

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**ANÁLISE DE DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS PARA A DETECÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS CALCIFICADAS E DE MICRORGANISMOS**

KAREN CAMPOS

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**ANÁLISE DE DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS PARA A DETECÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS CALCIFICADAS E DE MICRORGANISMOS**

**Karen Campos
Biomédica**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2008**

AGREDECIMENTOS

Aos amigos:

“Nada mais precioso do que a união do espírito e do coração na procura de um mesmo ideal: planejar em comum o caminho a percorrer, unir as mãos nas dificuldades encontradas, trabalhar e realizar juntos a tarefa empreendida, eis o cimento que resistirá a todas as forças destruidoras”.

ERHIN

Obrigada!

ANÁLISE DE DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS PARA A DETECÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CALCIFICADAS E DE MICRORGANISMOS

Autora: Karen Campos

Orientador: Prof. Amauri Braga Simonetti

RESUMO

Nanobactérias (NPC) ou nanopartículas calcificadas (NPC) são estruturas não convencionais, com tamanho de 100 a 1000 vezes menor do que bactérias comuns e com taxa de crescimento muito lenta, o que torna sua detecção difícil pelos métodos convencionais. Essas estruturas têm sido observadas no meio ambiente e em diferentes materiais biológicos. Sob condições fisiológicas, elas produzem uma cápsula ou envelope de apatita biogênica em sua superfície, podendo estar implicadas na formação de calcificações extra-esqueléticas em humanos contribuindo, assim, para o desenvolvimento de muitas doenças crônicas. A biomineralização é um processo que acontece normalmente ou pode ocorrer em condições patológicas, sendo sua base molecular ainda bastante desconhecida. Pacientes com insuficiência renal crônica, além de apresentarem calcificações vasculares, estão sujeitos à contaminação por microrganismos presentes na água quando submetidos ao processo de hemodiálise. Por outro lado, pessoas aparentemente saudáveis podem desenvolver cálculos renais, sem que se conheça exatamente a causa. Neste estudo foram analisados diversos tipos de material biológico: cultivos celulares, água utilizada nos sistemas de hemodiálise, sangue e outros tipos de materiais biológicos calcificados. A metodologia empregada incluiu técnicas de cultivo e de microscopia eletrônica de varredura para a detecção de NPC e de microrganismos. Os resultados mostraram que a água utilizada para hemodiálise era de boa qualidade, uma vez que poucos microrganismos foram detectados nas amostras analisadas. Por outro lado, em praticamente todo o material utilizado em cultivos celulares foram detectadas NPC. No material biológico proveniente de pacientes não foram detectadas NPC, com exceção dos cálculos renais, onde a microscopia

eletrônica evidenciou a presença dessas estruturas em 85% do material analisado.

ANALYSIS OF DEFERENT BIOLOGICAL STRUCTERS FOR THE DETENTION OF NANOPARTÍCULAS CALCIFICADAS AND MICROORGANISMOS

AUTHOR: Karen Campos

ADVISOR: Prof. Amauri Braga Simonetti

ABSTRACT

Nanobacteria (NPC) or calcifying nanoparticles (CNP) are not conventional structures, with size from 100 to 1000 times lesser of that of common bacteria and a very slow growth, wich makes difficult its detention by conventional methods. These structures have been observed in the environment and different biological materials. Under physiological conditions, they produce a capsule or envelope of hidroxyyl apatite on the surface, that could be related to extraskkeletal calcification in human beings contributing, thus, for the development of many chronic illness. The biomineralization is a process that occurs normally or in pathological conditions, but the molecular basis is not completely understood. Patients with chronic renal insufficiency, besides presenting vascular calcification, are vulnerable to contamination by microorganisms present in the water when submitted to the process of hemodialysis. On the other hand, healthy people may develop kidney stones whitout an apparent cause. Different biological materials were analyzed in this study: cell cultures, water used in hemodialysis systems, blood and other types of biological samples from patients with different diseases. The methodology employed here included techeniques of culture and scanning electronic microscopy (SEM) for the detection of CNP and microorganisms. The results showed that water with good quality was used for hemodialysis, since few microorganisms were detected in the analysed samples. On the other side, most material used in cell cultures was contaminated by CNP. In material collected from patients no CNP were detected, with exception of kidney stones where SEM indicated the presence of these structures in 85% of the analyzed samples.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	
LISTA DE FIGURA.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	
2.1. Descoberta das nanobacterias.....	
2.2. Propriedade das nanobacterias.....	
2.3. nanobactérias em materiais biológicos.....	
2.4. Nanobactérias associadas a patologias	
2.4.1. Doenças renais	
2.4.2. Doenças vasculares/cardíacas.....	
2.4.3. Câncer.....	
2.4.4. Outras doenças humanas	
2.5. Experimentos em animais	
2.6. Nanobactérias e o meio ambiente.....	
2.7. Nanobactérias frente a agentes físicos, químicos e antimicrobianos	
2.8. Controvérsia	
2.9. Detecção e identificação das nanobactérias	
2.9.1. Colorações	
2.9.2. Cultivo	
2.9.3. Testes imunológicos.....	
2.9.3.1. ELISA	
2.9.3.2. Imunohistoquímica	
2.9.3.3. Imunofluorescência	
2.9.3.4. SDS-PAGE/ Westen blot.....	
2.9.4. Microscopia óptica e eletrônica	

2.9.5 Métodos Moleculares	
2.9.6. outros métodos.....	
3. OBJETIVOS.....	
3.1. Geral.....	
3.2. Específicos	
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. Material biológico analisado	
4.1.1. Linhagens celulares	
4.1.2. Amostras de suplemento de cultivos celulares.....	
4.1.3. Água proveniente de equipamentos de hemodiálise.....	
4.1.4. Soros humanos	
4.1.5. Cálculos renais	
4.1.6. Calcificações de válvulas de aorta	
4.1.7. Nódulos pulpares	
4.2. Microscopia	
4.2.1. Microscopia eletrônica de varredura	
4.3. Teste para a dissolução da hidroxiapatita de NPCL.....	
5. RESULTADOS.....	
5.1. Amostras de linhagens celulares.....	
5.2. Amostras de suplemento de cultivo celulares	
5.3. Água proveniente de equipamentos de hemodiálise.....	
5.4. Soros humanos	
5.5. Cálculos renais.....	
5.6. Calcificação de válvula de aorta.....	
5.7. Nódulos pulpares	
5.8. Teste para a dissolução de hidroxiapatita	
6. DISCUSSÃO	
7. CONCLUSÕES.....	
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
10. ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Propriedades das NPC e de vírus, bactérias e prions.	23
TABELA 2: Linhagens celulares analisados neste estudo	
TABELA 3: Material utilizado como suplemento de cultivo celular analisado neste estudo.....	
TABELA 4: Pontos de coletas de acordo com os hospitais e microrganismos procurados. PA: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; BC: <i>Bulkoderia cepacia</i> ; LI: <i>Listeria</i> sp., LE: Leveduras.....	
TABELA 5: Total de amostras e pontos de coleta. Número de amostras aprovadas e reprovadas.....	

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** MEV de NPC cultivadas em DMEM com 10% de SBF.....
- FIGURA 2:** MET de NPC cultivadas em DMEM com 10% de SBF após três meses.....
- FIGURA 3:** MEV de calcita retirada de fonte de água quente.....
- FIGURA 4:** Cultivo celular após 4 semanas de incubação à 37°C.....
- FIGURA 5:** Imagem, ao MEV, de cultivo de células MDK após 8 semanas de incubação à 37°C.....
- FIGURA 6:** Aspecto do soro bovino fetal (SBF) antes e após incubação à 37°C por 8 semanas.....
- FIGURA 7:** Imagem, ao MEV, de soro bovino fetal (SBF) após 8 semanas de incubação à 37°C. Podem ser observadas estruturas cocóides de NPC....
- FIGURA 8:** Imagem, ao MEV, de SBF cultivado em E-MEM após 8 semanas de incubação à 37°C.....
- FIGURA 10:** Imagem, ao MEV, de cálculo renal analisado sem tratamento prévio por HCl, mostrando estruturas aglomeradas sobre a superfície de cristais de oxalato de cálcio.....
- FIGURA 11:** Imagem, ao MEV, de cálculo renal após tratamento com HCl
- FIGURA 12:** Imagem, ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), de cálculo renal.....
- FIGURA 13:** Imagem, ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), de cálculo renal.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{99\text{M}}\text{Tc}$: Tecnécio – massa molecular 99

AAMI: Association for the Advancement of Medical Instrumentation

BHI: Brain heart infusion

D-MEM: Meio essencial mínimo de Eagle

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

EDX: Microanálise por energia dispersa

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EPh: European Pharmacopeia

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformador de Fourier

HPLC: High performance liquid chromatography

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

NPC: Nanobactéria

NPC: Nanopartícula calcificada

PCR: Polymerase chain reaction

SDS-PAGE: Sodium dodecil sulfate – Poliacrilamide gel electrophoresis

SFB: Soro bovino fetal

SPECT: Single photon emission computed tomography

TSA: Tryptone soy agar

UFC: Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

A formação de estruturas inorgânicas cristalinas organizadas em matrizes extracelulares é um fenômeno biológico comum, usualmente referido como biomineralização. A partir de estudos de Bob Folk em 1990, que observou formas esféricas e ovóides nos minerais de calcita e de aragonita denominando-as de “nanobactérias”, vários trabalhos foram publicados associando essas estruturas com formação mineral em sedimentos aquosos, materiais fossilizados e extraterrestres. No entanto, a base molecular da biomineralização permanece desconhecida. Mais recentemente, foi descoberta a existência de estruturas ultrafiltráveis como contaminantes de cultivos celulares, as quais foram denominadas de *Nanobacterium sanguineum*. Estas nanobactérias foram também isoladas de sangue humano, de soro bovino fetal comercial (SBF), cálculos urinários e outros materiais biológicos humanos. Com base na seqüência de genes do RNAr 16S, estes microrganismos foram incluídos no subgrupo α de *Proteobacteria*.

Nanobactérias (NB) são estruturas não convencionais, com tamanho de 100 a 1000 vezes menor do que bactérias comuns; além disso, sua taxa de crescimento é muito lenta, o que torna sua detecção difícil pelos métodos convencionais. As NB produzem uma cápsula de apatita biogênica em sua superfície sob condições fisiológicas e, portanto, são suspeitas de mediar a formação de calcificações patológicas em tecidos biológicos, contribuindo assim, com o desenvolvimento de muitas doenças crônicas. Neste estudo será utilizada a terminologia Nanopartículas Calcificadas (NPC) às estruturas que se assemelham às descritas na literatura como nanobactérias.

Para a identificação de NPC têm sido relatados métodos de cultivo, microscopia eletrônica, métodos imunológicos e moleculares. Até o momento, somente 2 publicações no Brasil foram divulgadas sobre a presença de estruturas semelhantes em materiais: a primeira relatando a detecção em mineral oriundo do norte do país e, mais recentemente, a ocorrência dessas estruturas como contaminantes de cultivos celulares. Esses estudos sugerem que as NPC estão amplamente distribuídas na natureza e possíveis patologias estariam associadas a elas.

Os patógenos oportunistas são microrganismos que normalmente não causam doença em seu habitat normal, em uma pessoa saudável. Estes oportunistas são freqüentemente membros da microbiota normal do corpo. Portanto, a água utilizada em pacientes dialisados que são, na maioria das vezes, pessoas com deficiência em suas estruturas imunológicas deve ser totalmente livre, ou quase totalmente, de organismos que possam se aproveitar dessa condição fragilizada do paciente que utiliza o serviço de hemodiálise.

O aspecto microbiológico de um tratamento de diálise tem sido levado em conta mais recentemente quando foi demonstrado que o excesso de certas bactérias no dialisante era responsável por reações pirogênicas e por bacteremia.

O objetivo do presente estudo é a análise da água de sistemas de hemodiálise e de diferentes materiais biológicos para a verificar a presença de microrganismos e de NPC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descoberta das nanobactérias

O termo “nanobactéria” surgiu em 1988 nos EUA quando Morita relatou que a privação de nutrientes para a célula bacteriana provoca a sua diminuição e a transforma em ultramicrobactéria, também chamada de anã, mini, pico ou nanobactéria (Morita, 1998). Em 1992, Robert Folk, cientista norte-americano, publicou o resultado de uma pesquisa realizada em fontes de água quente, relacionando a existência de minerais porosos nestes locais a bactérias minúsculas às quais chamou de “nannobacteria” (Folk, 1992; 1993a).

Na década de 90, pesquisadores da Universidade de Kuopio, na Finlândia, detectaram partículas ultra filtráveis como contaminantes em cultivos celulares humanos, nos quais as células sofriam apoptose após algum tempo de incubação (Kajander & Çiftçioğlu, 1998a). Não se encontrando nem vírus nem mycoplasmas, mas foram capturadas imagens de estruturas semelhantes a bactérias inicialmente observadas em cultivos de longa duração e a pista inicial sobre sua natureza foi durante a realização de cultivos onde se utilizava o mesmo tipo de células em meios, cuja única diferença era o soro utilizado como suplemento. Na presença de um determinado lote de soro, que continha tais estruturas, as células morriam dentro de quatro semanas. O frasco desta cultura apresentava uma camada esbranquiçada na sua base (Kajander *et al.*, 1997). A partir daí foram realizados vários testes para a identificação destas estruturas, assim como para determinar as suas propriedades microbiológicas, bioquímicas e moleculares (Kajander *et al.*, 1997; Åkerman *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioğlu, 1998b). O mesmo grupo de pesquisadores também

observou estruturas similares em amostras de sangue e urina de humanos, com um envoltório de apatita (fosfato de cálcio) ao seu redor, relacionando-as à formação de cálculos renais (Çiftçioglu & Kajander 1998b). O nome sugerido, *Nanobacterium sanguineum*, refere-se ao seu pequeno tamanho e ao seu habitat, o sangue. (Kajander *et al.*, 2001a).

2.2. Propriedades das nanobactérias

Aparentemente, são bactérias providas de parede celular, gram-negativas (fracamente) e catalase-negativas, com morfologia cocóide (Çiftçioglu & Kajander 1998) e de crescimento lento (Dorrell, 1999). Possuem, em média, de 50 a 300 nanômetros (Çiftçioglu & Kajander 1998, Allen *et al.* 1997) de tamanho sendo, portanto, cerca de 100 vezes menores do que as bactérias comuns (Kajander *et al.*, 2001b). Seu tempo de duplicação é de aproximadamente três dias em meios de cultivos celulares (Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Aho & Kajander (2003) compararam as NPC a partículas virais, príons e bactérias usuais (Tabela 1).

As NPC produzem efeitos citotóxicos em cultivos celulares, invadindo células de mamíferos de diferentes maneiras (Kajander *et al.*, 1997). Elas podem produzir vacuolização e lise celular, apresentando uma maneira especial de invadir as células: ativam células, que normalmente não são fagocíticas, a fazê-lo (Çiftçioglu & Kajander, 1998). Utilizando fibroblastos 3T6, Çiftçioglu & Kajander (1998) demonstraram que as NPC produziam células apoptóticas que se caracterizavam por uma série de alterações morfológicas definidas, incluindo condensação da cromatina, fragmentação nuclear,

encolhimento do citoplasma, alterações na membrana celular e separação das células vizinhas.

As NPC apresentam um envoltório de hidroxiapatita (fosfato de cálcio), o que as torna de difícil fixação, rompimento, coloração e excepcionalmente resistentes ao calor e à irradiação (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu & Kajander, 1998; Kajander *et al.*, 1998a). O mecanismo pelo qual a apatita é formada ao redor das NPC é desconhecido e pode ser similar ao da formação óssea, que também não é totalmente compreendido (Çiftçioglu *et al.*, 1999). A formação de biofilme com apatita induzido por NPC é dependente da presença de oxigênio, podendo ser inibido por vários antibióticos e por elevadas doses esterilizantes de irradiação gama (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu & Kajander, 1998; Çiftçioglu *et al.*, 2002).

Na tabela 1 podemos observar algumas diferenças existentes entre as NPC, vírus, príons e bactérias tais como a estrutura da parede celular e a resistência à temperatura de fervura.

2.3. Nanobactérias em materiais biológicos

Um estudo de Kajander *et al.* (1997) relatou a presença de NPC em mais de 80% dos 50 lotes comerciais de SBF testados, sendo, também, encontradas em soros de cavalos e bovinos examinados na região onde se realizou o estudo. Os mesmos autores citaram a ocorrência destas estruturas em 4% dos soros provenientes de estudantes da Universidade de Kuopio e em lotes comerciais de soros humanos de doadores finlandeses, após esterilização por

filtração. Outro estudo reportou a presença de NPC, no soro, em 8% de um total de 336 pessoas saudáveis no sul da China (Wang *et al.*, 2004).

TABELA 1. Propriedades das NPC e de vírus, bactérias e prions^a (adaptado de Aho & Kajander, 2003).

Propriedades	Nanobactéria	Partículas Virais	Prions	Bactérias
Tamanho (nm)	50-300	20-250	<250	>250
Parede celular	atípica	Sem camada lipoprotéica	-	+
Ácidos nucleicos	algum / atípico	+ / atípico	-	+
Proteínas	+	+	+	+
Carboidratos	+	+	+	+
Auto-replicação	+	-	-	+
Crescimento em DMEM	+	-	-	+
Resistência à temperatura de fervura	+	- / +	+	-
Resistência a desinfetantes	+	- / +	+	-
Resistência a antibióticos	- / +	+	+	- / +
Sensibilidade a bifosfonados	+	-	-	-
Imunogenicidade	+	+	-	+
Presença de lipopolissacarídeos	+	-	-	+ (gram-negativas)
Capacidade de causar morte da célula hospedeira	+	+	Específica	+ em alguns
Capacidade de causar calcificação patológica	+	+ em poucos	-	+ em poucos
Formação de biofilmes	+	-	-	+
Presença em placas ateroscleróticas	+	+ em alguns	-	+ em poucos

^a+, presente; -, ausente.

Breitschwerdt *et al.* (2001) conseguiram detectar antígenos de NPC no soro de 22 bovinos de um rebanho da Carolina do Norte, EUA. Os autores sugeriram que bacteremia e infecção celular possam ocorrer via ingestão oral desses organismos.

Barr *et al.* (2003) determinaram a prevalência de formação de biofilme em amostras séricas de diferentes animais, sob condições de cultivo celular. Os resultados foram positivos para 97% dos bovinos, 92% dos caprinos, 100% dos gatos e 90% dos cães. A análise dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de varredura revelou minúsculas partículas cocóides, consistindo principalmente de cálcio e fosfato.

Recentemente, Simonetti *et al.* (2007) analisaram 19 linhagens celulares e 8 lotes de soro fetal bovino e verificaram a presença de partículas semelhantes às nanobactérias em praticamente todo o material analisado. Os autores observaram uma progressiva deterioração dos cultivos celulares com acúmulo dessas estruturas em vacúolos citoplasmáticos.

Diversos estudos têm relatado a presença de NPC em cálculos renais (Çiftçioglu & Kajander, 1998; Çiftçioglu *et al.*, 1999; Khullar *et al.*, 2004; Shiekh *et al.*, 2006), na bile (Li *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2003) e em placas ateromatosas (Rasmussen *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004; Puskas *et al.*, 2005).

Algumas vacinas utilizadas na prevenção de doenças, tanto em humanos como em animais, ainda são produzidas a partir de cultivos celulares contendo soro fetal bovino e poderiam estar contaminados por NPC. Foi relatada a presença de NPC em alguns lotes de vacina contendo vírus da poliomielite inativado (Çiftçioglu, 2001). Para evitar este problema, Doyle (2006) sugere que os produtos biológicos humanos devem ser produzidos em meios de cultura esterilizados em filtros de 20 nm de porosidade e submetidos à

irradiação gama (150 mega Rad) para destruir todas os microrganismos presentes.

2.4. Nanobactérias associadas a patologias

Autores sugerem que as NPC poderiam atuar como centros de cristalização levando à formação de estruturas de apatita biogênica sendo, então, responsáveis por calcificações extra-esqueléticas (Kajander & Çiftçioğlu, 1998a; Carson, 1998). Este fato seria de grande interesse em Medicina e alguns estudos têm sido publicados relatando a presença de NPC em doenças humanas onde há processos de calcificação.

2.4.1. Doenças renais

A capacidade de produzir envoltórios (cápsulas) de cálcio-apatita sugere que estas “bactérias” podem iniciar o crescimento de cálculos renais e, possivelmente, de outras estruturas patológicas calcificadas (Dorrell, 1999; Wood & Shoskes, 2006). Algumas evidências de que as NPC podem induzir calcificação e formação de cálculos *in vivo* são baseadas em experimentos que revelaram os seguintes resultados: NPC foram mostradas transportadas do sangue para a urina como organismos vivos (Akerman *et al.*, 1997); elas têm sido detectadas em sangue humano (Çiftçioğlu *et al.*, 1997a); antígenos de NPC foram encontrados em cálculos renais de humanos; foram reveladas NPC fagocitadas pelas células (fibroblastos), que poderiam originar calcificações intra e extracelulares (Kajander & Çiftçioğlu, 1998b).

A biomineralização em meio de cultivo celular resultou em biofilmes e agregados minerais extremamente semelhantes aos encontrados em calcificações de tecidos e em cálculos renais (Çiftçioglu & Kajander, 1998). Um estudo comparou 72 cálculos renais de pacientes finlandeses com amostras de NPC utilizando a MEV e ressaltou a semelhança no tamanho e na morfologia das NPC e das menores unidades de apatita dos cálculos renais. Após tratamento com HCl à 1 Normal, NPC puderam ser cultivadas de 93,1% dos cálculos (Çiftçioglu *et al.*, 1999). Hjelle *et al.* (2000) estudaram pacientes com a Doença do Rim Policístico e detectaram NPC e/ou antígenos de NPC na maioria do material analisado. Conte *et al.* (2001) pesquisaram a presença de NPC em 1000 cálculos renais, detectando-as em apenas 5, ou seja, 0,5%. Concluíram, com isso, que as NPC podem exercer um papel importante no desenvolvimento de cálculos, induzindo a formação de núcleos de oxalato de cálcio e ácido úrico. Segundo eles, no entanto, este mecanismo não é comum e deveria ser associado a outros fatores de risco litogênicos.

Observações sobre a ocorrência de um aumento na formação de cálculos renais em astronautas durante ou após missões de longa duração à gravidade zero, por Çiftçioglu *et al.* (2005), levou-os a investigar os efeitos da microgravidade no desenvolvimento de cálculos renais. Com base em suas pesquisas anteriores, em que se associou a presença de NPC em cálculos renais a uma função ativa na deposição de fosfato-carbonato de cálcio nos rins, os autores resolveram estudar o efeito da microgravidade na multiplicação e calcificação das NPC *in vitro*. O estudo revelou um aumento no grau de multiplicação de NPC em condições simuladas de microgravidade. Assim,

infecções por NPC podem ter um papel importante na formação de cálculos renais em membros do grupo durante vôos espaciais (Çiftçioglu *et al.*, 2005).

Os pacientes em hemodiálise recebem freqüentemente transfusão de sangue e podem desenvolver calcificações extraesqueléticas extensivas (Carson, D.A., 1998) Em um estudo não publicado de Kajander e Çiftçioglu encontraram 80% dos pacientes que utilizaram o serviço de diálise em um hospital da Turquia com “nanobacterimia”. Sendo assim, é importante determinar a freqüência exata da infecção de NPC no sangue humano e verificar se uma seleção rotineira de doadores neste parâmetro é necessária (Carson, D.A., 1998).

2.4.2. Doenças vasculares/cardíacas

Um estudo recente sugere que calcificações desencadeadas por NPC podem exercer alguma função no desenvolvimento da doença arterial coronariana (Maniscalco & Taylor, 2004). As nanopartículas isoladas de cálculos renais de humanos são encapsuladas com hidroxiapatita, o mineral de cálcio encontrado em tecidos ateroscleróticos (Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Miller *et al.*(2004) identificaram a presença de estruturas semelhantes às NPC em tecidos humanos calcificados de 4 diferentes origens: placa da carótida, válvula cardíaca, aneurisma da aorta e placa da artéria femural. As estruturas estavam presentes em áreas contendo fosfato de cálcio pela coloração de Von Kossa e microanálise de raio-X, sendo semelhantes às estruturas descritas como NPC cultivadas de cálculos renais (Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Estruturas auto-replicáveis contendo ácidos nucléicos foram cultivadas de

filtrados homogeneizados de dois aneurismas calcificados da aorta, ao passo que a aorta não calcificada usada como controle não revelou tais estruturas (Miller, *et al.*, 2004). Preece *et al.* em 2001 demonstraram que os bifosfonados (etidronato e clodronato) inibem a calcificação arterial. Um estudo mostrou que estes compostos inibiram completamente o crescimento de NPC bloqueando a agregação, o crescimento e a mineralização desses cristais (Çiftçioglu *et al.*, 2002).

2.4.3. Câncer

Questiona-se, ainda, a possível relação entre câncer e infecção por NPC (Wainwright, 1999). “Calcinosis cutis” é um termo utilizado para descrever um grupo de desordens caracterizadas por um depósito de sais de cálcio na derme e nos tecidos subcutâneos, incluindo a calcinose tumoral. Vários casos envolvendo acúmulo anormal de cálcio na pele foram examinados ultraestruturalmente para a presença de NPC e o resultado de todos eles foi negativo. Sendo assim, os autores concluíram que essas calcificações não são devidas a uma indução por agentes “bacterianos” (Morgan, 2002). Hudelist *et al.* (2004) encontraram uma relação entre a presença de NPC e o desenvolvimento de corpos de psammoma em tumores malignos de ovário. Os corpos de psammoma são estruturas concêntricas laminadas calcificadas, com aparência de casca de cebola e são freqüentemente observados em malignidades humanas, como meningioma (Hirota, *et al.*, 1995), câncer de mama, câncer de tireóide (Tunio, *et al.*, 1998), câncer no endométrio (Zreik & Rutherford, 2001) e adenocarcinomas serosos de ovário (Hudelist, *et al.*, 2004).

Muitas evidências sugerem o envolvimento das NPC no processo de biomineralização, podendo-se concluir que infecções por NPC em tecidos ovarianos com malignidades contribuem para os mecanismos que levam à formação de depósitos de cálcio conhecidos como corpos de psammoma (Hudelist, *et al*, 2004).

2.4.4. Síndrome da imunodeficiência humana (HIV)

As co-infecções de nanobactérias podem agravar consideravelmente a severidade do HIV. As nanobactérias tem sido implicadas inicialmente em manifestações clínicas severas, tais como os danos nos rins, cálculos renais e a arteriosclerose. Os pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana são extremamente vulneráveis a patógenos oportunistas. Interessantemente, os indivíduos portadores desse vírus e tratados com inibidores da protease mostraram uma tendência a desenvolver cálculos renais, os quais não poderiam ser atribuídas ao uso desse medicamento, sugerindo a ação de alguma anormalidade atuando concomitante e que poderia ser a responsável por essa desordem (Pretorius *et al.* 2004). Além disso, se suspeita que essa possível co-infecção poderia sobrecarregar o sistema imunológico deficiente contribuindo, dessa forma, para uma piora no quadro clínico desses pacientes (Pretorius *et al.*, 2004).

Em um estudo feito por Pretorius *et al.* (2004) para estimar a prevalência de nanobactéria em indivíduos HIV positivos, foi feita a detecção de antígeno de NPC e anticorpo contra esse patógeno. Foram testados os soros de 40 mães HIV positivas, 13 filhos de dessas mães, sendo dois destes

HIV positivo e 40 soros HIV negativos como controle. Para tal ensaio se utilizou o teste ELISA desenvolvido pela Nanobac, da Finlândia. Os resultados encontrados foram 85% dos HIV positivos apresentaram anticorpos contra NPC. Três mães HIV positivas tinham a presença de antígeno NPC. Dos filhos analisados, foram encontrados níveis de antígenos NPC superiores aos apresentados pelas mães dando positivos em 70% das amostras analisadas. Os dois bebês HIV positivos apresentaram os níveis mais elevados de antígenos e suas mães tiveram os antígenos NPC detectável na corrente sanguínea. Este estudo preliminar sugere que a transmissão transplacentar ou perinatal de NPC de mães infectadas para os filhos é possível.

2.4.5. Outras doenças humanas

Várias outras doenças têm sido relacionadas com o processo de calcificação atribuído às NPC (Kajander *et al.*, 2001b): catarata, doença de Alzheimer, artrite, calcificação do tecido mole na mama e tecido prostático, psoríase, eczema, calcificação na glândula pineal e autismo. É possível que o significado médico das NPC seja mais extenso, incluindo sua participação em cálculos biliares e nos processos de demência, artropatias e depósitos de cálcio no organismo, tais como observado na esclerodermia (Carson, 1998; Travis, 1998).

Têm-se demonstrado que as NPC infectam fibroblastos e, assim, elas poderiam aumentar a formação de colágeno, pela ativação dos fibroblastos. Em casos de implantes mamários, isso poderia causar a retração da cápsula fibrosa mamária. A formação de biofilmes em culturas positivas da

cápsula mamária pode ser explicada pela presença de NPC, que não são detectadas normalmente, com os métodos microbiológicos comuns (Gundeslioglu *et al.*, 2005).

Um estudo realizado na Turquia utilizando placas dentárias indicou a presença de antígenos de NPC nas placas desmineralizadas. Além disso, encontrou-se uma alta incidência de cálculos renais e cálculos biliares no grupo de pacientes e em seus familiares. Estudos *in vitro* foram realizados utilizando-se dentes molares. Estes foram incubados com NPC, onde se observou que as NPC podem provocar a formação de placas de apatita na superfície do dente (Çiftçioğlu *et al.*, 1998b). Assim, a nanobactéria pode ser considerada um fator de risco para doenças periodontais e que podem ocasionar a formação do nódulo pulpar (Demir, 2008). Além disso, tem-se estudado a aterosclerose coronária como sendo uma doença inflamatória em que infecções dentárias crônicas podem desencadear mecanismos patogênicos nas paredes das artérias. Çiftçioğlu *et al.* (2003) propõem que as NPC sejam uma potencial ligação entre doenças periodontais e doenças coronarianas periféricas, o que requer estudos complementares.

As NPC também estão sendo associada à diminuição da densidade óssea apresentada por astronautas expostos a baixa gravidade por longos períodos. A perda óssea é um dos problemas principais em missões a Marte ou outros planetas. Os estudos Russo-Americanos comuns mostram que a perda óssea varia em média de 1,5%. Algumas perdas ósseas podem ser irreversíveis, e assim, os astronautas que estiveram em missões de longa duração podem ser mais propícios a terem ossos quebradiços após o vôo ou

experimentalmente o início adiantado da osteoporose (Çiftçioğlu & McKay, 2005). Sendo revestido por uma barreira, constituída de apatita, as NPC podem competir com o osso pelo cálcio e o fósforo circulante no sangue (Sommer *et al.* 2004).

Agababov *et al.* (2007) que estudou a calcificação patológica da placenta encontrou estruturas semelhantes as NPC o que sugeriria que estas estruturas estariam atuando nesse processo.

2.5. Experimentos em animais

Um estudo de Garcia Cuerpo *et al.* (2000) demonstrou que a injeção translombar e percutânea intra-renal de NPC em ratos resultou na formação de cálculos renais. NPC cultivadas foram marcadas com ^{99m}Tc e a distribuição *in vivo* das NPC foi rastreada por um sistema de imagem *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT). As NPC marcadas com ^{99m}Tc permaneceram intactas e mostraram uma distribuição tecido-específica, com um acúmulo elevado nos rins e também na urina. Baço, estômago, coração e intestino também mostraram uma absorção aumentada. A excreção pela urina iniciou 10-15 minutos após a injeção e havia NPC vivas na urina. Assim, sugeriu-se que as NPC utilizam o transporte endocítico de células tubulares e podem estar envolvidas na patogênese da formação mineral de cálculos renais em humanos (Akerman *et al.*, 1997). Injeções de nanobactérias em ratos provocaram calcificações nos túbulos renais e várias manifestações de infecção (Shiekh, 2006).

2.6. Nanobactérias e o meio ambiente

As propriedades especiais das NPC sugerem que elas poderiam servir como um modelo para as formas de vida primordiais. Seus envoltórios de apatita poderiam servir como importantes indícios de como a vida começou em rochas e sedimentos, e como a vida poderia ter se espalhado pelo sistema solar (Kajander *et al.*, 1998b).

Ultramicrobactérias, capazes de passar através de filtros de esterilização, foram encontradas no solo e em fontes de água natural há cerca de 20 anos (Rozak & Colwell, 1987).

Folk, durante um estudo em fontes de calcáreo encontrou, através da microscopia eletrônica de varredura, estruturas minúsculas com formas esferoidais e ovóides no mineral de calcita e de aragonita. Devido às semelhanças entre esses objetos e as eubactérias (*Cocci*, *Bacilli*, *Streptococci* e *Staphylococci*), e devido à sua tendência em aparecer em cachos ou correntes, inicialmente foi proposto que se tratavam de “formas anãs” ou “nannobacterias” (Folk, 1992; 1993b), ou seus equivalentes fossilizados (McKay *et al.*, 1996). Desde então, essas estruturas em escala nanométrica têm sido associadas a microorganismos fossilizados em carbonatos, sulfitos, óxidos, argilas e outros silicatos (Folk, 1992, 1993a, 1993b, 1995, 2005; Pedone and Folk, 1996; Vasconcelos and McKenzie, 1997; Sillitoe *et al.*, 1996; Folk and Lynch, 1997). Também em rochas extraterrestres, incluindo o meteorito de Marte ALH84001, os meteoritos carbonáceos Allende and Murchison (McKay *et al.*, 1996; Tsuchiyama, 1996; Folk and Lynch, 1997, 1998;

Folk, 1998; Thomas-Keprta *et al.*, 1998) e o meteorito de Tataouine (Benzerara *et al.*, 2003).

Estudos preliminares concluíram que “nanobactérias” têm função ativa na corrosão do ferro e na solubilização do alumínio metálico. Elas também contribuem com o entupimento dos canos por crostas de minerais e parecem estar envolvidas na produção de cápsulas de calcáreo de moluscos (Folk, 1997).

Uwins *et al.* (1998) observaram o aparecimento de “nano-organismos” ou “nanobes” em amostras de arenito e outros substratos provenientes da Austrália. De acordo com as propriedades encontradas em seus estudos, eles acreditam tratar-se realmente de estruturas biológicas. Estes organismos possuíam características muito semelhantes às isoladas por Kajander e Çiftçioglu (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu *et al.*, 1997b).

No Brasil, Ávila *et al.* (2001) realizaram uma investigação com material de solo proveniente da região de Urucum (Mato Grosso do Sul) e Carajás (Pará), observando estruturas semelhantes às NPC.

2.7. Nanobactérias frente a agentes físicos, químicos e antimicrobianos

NPC calcificadas são muito resistentes à ação química, ao calor, às radiações ultravioleta e gama, podendo sobreviver em estado liofilizado por longos períodos de tempo (Kajander *et al.*, 1997, 1998b; Kajander & Çiftçioglu, 2004). Uma maneira que se mostrou efetiva na eliminação de NPC por agentes químicos foi a desmineralização. A apatita pode ser dissolvida em pH muito baixo ou com quelantes de cálcio, como o EDTA. Em doses elevadas a

irradiação gama é um método eficiente de eliminação de NPC; doses de 3 mega Rad são necessárias para destruí-las completamente (Kajander *et al.*, 1997, 1998b). A utilização tradicional de esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos é um método ineficiente para a esterilização de materiais contaminados com NPC, havendo apenas uma redução na quantidade desses organismos. O mesmo ocorre após tratamento com radiação ultravioleta (Kajander *et al.*, 1997, 1998b; Björklund *et al.*, 1998). O aquecimento a 100 °C por 30 minutos previne o seu crescimento em subcultivos (Kajander *et al.*, 1997).

A apatita biológica está presente na fase mineral das calcificações patológicas (Okazaki & Lê Geros, 1996). Não se conhece ainda o mecanismo pelo qual ocorre esta deposição de sais de cálcio no organismo. No entanto, antibióticos (Selikowitz & Olsson, 1976), bifosfonatos (Bone *et al.*, 1979; Cohen *et al.*, 1998), citrato (Cicerello *et al.*, 1994) e outros agentes quimioterápicos (Bone *et al.*, 1979) têm sido usados com algum sucesso no tratamento de doenças relacionadas a calcificações patológicas.

As cápsulas sólidas de cálcio-apatita que envolvem as NPC lhes conferem proteção contra muitos antibióticos, embora sejam bastante sensíveis às tetraciclina (Çiftçioglu *et al.*, 2002). As tetraciclina são conhecidas por se ligarem ao cálcio. Acredita-se que as tetraciclina ligam-se e acumulam-se sobre o revestimento de cálcio das NPC, persistindo por longos períodos de tempo, o que seria um fator relevante devido ao lento crescimento destes organismos (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu *et al.*, 2002). Por este motivo, as tetraciclina têm sido utilizadas para o tratamento de doenças onde ocorrem

calcificações patológicas, como artrites (Dorrell, 1999), aterosclerose e doenças coronarianas (Maniscalco & Taylor, 2004; Puskas *et al.*, 2005) e cálculos prostáticos (Shoskes *et al.*, 2005).

As NPC também se mostraram sensíveis ao sulfametoxazol-trimetoprim e a nitrofurantoína, que exercem função bactericida, e à ampicilina, que tem função bacteriostática. Em altas concentrações, também foram sensíveis aos aminoglicosídeos (estreptomicina, kanamicina e gentamicina) e seu crescimento foi inibido pelo arabinosídeo citosina, um inibidor da síntese de DNA (Kajander *et al.*, 1997). São, no entanto, altamente resistentes às cefalosporinas, rifocinas, vancomicina, cefalotina, eritromicina e ao cloranfenicol (Kajander *et al.*, 1998b; Çiftçioglu *et al.*, 2002; Kajander & Çiftçioglu, 2004). Recentemente, foi relatado um estudo onde foram utilizados bifosfonatos para inibir o desenvolvimento de aterosclerose, devido ao efeito bactericida destas drogas sobre as NPC. A calcificação das artérias foi induzida em ratos através de tratamento com warfarina que é um anticoagulante. O experimento mostrou que o uso de ibandronato e alendronato que são medicamentos que evitam a reabsorção óssea inibiu completamente a calcificação de todas as artérias e válvulas do coração examinadas após 2 a 4 semanas de tratamento com warfarina. Para os autores, esse resultado sustenta a hipótese de que a calcificação arterial está ligada à perda de massa óssea (Silay *et al.*, 2005). Sommer (2007) acredita que possa haver sinergismo na utilização de agentes químicos e a luz em torno de 1000 Wm que induzem a variações na densidade das camadas nanoscópicas.

No estudo de Shoskes *et al.* (2005) foi feita a análise de prostatites que eram formadas por precipitação de secreção e da calcificação da próstata e foi evidenciada estrutura semelhante a nanobacteria. Para o tratamento dessa patologia foi administrado um antibiótico (tetraciclina), um vetor que lavasse o antibiótico para o interior da mineralização e um agente para dissolver a calcificação EDTA. Todos os pacientes em que foram administrado esse coquetel outro tipo de tratamento não demonstrou eficácia . 80% dos 16 voluntários apresentaram melhora em 3 meses, e foi encontrado em 60% anticorpos de NPC (ELISA) no sangue e 40% na urina.

Para desinfecção de objetos contaminados com NPC, propõe-se a exposição das mesmas a uma solução desinfetante contendo persulfato de potássio e ácido sulfaminóico em água, preferencialmente destilada. Alternativamente, propõe-se a mistura de glutaraldeído, glioxil, ácido glioxílico, cloreto de lauril dimetil benzil amônio em água, de preferência destilada. O estudo propõe que as NPC podem ser erradicadas de líquidos através de ondas de ultra-som, cujo tempo deverá variar conforme a potência do sonicador, além do volume e das características do líquido a ser tratado (Kajander & Çiftçioğlu, 2004).

2.8. Controvérsia

Nanobactérias são consideradas por muitos cientistas como muito pequenas para conter o material genético e enzimático essencial para uma célula manter-se viva (Maniloff, 1997; Neelson, 1997; Psenner & Loferer, 1997; Harvey, 1997). Outros cientistas sustentam que estas minúsculas estruturas

são formadas por processos geológicos e não biológicos, por elas possuírem um tamanho que pode ser até 1000 vezes menor do que o tamanho de bactérias típicas. Cisar *et al.* (2000) acreditam que a aparente replicação das NPC poderia ser devido à cristalização do meio de cultivo e que se tratam de compostos minerais capazes de se auto-replicarem. Os mesmos autores, utilizando a técnica de PCR, contestaram a presença de ácidos nucleicos nas NPC, afirmando que os resultados encontrados por Kajander & Çiftçioglu (1998b), utilizando a mesma técnica, detectaram ácidos nucleicos de um contaminante das amostras.

Alguns autores foram incapazes de detectar antígenos de NPC através da técnica de ELISA em todos os cálculos renais testados (Chan *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2000). Eles também não conseguiram isolar DNA através da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos para a seqüência de RNA 16S publicada como sendo específica de NPC. Estes resultados confirmaram os resultados negativos encontrados por outros pesquisadores (Low *et al.*, 1999). Segundo Cranton (2005), as estruturas denominadas de NPC são apenas micromoléculas cristalinas não vivas, capazes de induzir a produção de anticorpos monoclonais que reajam com as estruturas de sua superfície. Ainda, se elas existirem, não há prova alguma de que elas tenham alguma relação com calcificações patológicas como, por exemplo, placas de ateroma.

Alguns pesquisadores afirmam que os nanorganismos encontrados em superfícies de rochas, minerais, entre outros não teriam o tamanho suficiente para armazenar toda a maquinaria genética para que pudesse sobreviver (Travis, 1998). O limite para a menor estrutura poderia se basear no

tamanho do ribossomo que pode variar em 18 nm. Se adicionarmos uma molécula de DNA ou RNA e diferentes tipos de proteínas chegaríamos ao tamanho de 50 a 100nm. Não está claro como algo significativamente menor a isto poderia realizar a sua reprodução e metabolismo. Se os nanobes estiverem vivos, como controlam suas funções com corpos tão pequenos (Nanjundiah, 2000)?

Drancourt *et al.* (2003) tentaram demonstrar a presença de NPC em cálculos do trato urinário superior utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cultivo. A MEV revelou a presença de “nanopartículas” em todas as amostras analisadas, semelhantes às descritas recentemente como NPC. As colorações de Hoechst 33258 e de Gimenez para análise de ácidos nucléicos e a imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais específicos, não revelaram a presença de tais estruturas. O estudo falhou no isolamento, por cultivo, dos microrganismos conhecidos como NPC e não conseguiu provar a natureza bacteriana dessas “nanopartículas” nos cálculos analisados.

Como mencionado anteriormente, embora sugerido no artigo de Uwins *et al.* (1998) que as estruturas denominadas por eles de “nanobes” se tratam de organismos biológicos, outro autor do mesmo artigo (Taylor, comunicação via eletrônica) discorda desta conclusão e sugere que estas estruturas não seriam biológicas, mas compostos de silicone auto-agregáveis.

Em um estudo recém publicado Raoult *et al.* 2008 acreditam que as nanobacterias não sejam organismos vivos e estas seriam uma proteína anti-

anti-mineralização que estaria na formação destes complexos que auto replicam. Além disso, propõem que se chame estas estruturas de nanons.

Em defesa da existência de NPC como um novo tipo de microrganismo, Aho & Kajander (2003) se referem à dificuldade de se trabalhar com estas estruturas pela ausência de dados publicados e de meios comercialmente disponíveis, assim como de controles positivos e negativos que possam ser facilmente adquiridos para se realizar os testes de identificação. Os autores reforçam a necessidade de mais experimentos e novas idéias em relação à metodologia a ser utilizada para a detecção e caracterização de nano-organismos.

O próprio Kajander (2006) recentemente admitiu que o status de bactéria das “nanobactérias” necessita, ainda, de uma evidência satisfatória e que o termo “nanopartícula calcificada” é a melhor descrição para essa estrutura.

2.9. Detecção e identificação das nanobactérias

Suas propriedades extraordinárias, como a lenta taxa de crescimento e uma parede celular impermeável, tornam difícil sua detecção pelas técnicas microbiológicas convencionais (Kajander *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioglu, 1998b). Para contornar esta dificuldade, têm sido utilizadas metodologias que incluem técnicas de colorações especiais, técnicas de cultivo em condições definidas, métodos imunológicos através do uso de anticorpos monoclonais específicos, microscopia eletrônica, espectroscopia e PCR.

2.9.1. Colorações

As NPC podem ser detectadas através de algumas colorações especiais. A coloração de Gram, quando realizada após fixação do material a 70 °C por 10 min, revelou a presença de partículas fracamente gram-negativas (Kajander *et al.*, 1997). Elas podem ser bem visualizadas com as colorações de Jones e de Bielschowsky (pela prata), coloração por thioflavin-S e pelo vermelho Congo (Kajander *et al.*, 1997). A coloração de von Kossa, que demonstra a presença de cálcio ou sais de cálcio em tecidos ou cultivos celulares, tem sido utilizada juntamente com outras técnicas para determinar a presença de NPC em calcificações patológicas (Çiftçioglu *et al.*, 1998a).

As colorações para ácidos nucléicos incluem coloração de Hoechst 33258, onde se utiliza uma concentração maior do que a usual (5 µg/mL), e a coloração por iodeto de propídio (Kajander *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioglu, 1998b; Çiftçioglu & Kajander, 1998; Khullar *et al.*, 2004).

2.9.2. Cultivo

NPC crescem sob as condições utilizadas em cultivos celulares de mamíferos (Kajander & Çiftçioglu, 2000; Kajander *et al.*, 2001a), porém, podem ser igualmente cultivadas na ausência de células de mamíferos (Çiftçioglu & Kajander, 1998).

2.9.3. Testes imunológicos

2.9.3.1. ELISA

O método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um dos métodos mais simples e mais utilizados para diagnósticos. Utiliza-se esta técnica com o objetivo de se verificar a presença de anticorpos e/ou antígenos.

No caso das NPC, os únicos kits comerciais existentes são fornecidos pela empresa NANOBAC Life Sciences, Inc. (Kuopio, Finlândia) e que foram desenvolvidos para a detecção quantitativa de NPC/antígeno nanobacteriano em plasma/soro humano ou anticorpos IgG anti-NPC, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos e conjugado anti-IgG marcado com peroxidase (<http://www.nanobaclifesciences.com/nanocapture-elisa.asp>).

Este teste de ELISA tem sido utilizado também para detectar NPC em cálculos renais, biofilmes calcificados, amostras de tecidos calcificados após tratamento com EDTA ou outros tipos de amostras. A empresa fornecedora do teste ressalta que nestes casos, no entanto, tais ensaios necessitam ser padronizados pelos usuários.

Diversos pesquisadores utilizaram este kit comercial ou anticorpos monoclonais específicos fornecidos por esta empresa para a detecção de NPC ou antígeno de NPC em diferentes doenças humanas (Çiftçioglu & Kajander, 1998; Breitschwerdt *et al.*, 2001; Khullar *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004; Hudelist *et al.*, 2004; Puskas *et al.*, 2005; Shoskes *et al.*, 2005).

Embora tenhamos tentado obter este kit ou o anticorpo monoclonal específico para utilizá-los em nosso estudo, não foi possível consegui-los

apesar das inúmeras tentativas. Devido à controvérsia sobre a natureza das NPC, este kit foi retirado do mercado.

2.9.3.2. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica, muito usada em laboratórios de patologia, foi utilizada para pesquisa de proteínas de NPC em material proveniente de corpos de psammoma, presentes em tumores de ovário (Hudelist *et al.*, 2004). Houve reação específica com o anticorpo anti-NPC em todas as 8 amostras analisadas.

2.9.3.3. Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência pode ser usado para detectar NPC utilizando-se anticorpos mono ou policlonais específicos. Çiftçioğlu & Kajander (1998) empregaram a técnica de imunofluorescência indireta para estudar a interação de NPC com fibroblastos, utilizando anticorpos monoclonais específicos. Os resultados mostraram que as NPC, após aderirem à superfície celular, são internalizadas e produzem um efeito citotóxico.

A mesma técnica foi utilizada em outro estudo, no qual foram analisados 60 cálculos renais, após desmineralização com HCl 1N. Nas lâminas tratadas com anticorpo monoclonal anti-NPC, foi observada a presença de pequenas estruturas cocóides em todos os cálculos, ao contrário do que ocorreu com o material tratado com outros anticorpos monoclonais não específicos (Çiftçioğlu *et al.*, 1998b).

2.9.3.4. SDS-PAGE/Western blot

A técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) foi utilizada por Khullar *et al.* (2004) para analisar lisados de *pellet* obtidos de cálculos renais desmineralizados. Os autores observaram diversos fragmentos de polipeptídeos com pesos moleculares variando entre 18 e 96 kD, com bandas proeminentes correspondendo a pesos moleculares de 18 kD e 36 kD. No mesmo estudo, esses lisados foram analisados pela técnica de Western blot (Towbin *et al.*, 1979), onde foi observado um fragmento único de 39 kD após tratamento com anticorpo monoclonal específico anti-NPC.

2.9.4. Microscopia ótica e eletrônica

A microscopia de contraste de fase, em aumento de 400x, mostrou ser um bom método para detecção de NPC em cultivos (Kajander *et al.*, 1997).

A microscopia eletrônica é outro método bastante utilizado para a visualização das NPC. Em estudo realizado por Kajander & Çiftçioglu (2000), as NPC foram isoladas diretamente de soro fetal bovino diluído 1:5 em PBS, pelo processo de centrifugação a 40,000 x g por 1 h. Os autores utilizaram microscópio eletrônico de varredura (MEV) equipado com EDX (microanálise por energia dispersiva de raio-X). A Figura 1 mostra NPC em grumos, de um cultivo em DMEM com 10% SFB, observadas ao MEV. A Figura 2 mostra o mesmo material, analisado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Em fibroblastos infectados com NPC, a microscopia eletrônica revelou depósitos de cristais aciculares intra e extracelulares, coráveis com a coloração de von Kossa e lembrando esferas de

cálcio encontradas em calcificações patológicas (Çiftçioglu & Kajander, 1998). A análise por MEV ressaltou a semelhança no tamanho e na morfologia das NPC e das menores unidades dos cálculos renais (Çiftçioglu *et al.*, 1999).

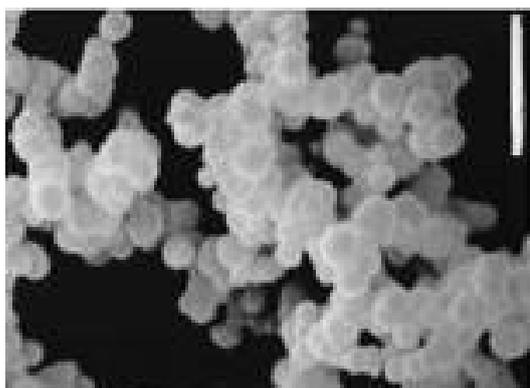


FIGURA 1 – MEV de NPC cultivadas em DMEM com 10% SFB (11000X; barra 1µm) (Kajander & Çiftçioglu, 1998b).

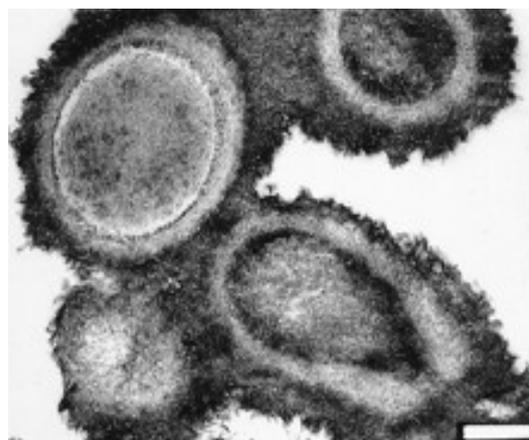


FIGURA 2 – MET de NPC cultivadas em DMEM com 10% SFB após 3 meses (35000X; barra 0,2 µm) (Kajander & Çiftçioglu, 1998b).

A MEV do biofilme retirado de subcultivos de saliva revelou grumos de pequenas partículas cocóides. Da mesma forma, a MET revelou estruturas cocóides semelhantes a células. Detectou-se, por EDX, picos de cálcio e fósforo de partículas individuais dos cultivos de saliva (Cisar *et al.*, 2000).

Em um trabalho onde foi pesquisada a presença de NPC em 10 cálculos retirados do trato urinário superior, observou-se a presença de nanopartículas em 4 cálculos analisados através de MEV. A MET de monocamadas de células 3T6 revelou formações vacuolares intracitoplasmáticas, contendo partículas de 200 a 500 nm em 3 de 10 cultivos celulares (Drancourt *et al.*, 2003). Barr *et al.* (2003) realizaram um experimento para determinar a prevalência da formação de biofilme sob as condições de

cultivos celulares em amostras de soros de gado, cabras, gatos e cães, e determinar a existência de alguma associação entre a formação desses biofilmes e a presença de NPC. Na maioria das amostras de soros ocorreu a formação de biofilmes, onde a MEV e a espectrofotometria revelaram pequenas partículas cocóides, consistindo principalmente de cálcio e fosfato.

A microscopia eletrônica também foi usada na análise de materiais provenientes do meio ambiente e de rochas extraterrestres. Através da análise por MEV e por MET, foram encontradas partículas semelhantes às NPC em meteoritos (McKay *et al.*, 1996; Tsuchiyama, 1996; Folk & Lynch, 1997, 1998; Folk, 1998; Thomas-Keprta, *et al.*, 1998; Sears & Kral, 1998; Benzerara *et al.*, 2003). Da mesma forma, através da análise de rochas terrestres por MEV e MET, verificou-se a presença de estruturas semelhantes a NPC, como se pode observar na Figura 3 (Folk, 1992; Thomas-Keprta *et al.*, 1997; Uwin *et al.*, 1998).

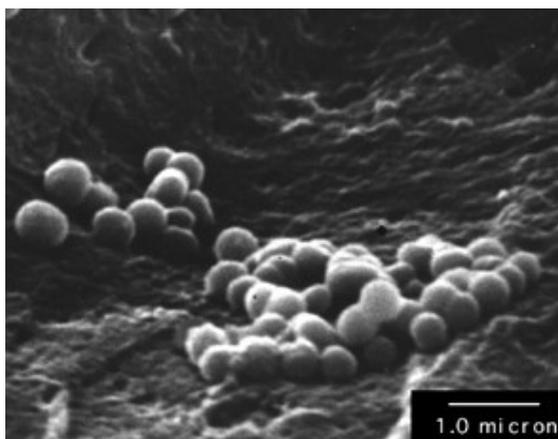


FIGURA 3 – MEV de calcita retirada de fonte de água quente, na Itália (8000X; barra 1 µm) (Fonte = Mississippi State University).

2.9.5. Métodos moleculares

Para detectar o DNA das NPC foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos desenhados a partir de seqüências do rDNA 16S (EMBL X98418 e X98419) de *Nanobacterium sanguineum* (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu & Kajander, 1998).

Com o intuito de analisar proteínas de NPC e expressão genética em amostras de tecidos de ovários com câncer contendo corpos de psammoma, foi realizada PCR com oligonucleotídeos especificamente desenhados para a detecção de elementos genômicos de NPC. Todas as amostras que tiveram resultados positivos para a imunohistoquímica, também exibiram mRNA de NPC. Já as amostras de tecidos de ovários com câncer, que não apresentavam corpos de psammoma e não foram positivos na imunohistoquímica, não revelaram bandas correspondentes à presença de mRNA de NPC. Dessa maneira, demonstrou-se a especificidade da técnica, revelando a presença de NPC exclusivamente em tecidos contendo corpos de psammoma (Hudelist *et al.*, 2004).

Utilizando as mesmas seqüências de oligonucleotídeos de rDNA 16S (EMBL X98418 e X98419) da *Nanobacterium sanguineum* utilizadas por Çiftçioglu & Kajander (1998), Cisar *et al.* (2000) realizaram PCR em material extraído de amostras de cultivos de saliva de humanos. Foi observada amplificação de fragmentos de DNA com o tamanho esperado, após 35 ciclos da PCR. Entretanto, um fragmento de tamanho idêntico foi amplificado nas reações de controle realizadas sem adição de amostra (molde) sugerindo, assim, a detecção de 16S rDNA de um contaminante do ambiente. Esta

possibilidade foi confirmada pela seqüência de nucleotídeos dos produtos da PCR realizada com os controles da reação, que se mostrou idêntica à seqüência rDNA 16S correspondente à bactéria *Pseudomonas sp.* (GenPCank acesso no. AF195876), mas apenas 85,6% de similaridade com a região correspondente da seqüência de *N. sanguineum*.

2.9.6. Outros métodos

Microanálise de energia dispersa de Raio X foi utilizada para a investigação das fraturas topográficas das “nanobactérias”. A estrutura química encontrada para as parcelas de cálcio e fósforo foi similar a encontrada na hidroxiapatita (Kajander e Çifçioğlu, 1998). Cisar e colaboradores em 2000 utilizaram os Raios X aplicados no biolfilme encontrado nos cultivos para verificar a evidência de mineralização e tiveram resultados similares ao Kajander e Çifçioğlu, 1998. Foram detectados picos de cálcio e fósforo em partículas individuais retiradas de seus cultivos, além disso, havia apatita microcristalina similar a encontrada nos ossos humanos.

Por HPLC o hidrolisado de “nanobacteria” apresentou glicose, galactose, aminoderivados, manose e componentes não identificados. Para ácidos nucleicos houveram picos em diferentes tempos de retenção. No espectro de massa foi revelado que esses picos, em adição com a possibilidade de fragmentos de nucleobases, eram fragmentos de alto peso molecular, especialmente em torno de 550 Daltons. Este fragmento é possivelmente derivado de um componente que pudesse agir como um par de ferro ou um par aromático mudando, dessa forma, o tempo de retenção (Kajander, *et al.*, 1997).

2.10. Água utilizada para hemodiálise

Hemodiálise renal é uma técnica que permite a sobrevivência de pacientes com falência renal. Em 1943, o especialista interno W. J. Kolff usou, com sucesso, a primeira máquina de diálise na aplicação clínica em um paciente urêmico. Desde então, o número de pessoas que utilizam os serviços de hemodiálise e seu tempo de sobrevida têm aumentado continuamente (Vorbeck-Meiser *et al.*, 1999). O então chamado “rim artificial” trata o sangue do paciente através de uma membrana semipermeável contra uma solução salina. Assim, há a eliminação do excesso de eletrólitos, algumas sobras tóxicas e água. Nos casos mais sérios de pacientes hemodialisados, aproximadamente 37 metros cúbicos por ano de dialisante (solução salina) entram em contato com o sangue do paciente, ou ainda, 400 litros a cada semana (Arvanitidou *et al.*, 1998). Pelo fato de a água fazer parte de 97% da solução, esta precisa ter características químicas e microbiológicas precisas (Morin, 2000).

A água utilizada nos centros de hemodiálise é geralmente obtida do reservatório de água da comunidade. A água pode vir da superfície ou leitos subterâneos. Ambas as fontes podem conter altas concentrações de endotoxina e bactérias. O tratamento de água da comunidade reduz o número de bactérias na água, mas, geralmente, não reduz significativamente a concentração de endotoxina (Da Silva *et al.*, 1996).

Em função do fato do sangue e dialisado serem separados apenas por uma membrana semipermeável, a qualidade microbiológica da água da diálise e dialisado são extremamente importantes (Da Silva *et al.*, 1996)

Depois do aprimoramento das técnicas de diálise, as doenças infecciosas, especialmente as infecções bacterianas continuam sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes urêmicos tratados com hemodiálise prolongada (Hoen *et al.*, 1995). Nos últimos 30 anos, o número de pacientes que fazem tratamento para doença renal em estágio final, através de hemodiálise, tem aumentado vertiginosamente. Pacientes em hemodiálise crônica têm um maior risco para infecção, porque este processo requer acesso vascular por um período prolongado, além de terem uma limitada excreção renal e um sistema imunológico debilitado (Arvanitidou *et al.*, 1998). Os centros de hemodiálise podem se tornar potencialmente perigosos se microrganismos do ambiente alcançar a corrente sangüínea dos pacientes, (Arnou *et al.*, 1998) seja pelas repetidas oportunidades de transmissão direta ou indireta de pessoa para pessoa de agentes infecciosos, seja através de dispositivos contaminados, equipamentos, provisões, superfícies ou as mãos de pessoal. Além disso, pacientes que passam por hemodiálise apresentam um sistema imune comprometido que faz com que fiquem suscetíveis a numerosas doenças infecciosas e que requerem freqüentes hospitalizações e cirurgias que aumentem as oportunidades para a exposição às infecções concomitantes (Arvanitidou *et al.*, 2003).

O aspecto microbiológico de um tratamento de diálise começou a ser levado em conta a partir do momento que foi demonstrado que o excesso de certas bactérias no dialisante era responsável por reações pirogênicas e por bacteremia (Morin, 2000), também, pela descoberta de que níveis moderados de produtos bacterianos em fluidos de diálise podem estimular a produção de

citosinas. Estas podem levar a inflamações subagudas e, conseqüentemente, podem causar algumas complicações, em longo prazo, em pacientes hemodialisados. Portanto, houve uma procura por melhorar a qualidade microbiológica de fluidos de diálise visando à diminuição dos altos níveis de endotoxinas e citosinas (Levebo *et al.*, 1999).

A contaminação microbiana mais freqüente encontrada em água de diálise é bacteriana e seus produtos de degradação como as endotoxinas e peptídeoglicanos. Entretanto, fungos, vírus e protozoários também podem ser encontrados ocasionalmente (Pontoriero *et al.*, 2003).

Numerosos surtos de infecção por bactérias Gram negativas no cenário de hemodiálise têm sido relatados, e a desinfecção inadequada da água tem sido apontada como uma possível fonte destes surtos. Portanto, bactérias Gram negativas de água podem ser contaminantes significativas no sistema de hemodiálise e praticamente todas as estratégias de desinfecção e esterilização são dirigidas para esse grupo de microrganismos (Arvanitidou *et al.*, 2003).

No decorrer da diálise, o fluido usado para o procedimento é enriquecido pela adição de nitrogênio e carbono que são produtos residuais da diálise, provenientes do sangue do paciente (Favero *et al.*, 1974). Esse processo gera um ambiente que pode favorecer o crescimento bacteriano.

Em todos os centros de diálise soluções de hipoclorito de sódio, de dióxido de cloro ou de formaldeído são usados na desinfecção do sistema de diálise (Favero *et al.*, 1974). Entretanto, o ácido acético e o hipoclorito de sódio

podem, na verdade, favorecer a produção da matriz inorgânica do biofilme (Dasgupta, 2002).

Biofilmes estão envolvidos na maioria das infecções bacterianas em humanos, incluindo infecções relatadas por dispositivos médicos como os cateteres. Para o desenvolvimento de infecção por biofilme são necessários vários fatores predisponentes: uma fonte de contaminação bacteriana, uma superfície para a aderência bacteriana e um fluido onde a bactéria possa crescer e obter constante nutrição para formação e aderência do biofilme. Em pacientes hemodialisados, essas condições são facilmente encontradas: uso de cateteres e enxertos artérios-venosos possibilitando a entrada de bactérias na pele e a superfície para a adesão bacteriana. Além disso, os fluidos de diálise que passam pelo circuito de hemodiálise providenciam o ambiente necessário e o suporte nutricional para o crescimento de microcolônias de biofilme (Dasgupta, 2002). Atualmente, a chave para esse problema é a desinfecção profilática a fim de evitar a formação dessas comunidades bacterianas (Levebo *et al.*, 1999).

Um número padrão de qualidade química e microbiológica tem sido proposto. As mais amplamente aceitas são as recomendações da Associação para o Avanço da Instrumentação Médica (AAMI) e da Farmacopéia Européia (EP). Ambos determinaram níveis bem restritos para contaminação química, enquanto para a microbiológica houve uma diferença substancial. A AAMI recomenda níveis de contaminação microbiana inferior a 200 UFC/mL e 2 IU/mL para toxinas. A EP recomenda parâmetros mais restritos como

crescimento microbiano inferior a 100 UFC/mL e para endotoxina menor que 0,25 IU/mL (Vorbeck-Meiser *et al.*, 1999 e Pontoriero *et al.*, 2003).

A osmose reversa é um excelente tratamento para a qualidade química e microbiológica da água (Cappelli *et al.*, 1998) e é baseada num processo de filtração no qual a água é empurrada por uma alta pressão através de uma membrana semipermeável que é capaz de rejeitar a maioria dos contaminantes: mais de 95 a 98% de sais dissolvidos, mais de 99% de bactérias, endotoxinas e substâncias com peso molecular de mais de 200 Daltons. A membrana de osmose reversa deve passar por periódicas desinfecções e ser limpa em ordem para evitar o risco de contaminação no seu lado limpo. No entanto, se a integridade da membrana de osmose reversa estiver danificada, muitos microrganismos poderão passar através dela (Arvanitidou *et al.*, 1998). Além disso, a desinfecção deve envolver todos os canos de distribuição do sistema, incluindo as linhas de entrada para as máquinas de diálise (Pontoriero *et al.*, 2003).

Em 1996, na cidade de Caruaru, Pernambuco, ocorreu o primeiro caso brasileiro de morte por cianobactéria hepatotóxica. A água que chegava à clínica era proveniente do sistema de tratamento de água do Estado. Após a chegada à clínica, a água era tratada pelo sistema de purificação que consistia nas seguintes etapas: areia, carbono, um filtro de troca ânion/cátion seguida por uma filtração por microporos. Nesse processo não foi utilizada a osmose reversa, evidenciando, dessa maneira, a importância dessa etapa na qualidade microbiológica da água (Azevedo *et al.*, 2002).

O sistema de água do equipamento de hemodiálise, freqüentemente, é contaminado com micróbios provenientes de uma manutenção inadequada de tanques e canos da máquina de hemodiálise (Oie *et al.*, 2003 e Humar *et al.*, 1996), evidenciando, dessa maneira, que novas medidas de prevenção e precaução quanto a contaminações microbiológicas devem ser tomadas para evitar que surtos epidemiológicos acometam os pacientes que são usuários deste sistema.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL: Verificar a presença de nanopartículas calcificadas e de microrganismos em sistemas de hemodiálise e em diferentes materiais biológicos.

3.2. ESPECÍFICOS:

3.2.1. Verificar a presença de nanopartículas calcificadas em material de cultivos celulares;

3.2.2. Verificar a presença de nanopartículas calcificadas e de microrganismos em amostras de água após o processo de tratamento por osmose reversa, nos filtros utilizados em hemodialisadores e no soro de pessoas submetidas à hemodiálise;

3.2.3. Análise de material biológico humano calcificado, tais como, cálculos renais, calcificação pulpar e calcificações de aorta para verificar a presença de nanopartículas calcificadas por microscopia eletrônica de varredura;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi executado nos laboratórios de microbiologia e de virologia do Departamento de Microbiologia-ICBS-UFRGS e do IPVDF-FEPAGRO, Eldorado do Sul. As análises por microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Corrosão do Departamento de Metalurgia da UFRGS.

4.1. Material biológico analisado

4.1.1. Linhagens celulares

Foram examinadas amostras de 19 linhagens celulares provenientes dos estoques do Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF-FEPAGRO, Eldorado do Sul, RS) (Tabela 2). Células foram cultivadas em frascos de 75 cm² (NUNC) contendo Meio Essencial Mínimo de Eagle (D-MEM, Gibco-BRL, Long Island, New York, USA), suplementado com soro bovino fetal 10 % e enrofloxacina 0,001% (Baytril-Bayer, São Paulo, SP). Os frascos foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C. As células foram tripsinizadas (tripsina 0,05%, Gibco-BRL, Long Island, New York, USA) e sub-cultivadas a cada 3 a 5 dias.

Tabela 2. Linhagens celulares analisadas neste estudo.

Linhagens Celulares	Fornecedores
BHK – BAYER	Laboratório Bayer Porto Alegre, RS, Brasil
BT	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
CER	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
CRFK	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
EBTR	Holanda (Lelystad)
HEP – 2	Centro de Biotecnologia – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil
MDBK (ATCC 22)	Faculdade de Veterinária – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil
MDCK	Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, SP, Brasil
MDCK	Laboratório Virologia Animal, Centro Ciências Agrárias, UEL, PR, Brasil
MMTV	Cultura Primária de Tumor Mamário (preparado em nosso laboratório)
N ₂ A	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
NS1	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
PK ₁₅	ATCC
PK ₁₅	Faculdade de Veterinária – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil
RK ₁₃	Tübingen, Alemanha
SK ₆	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
SP20	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido
TT	Cultura Primária Testiculos de Vítela (preparado em nosso laboratório)
VERO	Agencia Central de Veterinária, Surrey, Reino Unido

4.1.2. Amostras de suplemento de cultivos celulares

Alíquotas de 1 mL de 8 lotes de soro de diferentes procedências e 1 lote de outro tipo de suplemento foram adicionadas a frascos de 25 cm² contendo 9 mL de D-MEM (Gibco-BRL, Long Island, New York, USA) e incubados a 37 °C por até 12 semanas. Meio de cultura (D-MEM) sem adição de SBF foi incubado sob as mesmas condições, servindo como controle. Além disso, 2 mL de cada lote testado foram incubados a 37 °C, sem adição de D-

MEM, por até 12 semanas. A procedência dos lotes de suplemento analisados neste estudo é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Material utilizado como suplemento de cultivo celular analisado neste estudo.

Material	Fornecedor
AMNIOMAX-C100 Lot n° 1107512	GIBCO-BRL, New York, USA
SBF Lot n° 004/00	CULTILAB, Campinas, SP, Brasil
SBF Lot n° 013/04	CULTILAB, Campinas, SP, Brasil
SBF Lot n° 014/04	CULTILAB, Campinas, SP, Brasil
SBF Lot n° 40F6245K	GIBCO-BRL, Long Island, New York, USA
SBF Lot n° 40G3329K	GIBCO-BRL, Long Island, New York, USA
Soro Equino	Fac. Veterinária-UFSM, Santa Maria, RS, Brasil
Soro Vitela – pool	IPVDF, Eldorado do Sul, RS, Brasil
Pool soro bovino inativado com etilenimine binário	Laboratório Líder, Porto Alegre, Brasil

SBF: soro bovino fetal

4.1.3. Água proveniente de equipamentos de hemodiálise

Este material foi proveniente de dois hospitais da Grande Porto Alegre, RS. Foram coletadas, em recipiente estéril, 27 amostras da entrada e 27 amostras da saída de equipamentos de hemodiálise, além de 8 amostras após a passagem pela osmose reversa.

No Hospital B foram coletadas também 27 amostras da entrada e 27 da saída dos equipamentos de hemodiálise e 6 amostras da osmose reversa, com o mesmo objetivo citado anteriormente.

As amostras foram obtidas em dias diferentes, intercalando-se as semanas e os meses de março a dezembro de 2007. As amostras foram transportadas e mantidas em caixa de isopor com gelo até o momento do processamento.

Para o processamento das amostras de água colocou-se 0,1 mL de cada amostra na superfície do meio TSA (Tryptone Soy Agar- Biobrás) para bactérias heterotróficas e ágar Sabourand (Biobrás) com cloranfenicol para a pesquisa de leveduras, solidificados em placa de Petri. O inóculo foi, então, espalhado uniformemente na superfície do meio através da utilização de um bastão de vidro especial, chamado de alça de Drigalski (Arduino, M.J. *et al.*, 1991a). As placas foram inoculadas em estufa a 37°C para o TSA durante 48 horas para bactérias e a 25°C durante sete dias para o meio de leveduras. Além desse procedimento, foi feita uma pesquisa específica para *Pseudomonas* sp. onde 50 mL de água proveniente da osmose reversa e da entrada da água na máquina de hemodiálise foram passados por um filtro de porosidade de 0,42 µm e este cultivado em ágar Cetremide (Biobrás) que é um meio especial para o crescimento desse microrganismo.

Para a quantificação dos microrganismos foi feita manualmente a contagem do número de colônias presentes em cada placa. O valor de UFC (unidades formadoras de colônias) encontrado em 0,1 mL foi convertido para UFC/mL. Esta conversão possibilita verificar se as amostras apresentam a quantificação permitida em água de diálise, que deve ser inferior ou igual a 200 UFC/mL para amostras provenientes da osmose reversa e da entrada do equipamento de hemodiálise, e de 2000 UFC/mL para água da saída. Para leveduras qualquer valor é significativo (Arduino *et al.*, 1991, 1991b).

Para a detecção de NPC foi cultivado 1mL de água em caldo BHI à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ durante 4 meses. Após esse período as

amostras que apresentaram turbidez foram submetidas a microscopia eletrônica.

4.1.4. Soros humanos

Foram analisadas 85 amostras de soro humano provenientes de dois hospitais da Grande Porto Alegre, RS. Todas as amostras foram provenientes de pacientes com problemas renais e a quantidade utilizada foi de 1 mL. Deste total, 30 foram suplementadas com 4 mL caldo BHI (Bióbrás, São Paulo) e 55 amostras foram incubadas diretamente a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Nem todas as amostras foram suplementadas com BHI devido ao risco de contaminação e inibição do crescimento que esse processo poderia gerar. Após seis meses de incubação as amostras que independentemente turbidez foram filtradas em uma única membrana semipermeável de 0,42 µm. Para evitar a evaporação das mesmas durante o cultivo a cada mês as amostras eram acrescidas de 1 mL de caldo BHI. Após esse procedimento o filtro seria analisado por microscopia Eletrônica de Varredura. Além disso, uma parcela do filtro da máquina de hemodiálise foi cultivada em BHI à 37 °C com atmosfera de 5%, se após 6 semanas não apresentasse turbidez seriam submetido a MEV.

4.1.5. Cálculos renais

Foram analisados 52 cálculos renais gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Teodósio da Ros, provenientes da Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS. Todos os cálculos foram analisados diretamente por MEV, após

leve trituração. Somente alguns (os maiores) foram cultivados em 5 mL de meio BHI e incubados a 37 °C em 5% CO₂ por até 20 semanas.

4.1.6. Calcificações de válvulas de aorta

Foram analisadas diretamente por MEV, 4 amostras de válvulas aórticas calcificadas provenientes do Bloco Cirúrgico Cardíaco da Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS.

4.1.7. Nódulos pulpaes

Os 2 nódulos pulpaes analisados diretamente por MEV foram obtidos a partir de tratamentos de canais de molares e pré-molares, onde foram encontrados os mesmos. Este material foi gentilmente cedido pelo Dr. Renato Remi Kehl da Clínica Fossil, situada na Avenida Assis Brasil (Shopping Lindóia), Porto Alegre-RS.

4.2. Microscopia

Foram utilizadas as técnicas de Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para a análise das amostras.

4.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar amostras de suplemento de cultivos celulares, cálculo renal, calcificações de válvula aórtica, nódulos pulpaes, soros de hemodialisados, água utilizada para diálise e para o teste da hidroxiapatita.

Para dissolver os cálculos renais, esses foram tratados inicialmente com HCl 1M por 14-16 horas e, após neutralização com NaOH 1M, centrifugados em tubos Eppendorf. Os *pellets* foram lavados 3 vezes com PBS, sendo cada lavagem intercalada por centrifugação a 10000 x g (Sigma 2K15) por 10 min.

Os *pellets* assim obtidos, após ressuspensão em 0,1 mL de PBS, foram transferidos para lâminas, deixados secar à temperatura ambiente e fixados com glutaraldeído 1,25% (Merck) em PBS 0,5 M contendo sacarose 4% por 16 horas a 4 °C. Após várias lavagens em PBS, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 90 e 100%), à temperatura ambiente, por 40 minutos em cada concentração. Após serem tratadas com acetona (Merck) por 20 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secar, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 a 40 nm (Sputtering-Balzers Union ScD040) antes de serem examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (Philips E.M. 301).

Os cálculos renais, assim como as calcificações de aorta e os nódulos pulpaes também foram analisados por MEV diretamente, sem tratamento prévio das amostras com HCl, simplesmente por trituração.

4.3. Teste para dissolução da hidroxiapatita de NPC

Para a dissolução da hidroxiapatita que envolve as nanobactérias seria necessário, segundo Kajander *et al* (2006), tratamento com HCl 1M por alguns minutos à temperatura ambiente. Entretanto, em nosso estudo esse método se mostrou ineficaz no tratamento de NPC provenientes de cultivo em

soro fetal bovino, mesmo com o material ficando em contato com HCl *overnight*. Foram, então, tentadas outras alternativas sendo testados HCl nas concentrações de 1, 2,5 e 5 M em períodos de 10, 30 e 60 minutos.

5. RESULTADOS

5.1. Amostras de linhagens celulares

Todas as 19 linhagens celulares analisadas mostraram uma progressiva deterioração após um tempo de incubação de 1 a 4 semanas. A microscopia revelou a presença de partículas extra e intracelulares (granulações) e um número crescente de células mortas e de degenerações celulares, que permaneceram aderidas ao fundo do frasco de cultivo. Essas partículas podiam também ser vistas nos sobrenadantes dos cultivos, muito agrupadas e variando de tamanho com movimentos brownianos. A Figura 4 mostra uma imagem de células MDBK com NPC agrupadas, após 4 semanas de incubação a 37 °C.

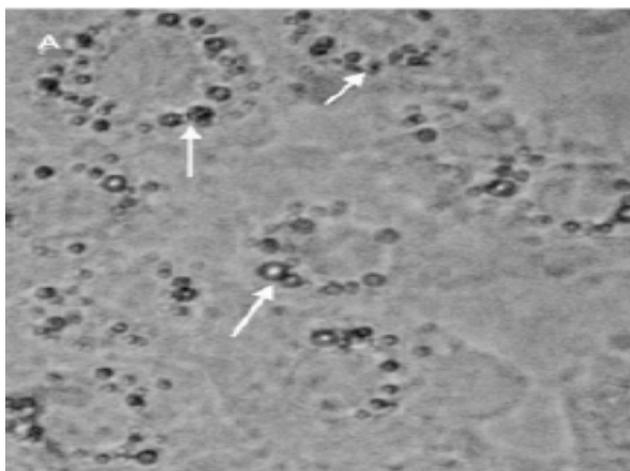


FIGURA 4 – Cultivo celular após 4 semanas de incubação a 37 °C. Setas indicam NPC (400X).

A análise por MEV dos cultivos celulares revelou estruturas com tamanhos variáveis, menores do que 500 nm, esféricas ou ovóides, isoladas ou agrupadas (Figura 5).

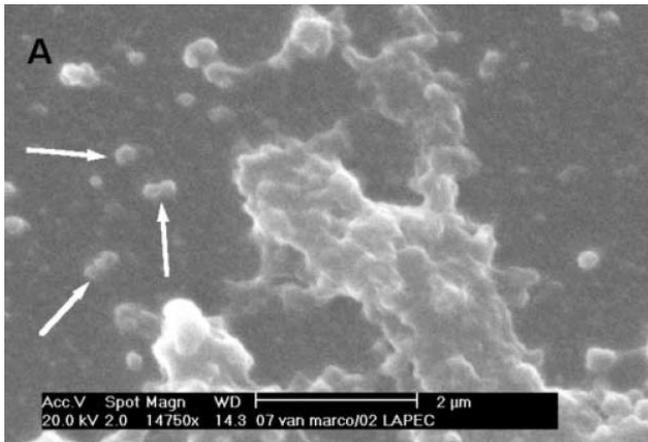


FIGURA 5 – Imagem, ao MEV, de cultivo de células MDBK após 8 semanas de incubação a 37 °C. Setas indicam NPC (Barra: 2 μm, 14000X).

Não foi observada a presença de bactérias, fungos ou vírus durante a análise deste material.

5.2 Amostras de suplemento de cultivos celulares

Após 2 meses de incubação, 8 de 9 lotes (89%) usados como suplemento de cultivos celulares incubados a 37 °C sem adição de D-MEM se mostraram opalescentes (Figura 6A) e evidenciaram um sedimento esbranquiçado após 12 semanas de incubação (Figura 6B). Com adição de D-MEM o mesmo material apresentou aspecto similar quando incubado nas mesmas condições, que não foi observado em D-MEM sem a adição de soro (resultados não mostrados).



FIGURA 6 – Aspecto do soro bovino fetal (SBF) antes e após incubação a 37°C por 8 semanas. “A” Soro fetal bovino antes (tubo da esquerda) e após (tubo da direita) 8 semanas de incubação a 37 °C; “B” Sedimento esbranquiçado após 12 semanas de incubação a 37°C.

Por MEV foi possível observar pequenas estruturas cocóides nas amostras examinadas diretamente, ou seja, sem nenhum tratamento prévio após 8 semanas de incubação em D-MEM a 37 °C (Figura 7 e 8).

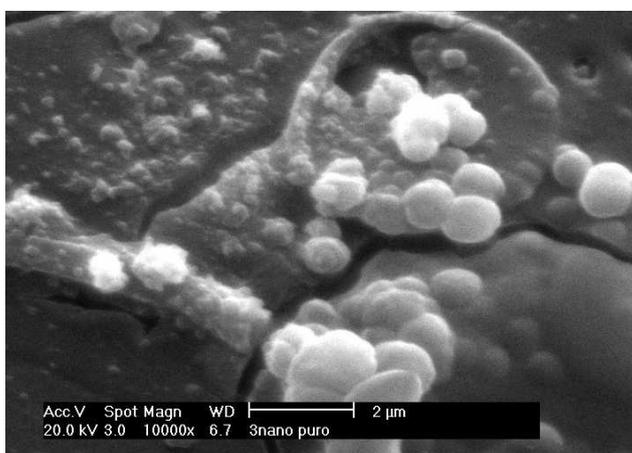


FIGURA 7 – Imagem, ao MEV, de SBF após 8 semanas de incubação a 37 °C. Podem ser observadas estruturas cocóides sugestivas de NPC (Barra: 2 µm, 7000X).



FIGURA 8 - Imagem, ao MEV, de SBF cultivado em D-MEM após 8 semanas de incubação a 37 °C (Barra: 2 µm, 18500X).

5. 3. Água proveniente de equipamentos de hemodiálise

Das 122 amostras analisadas nenhuma apresentou crescimento de microrganismos ou de estruturas sugestivas de NPC. Para confirmação, algumas amostras foram analisadas por MEV, não sendo observadas estruturas sugestivas de NPC.

No Hospital A tivemos duas amostras de osmose reversa e uma de entrada da máquina de hemodiálise com valores acima do recomendado pela Secretaria de Saúde. Porém, todas as outras ficaram dentro dos padrões estabelecidos. No Hospital B nenhuma amostra apresentou valores superiores preconizados (Tabela 4).

Tabela 4 – Pontos de coletas de acordo com os hospitais e microrganismos procurados. PA: *Pseudomonas aeruginosa*; BC: *Bulkoderia cepacia*; LI: *Listeria* sp., LE: Leveduras

Ponto de Coleta	Hospital A				Hospital B				Total
	PA	BC	LI	LE	PA	BC	LI	LE	
Osmose reversa	1	–	1	–	–	–	–	–	2
Entrada-máquina	–	1	–	–	–	–	–	–	1
Saída-máquina	–	1	–	–	–	–	–	–	1
Total	1	2	1	–	–	–	–	–	4

No Hospital A foi detectada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em uma amostra da água submetida à osmose reversa (Tabela 4). O outro gênero bacteriano encontrado neste tipo de amostra foi *Listeria* spp. Também, foi identificada *Bulkoderia cepacia* em outra amostra proveniente da entrada e da saída da máquina de hemodiálise.

Em nenhuma das amostras coletadas de todos os pontos dos dois Hospitais foi detectada a presença de leveduras.

Das 122 amostras coletadas em 97% não foi detectado qualquer tipo de microrganismo, o que demonstra a qualidade da água dos Centros de Hemodiálise onde foram coletadas as amostras (Tabela 5) e evidencia que os serviços de hemodiálise prestados por esses dois hospitais estão de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Saúde.

Tabela 5 – Total das amostras e pontos coletados. Número de amostras aprovadas e reprovadas

Pontos	Aprovadas	Reprovadas	Total
Entrada	53	1	54
Saída	53	1	54
O.R.	12	2	14
Total	118(97%)	4(3%)	122(100%)

5. 4. Soros humanos

Os soros de pacientes submetidos a sessões de hemodiálise não revelaram crescimento de microrganismos ou a presença de estruturas sugestivas de NPC. Também não foram observadas tais estruturas nos filtros de 0,42 µm submetidos ao cultivo e da máquina de hemodiálise.

5. 5. Cálculos renais

Em 45 dos 52 cálculos renais analisados foram visualizadas pequenas estruturas, morfológicamente semelhantes às nanobactérias descritas na literatura, denominadas de NPC neste estudo (Figura 10). A Figura 11 mostra NPC encontradas em um cálculo renal, após tratamento com HCl 1M.

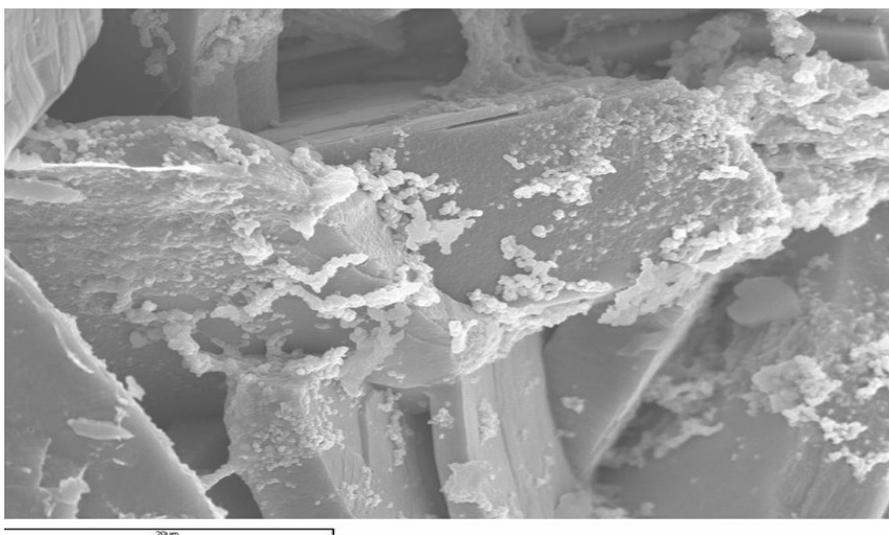


FIGURA 9 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal analisado sem tratamento prévio por HCl, mostrando estruturas aglomeradas sobre a superfície de cristais de oxalato de cálcio. (Barra: 20 μm, 3450X).

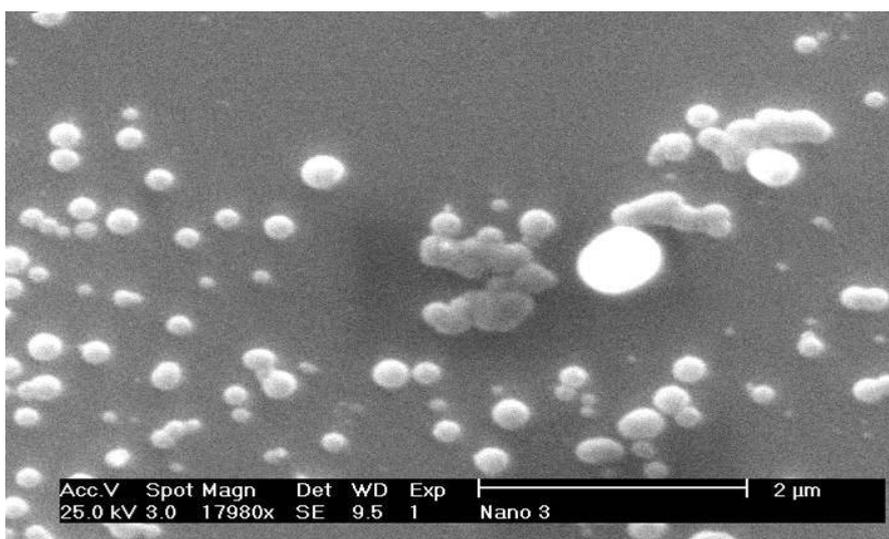


FIGURA 10 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal após tratamento com HCl. Pode-se observar estruturas isoladas e agrupadas com tamanho inferior a 500 nm (Barra: 2 μm, 15000X).

Nas Figuras 12 e 13 pode-se observar a presença de estrutura sugestiva de biofilme após trituração de dois cálculos renais de pacientes diferentes.

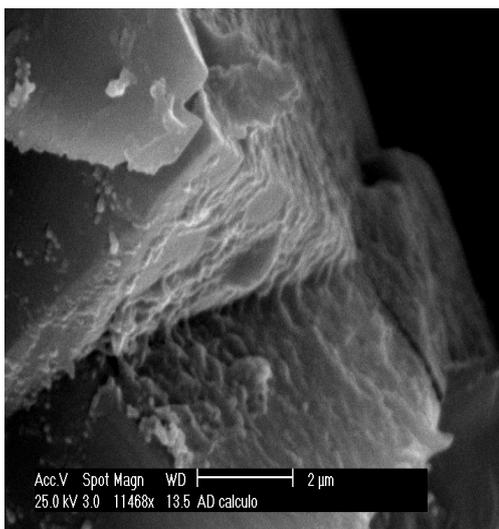


FIGURA 11 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal com a presença de estrutura sugestiva de biofilme após trituração do material. (Barra: 2 μm, 10750X).

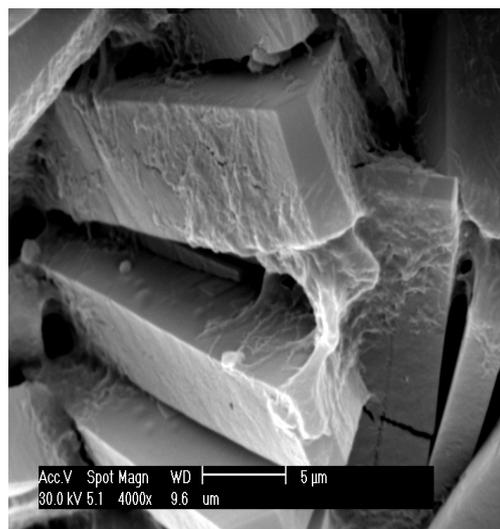


FIGURA 12 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal com a presença de estrutura sugestiva de biofilme após trituração do material. (Barra: 2 μm, 3800X).

5. 6. Calcificações de válvulas de aorta

Não foram verificadas estruturas sugestivas de NPC no material analisado (resultados não mostrados).

5. 7. Nódulos pulpares

Não foram verificadas estruturas sugestivas de NPC no material analisado (resultados não mostrados).

5.8. Teste para dissolução da hidroxiapatita de NPC

Para se tentar dissolver a camada de hidroxiapatita da NPC foram tentadas 3 concentrações de ácido clorídrico (1; 2,5 e 5 Molar), tratando-se o material por 10, 30 e 60 minutos. Mesmo após 1 hora de tratamento com a

solução 5 M de HCl, não houve dissolução do material analisado após análise por microscopia eletrônica (resultados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Contaminantes de cultivos celulares são um problema enfrentado por laboratórios que necessitam de células para seus experimentos. Há algum tempo vinha sendo notada em nossos laboratórios de virologia a presença de um contaminante que, ao microscópio ótico, se apresentava na forma de granulações sobre as células e em vacúolos citoplasmáticos, assim como no sobrenadante, onde apresentava movimento browniano. As células atingidas por esse contaminante demonstravam certas alterações após algum tempo de cultivo e morriam. Com amostras destes cultivos contaminados foram realizados vários testes utilizando-se meios tradicionais de cultivo e de coloração para a detecção de bactérias, mas os resultados foram negativos. Também os testes para a detecção de *Mycoplasma spp* e vírus mais freqüentemente encontrados em cultivos celulares revelaram resultados negativos.

Ao revisar a literatura para analisar as possíveis causas de contaminação de cultivos celulares, verificou-se que dificuldades semelhantes já haviam sido descritas por um grupo de pesquisadores finlandeses (Akerman *et al.*, 1997), quando trabalhavam com cultivos celulares de longo tempo e detectaram a presença de partículas semelhantes a bactérias. Os autores verificaram que a contaminação era proveniente do soro utilizado como suplemento do cultivo celular. Após extensivos estudos para a identificação dessas estruturas através de microscopia eletrônica, testes bioquímicos e moleculares, esses pesquisadores concluíram que se tratava de bactérias às quais denominaram de nanobactérias (NPC), pertencentes ao subgrupo alfa-2

de *Proteobacteria* (Kajander *et al.*, 1997). Estudos posteriores realizados por este mesmo grupo investigaram a interação de NPC com células de mamíferos, observando uma internalização desses organismos e um efeito citotóxico sobre fibroblastos mantidos em cultura (Çiftçioglu & Kajander, 1998; Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Tais resultados foram obtidos por microscopia eletrônica e por imunofluorescência indireta, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos.

A partir destes dados da literatura, começamos a analisar amostras dos cultivos celulares suspeitos ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Como se pode observar nas Figuras 4 e 5, estas estruturas se mostravam morfológicamente muito semelhantes com as encontradas pelo grupo finlandês e, por isso, passamos a utilizar o termo Nano-Partículas Calcificadas (NPC) para designá-las.

A seguir, as amostras de suplementos celulares de diferentes procedências foram cultivados e incubados por 12 semanas. Após este tempo de incubação, 8 dos 9 (89%) tubos contendo os suplementos de cultivos celulares mostravam um aspecto opalescente a olho nu e um sedimento esbranquiçado após várias semanas de incubação (Figura 6). Analisando-se este material por MEV podia se observar estruturas cocóides com tamanho inferior a 500 nm (Figuras 7 e 8). Nos estudos de Kajander *et al.* (1997), foi detectada a presença de NPC em mais de 80% dos lotes comerciais de soro fetal bovino analisados. Nestes estudos foi também mencionado que o problema principal com NPC em cultivos celulares ocorreu em experimentos de longos períodos e quando elas estavam presentes em altas concentrações em

relação às células. Este tipo de contaminação encontrado em nossos laboratórios foi relatado recentemente (Simonetti *et al.*, 2007) e temos notícia de que em outros laboratórios do Brasil, pesquisadores também enfrentam dificuldades na manutenção de cultivos celulares por longo tempo (comunicação pessoal).

Na água utilizada para hemodiálise não foi encontrada nenhuma amostra sugestiva de NPC. Isto pode ter acontecido por causa da baixa bacteremia que os pacientes analisados teriam. Outra hipótese pode ser que não ocorra a migração das NPC para a água que faz a “purificação” do sangue de pacientes hemodialisados.

No Hospital A tivemos as únicas amostras positivas para a pesquisa de bactéria heterotróficas onde foram identificadas bactérias da família *Pseudomonas* que é o mais isolado em águas tratadas para diálise, solução dialisadora e dialisado (Avarantirou *et al.* 2003 e Zunino *et al.* 2002). Uma das amostras positivas encontradas foi na água de amostra da osmose reversa onde o microrganismo achado foi uma *P. aeruginosa* o que vai de acordo com o achado de Simões e colaboradores (Simões *et al.* 2003) que encontrou 19 amostras positivas das 200 coletadas. Em 1996 em Campina, São Paulo, ocorreu um surto de bacteremia por *P. aeruginosa* em uma unidade de hemodiálise. Foram analisadas amostras de água e dialisado e, também, houve a realização da hemocultura dos pacientes afetados, confirmado a presença da mesma cepa de *P. aeruginosa* na amostra de água e no sangue dos pacientes (Pisani *et al.* 2003).

Outro fator que pode introduzir esse gênero bacteriano nas linhas de diálise são os acessos venosos por cateteres. Estes, muitas vezes, apresentam diversas complicações que incluem a manifestação de eventos como septicemia, trombos e endocardite (Savani *et al.* 2007).

Esse gênero de microrganismo cresce facilmente em ambientes com poucos recursos nutricionais, sendo dessa maneira, o mais isolado das amostras provenientes de hemodiálise e podem causar diversas reações adversas nos pacientes hemodialisados. Os fatores de virulência expressos pela *P. aeruginosa* incluem a produção, síntese de enzimas, hemolisinas que degradam o tecido do hospedeiro e a camada mucóide (Simões *et al.* 2003).

A cápsula mucóide possibilita aderência à superfície mucosa normal, através da interação do alginato com o material mucóide similar que recobre a superfície da mucosa (Keuh *et al.* 2005). Além disso, a cápsula tem a habilidade de prevenir a atração dos leucócitos para o sítio de infecção, de não ativar o complemento e de aumentar a atividade oxidativa dos neutrófilos, contribuindo para a patogênese da infecção crônica (Sadikot *et al.* 2005). Permite, também, a formação de microcolônias fortemente aderidas e recobertas por um material espesso constituído pelo próprio alginato, LPS e proteínas, denominado de biofilme (Suci *et al.* 1994).

A outra amostra positiva encontrada na entrada e saída da máquina de osmose reversa pertencente à mesma coleta foram identificadas com *Burkholderia cepacia*, antigamente pertencente à família das Pseudomonas.

Membros do complexo da *Burkholderia cepacia* são taxonomicamente complexos, mas apenas o complexo isolado do trato respiratório de pacientes

com fibrose cística tem sido amplamente estudados. Entretanto, esse gênero foi isolado no Hospital da Beneficência Portuguesa de São Paulo de 28 pacientes que utilizam o serviço de hemodiálise deste hospital (Souza *et al.* 2004) o que entra em concordância com os nossos resultados.

A principal responsável pela bacteremia policlonal de *B. cepacia* no Hospital da Beneficência Portuguesa em pacientes com complicações renais crônicas foi apontado como sendo a contaminação da membrana da osmose reversa (Souza *et al.* 2004).

Outro achado de *B. cepacia* em surtos de bacteremia em unidades de diálise e que vai de acordo com os nossos resultados foi o estudo de Magalhães e colaboradores (Magalhães *et al.* 2003).

O outro gênero bacteriano encontrado na água pertencente à osmose reversa é do gênero *Listeria* spp. Este microrganismo é um bacilo gram-positivo que produz um grande número de toxinas e é facilmente encontrado na formação de biofilme.

Os fungos durante a última década surgiram como principal causa de infecções adquiridas em ambiente hospitalar (Arvanitidou *et al.* 2000). Entretanto, todas as nossas amostras foram negativas para leveduras o que contradiz Simões e colaboradores (Simões *et al.* 2003) que das 153 amostras coletadas 25 foram positivas para esses microrganismos. As espécies encontradas foram *Cândida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorulas* e *Aureobasidium* sp.

Das 122 amostras coletadas tivemos 97% de amostras negativas para algum tipo de organismo o que demonstra a qualidade da água dos Centros de Hemodiálise onde foram coletadas as amostras (Tabela 5). Além disso, apenas

3% das amostras se mostraram positivas reforçando que os serviços de hemodiálise prestados por esses dois hospitais estão de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Saúde que segue os padrões da Associação para o Avanço da Instrumentação Médica (AAMI) e, o mais importante, estão qualificados para atender as necessidades de suas comunidades. Entretanto, estudos realizados na Espanha apontam que os valores para determinação dos níveis de corte para o limite máximo permitido para bactérias e endotoxinas em amostras de água das unidades de hemodiálise deveriam ser padronizados de acordo com cada região (Lemos *et al.* 1999).

A utilização do meio de cultura TSA ao invés do R2A foi devido ao foco principal do trabalho que foram à pesquisa de patógenos potencialmente oportunistas. O TSA é excelente para o crescimento de microrganismos que possam vir causar algum tipo de patologia e seleciona as bactérias que crescem bem a uma temperatura média de 37°C. O R2A é mais utilizado para a pesquisa de todos os tipos de microrganismos, ou seja, tem o objetivo de verificar a microbiota presente nas amostras de água independentemente de que possam causar algum tipo de injúria aos pacientes que se submetem ao tratamento de hemodiálise (Van der Linder *et al.* 1999).

É possível que os seres humanos estejam expostos rotineiramente às NPC. Um estudo realizado por Hjelle *et al.* (2000) demonstrou que 5% de 1000 voluntários apresentavam bacteremia e este mesmo trabalho afirma que o fato de o rim ter dificuldade de filtrar o sangue (dano renal) ocasionou uma taxa de 80% de nanobacteremia em pacientes hemodialisados. Estes

resultados não foram comprovados em nosso estudo, pois nenhuma das amostras de soro de pacientes que utilizam o serviço de diálise apresentou qualquer estrutura que pudesse sugerir ser NPC.

Essa divergência pode ter acontecido devido aos diferentes níveis de deficiência renal que os pacientes se encontravam em cada estudo. Em outras palavras, se uma pessoa apresenta uma menor taxa de filtração renal, maior a possibilidade de se encontrar estruturas semelhantes às NPC. Além disso, outro fator que devemos levar em conta é o número de sessões que cada paciente foi submetido por semana e a duração da mesma. Esses fatores poderiam fazer com que o sangue estivesse mais “diluído” diminuindo, dessa forma, as chances de se encontrar NPC, mas não necessariamente porque a pessoa em questão não tivesse estruturas semelhantes às NPC em sua corrente sanguínea.

Um fato interessante é a capacidade que as NPC têm de biomineralização que, em cultivos celulares, resultou na formação de biofilmes e agregados minerais (Kajander *et al.*,1997). Neste estudo, também observamos a presença de uma espécie de biofilme nas paredes dos frascos e tubos de cultura após incubação (Figura 6B). Este material analisado por MEV mostrou pequenas estruturas arredondadas isoladas ou agrupadas (Figuras 7 e 8), muito semelhantes morfológicamente às relatadas por Kajander e seu grupo (Figura 1). Através da análise química e da micro-análise de Raios-X por energia dispersiva (EDX) foi verificado que todas as fases de crescimento das NPC produzem apatita biogênica no seu envelope celular, material que é encontrado na maioria dos tecidos onde há calcificação (Çiftçioglu &

Kajander,1998). O mesmo estudo demonstrou, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a presença de uma espessa camada que revelou um alto conteúdo de carbonato-apatita quando analisada pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformador de Fourier (FTIR). Infelizmente não foi possível realizar, até o momento, estes tipos de análises em nosso material, devido à falta de acesso a esses equipamentos.

Devido a essa propriedade de calcificação das NPC, surgiu o interesse em se pesquisar a presença destas estruturas em diferentes materiais de origem humana e avaliar a sua possível relação com condições patológicas onde ocorrem calcificações (Carson, 1998). Diversos trabalhos foram realizados para detectar a presença de NPC em cálculos renais (Çiftçioglu & Kajander, 1998; Çiftçioglu *et al.*, 1999; Drancourt *et al.*, 2003). No presente estudo foram analisados 52 cálculos renais humanos, 4 calcificações de aorta e 2 nódulos pulpaes. Foi utilizada técnica de MEV para a análise dos cálculos renais após trituração ou tratamento com HCl. Observou-se a presença de pequenas estruturas cocóides de tamanho e morfologia semelhantes às NPC descritas na literatura em 45 dos 52 cálculos (86%). É interessante observar a disposição dessas estruturas, na maior parte das vezes aglomeradas, quando o cálculo foi somente triturado e analisado diretamente (Figura 10). Já em cálculos renais tratados com HCl 1M, pode-se visualizar estruturas semelhantes, geralmente isoladas (Figura 11). Nas Figuras 12 e 13 pode-se observar a presença de estrutura sugestiva de biofilme após trituração de dois cálculos renais de pacientes diferentes e análise direta por MEV. Até o

momento, não foi relatada ou mostrada na literatura a presença de biofilme diretamente em cálculos renais.

Ryall (2008) encontrou estruturas semelhantes as NPC também em rins saudáveis o que a partir desse ponto fica a questão de que se essas estruturas são responsáveis pelo início do processo de formação de cálculo renal.

Os pacientes com problemas renais apresentam um estado fisiológico diferenciado, pois estes têm altos níveis de fósforo e cálcio o que facilitaria o processo de calcificação. Além disso, a idéia de um patógeno circulante persistente, cuja via de eliminação é a renal e que tem a capacidade de produzir hidroxiapatita, se torna coerente com o elevado número de cálculos renais encontrados em pacientes com problemas renais, já que estes apresentam problemas de retenção de líquidos (López-Brea *et al*, 2000).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica causada em parte pelo metabolismo anormal de lipídios na parede arterial. Entretanto, evidências sugerem que a infecção microbiana poderia contribuir para a inflamação e progressão da doença. Além disso, a calcificação das paredes arteriais aumenta a severidade da doença que, atualmente, é um dos maiores problemas de saúde que afeta a população de todas as classes (Çiftçioğlu *et al.*, 2003). A calcificação do tecido arterial humano com presença de placas ateromatosas é um acontecimento freqüente e tende a aumentar com a idade, podendo desencadear problemas cardiovasculares. Os mecanismos da calcificação vascular continuam desconhecidos, mas Çiftçioğlu *et al.* (2003) relataram a presença de NPC em artérias calcificadas, aneurisma aórtico e em

válvulas cardíacas, utilizando a técnica de microscopia eletrônica e imunohistoquímica. Tal achado foi confirmado por Miller et al (2004) que analisaram 8 calcificações de aorta, através de cultivo das amostras em DMEM, imunohistoquímica e MEV; em todas as amostras foram encontradas evidências da presença de partículas com características semelhantes às das NPC. Também, em um estudo de caso Piper *et al.* (2006) relataram a presença de NPC em uma válvula mitral de uma paciente com diabetes, entretanto na pesquisa de 20 amostras de pacientes que se submeteram a recolocação de válvula a presença de NPC não foi demonstrada por MET nem por pesquisa de DNA de nanobactéria feita por PCR. Bratos-Péres *et al.* (2008) analisaram 75 válvulas com estenose cardíaca e encontraram estruturas semelhantes às NPC em 48 válvulas, sendo que não encontrou nenhuma dessas estruturas nas 8 válvulas controles.

Em nossas amostras de calcificação de aorta não terem sido identificadas estruturas semelhantes as NPC. Isto pode ser em decorrência ao baixo número de amostra. Outro ponto que pode ter interferido é o fato de que as amostras foram congeladas e analisadas em torno de 20 semanas após a retirada desse material.

Recentemente tem se suspeitado da relação de doença periodontal com alterações coronarianas e arteriais periféricas, embora haja controvérsia a respeito deste assunto. Em um trabalho de Hung *et al.* (2003) foi mencionado que a doença arterial periférica é desencadeada provavelmente por reação inflamatória na região bucal. Foi sugerido que bactérias que colonizam a região bucal e que causam a periodontite ativariam os leucócitos a iniciarem uma

resposta liberando mediadores inflamatórios que, por sua vez, contribuiriam para o desenvolvimento de doença coronariana. Em uma revisão recente (Ford *et al.*, 2007), foram discutidas várias hipóteses para explicar a etiologia das doenças cardiovasculares e sua possível interação com doença periodontal: suscetibilidade individual, resposta inflamatória com liberação de citosinas e mediadores inflamatórios, infecção direta dos vasos sanguíneos e pela possibilidade de haver reação imune cruzada/mimetismo molecular entre antígenos bacterianos e do próprio indivíduo.

Na pesquisa de Cisar *et al.* (2000) utilizando 27 pacientes foram observadas estruturas sugestivas de NPC em 8 amostras de placa dental e em 11 amostras de saliva. Ainda neste estudo, a análise do biofilme raspado das garrafas do subcultivo de saliva por MEV revelou a presença de estruturas cocóides semelhantes às NPC. Porém, esses autores refutam a possibilidade dessas estruturas serem bactérias.

Em amostras de nódulos pulpaes não foram evidenciadas estruturas semelhantes NPC isto pode ser em decorrência do baixo número de amostras ou porque essas estruturas cocóides estariam presentes mais no interior do nódulo. Além disso, não foram pesquisados antígenos anti NPC o que favoreceria para uma discordância em nossos resultados e os achados por Çiftçioglu *et al.* (2003) que em um estudo preliminar confirmaram a presença de antígenos de NPC em 18 nódulos pulpaes analisados.

Pelos estudos publicados até hoje, embora a grande controvérsia existente sobre a sua natureza, não se deve descartar a possibilidade de que NPC ou NPC existam em diversos materiais calcificados e que possam estar

envolvidas na etiologia de algumas doenças. Se isso realmente for verdadeiro, é importante que se aprofunde os conhecimentos sobre esta relação com doenças e possíveis tratamentos.

Devido às suas propriedades extremófilas, as NPC são resistentes a altas temperaturas, à irradiação gama e a repetidos congelamentos. Tratamento com HCl ou EDTA retiram a camada de cálcio que existe ao seu redor, tornando as NPC viáveis e “virulentas”. Dessa forma, elas ficam vulneráveis, duplicando sua taxa de crescimento e iniciam uma nova formação de biofilme para sua proteção (Kajander & Çiftçioğlu, 2000). No presente estudo testou-se várias concentrações de HCl por diferentes tempos em amostras de NPC retiradas de cultivo. Não foi possível, se obter uma desmineralização mesmo em concentração alta de HCl por tempo prolongado (resultados não mostrados). O que se pode concluir é que, pelo menos quando submetidas ao cultivo, as NPC apresentam grande resistência à dissolução por HCl

Desinfetante como formaldeído, hipoclorito, hidróxido de sódio e glutaraldeído não possuem efeito sobre a taxa de crescimento ou replicação das NPC. Privá-las de nutrientes apenas fazem com que elas diminuam a taxa de crescimento e entrem na fase latente (Kajander & Çiftçioğlu, 2004).

Antibióticos comumente usados não têm efeito sobre as NPC. Doses tóxicas de aminoglicosídeos diminuem sua taxa de crescimento, mas apenas por um tempo. Os melhores resultados encontrados por Çiftçioğlu *et al.* (2002) foram obtidos com a tetraciclina-HCl. A tetraciclina, por ser quelante de cálcio, é capaz de agir contra as NPC. Recentes relatos informam os benefícios de

terapias de longo prazo com tetraciclina em pacientes com esclerodermia ou com aterosclerose. Kulhall (2004) relatou a sua experiência com pacientes portadores de doença coronariana grave, aos quais aplicou o protocolo descrito para NPC, que utiliza quelantes de cálcio. O uso de EDTA combinado com tetraciclina regrediu significativamente os níveis de cálcio desses pacientes no coração, acabando com sua angina, resultado que não havia sido conseguido com outros tratamentos testados anteriormente.

Apesar da possibilidade de que NPC sejam agentes etiológicos de calcificação extra-esquelética, existem controvérsias em relação à existência de tais bactérias e seu papel na biomineralização. Um dos pontos mais polêmicos para muitos na comunidade científica é o pequeno tamanho das NPC, cerca de 10 a 100 vezes menor do que o da maioria das bactérias conhecidas até hoje. Segundo alguns autores, seria impossível para uma célula deste tamanho conter os componentes macromoleculares necessários para uma célula viva, que exigiriam um diâmetro mínimo de 140 nm (Maniloff, 1997; Neelson, 1997; Psenner, 1997). Outros autores questionam o papel das NPC na biomineralização, afirmando que este processo pode ser iniciado por macromoléculas não-vivas e auto-replicáveis (Cisar *et al.*, 2000). Os mesmos autores, utilizando a técnica de PCR, contestam a presença de ácidos nucléicos nas “nanobactérias”. Alguns estudos revelaram a presença de ácidos nucléicos nas NPC pelo uso de corantes específicos, como o corante de Hoechst 33258 e o iodeto de propídio (Kajander *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioğlu, 1998; Çiftçioğlu & Kajander, 1998; Khullar *et al.*, 2004). Outros

demonstraram que as NPC possuem material genético através da técnica de PCR (Hudelist *et al.*, 2004).

De acordo com dados da literatura, as NPC encontram-se distribuídas na natureza. Através de estudos, já foi detectada a presença de tais estruturas em locais como solos e fontes de água natural (Rozak & Colwell, 1987), em minerais como a calcita e a aragonita (Folk, 1992), no arenito (Uwins *et al.*, 1998) e em rochas extraterrestres (McKay *et al.*, 1996; Tsuchiyama, 1996; Folk & Lynch, 1997; Thomas-Keprta *et al.*, 1998; Benzerara *et al.*, 2003).

Se essas estruturas chamadas de NPC forem realmente organismos vivos, seu significado quanto aos processos terrestres é complexo e profundo. NPC poderiam ser mediadoras de muitos processos atualmente tidos como sendo controlados por reações químicas e, além disso, poderiam estar no controle de processos como as calcificações extra-esqueléticas. Elas têm sido encontradas em sangue de animais e de humanos, o que pode ter implicações tanto em pesquisas básicas, como na qualidade dos produtos biotecnológicos e em doenças humanas.

De acordo com Taylor, A.P. coautor no artigo de Uwins *et al.* publicado em 1998, os “nanobes” e possivelmente as NPC são uma forma de “silicone autoprodutivo” (semelhantemente à hipótese da associação das ribozimas que iniciaram o mundo do RNA). Para ele, se as NPC fossem formas de vida de DNA-RNA-proteína normais, pelo grande número de grupos de pesquisa que vêm trabalhando nisso já teria sido relatada a presença destas moléculas há muitos anos (comunicação via eletrônica).

Não se sabe ainda se as NPC são realmente bactérias, mas o fato é que elas estão presentes como contaminantes em cultivos celulares, SBF e em soro de diferentes animais e podem replicar-se em cultivo. Apesar de não podermos afirmar que as estruturas encontradas no presente estudo sejam realmente NPC ou NPC, elas são muito semelhantes às aquelas descritas na literatura no que diz respeito ao seu tamanho e morfologia.

7. CONCLUSÕES

Em 8 dos 9 lotes de suplementos de cultivo observou-se turvação após algumas semanas de incubação a 37°C com a presença de sedimento no fundo dos frascos.

A análise destes sedimentos por MEV revelou partículas cocóides, minúsculas, isoladas e aglomeradas, muito semelhantes às descritas na literatura como sendo nanobactérias.

Todas as 19 linhagens celulares analisadas mostraram uma progressiva deterioração após um tempo de incubação de 1 a 4 semanas. A microscopia revelou a presença de partículas extra e intracelulares (granulações) e um número crescente de células mortas e de degenerações celulares, que permaneceram aderidas ao fundo do frasco de cultivo.

Das 122 amostras de água proveniente do serviço de hemodiálise tivemos 97% de amostras negativas para algum tipo de organismo o que demonstra a qualidade da água dos Centros de Hemodiálise onde foram coletadas as amostras.

A análise dos cálculos renais por MEV também mostrou estruturas semelhantes às nanobactérias em 86% do material (45/52).

A análise por MEV dos soros de pacientes hemodialisados, das calcificações de aorta e dos nódulos pulpaes não evidenciou estruturas semelhantes com NPC.

O teste de hidroxiapatita mesmo na concentração de 5 M e no tempo de 6 minutos não se mostrou efetivo para a desmineralização das NPC.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gostaríamos de salientar a importância da continuação desse estudo, uma vez que foram analisadas poucas amostras de calcificação de aorta e nódulos pulpaes e os mesmos materiais não apresentaram evidências de NPC. Além disso, a análise desses materiais por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para saber a composição desses materiais seria uma ferramenta importante para conhecer os procedimentos que levam à formação dessas estruturas.

Outro estudo de grande valor sobre esse assunto seria no sentido de um melhor entendimento sobre a formação do biofilme e sua possível relação com as NPC em diversos tipos de materiais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGABABOV, R.M.; ABASHINA, T.N.; SUZINA, N.E.; VAINSHTEIN, M.B.; SCHWARTSBURD, P.M. Link between the early calcium deposition in placenta and nanobacterial-like infection. **Journal of Biosciences**, India, v. 32, n.6, p.1163-1168, 2007.

AHO, K. & KAJANDER, E.O. Pitfalls in the detection of novel nanoorganisms. Letters to the Editor. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.41, n.7, p.3460-3461, 2003.

AKERMAN, K.K.; KUIKKA, J.T.; ÇIFTÇIOĞLU, N.; PARKKINEN, J.; BERGSTRÖM, K.A.; KURONEN, I.; KAJANDER, E.O. Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit. **SPIE-The International Society for Optical Engineering**, Estados Unidos da América, v.3111, 1997.

ALLEN, C.C.; THOMAS-KEPRTA, K.L.; MCKAY, D.S.; CHAFETZ, H.S. Nanobacteria in carbonates. **Lunar and Planetary Science XXVII**, Estados Unidos da América, 1997.

ARDUINO, M. J.; BLAND L.A.; AGUERO, S.M.; CARSON, L.; RIDGEWAY, M.; FAVERO, M.S. Comparison of microbiologic assay methods for hemodialysis fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.29, p.592-594, 1991b.

ARDUINO, M. J.; BLAND, L.A.; AGUERO, S.M.; FAVERO, M.S. Effects of Incubation Time and temperature on microbiologic sampling procedures for hemodialysis fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.29, p.1462-1465, 1991a.

ARNOW, P.M.; GARCIA-HOUCHINS, S.; NEAGLE, M. B.; BOVA, J. L.; DILLON, J.J.; CHOU, T.; An outbreak of bloodstream infections arising from hemodialysis equipment. **The Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos da América, 178: 783-91, 1998.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; KATSINAS, C.; PANGIDIS, P.; CONSTANTINIDS, T.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; VAYONAS, G. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centers of Greece. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Reino Unido e Estados Unidos da América, v.13, p.949-954, 1998.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; VELEGRAKI, A.; PAZARLOGLOU, M.; KANETIDIS, D.; PANGIDIS, P.; ASKEPIDI, N.; KATSINAS, C.; VAYONAS, G.; KATSOUYANNOPOULOS, V. High level of recovery of fungi from water and Dialysate in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, Reino Unido e Estados Unidos da América, v.45, p.225-230, 2000.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of greek multicenter study. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v.95, p.180-185, 2003.

ÁVILA, J. M; TAKEHARA, L.; CHEMALE, J.R. Investigation of “nanobacteria” in banded iron formations by Scanning Eletron Microscopy: an example from Urucum and Carajás, Brazil. **Acta Microscopica**, Supplement A, November 2001.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Estados Unidos da América, 181-182: 441-446, 2002.

BARR, S.C.; LINKE, R.A.; JANSSEN, D.; GUARD, C.L; SMITH, M.C.; DAUGHERTY, C.S.; SCARLETT, J.M. Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos da América v.64, n.2, p.176-182, 2003.

BASTOS-PÉRZ, M.A.; SANCHEZ, P.L.; GARCÍA DA CRUZ, S.; VILLACORTA, E.; PALACIOS, I.F.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; DI STEFANO, S.; ORDUÑA-DOMINGO, A.; CARRASCAL, Y.; MOTA, P.; MARTÍN-LUENGO, C.; BERMEJO, J.; SAN RONAN, J.A.; RODRÍGUEZ-TORRES, A.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F.; on behalf of GRUPO AORTICA (GRUPO DE ESTUDIO DE LA ESTENOSIS AÓTICA). Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. **European Heart Journal**, Espanha, v.29, n.3, p.371-376, 2008.

BENZERARA, K.; MENGUY, N.; GUYOT, F.; DOMINIC, C.; GILLET, P. Nanobacteria-like calcite single crystals at the surface of the Tataouine meteorite. **PNAS**, França, v.100, n.13, p.7438-7442, 2003.

BJÖRKLUND, M.; ÇIFTÇIOĞLU, N.; KAJANDER, E.O. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. **Proceeding SPIE International Society Optical Engineering**, Estados Unidos da América, v.3441, p.123-129, 1998.

BONE, H.G. III ; ZERWEKH, J.E. ; BRITTON, F. ; PAK, C.Y.C. Treatment of calcium urolithiasis with diphosphonate: efficacy and hazards. **Journal of Urology**, Estados Unidos da América, v.121, p.568-571, 1979.

BREITSCHWERDT, E. B.; SONTAKKE, S.; CANNEDY, A.; HANCOCK, S.I.; BRANDLEY, J.M. Infection with Bartonella weissii and detection of nanobacteria antigens in a North Carolina beef Herd. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.39, p.879-882, March 2001.

CAPPELLI, G.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A. water quality for on-line haemodiafiltration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Reino Unido, Estados Unidos da América e Japão, 13 [Suppl 5]: 12-16, 1998.

CARSON, D.A. An infectious origin of extraskeletal calcification. **Proceeding National Academy of Scienci the United States of America \ Commentary**, Estados Unidos da América, v.45, n.14, p.7846-7847, 1998.

CHAN D.; JARRET, T.; KAVOUSSI, L. Nanobacteria: role in human renal calculi disease. **Journal of Endourology**, Estados Unidos da América, BRS2-11, A7, 1999. 17th World Congress on Endourology and SWL, 1999.

CICERELLO, E.; MERLO, F.; GAMBARO, G.; MACCATROZZO, L.; FANDELLA, A.; BAGGIO, B.; ANSELMO, G. Effect of alkaline citrate therapy on clearance of residual renal stone fragments after extracorporeal shock wave lithotripsy in sterile calcium and infection nephrolithiasis. **Journal of Urology**. Estados Unidos da América, v.151, p.5-9, 1994.

ÇIFTÇIOĞLU, N. & Kajander, E.O. Interaction of Nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Estados Unidos da América, v.4, p. 259-270, 1998.

ÇIFTÇIOĞLU, N. Another debate in viral vaccines: nanobacterial contamination. 101st General Meeting of the American Society for Microbiology, Finlândia, Session 078/Y Paper Y-3, 2001.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; BJORKLUND, M. ; KAJANDER, E.O. Stone formation and calcification by nanobacteria in human body, **Proceeding SPIE**, Estados Unidos da América, v. 3441, p.105-111, 1998a.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; ÇIFTÇIOĞLU, V.; VALI, H.; TURCOTT, E.; KAJANDER, E.O. Sedimentary rocks in our mouth: Dental pulp stones made by Nanobacteria. **Proceeding Of Spie Reprint**, Estados Unidos da América, v.3441, 1998b.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; HADDAD, R.S.; GOLDEN, D.C.; MORRISON, D.R.; McKAY, D.S. A potencial cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity. **Kidney International**, Estados Unidos da América, v.67, p.483-491, 2005.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; KURONEN, I.; AKERMAN, K.; HILTUNEN, E.; LAUKKANEN, J.; KAJANDER, E.O. A new potencial threat in antigen and antibody products: Nanobacteria. p.99-103 in: **Vaccines 97 Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, Estados Unidos da América, 1997a.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; McKAY, D.S. Overview of biomineralization and nanobacteria. **Lunar and Planetary Science XXXVI**, Estados Unidos da América, 2005.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; MCKAY, D.S.; KAJANDER, E.O. Association between Nanobacteria and periodontal disease. **Circulation**, Estados Unidos da América, v.108, n.8, p.58, 2003.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; MILLER-HJELLE, M.A.; HJELLE, J.T.; KAJANDER, E.O. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos da América, v.46, n.7, p.2077-2086, 2002.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; MÖNKKÖNEN, M.; MILLER-HJELLE, M.A.; HJELLE, J.T.; KAJANDER, E.O. Nanobacterium sanguineum (NS) antibiotic susceptibility tests and evidence of cytotoxicity of NPC isolates from patients with polycystic kidney disease. In: **Proceeding of the Ameriam Society of Microbiology**, Estados Unidos da América, General Meeting; 30 May-3 June 1999; Chicago: abstract A-114, p.24, 1999.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; PELTTARI, A.; KAJANDER, E.O. Extraordinary growth phases of Nanobacteria isolated from mammalian blood. **Proceeding SPIE**, Estados Unidos da América, v.3111, p.429-435, 1997b.

CISAR, J.O.; XU, D.Q.; THOMPSON, J.; SWAIM, W.; HU, L.; KOPECKO, D.J. An alternative interpretation of nanobacteria induced biomineralization. **Proceeding Natlional Acadademic Sciences of the United States of America**, Estados Unidos da América, v. 97, n.21, p.11511-11515, 2000.

COHEN, H.; SOLOMON, V.; ALFERIEV, I.S.; BREUER, E.; ORNOY, A.; PATLAS, N.; EIDELMAN, N.; HÄGELE, G.; GOLOM, B.G. Bisphosphonates and tetracycline: experimental models for their evaluation in calcium-related disorders. **Pharmaceutical Research**, Estados Unidos da América, v.15, p.606-613, 1998.

CONTE, V. A.; GRASES, F.F.; COSTA-BAUZÁ, A.; PIZÁ, R.P. Microinfections and kidney lithiasis. **Archivos Españoles de Urología**, Espanha, v.54, n.9, p.855-60, 2001.

CORIELL, L.L.; Methods of prevention of bacterial, fungal, and other contaminations, in: J. Fogh (Ed.), Contamination of Tissue Culture, **Academic Press**, Estados Unidos da América, p. 29-47, 1973.

CRANTON, E.M. Alleged nanobacteria do not cause calcification of arterial plaque. <http://drccranton.com/nanobacteria.htm>, 2005.

DA SILVA, A.M.M.; MARTINS, C.T.B.; FERRABOLI, R.; JORGATTI, V.; ROMÃO JÚNIOR, J.E. Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, Brasil, v.18, n.2, p.180-188, 1996.

DASGUPTA, M. K. Biofilms and infections in dialysis pacientes. **Seminars in Dialysis**, Estados Unidos da América, Vol 15, 5: 338-346, 2002.

DEMIR, T. Is there any relation of nanobacteria with periodontal disease? **Medical Hypotheses**, Estados Unidos da América, v.70, n.1, p. 36-39, 2008.

DORRELL, S. Nanobacteria linked to kidney disease. **Molecular Medicine Today**, Estados Unidos da América, v.5, September, 1999.

DOYLE, P. Nanobacteria in vaccines made of BSE - Possible bovine material, Disponível em: <www.rense.com/general32/poss.htm>. Acesso em: 09 abril 2006.

DRANCOURT, M.; JACOMO, V.; LÉPIDI, H.; LECHEVALLIER, E.; GRISONI, V.; COULANGE, C.; RAGNI, E.; ALASIA, C.; DUSSOL, B.; BERLAND, Y.; RAOULT, D. Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.41, n.1, p.368-372, 2003.

FAVERO, M; S.; CARSON, L. A.; BOND, W. W.; PETERSEN, N. J. Factors that influence microbial contamination of fluids associated with hemodialysis machines. **Applied Microbiology**, Estados Unidos da América, v.28, n.5, p.822-830, 1974.

FOLK, R. L. & LYNCH, F. L. Morphology of nannobacterial cells in the Allende carbonaceous chondrite, *in* Hoover, R. B., ed., Instruments, methods, and missions for astrobiology. **Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers**, Estados Unidos da América, v. 3441, p. 112-122, 1998.

FOLK, R. L. Bacteria and nannobacteria revealed in hardgrounds, calcite cements, native sulfur, sulfide minerals, and travertines. **Geological Society of America, Abstracts with Programs**, Estados Unidos da América, v. 24, p. 104, 1992.

FOLK, R. L. Dolomite and dwarf bacteria (nannobacteria) (abstract). In: **Geol. Soc. of Am. Annual Meeting**, Estados Unidos da América, Program Abstracts, A-397, 1993a.

FOLK, R. L. Nanobacteria: surely not figments, but what under heaven are they? **Natural Science**, Estados Unidos da América, v.1, article 3, 1997.

FOLK, R.L. Nannobacteria and the formation of framboidal pyrite: Textual evidence. **Journal of Earth Systems and Scienc**, Estados Unidos da América, v. 114, n.º 3, p. 369-374, 2005.

FOLK, R. L. Precipitation of opal-CT lepispheres, chalcedony and chert nodules by nannobacteria (dwarf bacteria) (abstract). In: **Geol. Soc. of Am. Annual Meeting**, Estados Unidos da América, Program Abstracts, A-305, 1995.

FOLK, R. L. SEM imaging of bacteria and nannobacteria in carbonate sediments and rocks. **Journal of Sedimentary Petrology**, Estados Unidos da América, v. 63, p. 990-999, 1993b.

FOLK, R.L. & LYNCH, F.L. Nannobacteria are alive on Earth as well as Mars. In: R.B. Hoover (Editor), **Proceedings SPIE**, Estados Unidos da América, v.3111, p.406-419,1997.

FOLK, R.L. 50-100 nm carbon balls in Allende meteorite morphologically identical to nanobacterial colonies on Earth. **Lunar and planetary science XXIX**; Proceedings of the 29th Lunar and Planetary Science Conference, Estados Unidos da América, 1998.

FORD, P.J.; YAMAZAKI, K. & SEYMOUR, G.J. Cardiovascular and oral disease interactions: what is the evidence? **Primary Dental Care**, Estados Unidos da América, v.14 (2), p.59-66, 2007.

GARCIA CUERPO E.; KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOĞLU, N; CASTELLANO, F.L.; CORREA, C.; GONZÁLVEZ, J.; MAMPASO, F.; LIAÑO, F.; GARCIA DE GABIOLA, E.; BARRILERO, E.A. Nanobacteria. An experimental neolithogenesis model. **Archivos Españoles de Urología**, Espanha, v.53, n.4, p.291-303, 2000.

GUNDESLIOĞLU, O.; ALTUNDAG, O.; ALTUNDAG, K. Nanobacteria and breast implant contracture and calcification: a hypothesis. **Aesthetic Plastic Surgery**, Estados Unidos da América, v.29, p.582, 2005.

HARVEY, R.P. Nannobacteria: What is the evidence? **Natural Science**, Estados Unidos da América, v.1, p.7, 1997.

HIROTA, S.; NAKAJIMA, Y.; YOSHIMINE, T.; KOHRI, K.; NOMURA, S.; TANEDA, M.; HAYAKAWA, T.; KITAMURA, Y. Expression of bone-related protein messenger RNA in human meningiomas: possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Estados Unidos da América, v.54, p.698-703, 1995.

HJELLE, J. T. ; MILLER-HJELLE, M.A.; POXTON, I.R.; KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOĞLU, N.; JONES, M.L.; CAUGHEY, R.C.; BROWN, R.; MILLIKIN, P.D.; DARRAS, F.S. Endotoxin and Nanobacteria in polycystic kidney disease. **Kidney International**, Estados Unidos da América, v.57, p.2360-2374, 2000.

HOEN, B.; KESSLER, M.; HESTIN, D.; MAYEUX, D. Risk factors for bacterial infections in chronic haemodialysis adult patients: a multicenter prospective survey. **Nephology Dialysis Transplantation**, Estados Unidos da América, 10: 377-381, 1995.

HUDELIST, G.; SINGER, C.F.; KUBISTA, E.; MANAVI, M.; MULLER, R.; PSICHINGER, K.; CZERWENKA, K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenic role in intratumoral biomineralization. **Histopathology**, Estados Unidos da América, v.45, p.633-637, 2004.

HUMAR, A.; OXLEY, C.; SAMPLE, M. L.; GARBER, G. Elimination of an outbreak of Gram-negative bacteremia in a hemodialysis unit. **American Journal of Infection Control**, Estados Unidos da América, 24: 359-63, 1996.

HUNG, H.C.; WILLETT, W.; MERCHANT, A.; ROSNER, B.A.; ASCHERIO, A.; JOSHIPURA, R.J. Oral health and peripheral arterial disease. **Circulation**, Estados Unidos da América, v. 107, p. 1152-1157, 2003.

KAJANDER, E.O. & ÇİFTÇIOĞLU, N. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Estados Unidos da América, v. 4, p.259-270, 1998b.

KAJANDER, E.O. & ÇİFTÇIOĞLU, N. Methods for eradication of nanobacteria. **United States Patent 6706290**, 2004.

KAJANDER, E.O. & ÇİFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria as extremophiles. **Proceeding SPIE International Society Optical Engineering**, Estados Unidos da América, v.3755, p.106-112, 2000.

KAJANDER, E.O. & ÇİFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. **Proceeding National Academy of Scienci of the United States of America**, Estados Unidos da América, n.95, v.14, p. 8274-8279, 1998a.

KAJANDER, E.O. Nanobacteria – Propagation calcifying nanoparticles. **Letter of Appled of Microbiology**, Estados Unidos da América, v.12, p.549-552, 2006.

KAJANDER, E.O. ; BJÖRKLUNO, M.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Suggestions from observations on nanobacteria isolated from blood. **National Academy of Sciences**, Estados Unidos da América, panel 2, 2001a.

KAJANDER, E.O. ; ÇİFTÇIOĞLU, N ; MILLER-HJELLE, M.A. ; HLELLE, J.T. Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. **Current Opinion of Nephrology Hypertens**, Estados Unidos da América, v.10, p.445-452, 2001b.

KAJANDER, E.O.; BJÖRKLUND, M.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. **Proceeding SPIE International Society Optical Engineering**, Estados Unidos da América, v.3441, p.123-129, 1998b.

KAJANDER, E.O.; BJÖRKLUND, M.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Mineralization by nanobacteria. **Proceeding SPIE International Society Optical Engineering**, Estados Unidos da América, v.3441 p.86-94, 1998a.

KAJANDER, E.O.; KURONEN, I.; PELTTARI, A.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth, **Proceeding SPIE**, Estados Unidos da América, v.3111, p.420-428, 1997.

KEUH, M.J.; KESTY, N. C. Bacterial Outer Membrane Vesicles and the Host-pathogen Interaction. **Genes & Development**, Estados Unidos da América, 19: 2645-2655, 2005.

KHULLAR, M.; SHARMA, S.K.; SINGH, S.K.; BAJWA, P.; SHEIKH, F.A.; RELAN, V.; SHARMA, M. Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population. **Urological Research**, Estados Unidos da América, v.32, p. 190-195, 2004.

KRAMER, G.; KLINGER, H.C.; STEINER, G.E. Role of bacteria in the development of kidney stones. **Current Opinion in Urology**, Estados Unidos da América, v.10, n.1, p.35-38, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, Estados Unidos da América, v.227, p.680, 1970.

LAMAS, J.M.; ALONSO, M.; SASTRE, F.; SAAVEDRA, J.A.; GARCÍA-TRÍO, G.; PALOMARE, L. Dialyzate Bacteriological Quality in a Health District. **Nefrología**, Estados Unidos da América, 27(2): 191-195, 2007.

LEDEBO, I.; NYSTRAND, R. Defining the microbiological quality of dialysis fluid. **Artificial Organs**, Estados Unidos da América, 23(1): 37-43, 1999.

Li, Y.; WHEN, Y.; YANG, Z.; WEI, H.; LIU, W.; TAM, A.; WU, X.; WANG, O.; HUANG, S.; KAJANDER, E.O.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Culture and identification of nanobacteria in bile. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, China, v.82, n.22, p.1557-60, 2002.

LÓPEZ-BREA, M.; SELGAS, R. Lãs nanobacterias como causa de enfermidades renales y de patologia calcificante vascular em pacientes renales (la "litiasis endovascular"). **Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clínica**, Espanha, v. 18, n 10, p. 491-492, 2000.

LOW, M.; DALIÈRA, S.A.; TROXEL, H.G.S.; RAO, S. Nanobacteria detection in the serum and urine of urinary stone patients versus normal controls. **Journal of Endourology**, Estados Unidos da América, BRS2-12:A7, 1999. 17th World Congress on Endourology and SWL, 1999.

MAGALHÃES,M.; DOHERTY,C.; GOVAN,J.R.W.; VANDAMME,P. Polyclonal Outbreak of *Burkholderia cepacia* Complex Bacteremia in Haemodialysis Patients. **Journal of Hospital Infection**, Brasil, v.54, p.120-123, 2003.

MANILOFF, J. Nannobacteria: Size limits and evidence. **Science**, Estados Unidos da América, v.276, p.1776, 1997.

MANISCALCO, B.S. & TAYLOR, K.A. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. **Pathophysiology**, Estados Unidos da América, v.11, p.95-101, 2004.

McKAY, D.S., GIBSON, E.K. JR.; THOMAS-KEPPTA, K.L.; VALI, H.; ROMANEK, C.S.; CLEMENTT, S.J.; CHILLIER, X.; MAECHLING, C.R.; ZARE, R.N. Search for past life on Mars:possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. **Science**, Estados Unidos da América, v.273, p.924, 1996.

MILLER, V.M. ; RODGERS, G. ; CHARLESWORTH, J.A.; KIRKLAND, B.; SEVERSON, S.R.; RASMUSSEN, T.E.; YAGUBYAN, M.; RODGERS, J.C.; COCKERILL, F.R. 3rd.; FOLK, R.L.; RZEWUSKALECH, E.; KUMAR, V.; FARELL-BARIL, G.; LIESKE, JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. **American Journal of Heart and Circulatory Physiology**, Estados Unidos da América, v.287, p.H1115-H1124, 2004.

MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY. Nannobacteria in Hot Springs Carbonates. Disponível em: http://www.msstate.edu/dept/geosciences/4site/Hot_Springs/hot_springs_triple_frame.htm. Acesso em 17, abril, 2006.

MORGAN, M.B. Nanobacteria and calcinosis cutis. **Journal of Cutaneous Pathology**, Estados Unidos da América, v.29, n.3, p.173,2002.

MORIN, P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. **Journal of Hospital Infection**, Estados Unidos da América, 45: 218-224., 2000.

MORITA, R. Y. Bioavaliability of energy and starvation survival in nature: **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 34, p. 436-441, 1998.

NANJUNDIAH, V. The smallest form of life yet? **Journal of Bioscienci**, Estados Unidos da América, v. 25, nº 1, p. 9-10, 2000.

NEALSON, K.H. The limits of life on Earth and searching for life on Mars. **Journal of Geophysical Research**, Estados Unidos da América, v.102, p.23675-23686, 1997.

OIE, S.; KAMIYA, A.; YONEDA, I.; UCHIYAMA, K.; TSUCHIDA, M.; TAKAI, K.; NAITO, K. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, Estados Unidos da América, 54: 115-119, 2003.

OKAZAKI, M. & LeGEROS, R.Z. Properties of heterogeneous apatites containing magnesium, fluoride, and carbonate. **Advances in Dental Research**, v.10, p.252-259, 1996.

PEDONE, B. A. & FOLK, R. L. Formation of aragonite cement by nanobacteria in the Great Salt Lake, Utah. **Geology**, Estados Unidos da América, v. 24, p. 763-765, 1996.

PIPER, C.; DREIER, J.; KLESSIEK, K.; KÖRFER, R.; HORSTKOTTE, D. Nanobacteria to promote degenerative aortic valve stenosis? **The Journal of Heart Valve Disease**, Alemanha, v. 15, p. 499-501, 2006.

PISANI,B.; SIMÕES,M.; PRANDI,M.A.G.; ROCHA,M.M.M.; GONÇALVES,C.R.; VAZ,T.M.T.; IRINO K. Surto de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Instituto Adolfo Lutz**, Brasil, n.59, p.51-56, 2000.

PONTORIERO, G; POZZONI, P; SIMEONE, A; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Estados Unidos da América, v.18, n.7, p.21-25, 2003.

PRETORIUS, A.M.; SOMMER, A.P.; AHO, K.M.; KAJANDER, E.O. HIV and nanobacteria. **British HIV Association, HIV Medicine**, Reino Unido, v. 5, p. 391-393, 2004.

PRIECE, P.A.; FAUS, S.A.; WILLIAMSON, M.K. Biphosphonates allendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**., Estados Unidos da América, v.21, p.817-824, 2001.

PSENNER, R. & LOFERER, M. Nanobacteria: Size limits and evidence. **Science**, Estados Unidos da América, v.27, p.1776-1777, 1997.

PUSKÁS, L. G.; TISZLAVICS, L.; RÁSGA, Z.; TORDAY, L.L.; KRENACS, T.; PAPP, J.G. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. **Acta Biologica Hungarica**, v. 56, n. 3-4, p.233 – 245, 2005.

RAOULT, D.; DRANCOURT, M.; AZZA, S.; NAPPEZ, C.; GUIEU, R. ; ROLAIN, J.M. ; FOURQUET, P. ; CAMPAGNA, B. ; LA SCOLA, B. ; MEGE, J.L. ; MANSUELLE, P. ; LECHEVALIER, E. ; BERLAND, Y. ; GORVEL, J.P. ; RENESTO, P. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. **Plos Pathology**, Estados Unidos da América, Epub ahead of print, 2008.

RASMUSSEN T.E. ; KIRKLAND, B.L. ; CHARLESWORTH, J.A. Electron microscope and immunological evidence of nanobacterial-like structures in calcified carotid arteries, aortic aneurysms and cardiac valves. **Journal-American College of Cardiology**, Estados Unidos da América , 206A, 2002.

ROZAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 51, p.365-379, 1987.

RYALL, R.L. The future os stone research: rummaning in the attic, Randall's plaque, nanobacteria, and lessons from phylogeny. **Urological Reserch**, Estados Unidos da América, Epub ahead of print, 2008.

SADIKOT, R. T.; BLACKWLL, J. W.; CHRISTMAN, A. S.; PRINCE,A.S. Pathogen-host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, Estados Unidos da América, 171: 1209-1223, 2005.

SANAVI,S.; GHODS,A; AFSHAR,R. Catheter Associated Infection in Hemodialysis Patients. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, Irã, n.18, v.1, p.43-46, 2007.

SEARS, D.W.G. & KRAL, T.A. Martian "microfossils" in lunar meteorites? **Meteoritics & Planetary Science**, Estados Unidos da América, v. 33, n. 4, p. 791-794, 1998.

SEDIVI, R. & BATTISTUTTI, W.B. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. **Apmis**, Estados Unidos da América, v.111, n.10,p.951,2003.

SELIKOWITZ, S.M. & OLSSON, C.A. Effect of tetracycline on calcium oxalate calculi: in vivo and in vitro studies. **Investigative Urology**, Estados Unidos da América, v.14, p.124-127, 1976.

SHIEKH, F.A. ; KHULLAR, M. ; SINGH, S.K. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. **Urological Research**, Estados Unidos da América v.34,n.1,p.53-57,2006.

SHOSKES, D.A.; THOMAS, K.D.; SOMES, E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience. **The Journal of Urology**, Estados Unidos da América, v.173, p.474-477, 2005.

SILAY, Y.S.; ALTUNDAG, K.; ALTUNDAG, O.; ATIK, M.A. Biphosphonates may inhibit development of atherosclerosis formation through its bactericidal effect on nanobacteria. **Medical Hypotheses**, Estados Unidos da América, v.64, n.6, p.1239-1240, 2005.

SILLITOE, R. H.; FOLK, R.L.; SILLITOE, R.H.; SARIC, N. Bacteria as mediators of copper sulfide enrichment during weathering. **Science**, Estados Unidos da América, v. 272, pp. 1153-1155, 1996.

SIMÕES, M.; PRANDI, M.A.G.; PIRES, M.F.C. Leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas em água de diálise. **Instituto Adolfo Lutz**, Brasil, 2003.

SIMONETTI, A.B. ; ENGLERT, G. ; CAMPOS, K.; MERGENER, M.; DE DAVI, C.; DA COSTA, M.; OLIVEIRA, A.P.; ROCHE, P.M. Nanobacteria-like particles: a threat to cell culture. Brazilian Journal of Microbiology. **Journal of Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 38, p 153-158, 2007.

SOMMER, A.P. & WICKRAMASINGHE, N.C. Keeping nanobacterial infections at bay during space travel. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Alemanha, v. 24, p. 548-549, 2004.

SOMMER, A.P. Antiinfectives and lowlevel light: a new chapter in photomedicine. **Photomed Laser Surg**, Alemanha, n. 25, v.3, p.150-158, 2007.

SOUZA,A.V.; MOREIRA,C.R.; PASTERNAK,J.; HIRATA,M.L.; SALTINI,D.A.; CAETANO,V.C.; CIOSAK,S.; AZEVEDO,F.M.; SEVERINO,P.; VANDAMME,P.; MAGALHÃES,V.D. Characterization uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. **Journal of Medical Microbiology**, Estados Unidos da América, v.53, p.999-1005, 2004.

SUCI, P.A.; MITTELMAN, M.W.; YU, F.P.; GEESEY, G.G. Investigation of Ciprofloxacin Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos da América, 38: 2125-2133, 1994.

THOMAS-KEPRTA, D. S.; FOLK, K.L.; LYNCH, F.L. "Bacterial Mineralization Patterns in Basaltic Aquifers. Implications for Possible Life in Martian Meteorite ALH84001," **Geology**, Estados Unidos da América, v.26, p.1031-1034, 1998.

TOWBIN H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding National Academy of Scienci of the United States of America**, Estados Unidos da América, v.76, p.4350, 1979.

TRAVIS, J. The Bacteria in the Stone. **Science News**, Estados Unidos da América, v.154, n.5, p. 75, 1998.

TSUCHIYAMA A. Meteoritics and mineralogy on possible ancient Martian life. **Biological sciences in space**, Estados Unidos da América, v.10, n.4, p.262-270, 1996.

TUNIO, G.M. HIROTA, S.; NOMURA, S.; KITAMURA, Y. Possible relation of osteopontin to development of psammoma bodies in human papillary thyroid cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Estados Unidos da América, v.122, p.1087-1090, 1998.

URBANO,P. & URBANO, F. Nanobacteria: Facts or Fancies?. **Plos Pathogens**, Estados Unidos da América, v.3, n.5, p 567-570, 2007.

UWINS, P.J.R. ; WEBB, R.I. ; TAYLOR, A.P. Novel nano-organisms from Australian sandstones. **American Mineralogist**, Estados Unidos da América, v.83, p.1541-1550, 1998.

VAN DER LINDE,K.; LIM,B.T.; RONDEEL,J.M.M.; ANTONISSEN,L.P.M.T.; DE JONG,G.M.Th. Improved Bacteriological Surveillance of Haemodialysis Fluids: a Comparison between Tryptic Soy Agar and Reasoner's 2A Media. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Estados Unidos da América, v.14, p.2433-2437, 1999.

VASCONCELOS, C. & McKENZIE, J. A. Microbial mediation of modern dolomite precipitation and diagenesis under anoxic conditions, Lagoa Vermelha, Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of Sedimentary Research**, Estados Unidos da América, v. 67, p. 378-390, 1997.

VORBECK-MEISER, I.; SOMMER, R.; VORBECK, F.; HÖRL, W.H. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Estados Unidos da América, v.14, p.666-675, 1999.

WAINWRIGHT, M. Nanobacteria and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer. **Microbiology**, Estados Unidos da América, v.145, p.2623-2624, 1999.

WANG, X.J. ; LIU, W. ; YANG, Z.L.; WEI, H.; WHEN, Y.; LI, Y.G. The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, China, v.25, n.6, p.492-494, 2004.

Wen, Y.; LI, Y.G.; YANG, Z.L.; WANG, X.J.; WEI, H.; LIU, W.; TAN, A.L.; MIAO, X.V.; WANG, Q.W.; HUANG, S.F.; KAJANDER, E.O.; ÇİFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of cholecystolithiasis patients. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, China, v.41, n.4, p.267-70, 2003.

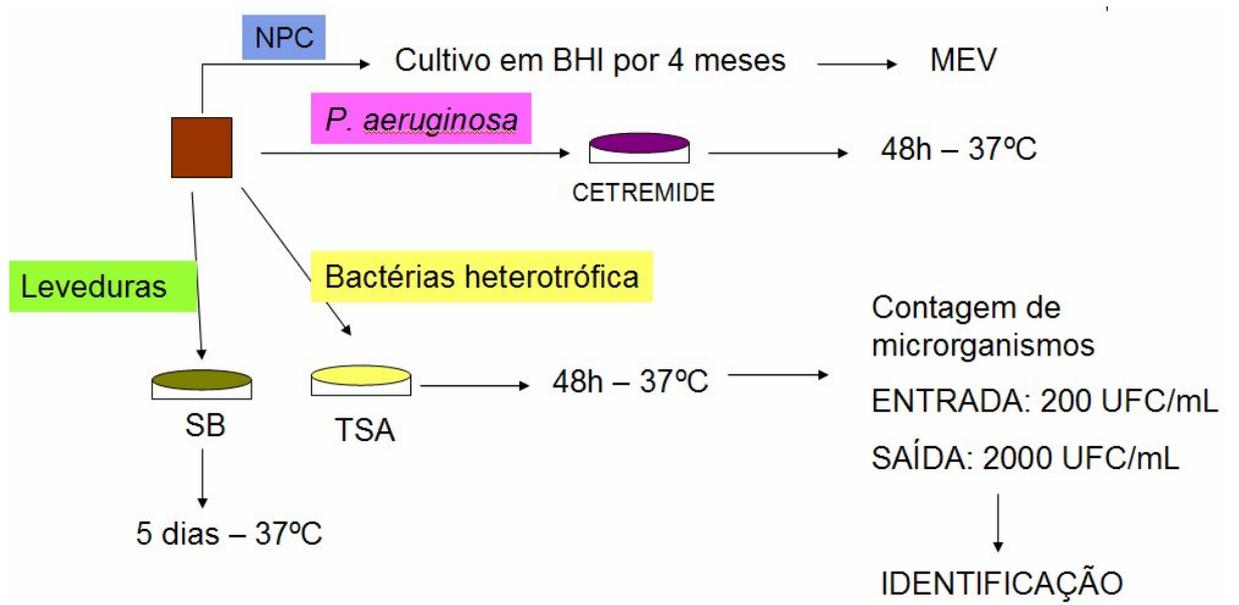
ZREIK, T.G. & RUTHERFORD, T.J. Psammoma bodies in cervicovaginal smears. **Obstetrics and Gynaecology**, Estados Unidos da América, v. 97 (5 Part 1), p.693-695, 2001.

ZUNINO,P.; BELTRÁN, L.; ZUNINO,L.; MÉNDEZ, H.; PERCOVICH,V.; ROCCA,R.; ANTONIELLI,B. Microbiological Quality of Hemodialysis Water in a

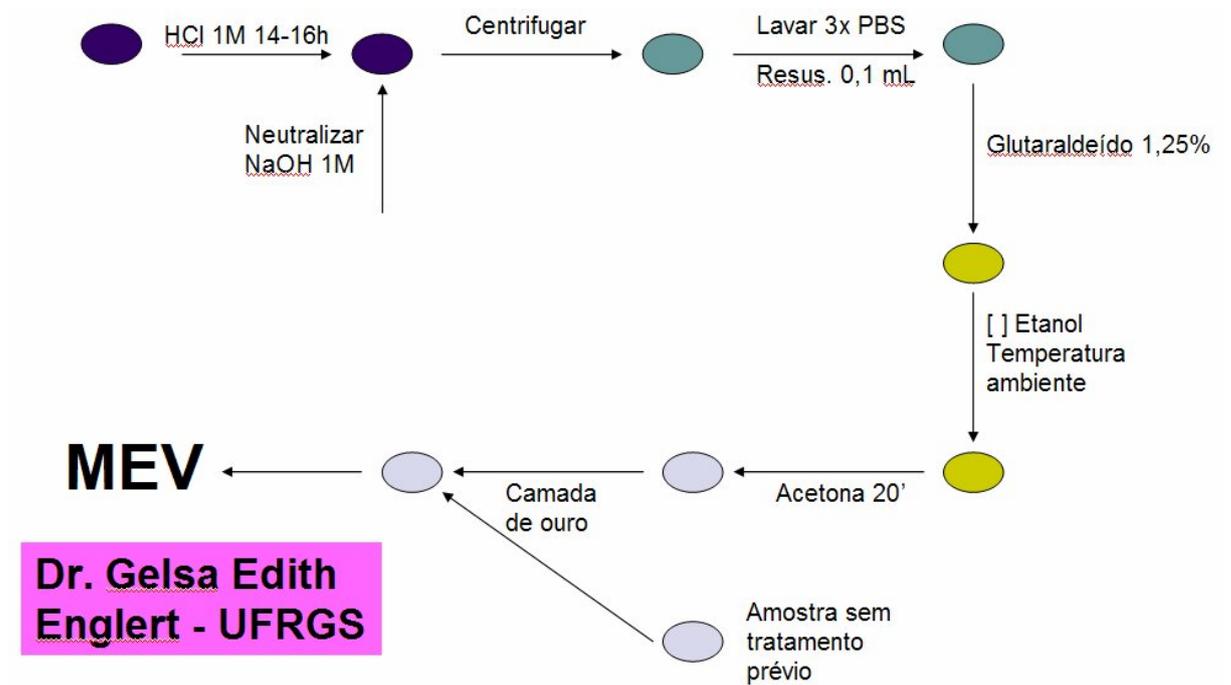
Three-year Multicenter Study in Uruguay. **Journal of Nephrology**, Estados Unidos da América, 15: 374-379, 2002.

10. ANEXOS

10.1. Esquema do processamento das amostras de água provenientes do serviços de hemodiálise:



10.2. Processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura:



10.3. Esquema para a dissolução da hidroxiapatita de acordo com as concentrações e tempos utilizados:

