de patógenos, a pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos pode selecionar cepas cada vez mais resistentes, inclusive com múltipla resistência a diferentes classes de antimicrobianos, com isso contribuindo com a emergência de patógenos resistentes e de alta relevância clínica. Dessa forma, ambientes com elevado uso de microbianos como ambientes hospitalares; o próprio uso cada vez mais na pecuária e consequente despejo em corpos hídricos gera ambientes com elevada pressão seletiva favorecendo a seleção de resistência.

~~Assim~~ Assim assim o principal mecanismo seletivo no contexto de bactérias ~~é~~ é a transferência horizontal, que pode ocorrer mesmo entre espécies evolutivamente distantes. Os três mecanismos de transferência horizontal são a transformação, transdução e conjugação. A transformação envolve a captura e internalização de DNA livre no ambiente, que pode estar na forma de plasmídeos ou mesmo porções. Alguns patógenos são naturalmente competentes e mais propensos a sofrer transformação, como o caso do *Streptococcus*

pru monise. No caso da transformação e aquisição de plasmídeos, esses podem ser montados como componentes do genoma, mas no caso de porções gênicas, os mesmos devem ser integrados ao genoma por recombinação genética.

A transdução envolve a inserção de material genético direto no citoplasma bacteriano por ação de um bacteriófago. Esse material pode ser integrado ao genoma bacteriano durante a fase lisogênica do fago e durante a fase lítica, por erros de excisão pode liberar porções do genoma bacteriano para outra célula. Ou mesmo o material pode permanecer integrado ao genoma bacteriano, muitos genes de virulência importantes estão associados a fagos, como o caso da toxina colérica (CTX) de *Vibrio cholerae*, dessa forma sendo um importante elemento de evolução do genoma.

Por fim, o processo de transferência horizontal genética mais prevalente é o processo de conjugação, possível por conta da maquinaria TRA que promove a formação do pili sexual, que permite a transferência do material genético entre bactérias, em um processo dependente do contato célula-célula. A maquinaria tra é observada em plasmídeos conjugativos, que permite a transferência do próprio plasmídeo para outra bactéria, ou em elementos conjugativos integrativos (ICEs) ou transposons conjugativos. Alguns plasmídeos são mobilizáveis ou conjugáveis e podem se transferidos através da maquinaria TRA presente em trans em outros.

porções do genoma. Dessa forma, por permitir a transferência de material genético entre espécies distintas, a conjugação é um importante processo evolutivo de bactérias, sendo muito importante também para a transferência de genes de virulência e resistência a antimicrobianos.

Outro importante fator de evolução é a vasta existência de elementos genéticos móveis, que podem ser transferidos ~~de~~^{pelos} diferentes mecanismos de transferência horizontal genética e normalmente também estão associados a importantes genes de virulência e resistência, ~~sendo~~^{sendo} ~~imp~~^{que} muitas vezes são mapeados nesses elementos, contribuindo para a emergência de cepas patogênicas e virulentas. Entre os elementos genéticos móveis estão incluídos os plasmídeos; fagos; sequências de inserção; transposons, elementos conjugativos de inserção (ICE) e fagos integrados.

Conforme discutido anteriormente, plasmídeos podem ser conjugativos, promovendo sua própria transferência, ou podem ser mobilizáveis via maquinaria TRA em trans, ou podem ser adquiridos por transformação. De modo geral, muitos elementos de virulência podem ser associados a plasmídeos, como o caso do prototipo de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) que está associada a presença do plasmídeo pAA, ou no caso do prototipo enteroinvasivo (EIEC) que está associada ao plasmídeo pINV.

Fagos também podem contribuir com a evolução genômica ao serem integrados ao genoma, podendo inclusive alterar quadros de leitura, além de potencialmente

7

Questão 3

Conegorem genes importantes para o fitness bacteriano.

Sequências de inserção são elementos simples com sequências invertidas flanqueando o gene de transposase que pode movimentá-lo pelo genoma. O inserção em diferentes regiões pode causar alterações no perfil de expressão gênica e mutações de inserção, contribuindo para a evolução genômica. Já os transposons são estruturas mais complexas de duas sequências de inserção flanqueando uma porção gênica que ~~se~~ não ~~mas~~ mobiliza genes de resistência a antimicrobianos e de forma a inibir os ISs também podem causar mutações. ICEs também são conhecidos como ~~elementos~~ ^{transposons} conjugativos que são ~~integrons~~ ~~integras~~ capazes de promover sua transferência via maquinaria TRA.

Por fim, integrons são elementos que se inserem em sítios att no genoma, inserindo cópias para expressão gênica.

De modo geral, muitos genes de virulência e resistência são associados a esses elementos. Além disso, o processo de integração desses elementos no genoma envolve o processo de recombinação homóloga, que é também um importante fator envolvido na evolução. A recombinação homóloga também pode ser observada nos processos de variação de fase antigênica, que promove a variação dos antígenos de superfície de alguns patógenos, como no caso do patógeno *Campylobacter* spp.

Além disso, a transferência horizontal estende em alguns mecanismos de proteção da

genoma bacteriano, que reconhece material genético
estranho, ^{principalmente viral} como o caso do caso de enzimas de
restrição que degradam DNA não metilado, ou
mesmo o sistema CRISPR-Cas, mais recentemente
descoberto. Alguns patógenos, como Enterococcus spp
não tem sistema CRISPR sendo mais suscetíveis a
processos de transferência horizontal. Sendo assim
a transferência horizontal gênica ocorre amplamente
entre todos os bactérias, patogênicos e não patogênicos
por isso, a constante preocupação pela vigilância
de elementos genéticos importantes como genes
de virulência, genes de resistência à antimicrobianos
ainda mais aqueles associados a elementos genéticos
móveis, como estratégia de minimizar a emergência
de novas cepas mais patogênicas de mesmo novo
patógenos.