

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de
metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato**

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Karine Rigon Zimmer

Porto Alegre, agosto de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de
metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Karine Rigon Zimmer

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e
Molecular (PPGBCM) da UFRGS
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, agosto de 2012.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia e na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) sendo financiado pelos seguintes órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular/CNPq.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. Célia Carlini

Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. André Luis Souza dos Santos

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr.^a. Fabiana Horn (Suplente)

Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.^a. Tiana Tasca (Suplente)

Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, agosto de 2012.

Ao meu amado e fiel companheiro Louis

Ao meu esposo Claiton

A meus pais e irmãos, Nelson, Arlete, Marcelo, Aline e Eduardo

AGRADECIMENTOS

No término dessa jornada repleta de desafios, conquistas, descobertas, aprendizado e superações agradeço imensamente a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para o desenvolvimento e finalização deste trabalho de tese.

À CAPES pela bolsa de doutorado, Centro de Biotecnologia da UFRGS e a todos os órgãos de fomento que permitiram a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Prof. Carlos Termignoni e Prof. Alexandre José Macedo por terem me recebido de braços abertos nos seus laboratórios e por terem acreditado no meu potencial me proporcionando desenvolver um trabalho de tese com um tema intrigante ligado a constantes desafios e dificuldades. Agradeço também ao Alexandre pela ajuda incondicional em todos os momentos e por ter me possibilitado conhecer um pouco mais o mundo fascinante das bactérias, que são e serão, as protagonistas da minha vida acadêmica.

Agradeço do fundo do coração ao pessoal do laboratório pelo ótimo convívio e por terem ajudado significativamente para o bom andamento da tese. Em especial aos amigos: Dani Trentin, Lucas Dedavid, Adri, Jordan, Clara, Janine, Marina, Susana, Vivi, Lucas Tirloni, Sharon, Dani Arruda, Igor, Daiane, Tadeu, Matheus, Élen e William. Agradeço a querida Raquel pela amizade, serenidade e dedicação em ajudar a desvendar o “misterioso carrapato”.

Não poderia deixar de mencionar e agradecer a Prof. Regina e sua equipe, Ana Laura, Ana Paula, Gilberto, Gianlucca, Gabi, Diogo, Sandra e Luci pelos dias especiais de convivência no laboratório da Universidade de São Paulo e que certamente agregaram muito a esta tese.

A Prof. Tiana que teve papel central na minha escolha pela vida acadêmica e as gurias do laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Ao Claiton pelo apoio e incentivo constante, pela compreensão nos momentos de ausência, carinho e paciência durante toda essa trajetória.

Aos meus queridos irmãos Aline, Marcelo e Eduardo, meus grandes aliados de todas as horas.

Gostaria de agradecer muito ao amor e apoio imensuráveis dos meus pais Arlete e Nelson durante todo esse caminho trilhado. Mesmo estando longe foram os que estiveram e estão, de alma e coração, mais próximos em todos os momentos da minha vida. Certamente foram, e sempre serão, a minha base de apoio mais importante.

E não poderia deixar de lembrar do Louis que surgiu na minha vida no início do doutorado e se tornou o companheiro mais fiel ao longo dessa jornada.

ÍNDICE

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Carrapatos e classificação taxonômica	16
1.2. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	19
1.2.1. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	19
1.3. Sistema imune de invertebrados	22
1.3.1. Sistema imune celular	23
1.3.1a. Fagocitose	23
1.3.1b. Encapsulação, melanização e nodulação	24
1.3.1c. Coagulação	25
1.3.2. Sistema imune humoral	26
1.4. Peptídeos antimicrobianos em <i>R. microplus</i>	29
1.5. Substâncias antimicrobianas encontradas em ovos de invertebrados	30
1.6. Oogênese e oviposição em carrapatos	32
1.7. Produção de metabólitos por microrganismos associados a invertebrados	41
1.8. Biofilmes microbianos	43
1.8.1. Histórico e a evolução no conceito de biofilmes	43
1.8.2. Fatores que afetam a adesão, formação e desenvolvimento de biofilmes	46
1.8.2a. Estruturas de adesão especializadas e propriedades de superfície celular	47
1.8.2b. Matriz do biofilme	52
1.8.2b.1. Substância polimérica extracelular (EPS)	53
1.8.2b.2. Proteínas extracelulares	54
1.8.2b.3. DNA extracelular (eDNA)	55
1.8.2b.4. Surfactantes e lipídeos	55
1.8.2b.5. Água	55
1.8.3. Resistência do biofilme a agentes antimicrobianos e às defesas imunes do hospedeiro	57
1.8.3a. Penetração de antibióticos	59
1.8.3b. Estímulo da produção de EPS por antibióticos	60
1.8.3c. Reduzido crescimento bacteriano em biofilmes	60

1.8.3d. Persistência	61
1.8.3e. Fisiologia singular do modo de vida biofilme	61
1.8.4. Regulação do biofilme	62
1.8.4a. <i>Quorum sensing</i>	63
1.8.4b. O segundo mensageiro: c-di-GMP	68
1.9. Estratégias anti-virulência	71
2. OBJETIVOS	75
3. RESULTADOS	76
3.1. Cera do ovo do carrapato bovino <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> inibe biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
Artigo I - Egg-wax from cattle tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> inhibits <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm	78
3.2. Uma molécula esteroidal presente na cera dos ovos do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> inibe biofilmes bacterianos	118
Artigo II - A steroidal molecule present in the egg wax of the tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> inhibits bacterial biofilms	119
3.3. Metabólitos de bactérias associadas ao carrapato bovino possuem notável atividade antibiofilme e anti- <i>Tritrichomonas foetus</i>	150
Artigo III – Metabolites from cattle tick-associated bacteria possess remarkable anti-biofilm and anti- <i>Tritrichomonas foetus</i> activity	151
4. DISCUSSÃO	174
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	191
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
7. ANEXOS	226
8. <i>Curriculum Vitae</i>	232
9. Trabalhos publicados	241

ABREVIATURAS

PO: fenoloxidase

PPO: pró-fenoloxidase

LPS: lipolissacarídeo

PAM: peptídeo antimicrobiano

QS: *quorum sensing*

AI: auto-indutor

AHL: acil-homoserina lactona

PAI: peptídeo auto-indutor

EPS: substância polimérica extracelular

PNAG: poli-*N*-acetilglucosamina

PIA: adesina intercelular polissacarídica

Pel: polissacarídeo rico em glicose (pel vem do termo película)

Psl: polissacarídeo rico em manose (psl vem do termo *locus* de síntese do polissacarídeo)

eDNA: DNA extracelular

c-di-GMP: monosfosfato de guanosina dimérico cíclico

DGC: diguanilato ciclase

PDE: fosfodiesterase específica

RESUMO

A oviposição é um estágio vulnerável do ciclo de vida de carrapatos. *Rhipicephalus microplus*, como todos Ixodidae e Argasidae, possui uma glândula especializada, o órgão de Gené, que produz uma cera que é depositada na superfície do ovo durante a oviposição. Além de restringir a perda excessiva de água, a cera atua como uma barreira contra o ataque de organismos invasores. Em *R. microplus*, como em outros carrapatos, há poucos estudos demonstrando atividade antimicrobiana em ovos. Ainda mais, não há na literatura relato de atividade antibiofilme em ovos de carrapatos e nem mesmo em qualquer outro artrópode. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a hipótese da existência de mecanismos de defesa em ovos de *R. microplus* contra biofilmes bacterianos.

O extrato água/metanol da cera dos ovos apresentou atividade contra o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sem afetar a sua viabilidade. Esse extrato também demonstrou efeito antibiótico contra *Staphylococcus epidermidis*. Nós identificamos a molécula com ambas atividades (antibiofilme e antibiótica) como *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina (boophilina).

Na busca por possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito antibiofilme de boophilina contra *P. aeruginosa*, 14 genes foram analisados por qRT-PCR. Boophilina inibe a expressão de *fliC* (flagelo) e *cdrA* (componente estrutural da matriz), cujos produtos são necessários para a formação do biofilme de *P. aeruginosa*.

Monosfosfato de guanosina dimérico cíclico (c-di-GMP) é um importante segundo mensageiro característico de bactérias Gram-negativas. Altos níveis intracelulares de c-di-GMP promovem o estilo de vida sésil enquanto baixos níveis induzem o comportamento móvel. De acordo com essa afirmação, nós encontramos que boophilina aumenta a motilidade *swarming* de *P. aeruginosa*. Desta forma, nos questionamos se o mecanismo de ação de boophilina estaria envolvido com c-di-GMP já que o sistema *quorum sensing* não foi afetado pela molécula. Interessantemente, quando os níveis de c-di-GMP foram aumentados pela superexpressão de uma diguanilato ciclase, boophilina não inibiu efetivamente a formação de biofilme. Uma explicação para esse resultado é que boophilina interfere em uma via específica regulada por c-di-GMP, o que explicaria não termos obtido um decréscimo no nível total deste segundo mensageiro.

Contrariamente, boophilina foi bactericida contra *S. epidermidis*. Mudanças morfológicas significativas foram observadas em células tratadas com a molécula, as quais foram severamente danificadas. Boophilina levou a formação anormal de septo, rompimento da membrana bacteriana e extravasamento do material intracelular.

Adicionalmente avaliamos o potencial antibiofilme e anti-protozoário de filtrados de cultura obtidos de bactérias isoladas de tecidos de *R. microplus*. Quatorze filtrados de cultura bacteriana apresentaram notável atividade contra o biofilme de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* e foram citotóxicos contra *Tritrichomonas foetus*.

Nosso trabalho é pioneiro em demonstrar a existência de proteção contra biofilmes em ovos de carrapatos bem como de bactérias associadas a carrapatos como produtoras de moléculas bioativas. Além disso, nós demonstramos que boophilina é uma nova molécula antibiofilme, sendo a primeira vez relatado na literatura que um composto age inibindo *cdrA*. Os dados obtidos em nosso estudo poderiam estimular novas abordagens em áreas como fisiologia e controle de artrópodes, genética e fisiologia de microrganismos e controle de biofilmes.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ovos, inibição de biofilme, *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina

ABSTRACT

The oviposition is a vulnerable stage of the tick life cycle. *Rhipicephalus microplus*, as all Ixodidae and Argasidae, has a specialized gland, the Gne's organ, which produce a wax that is smeared on egg surface during oviposition. In addition to restricting excessive water loss, wax acts as a barrier to attack by invading organisms. In *R. microplus*, as in other ticks, there are few studies showing antimicrobial activity in eggs. Moreover, there is no report of antibiofilm activity in tick eggs nor in any other arthropod. The objective of our study was to evaluate the hypothesis of the existence of defense mechanisms against bacterial biofilms in *R. microplus* eggs.

The eggs wax water/methanol extract showed activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm without affecting its viability. This extract also presented an antibiotic effect against *Staphylococcus epidermidis*. We have identified the molecule anti-biofilm and antibiotic as *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (boophiline).

In the search for possible mechanisms responsible by antibiofilm effect of boophiline against *P. aeruginosa*, 14 genes were evaluated by qRT-PCR. We showed that boophiline inhibits the expression of *fliC* (flagellum) and *cdrA* (matrix structural component), whose products are necessary for biofilm formation in *P. aeruginosa*.

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is an important second messenger, characteristic of Gram-negative bacteria. High intracellular levels of c-di-GMP promote a sessile mode of growth, while low levels promote motile behavior. In line with this, we found that boophiline increases swarming motility, which raised the question whether it acts by altering c-di-GMP levels. Interestingly, when c-di-GMP levels were increased by overexpression of a diguanilate cyclase, boophiline no longer inhibited biofilm formation. One explanation for these results is that boophiline interferes with a specific c-di-GMP-regulated pathway, which would explain we have not obtained a decrease in the total level of this second messenger.

Conversely, boophiline had a bactericidal effect against *S. epidermidis*. Significant morphological changes were observed in the boophiline-treated cells, which appeared to be severely damaged. Boophiline was found to cause abnormal septum formation, bacterial membrane disruption, and extravasation of intracellular material.

Additionally, our work also aimed to evaluate the potential antibiofilm and anti-protozoa of culture filtrates obtained from bacteria isolated of *R. microplus* tissues. Fourteen bacterial culture filtrates showed remarkable activity against of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* biofilms, and were cytotoxic against *Tritrichomonas foetus*.

Our work is pioneer in demonstrating the existence of protection mechanisms in tick eggs against biofilms, and ticks-associated bacteria as producers of bioactive molecules. Furthermore, we demonstrated that boophilin is a new antibiofilm molecule, and is the first reported in the literature that a molecule inhibits *cdrA*. The data obtained in our study could stimulate new approaches in areas such as the physiology and control of arthropods, the genetics and physiology of microorganisms, and biofilm control.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, eggs, biofilm inhibition, *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos como *R. microplus* são desafiados constantemente por microrganismos presentes nos seus hospedeiros ou no ambiente durante seu ciclo de vida, desde a fase ovo até o estágio adulto (POTTERAT *et al.*, 1997; ESTEVES, 2003; ARRIETA *et al.*, 2006; TAYLOR, 2006; KOPÁCEK *et al.*, 2010). Esses artrópodes possuem uma defesa imune inata robusta contando com respostas celulares e humorais (SONENSHINE, 1991; TAYLOR, 2006; KOPÁCEK *et al.*, 2010; OLIVER, 2011). Carrapatos são capazes de defender-se contra infecções microbianas utilizando enzimas como a lisozima e uma ampla variedade de peptídeos antimicrobianos como defensinas (KOPÁCEK *et al.*, 2010). Moléculas com atividade anticoagulante (WAXMAN *et al.*, 1990; CIPRANDI *et al.*, 2006), anti-inflamatória (RIBEIRO *et al.*, 1985) e imunossupressora (NUNN *et al.*, 2005; TYSON *et al.*, 2007) são apenas alguns exemplos do rico arsenal utilizado por carrapatos a fim de garantir seu parasitismo e sobrevivência.

Por outro lado, relatos focalizando mecanismos de defesa presentes nos ovos de carrapatos são escassos (ARRIETA *et al.*, 2006; ESTEVES *et al.*, 2009; OLDIGES *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). Os ovos, assim como larvas e adultos, podem ser especialmente vulneráveis as condições do ambiente e serem presas fáceis de predadores (ESTEVES, 2003; ARRIETA *et al.*, 2006). No momento da oviposição a fêmea busca no solo locais úmidos e protegidos da luz solar onde os ovos ficam durante o período de incubação até a eclosão das larvas (PEREIRA *et al.*, 2008). Apesar da deposição nesses locais hostis, os ovos permanecem viáveis, sem aparente colonização por microrganismos, levantando a hipótese da existência de mecanismos de defesa contra organismos oportunistas e/ou patogênicos (BOOTH, 1992; POTTERAT *et al.*, 1997; ARRIETA *et al.*, 2006).

Poucas moléculas com ação antimicrobiana foram identificadas em ovos de carrapatos (ESTEVES, 2003; ARRIETA *et al.*, 2006; OLDIGES *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). Até o momento, não há relato na literatura descrevendo mecanismos de defesa de carrapatos, ou mesmo de qualquer outro artrópode, contra biofilmes microbianos.

Biofilmes têm recebido atenção considerável da comunidade científica nos últimos anos em razão da sua ubiquidade em ambientes naturais, clínicos e industriais. Há também grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias que os constituem a antibióticos e ao sistema de defesa dos hospedeiros infectados (DAVIES, 2003). Bactérias existindo na forma de biofilmes podem ser prejudiciais para animais e/ou plantas. Mastite

(*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), pneumonia (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*), abscesso de fígado (*Fusobacterium necrophorum*), linfadenite (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp.), enterite (*E. coli*, *Salmonella* spp.) e infecções de feridas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) são alguns exemplos de infecções envolvendo biofilmes em animais de importância econômica (OLSON *et al.*, 2002).

Em humanos, várias doenças estão associadas a biofilmes bacterianos, incluindo colites, uretrites, conjuntivites, vaginites, otites e fibrose cística (DONLAN & COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003). As infecções associadas a biofilmes são persistentes, de difícil erradicação totalizando em muitos casos prejuízos consideráveis (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Além disso, um ponto não abordado até o momento é a possibilidade de simbiontes ou microrganismos associados a carrapatos serem fonte potencial de moléculas. Contrariamente, esse tema é bem explorado em outros artrópodes. Polimixina (JIGAMI *et al.*, 1986), bacitracina (GEBHARDT *et al.*, 2002), diacetilfloroglucinol (KENNY *et al.*, 1989), pioluteorina (KENNY *et al.*, 1989) e amicoumacina (GEBHARDT *et al.*, 2002) são exemplos do repertório de moléculas fisiologicamente ativas produzidas por simbiontes de artrópodes.

Dessa forma, entender os possíveis mecanismos de defesa contra biofilmes em carrapatos, buscando molécula com tal atividade, pode contribuir tanto para novas abordagens no controle do carrapato como também no controle de biofilmes de importância industrial e clínica.

1.1. Carrapatos e classificação taxonômica

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Parasitiformes e subordem Ixodida (SONENSHINE, 1991) (Fig. 1).

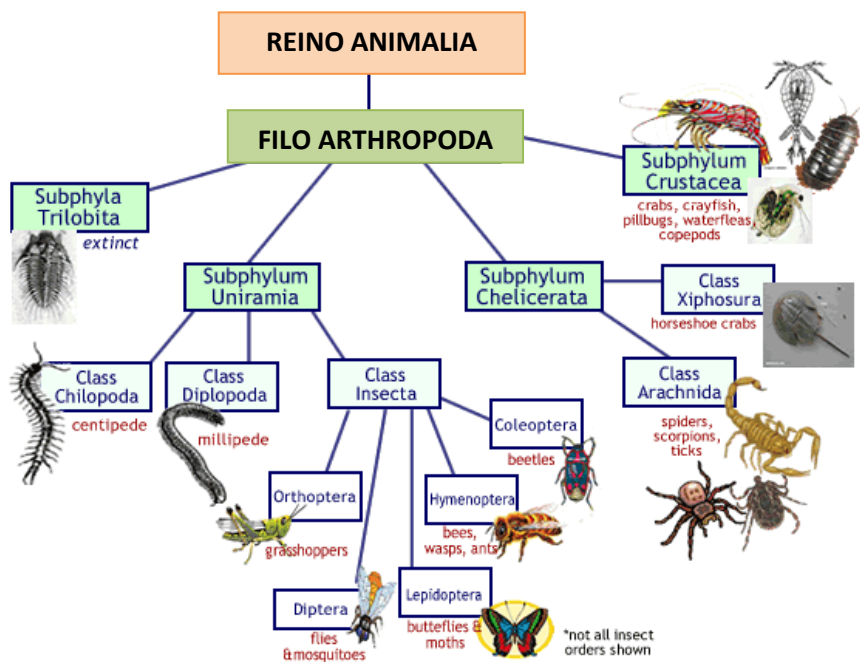


Figura 1. Classificação taxonômica de artrópodes. Imagem adaptada de biologycorner.com.

Há mais de 800 espécies de carrapatos descritas. Elas são classificadas em três famílias: Argasidae, popularmente conhecidos como “carrapatos moles” com 185 espécies, Ixodidae conhecidos como “carrapatos duros” com 685 espécies e Nuttalliellidae com uma espécie (HORAK *et al.*, 2002). A família Nuttalliellidae possui características morfológicas intermediárias entre Argasidae e Ixodidae. Ambas as famílias (Argasidae e Ixodidae) encontram-se amplamente distribuídas em todos os continentes, enquanto a família Nuttalliellidae é restrita a região Afrotropical (PEREIRA *et al.*, 2008). Carrapatos duros apresentam uma placa de superfície esclerotizada no corpo dorsal (escudo) enquanto carrapatos moles possuem apenas uma cutícula. Esta característica morfológica mais visível é apenas uma marca para outras inúmeras diferenças biológicas, fisiológicas e ecológicas entre essas duas famílias (KOPÁCEK *et al.*, 2010).

Os carrapatos da família Ixodidae são divididos em dois grupos: Prostriata e Metastriata. Prostriata contém somente o gênero *Ixodes* (241 espécies), enquanto todos os demais carrapatos Ixodidae são classificados como Metastriata. Os Metastriatas mais importantes se dividem nos gêneros *Amblyomma* (128 espécies), *Dermacentor* (33

espécies), *Haemaphysalis* (164 espécies), *Hyalomma* (24 espécies), *Rhipicephalus* (63 espécies) e *Boophilus* (5 espécies) (HORAK *et al.*, 2002; MURRELL & BARKER, 2003; KOPÁCEK *et al.*, 2010). Com base em dados de filogenia molecular as cinco espécies do gênero *Boophilus* foram agrupadas ao gênero *Rhipicephalus*, pois apresentam características filogenéticas muito relacionadas, sendo considerados gêneros monofiléticos (HORAK *et al.*, 2002; MURRELL & BARKER, 2003). Entretanto, alguns pesquisadores preferem manter os dois gêneros.

Os carrapatos Argasidae estão divididos em quatro gêneros: *Argas* (57 espécies), *Carios* (87 espécies), *Ornithodoros* (36 espécies) e *Otobius* (3 espécies) (HORAK *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2008).

Carrapatos, dependendo da espécie, parasitam um ou mais hospedeiros (monoxenos ou eurixenos) podendo alimentar-se de uma ampla variedade de vertebrados incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (LABRUNA & VERISSÍMO, 2001).

Carrapatos da família Argasidae parasitam múltiplos hospedeiros de uma mesma espécie ou de espécies diferentes, tendo vários estágios de ninfa, todos se alimentando rapidamente nos hospedeiros (o período de alimentação pode durar de minutos a horas). Os carrapatos adultos podem alimentar-se repetidamente e as fêmeas adultas, que copulam fora do hospedeiro, depositam um número limitado de ovos (poucas centenas) após a alimentação. O tempo de vida dos carrapatos dessa família (Argasidae) é bastante longo, chegando a alguns anos (KOPÁCEK *et al.*, 2010).

Contrariamente, os carrapatos da família Ixodidae possuem somente três estágios de desenvolvimento: larvas, ninfas e adultos. A maioria dos Ixodidae (por exemplo, os gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Haemaphysalis*) são carrapatos de três hospedeiros (DIEHL *et al.*, 1982). Esses carrapatos alimentam-se lentamente por vários dias, dependendo do estágio e da espécie. As fêmeas adultas acasalam usualmente no hospedeiro e após o ingurgitamento abandonam-no. A refeição é digerida por várias semanas durante as quais a fêmea põe milhares de ovos e morre. Apenas poucas espécies, como o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitam um único hospedeiro, onde larvas, ninfas e adultos permanecem em um mesmo hospedeiro durante toda a vida parasitária (DIEHL *et al.*, 1982; PEREIRA *et al.*, 2008).

1.2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887), objeto deste estudo, é uma espécie originária do sudeste da Ásia, sendo o principal ectoparasita de gados em países tropicais e sub-tropicais incluindo Austrália, África e América provocando substanciais perdas econômicas na pecuária (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999).

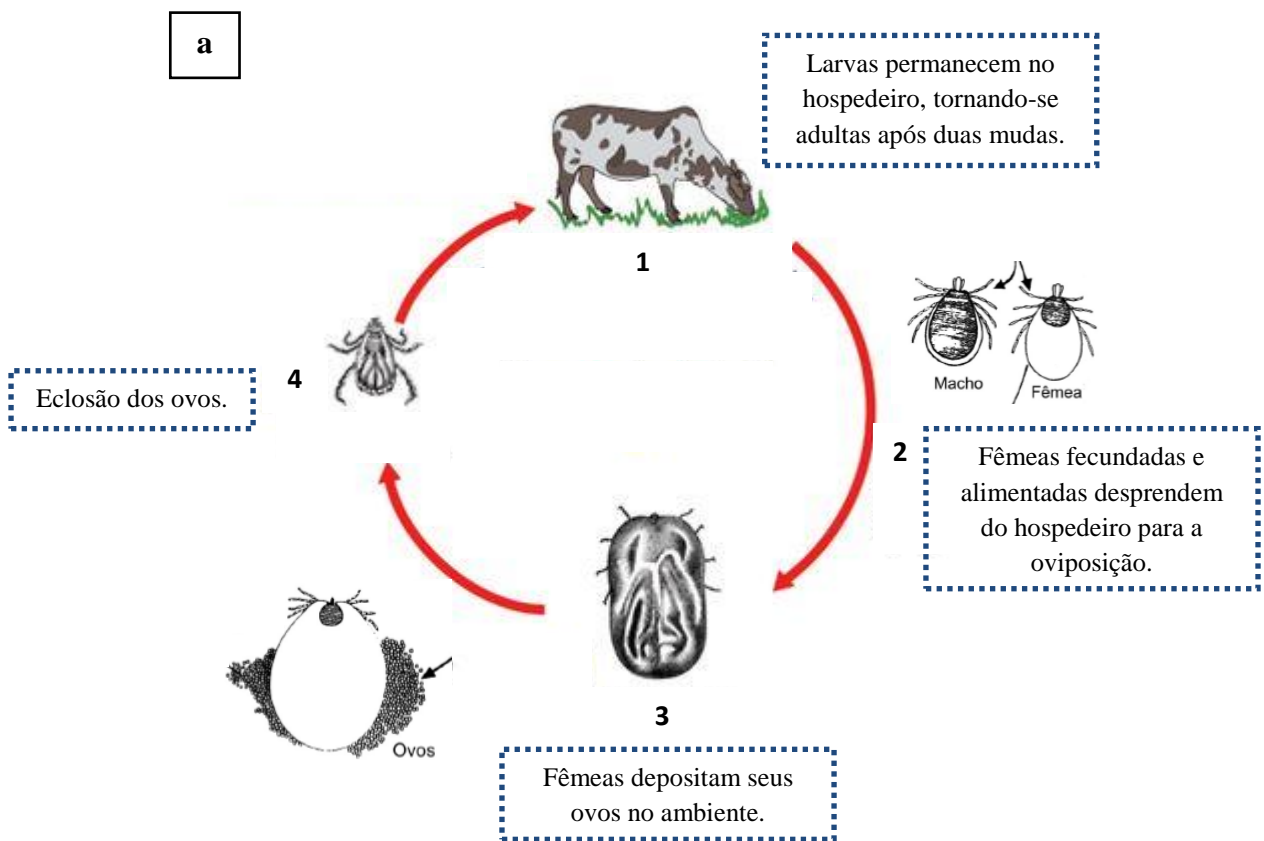
O principal hospedeiro deste carrapato é o bovino. Entretanto, outros animais, domésticos ou não, podem ser hospedeiros, tais como: cervídeos, eqüinos, ovinos, caprinos e bubalinos quando criados no mesmo pasto de bovinos (PEREIRA *et al.*, 2008).

Rhipicephalus microplus é motivo de grande preocupação para bovinocultores devido a espoliação que causa no hospedeiro e ao seu papel como vetor de agentes etiológicos de babesiose e anaplasiose (*Babesia bovis*, *B. bigemia* e *Anaplasma marginale*). Infestação por *R. microplus* leva a deterioração da condição física do hospedeiro, perda de peso, produção diminuída de leite, decréscimo na qualidade do couro e maiores custos de produção (GRISI *et al.*, 2002).

1.2.1. Ciclo de vida de *R. microplus*

O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* inclui duas fases: a fase parasitária (19 a 24 dias) e a fase de vida livre ou não-parasitária (aproximadamente 28 dias) abrangendo no total um período de 45 a 52 dias (Fig. 2a). A fase de vida parasitária inicia-se quando as larvas instalam-se no bovino e iniciam o repasto sanguíneo (Fig. 2a1), permanecendo aderidas ao mesmo hospedeiro por aproximadamente 21 dias. Nesta fase, as larvas infestantes passam a larvas parasitárias, transformando-se em seguida em metalarvas (3 a 8 dias). As metalarvas passam a ninfa em 5 a 10 dias (em média 8 dias) e de ninfa em metaninfa em 9 a 23 dias (13 dias em média). Até o estágio de metaninfa, o parasita alimenta-se de linfa. A metaninfa sofre diferenciação sexual, transformando-se em neandro após 18 a 28 dias do início do ciclo (com 14 dias em média), e passando a gonandro (macho) em mais dois dias ou transformando-se de metaninfa em neógena (fêmea) em cerca de 14 a 23 dias (em média 17 dias) após o início do ciclo. O macho fecunda a neógena (Fig. 2a2), que inicia a hematofagia, passando à partenógena (parcialmente alimentada ou ingurgitada) em três dias e, finalmente, à teleógena (totalmente alimentada ou ingurgitada) em mais dois dias. As fêmeas copuladas ingerem grande quantidade de

sangue aumentando significativamente o tamanho corporal. Cada carrapato bovino suga ao longo do ciclo de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro. Os carrapatos aumentam várias vezes seu tamanho, desde o estágio de larva que mede aproximadamente 1 mm, até o estágio adulto, quando uma fêmea ingurgitada (teleógina) pode medir até 1,2 cm (Fig. 2b e c). No momento em que as fêmeas atingem a repleção sanguínea, tornando-se completamente ingurgitadas, desprendem-se naturalmente do hospedeiro. O início da queda das teleóginas ocorre no 19º dia da infestação, sendo a moda entre o 22º e 23º dia. No solo, inicia-se a fase de vida livre (Fig. 2a3). A fêmea ingurgitada assim que se desprende do hospedeiro e cai no solo, procura abrigo, embaixo de touceiras e de estalões de capim, contra a luz solar direta, em resposta a fototactismo negativo, para a realização da postura. Somente após cerca de 3 a 5 dias da queda (este o período chamado de pré-postura) as fêmeas iniciam a postura dos ovos, período que dura aproximadamente 17 dias (Fig. 2a3). Esse período de pré-postura é necessário já que a fêmea não possui ainda seus ovários maduros, sendo então esse tempo requerido para o desenvolvimento, produção e maturação dos ovos. Após a postura as fêmeas morrem (chamadas de quenóginas; Fig. 2d) e em aproximadamente 17 a 21 dias as larvas eclodem. As larvas recém-eclodidas permanecem no solo e devido a estímulos como gradiente de concentração de CO₂ sobem em gramíneas e arbustos e esperam a passagem do hospedeiro (Fig. 2a4), iniciando a fase de vida parasitária. No hospedeiro, as larvas migram para determinadas regiões corporais, como a região posterior das coxas, e as regiões perianal e perivulvar, as quais são mais propícias para seu desenvolvimento, em virtude da espessura, vascularização e temperatura da pele bem como pela dificuldade de auto limpeza do hospedeiro nessas regiões (PEREIRA *et al.*, 2008). A fase de vida-livre varia muito dependendo de condições climáticas como umidade e temperatura podendo prolongar-se por meses. Já a fase de vida-parasitária é muito pouco sensível às influências climáticas (GONZALES, 1995; GARCIA, 2009).



Adaptado de *Center for Diseases Control and Prevention*



Figura 2. a: Ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (Ixodidae). Neste ciclo ocorre apenas uma fase de vida livre (ovo/larva, **3** e **4**) e uma fase de vida parasitária (**1** e **2**). A larva não alimentada fica no solo/vegetação a espera de um hospedeiro (**4**). Quando esse hospedeiro aparece ocorre o contato e fixação com início da alimentação (**1**). As fêmeas ingerem sangue do hospedeiro até completarem seu ingurgitamento. Durante este período de alimentação ocorre o acasalamento (**2**). O macho permanece no hospedeiro podendo

fecundar várias fêmeas. A fêmea quando repleta de sangue desprende-se do hospedeiro e cai ao solo onde inicia o período de pré-oviposição, o qual dura aproximadamente 3 dias (3). A postura dura vários dias, até a morte da fêmea. Uma fêmea de *R. microplus* produz de 2 a 3 mil ovos; **b**: *R. microplus* macho (esquerda) e fêmea (direita); **c**: Diferentes fases do desenvolvimento da fêmea de *R. microplus*; **d**: Fêmea ingurgitada (direita) e no final da oviposição (esquerda).

1.3. Sistema imune de invertebrados

Os carrapatos mesmo carecendo de resposta imune adaptativa possuem mecanismos de resposta imune inata muito eficazes (NAPPI & OTTAVIANI, 2000; TAYLOR, 2006; SONENSHINE & HYNES, 2008).

A capacidade imune em artrópodes é altamente complexa contando com distintos meios para o controle de infecção (TAYLOR, 2006; SONENSHINE & HYNES, 2008; KOPÁČEK *et al.*, 2010; OLIVER, 2011).

O sistema imune inato de invertebrados possui uma rede de respostas celulares e humorais (TAYLOR, 2006). As defesas celulares incluem fagocitose, encapsulação, nodulação, melanização e coagulação (IWANAGA, 1998; KOPÁČEK *et al.*, 2010). A resposta imune humoral compreende uma variedade de peptídeos antimicrobianos que atuam contra bactérias, fungos, vírus e parasitos (VIZIOLI & SALZET, 2002). A produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio e enzimas associadas também faz parte da resposta imune humoral. Além disso, fatores humorais envolvidos no reconhecimento e eliminação de patógenos incluem: receptores de reconhecimento padrão, lectinas, sistema tipo-complemento e ativação da pró-fenoloxidase. O conjunto de defesas (celular e humoral) em invertebrados os protege de agentes causadores de doenças que tentam ganhar acesso aos tecidos internos desses invertebrados penetrando pela cutícula do exoesqueleto ou através da alimentação (KOPÁČEK *et al.*, 2010).

1.3.1. Sistema imune celular

As células envolvidas na resposta imune celular são os hemócitos (ROWLEY & POWELL, 2007). Vários tipos de hemócitos foram descritos com base em estudos morfológicos e fisiológicos (NAPPI & OTTAVIANI, 2000; ESTEVES, 2003). Entretanto, a atividade fagocítica é atribuída principalmente a plasmatócitos e granulócitos I, enquanto granulócitos II são células não fagocíticas (PEREIRA *et al.*, 2001). Hemócitos diferenciam-se a partir de células-tronco denominadas pró-hemócitos, sendo estas últimas raramente detectadas na hemolinfa (KOPÁCEK *et al.*, 2010).

Respostas imunes mediadas por células são iniciadas quando hemócitos circulantes entram em contato com patógenos na hemocele. Hemócitos então podem fagocitar e digerir pequenos invasores tais como protozoários, bactérias, fungos e vírus (KOPÁCEK, 2010).

1.3.1a. Fagocitose

A fagocitose envolve etapas de reconhecimento, ingestão e morte do microrganismo invasor. O reconhecimento do invasor pode ocorrer por meio de lectinas, que recobrem-no e ligam-se a receptores presentes na superfície dos hemócitos (ESTEVES, 2003). Na fagocitose, o hemócito circunda a partícula estranha com pseudópodos, isolando-a em um vacúolo, tipicamente um fagossomo, dentro do citoplasma da célula. Este vacúolo funde com o lisossomo tornando-se um fagolisossomo. Vacúolos lisossomais contêm vários tipos de enzimas hidrolíticas que destroem a partícula fagocitada e os produtos resultantes da digestão são utilizados como nutrientes para a célula (DESJARDINS *et al.*, 2005; OLIVER, 2011).

A fagocitose possui vantagens em comparação a outros componentes do sistema imune. Respostas celulares atuam geralmente mais rápido que respostas humorais, e a fagocitose é o componente atuando com maior rapidez em alguns artrópodes (OLIVER, 2011). Por exemplo, no carrapato *Dermacentor variabilis*, *Escherichia coli* injetada na hemocele é inteiramente eliminada por hemócitos via fagocitose após algumas horas da injeção do microrganismo (CERAUL *et al.*, 2002). Outra vantagem da fagocitose é que ela não destrói os hemócitos envolvidos. Hemócitos podem fagocitar e digerir patógenos sem causar impacto negativo a célula. Contrariamente, outras respostas celulares imunes tais

como encapsulação e nodulação, destroem a célula por lise ou melanização, o que pode constituir uma desvantagem em organismos cuja resposta imune conta com um número limitado de hemócitos (OLIVER, 2011).

1.3.1b. Encapsulação, melanização e nodulação

A encapsulação é uma resposta celular de hemócitos a corpos estranhos encontrados na hemocele que são demasiadamente grandes para ser fagocitados pelos hemócitos. Encapsulação envolve circundar o corpo estranho com uma camada de hemócitos impedindo assim seu acesso a oxigênio e também limitando seu contato com tecidos do artrópode (KLOWDEN, 2007; ROWLEY & POWELL, 2007).

No sistema de encapsulação tradicionalmente conhecido, granulócitos e plasmatócitos estão envolvidos no processo. Após a liberação de sinais químicos por granulócitos que estimulam a agregação de hemócitos, plasmatócitos começam a aderir à superfície do corpo estranho achatando-o. Uma parede de várias camadas de espessura composta de plasmatócitos vivos e mortos envolve o patógeno (cápsula) (RATCLIFFE & GAGEN, 1976; OLIVER, 2010). Após a formação da cápsula, pode ocorrer a deposição de melanina ao redor dos microrganismos invasores. A melanina reforça a cápsula e leva a um dano potencialmente fatal ao patógeno (ESTEVES, 2003; NAPPI *et al.*, 2009).

A melanização pode ser considerada tanto uma resposta imune celular associada à encapsulação como também uma resposta humoral. De todo o modo, a melanização é iniciada pela liberação de pró-fenoloxidase de hemócitos (ASHIDA & BRET, 1998; KOPÁCEK *et al.*, 2010). A fenoloxidase é sintetizada pelos hemócitos em sua forma de zimogênio, a pró-fenoloxidase (PPO), que é convertida na forma ativa por uma cascata de serino endopeptidases (ASHIDA & BREY, 1998). Potencialmente, são geradas durante o processo de melanização moléculas tóxicas aos microrganismos, tais como semiquinonas, quinonas e espécies reativas de oxigênio (SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998; NAPPI & OTTAVIANI, 2000; VAVRICKA *et al.*, 2010). A cascata da PPO pode ser ativada por concentrações muito baixas de compostos como peptidoglicanos e β -1,3-glucana presentes na parede de bactérias e fungos, respectivamente (SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998). Durante esse processo, um grande número de hemócitos é destruído. Artrópodes com número limitado de hemócitos, como por exemplo, insetos no estágio adulto

carecendo de órgãos hematopoiéticos, podem preferir uma estratégia de melanização não-hemocítica (OLIVER, 2011).

Nodulação é uma resposta imune celular, relacionada com a encapsulação, envolvendo a agregação de hemócitos (KOPÁCEK *et al.*, 2010). Para a formação de um nódulo, hemócitos agregam em torno da área onde se encontra o corpo estranho e produzem uma matriz extracelular viscosa que prende os organismos invasores (RATCLIFFE & GAGEN, 1976). Isto envolve, frequentemente, a destruição das células envolvidas. Em alguns artrópodes, grandes nódulos podem tornar-se encapsulados, prevenindo a propagação da infecção bacteriana (KLOWDEN, 2007).

1.3.1c. Coagulação

A coagulação é utilizada por artrópodes como uma resposta quando do surgimento de ferimento, para reduzir a perda de hemolinfa e de água pela cutícula perfurada, também impedindo a exposição a patógenos externos (THEOPOLD *et al.*, 2004; CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2011). Em alguns artrópodes a coagulação é empregada como uma resposta imune robusta a infecção bacteriana. Coagulação ocorre quando proteínas de coagulação, encontradas abundantemente no plasma da hemolinfa, são ativadas pela enzima transglutaminase. Hemócitos liberam essa enzima em resposta à detecção de moléculas de lipolissacarídeos (LPS) por receptores específicos encontrados em suas superfícies. Uma vez que a liberação da transglutaminase é estimulada principalmente por LPS, a resposta imune de coagulação está associada principalmente à defesa contra bactérias Gram-negativas (OLIVER, 2011).

Embora alguns autores admitam que a hemolinfa de carrapatos seja capaz de coagulação e melanização, existem poucos relatos tratando desse aspecto na imunidade inata desses artrópodes (SONENSHINE, 1991; TAYLOR, 2006; SONENSHINE & HYNES, 2008). O genoma de *Ixodes scapularis* contém sequências de DNA que codificariam transglutaminases putativas e que poderiam estar envolvidas no processo de coagulação (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2000; GUDDERRA *et al.*, 2002). Já considerando a melanização, há dados controversos sobre atividade da PPO na hemolinfa de carrapatos. Tal atividade foi observada na hemolinfa de *Ornithodoros moubata*, mas não foi detectada

na hemolinfa de *Amblyomma americanum*, *D. variabilis* e *I. scapularis* (KOPÁČEK *et al.*, 2010).

Entretanto, é importante ressaltar que as armas efetoras da resposta imune inata variam entre diferentes artrópodes (OLIVER, 2011). Respostas imunes, tais como melanização ou coagulação, que são fortemente utilizadas por um grupo de artrópodes, tais como Lepidoptera e Crustacea, respectivamente, não estão presentes em outros grupos. Carrapatos, por exemplo, carecem tanto de melanização como de respostas associadas à coagulação (OLIVER, 2011). Por outro lado, alguns estudos sugerem que processos de encapsulação e nodulação podem ocorrer em carrapatos. Processo hemocítico de encapsulação e coagulação foram identificados no carrapato *D. variabilis* quando pequenas peças foram implantadas na sua cutícula (CERAUL *et al.*, 2003). Entretanto, não foi observado nenhum sinal de formação de melanina na superfície desse implante. Além disso, respostas imunes profundamente enraizadas nas fisiologias das células envolvidas podem ser extremamente variáveis, por exemplo, a fagocitose de patógenos por hemócitos. Em algumas espécies de artrópodes, a maioria dos hemócitos participa de uma fagocitose disseminada, enquanto em outros artrópodes esse tipo de fagocitose inicia-se apenas em condições específicas (KOPÁČEK *et al.*, 2010).

A dicotomia do sistema imune inato de artrópodes (respostas celulares e humorais) pode, entretanto, ser largamente arbitrária já que alguns mecanismos de sinalização imune são conhecidos para atuar em ambos os sistemas (ESTEVEZ, 2003).

1.3.2. Sistema imune humoral

Respostas imunes humorais são desencadeadas por fatores extracelulares encontrados no plasma da hemolinfa. Na defesa humoral de invertebrados, peptídeos antimicrobianos (PAM) são efetores chave na destruição e eliminação de bactérias e fungos (ZASLOFF, 2002). Peptídeos antimicrobianos são uma classe de peptídeos ou pequenas proteínas envolvidas na resposta imune inata de vertebrados e invertebrados (GANZ & LEHRER, 1999; ZASLOFF, 2002; MELO *et al.*, 2009). Estas moléculas foram inicialmente isoladas da hemolinfa de insetos, pele de sapos e grânulos de neutrófilo humano. Atualmente, mais de 1.000 PAM foram caracterizados, considerando todas as espécies vivas, de bactérias a vertebrados (ZASLOFF, 2002). A síntese de PAM pode ser

constitutiva ou induzida por infecção e/ou lesão (GANZ & LEHRER, 1999). Geralmente PAM apresentam massa molecular pequena (menores que 10 kDa), são catiônicos e anfipáticos (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Vários mecanismos de ação foram relatados para PAM os quais envolvem permeabilização da membrana através da formação de poros e estreitamento da membrana ou micelização de forma tipo detergente. Além disso, PAM podem ter como alvos componentes intracelulares como DNA, enzimas e outras organelas (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Eles promovem uma rápida eliminação do invasor, em minutos *in vitro*, e possuem um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus e parasitos (ESTEVES, 2003).

Pesquisadores russos no início dos anos 90 descreveram a existência de potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por carrapatos de ambas as famílias: Argasidae e Ixodidae. As atividades antibacterianas neste caso foram principalmente atribuídas a lizosimas do tipo C as quais foram purificadas e parcialmente caracterizadas (KOPÁCEK *et al.*, 2010).

Pelo menos três grandes grupos de PAM estruturalmente bem definidos são encontrados em artrópodes:

- Peptídeos catiônicos com estrutura em α -hélice sem cisteína, como por exemplo, a cecropina;
- Peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos tais como a abaecina;
- Peptídeos contendo cisteína e com pontes dissulfeto como as defensinas (BULET & STOCKLIN, 2005).

Defensina é a classe de PAM mais bem estudada em carrapatos, e compreende provavelmente o principal grupo de PAM envolvidos na resposta imune destes organismos (NAKAJIMA *et al.*, 2001). Defensinas (frequentemente várias isoformas) são produzidas na hemolinfa, intestino e outros tecidos, incluindo glândula salivar e corpo gorduroso de carrapatos. Defensinas foram identificadas em carrapatos duros e moles, incluindo, na família Ixodidae, *D. variabilis* (JOHNS *et al.*, 2001; CERAUL *et al.*, 2003), *I. scapularis*

(HYNES *et al.*, 2005), *A. americanum* (TODD *et al.*, 2007), *Amblyomma hebraeum* (LAI *et al.*, 2004) e *R. microplus* (FOGAÇA *et al.*, 2004).

Defensinas típicas com sequência de aminoácidos específica para clivagem e padrão de seis cisteínas pareadas são exemplificadas pela varisina de *D. variabilis* (KOPÁCEK *et al.*, 2010). A produção de defensinas pode ser induzida pela alimentação ou pela exposição a microrganismos. Interessantemente, peptídeos aniônicos tipo defensina (ADP1 e ADP2) apresentando características típicas de defensinas como os resíduos de cisteína e carecendo da sequência de clivagem clássica foram identificados no singânglio de *A. hebraeum*. ADP2 apresentou-se efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e foi ineficaz contra fungos (KOPÁCEK *et al.*, 2010). Do mesmo carrapato foi identificado um novo PAM denominado de hebraína. Hebraína possui 102 aminoácidos, incluindo as seis cisteínas, entretanto, seu padrão de pontes dissulfeto, caráter aniônico e estrutura secundária com prevalência de α -hélices difere das defensinas típicas (LAI *et al.*, 2004).

A alimentação do carrapato é dificilmente um processo asséptico. Por isso, supõe-se que esteja presente um mecanismo de defesa eficiente e ativo prevenindo o crescimento bacteriano no lúmen do intestino desses artrópodes (OLIVER, 2011). O papel principal no controle microbiano no intestino de ambas as famílias de carrapatos é aparentemente desempenhado por fragmentos de hemoglobina do hospedeiro com atividade antimicrobiana (NAKAJIMA *et al.*, 2003). Foram identificados fragmentos de hemoglobina no intestino de *R. microplus*, *O. moubata* e *D. variabilis* (FOGAÇA *et al.*, 1999; KOPÁCEK *et al.*, 2010). Além dos peptídeos originários do hospedeiro, vários tipos de moléculas endógenas podem contribuir para a imunidade no intestino de carrapatos como defensinas, lisozimas e inibidores de proteases (KOPÁCEK *et al.*, 2010).

Um exemplo interessante é a longicina, uma molécula relacionada com as defensinas e expressa no intestino de *Haemaphysalis longicornis*. Esta molécula é eficaz contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas resistentes a múltiplos antibióticos. Além disso, longicina apresenta atividade babesicida (TSUJI *et al.*, 2007).

PAM foram também descritos na glândula salivar de carrapatos. Entre eles ixosina A e ixosina B isoladas de *Ixodes sinensis* (YU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008). Essas duas moléculas não possuem resíduos de cisteína e apresentam atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e em menor extensão contra *E. coli* (YU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008). Um novo PAM nomeado IsAMP foi isolado recentemente da saliva de *I. scapularis*, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (PICHU *et al.*, 2009).

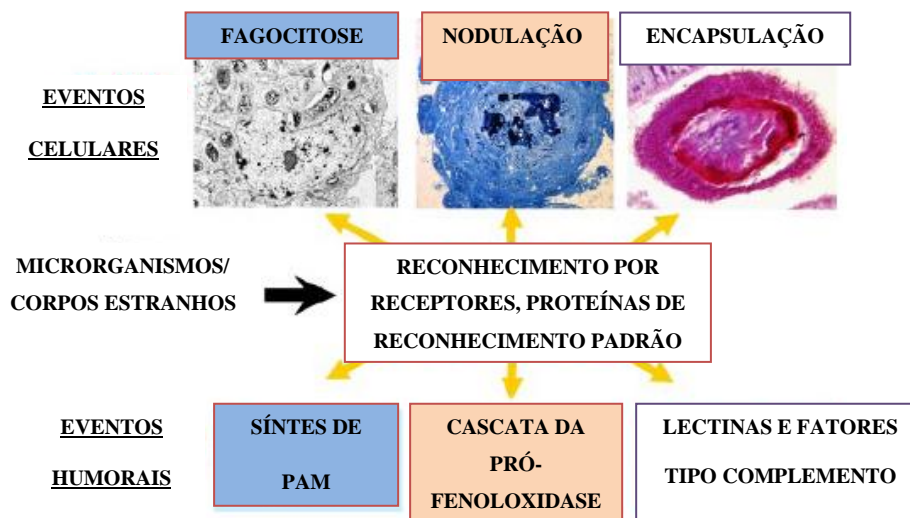


Figura 3. Representação esquemática geral dos mecanismos de resposta imune inata em invertebrados. Adaptado de ROWLEY & POWELL, 2007.

1.4. Peptídeos antimicrobianos em *R. microplus*

Moléculas com atividade antimicrobiana foram encontradas em teleóginas (no conteúdo intestinal e na hemolinfa) e em ovos de *R. microplus*.

POTTERAT e colaboradores (1997) extraíram um esteróide (nomeado boophilina) de fêmeas de *R. microplus*. Esta molécula inibe o crescimento de *E. coli* e *Bacillus subtilis* e também dos fungos *Cladosporium cucumerinum* e *C. albicans*.

Em 1999, FOGAÇA e colaboradores demonstraram que um fragmento da α -hemoglobina bovina encontrada no intestino de fêmeas teleóginas de *R. microplus* apresentava atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos.

Outro PAM, microplusina, foi obtido da hemolinfa livre de células de *R. microplus* (FOGAÇA *et al.*, 2004). Este PAM rico em histidina e com massa molecular de 10.204 Da, é ativo contra bactérias Gram-positivas como *Micrococcus luteus* sendo também eficaz contra alguns fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e contra leveduras como *Cryptococcus neoformans* (FOGAÇA *et al.*, 2004). Surpreendentemente, microplusina não apresenta nenhuma similaridade com qualquer outro fator antimicrobiano descrito. Expressão gênica da microplusina foi observada em diferentes tecidos de *R. microplus* incluindo corpo gorduroso, hemócitos e ovário, sendo que expressão bem mais baixa foi verificada no intestino (FOGAÇA *et al.*, 2004).

Dos hemócitos deste carrapato foram purificados dois peptídeos com ação antibacteriana, um deles pertencente ao grupo das defensinas de invertebrados e outro denominado ixodidina. Ixodidina, um PAM rico em cisteína, inibe o crescimento de *E. coli* e *M. luteus*. Além disso, esse PAM inibe duas serino endopeptidases: quimiotripsina e elastase (FOGAÇA *et al.*, 2006).

Ademais, em uma linhagem celular fagocítica derivada de embriões de *R. microplus* (BME26) foram identificados vários transcritos de genes putativamente envolvidos na resposta imune. Entre eles microplusina, hebraína, α_2 -macroglobulina, proteína tipo fator D, glutatona S-transferase (GST), peroxidase e NADPH oxidase (ESTEVEZ *et al.*, 2008).

1.5. Substâncias antimicrobianas encontradas em ovos de invertebrados

PAM são importantes não somente para os animais na fase adulta, mas também em outras fases do seu ciclo de vida como, por exemplo, na fase ovo (BOOTH, 1992; POTERATT *et al.*, 1997; ARRIETA *et al.*, 2006). A oviposição é claramente um estágio vulnerável do ciclo de vida de carrapatos. Uma vez que ovos podem ser atacados por patógenos é importante haver mecanismos de defesa eficientes (BOOTH, 1992).

Informações referentes à presença de substâncias antimicrobianas em ovos de carrapato são muito escassas. Poucos estudos estão disponíveis mostrando a presença de substâncias antimicrobianas em ovos de artrópodes. Nos ovos da mosca *Ceratitis capitata*, MARCHINI *et al.* (1993 e 1997) identificaram peptídeos denominados ceratotoxinas que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores sugerem que a função desses peptídeos seja de defesa dos ovos e das larvas jovens contra organismos patogênicos presentes no meio ambiente. Ceratotoxinas estão também presentes no material secretado pelas glândulas acessórias do trato reprodutivo deste inseto. Esses peptídeos são secretados somente pelas fêmeas sexualmente maduras, sugerindo que estejam envolvidos na reprodução e na proteção do trato genital feminino contra invasores bacterianos (ROSETTO *et al.*, 1996; MANETTI *et al.*, 1997).

Uma proteína antimicrobiana, denominada aplisianina E, foi encontrada nos ovos do molusco marinho *Aplysia kurodai*, sendo uma glicoproteína que apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (KISUGI *et al.*, 1989; IJIMA *et al.*, 1995).

GORMAN *et al.* (2004) relataram um aumento da expressão de seis genes de proteínas antimicrobianas quando ovos de *Manduca sexta* foram infectados com *Serratia marcescens*.

Cecropina A₁, um peptídeo antimicrobiano, está presente em ovos de *Drosophila melanogaster* (ÖNFELT *et al.*, 2001).

ARRIETA e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antibacteriana de ovos do carrapato *A. hebraeum*. Os extratos obtidos a partir da cera dos ovos deste carrapato foram ativos contra bactérias Gram-positivas (*S. epidermidis*, *B. subtilis* e *M. luteus*) e não mostraram efeito contra as bactérias Gram-negativas testadas. Estudos mais detalhados deste extrato da cera evidenciaram que o mecanismo de ação parecer ser por aumento da permeabilidade das células de *S. epidermidis*. Os autores concluíram que a atividade antimicrobiana da cera do ovo é uma adaptação para protegê-lo da microflora do solo (ARRIETA *et al.*, 2006). Entretanto, a molécula (ou moléculas) responsável por esta atividade antibiótica não foi identificada até o momento.

Atividade antibiótica foi também encontrada no homogeneizado total e na superfície de ovos de *R. microplus*. O PAM do homogeneizado dos ovos foi identificado

como sendo a microplusina (ESTEVEES *et al.*, 2009). Além disso, um papel de defesa é possivelmente desempenhado por dois inibidores de subtilisina nomeados BmSI-7 e BmSI-6, purificados de ovos de *R. microplus*. Ambos inibiram fortemente a protease Pr1 do fungo patogênico *Metarhizium anisopliae* (SASAKI *et al.*, 2008).

Recentemente foi reportado que VTDCE, uma cisteíno endopeptidase de *R. microplus* que degrada vitelina, possui atividade antibiótica contra a bactéria *S. epidermidis*, sendo que esta atividade é independente da atividade enzimática. VTDCE é produzida no intestino, transportada através da hemolinfa, captada pelos oócitos e estocada em grânulos de vitela onde no ovo, após a postura, é ativada por acidificação (OLDIGES *et al.*, 2012).

1.6. Oogênese e oviposição em carrapatos

Durante a oogênese, nutrientes de origem materna são estocados nos oócitos em crescimento, servindo como fonte de nutrientes para o embrião (FAGOTTO, 1990; SAITO *et al.*, 2005).

O ovário de *R. microplus* é uma estrutura tubular em formato de U, contínuo e composto de um lúmen delimitado por uma parede de pequenas células epiteliais com núcleo arredondado (SAITO *et al.*, 2005) (Fig. 4a). Ele possui um par de ovidutos, um útero, um tubo de conexão muscular, vagina e uma abertura genital. Após a fertilização o ovário aumenta de tamanho consideravelmente exibindo ovos de todos os estágios de desenvolvimento (REY, 1973). Segundo BALASHOV (1972), os oócitos são classificados em 5 estágios (I a V) levando em conta as seguintes características: aparência do citoplasma, presença de vesícula germinal, grânulos de vitelo e córion (SAITO *et al.*, 2005). Oócitos de vários tamanhos e diferentes estágios de desenvolvimento podem ser encontrados no ovário já que são processados simultaneamente e de forma assíncrona (DENARDI *et al.*, 2004) (Fig. 4b e c).

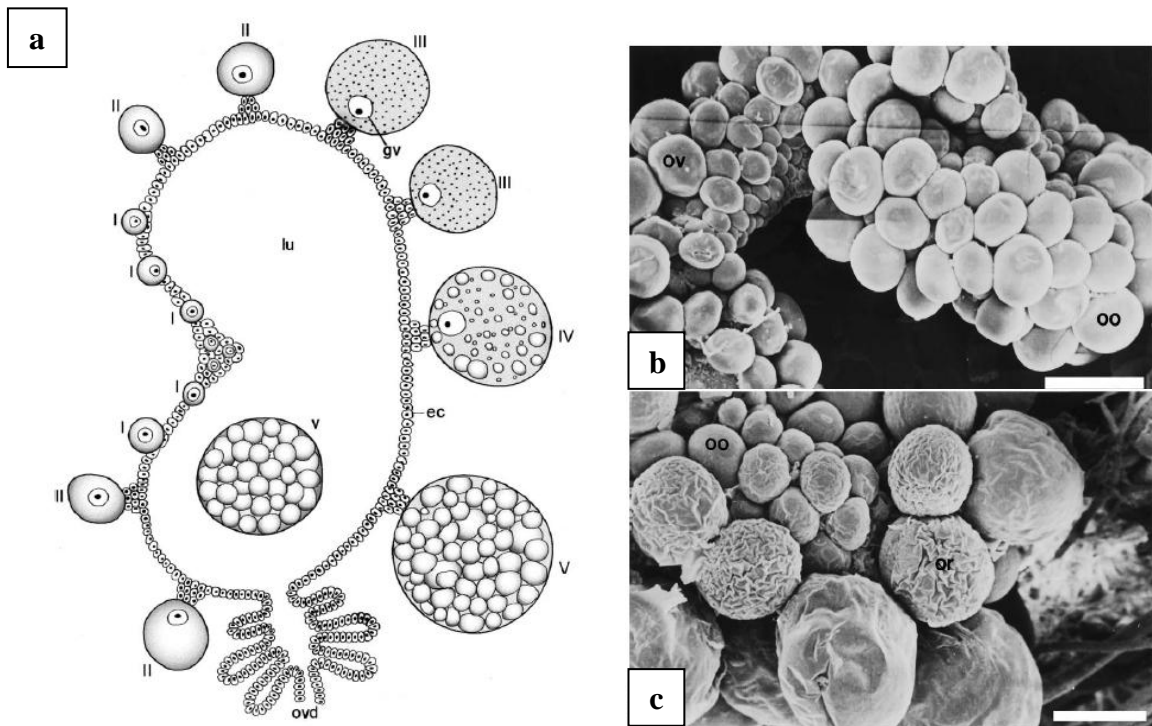


Figura 4. a: Imagem representativa do ovário de *R. microplus* com oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (I-V), ec: epitélio ovariano, lu: lúmen, ovd: oviduto, gv: vesícula germinal; **b:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura do ovário de *R. microplus* com oócitos (b e c), ov: ovário, oo: oócito jovem, or: oócito em processo de reabsorção. Escala: 0,1 mm (imagens de SAITO *et al.*, 2005).

- Órgão de Gené

A oviposição é similar em carrapatos Ixodidae e Argasidae e envolve um sistema especializado não encontrado em outros artrópodes, o órgão de Gené (Fig. 5a-c), o qual produz uma camada de cera superficial que é depositada nos ovos no momento da oviposição (BOOTH, 1989; BOOTH, 1992; SCHÖL *et al.*, 2001). Carrapatos parecem ser únicos em elaborar uma camada externa de cera durante a postura por uma glândula especializada, órgão este não encontrado em outros ácaros (LEES & BEATMENT, 1948; SIEBERZ & GOTHE, 2000).

Cada ovo, ao sair através da abertura vaginal é manipulado de forma a receber em toda a sua superfície a secreção do órgão de Gené. A estreita ligação desta estrutura com a oviposição é enfatizada pelo fato de que ela está ausente tanto em machos como nos estágios imaturos (LEES & BEATMENT, 1948; BOOTH *et al.*, 1984).

No entanto, apesar da estrutura do órgão de Gené ter sido descrita há mais de um século, o conhecimento da sua morfologia bem como da sua função ainda são pouco estabelecidos. Em um dos primeiros relatos sobre oviposição em carrapatos, Gené (1848) observou que quando esse órgão na fêmea era perfurado com uma agulha, os ovos que ela depositava murchavam rapidamente. Em 1881, Bertkau também avaliou a possível importância deste órgão para a viabilidade dos ovos. Nesse estudo ovos impedidos de entrar em contato com a glândula de Gené murchavam muito mais rapidamente do que quando ovipostos normalmente (LEES & BEATMENT, 1948).

Durante o ingurgitamento, o órgão de Gené cresce rapidamente, ocorrendo o desenvolvimento da sua forma inativa para o estágio secretório de cera ativo. O desenvolvimento é completado logo antes da postura dos ovos, estando em sincronia com o desenvolvimento ovariano (LEES & BEATMENT, 1948).

Além de impedir a dessecação do ovo em condições de baixa umidade, a camada de cera sobre a cutícula do ovo atua como uma barreira contra o ataque de microrganismos, reduz a absorção de pesticidas do ambiente, permite que os ovos fiquem agrupados e alguns componentes ainda atuam como ferormônios (BOOTH, 1992).

O órgão de Gené parece ser um pré-requisito para a viabilidade, mas não para a produção de ovos (SIEBERZ & GOTHE 2000). Carrapatos com e sem bloqueio mecânico deste órgão, põem um número similar de ovos. Entretanto, larvas eclodem e se desenvolvem somente de ovos depositados por carrapatos com a glândula de Gené íntegra e não bloqueada mecanicamente. Todos os ovos depositados sem entrar em contato com o órgão de Gené secam e murcham em poucos minutos e as larvas não eclodem (SIEBERZ & GOTHE, 2000).

A glândula de Gené é uma proliferação da epiderme a qual se desliga da cutícula (LEES & BEATMENT, 1948) (Fig. 5c). Sua secreção é um líquido contendo o precursor da cera. O precursor é captado pelas projeções (ou chifres) do órgão, onde ele é estocado, e

é presumivelmente modificado dentro das células glandulares. Provavelmente a cera esteja ligada quimicamente a uma proteína quando secretada pelo órgão de Gené. A secreção proteinácea das glândulas reage com a superfície, entretanto seu papel permanece desconhecido (PEREIRA *et al.*, 2008).

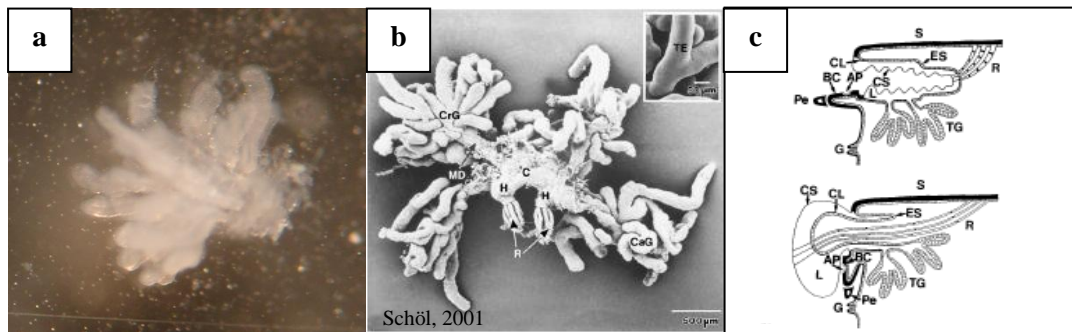


Figura 5. Glândula de Gené de carrapatos. **a:** Órgão de Gené de fêmea teleógena de *R. microplus*, **b:** Órgão de Gené excisado de fêmea teleógena de *D. reticulatus* mostrado por microscopia eletrônica de varredura, C: corpo, CaG: glândula caudal, CrG: glândula cranial, H: projeção ou chifre, MD: ducto eferente principal, R: músculos retratores, TE: ponteira tubular ramificada; **c:** Figura mostrando o órgão de Gené de *D. reticulatus* retraído (acima) e protraído (abaixo), AP: área porosa, BC: base do capítulo, CL: camada cuticular, CS: saco cuticular, ES: saco epitelial, G: abertura genital, L: lúmen entre o saco epitelial e o saco cuticular, Pe: pedipalpos, R: músculos retratores, S: escudo, TG: glândula tubular. Imagens b e c foram retiradas de SCHÖL *et al.*, 2001.

Em *R. microplus*, o estudo ultraestrutural do órgão de Gené revelou que três tipos de glândulas dermais podem estar envolvidas na síntese da cera do ovo: glândulas tubulares, glândulas lobulares e glândulas acessórias acinares. Estes três tipos de células produzem a cera dos ovos de maneira coletiva e possuem uma alta capacidade sintética (BOOTH, 1992). As glândulas tubulares são o tecido mais abundante, contribuindo provavelmente para a maior proporção de cera e possuindo uma maior proporção de lipídeos apolares. Elas são formadas por uma camada epitelial colunar contendo extensivas vesículas lipídicas arranjadas ao redor de um lúmen secretório central conectando as

projeções ou chifres do órgão (BOOTH, 1992). O lúmen das glândulas lobulares está conectado com o lúmen intracuticular dos chifres. Logo, a secreção das glândulas lobulares também passa através de poros na camada cuticular externa, e é então, incorporada na cera do ovo durante a manipulação dos ovos no processo de oviposição. O lúmen de cada glândula acessória acinar é conectado a um ducto levando a um poro do capítulo, então sua secreção é igualmente incorporada na cera do ovo, quando ele é oviposto. Componentes lipídicos similares parecem ser sintetizados e secretados pelos três tipos de glândulas, mas eles diferem na abundância relativa dos componentes individuais (BOOTH, 1992). Os lipídeos são principalmente hidrocarbonos apolares e ésteres. Entretanto a completa elucidação química dos componentes presentes na secreção do órgão de Gené permanece desconhecida. BOOTH (1992) avaliando os lipídeos extraídos da cera demonstrou que em *R. microplus*, ela consiste de uma mistura de alcanos de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos. A síntese de alcanos pode ocorrer no órgão de Gené por alongação de ácidos graxos seguida de descarboxilação. Uma via similar foi descrita para a síntese de alcanos em insetos (BOOTH, 1992). A presença de três tipos de glândulas no órgão de Gené sugere que pode haver uma divisão de trabalho envolvendo a contribuição de cada uma para a produção da cera do ovo (SIEBERZ & GOTHE, 2000).

Os movimentos realizados pela fêmea durante a oviposição foram observados e registrados em *D. reticulatus* (Fig. 6) (SIEBERZ & GOTHE, 2000). Durante o período de pré-postura o órgão de Gené não é visível, estando o conjunto de peças bucais (capítulo) dirigido anteriormente e a abertura vaginal se mostra como uma fenda. Quando o primeiro ovo está prestes a ser eliminado, há movimento do capítulo em arco vertical, em direção à face ventral da fêmea, onde a sua extremidade anterior repousa defronte a fenda genital. Nesse momento, o órgão de Gené é protraído entre o capítulo e a margem anterior do escudo (Fig. 6a). Devido aos movimentos do capítulo, o órgão de Gené, então totalmente protraído, vem localizar-se sobre o hipostômio e os palpos, assumindo a forma de vesícula, apresentando de cada lado duas projeções (ou chifres) contendo fluido translúcido (Fig. 6b). Quando a postura está por iniciar, o hipostômio é comprimido firmemente contra a face ventral do carrapato, estando os palpos espalhados para os lados e o órgão de Gené protraído ao máximo. Ao mesmo tempo, o vestíbulo vaginal prolapsa a partir da abertura genital formando um tubo estendido. O vestíbulo vaginal atua como um ovipositor e entrega um ovo para as projeções do órgão de Gené após breve, mas intenso contato (Fig.

6c). O ovo é “abraçado” pelas projeções do órgão de Gené (Fig. 6d), e o vestíbulo vaginal retraído simultaneamente. Após a retração do ovipositor, os palpos são posicionados quase paralelos uns aos outros e realizam movimentos circulares, enquanto o ovo é ligeiramente virado. O órgão de Gené, com o ovo aderido à sua superfície, rapidamente retrai e protraí diversas vezes, sendo seguido por movimentos ativos dos palpos. Em seguida, as projeções são invaginadas (Fig. 6e), ocorrendo a lenta retração do órgão de Gené. Finalmente, o órgão é retraído completamente, ficando o ovo aderido sobre a face dorsal do hipostômio. Com o retorno do capítulo a sua posição natural, o ovo tende a localizar-se sobre a face dorso-anterior do carrapato (Fig. 6f). Esses movimentos fazem com que toda a superfície de cada ovo seja completamente revestida pela secreção (SIEBERZ & GOTHE, 2000).

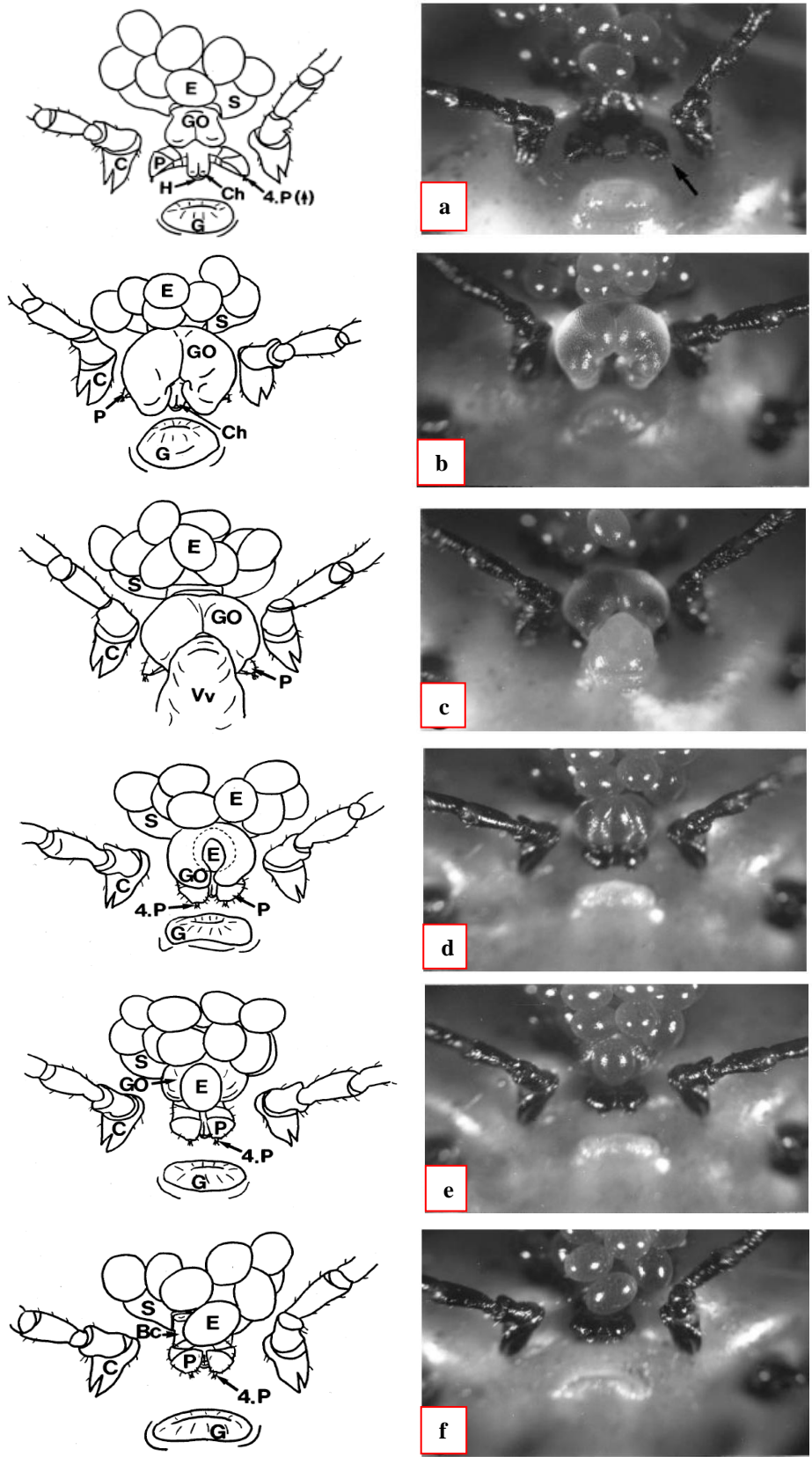


Figura 6. Eventos sequenciais da oviposição em *D. reticulatus* (Ixodidae). G: abertura genital; Ch: quelíceras; 4.P: quarto segmento de palpos; H: hipostômio; GO: órgão de

Gené; E: ovos; P: pedipalpos; S: escudo; Vv: vestíbulo vaginal; Bc: base do capítulo.
Figura retirada de SIEBERZ & GOTHE, 2000.

Na Figura 7 podemos observar fêmeas ingurgitadas no período pré-postura (Fig. 7a) e no final da oviposição (Fig. 7b).

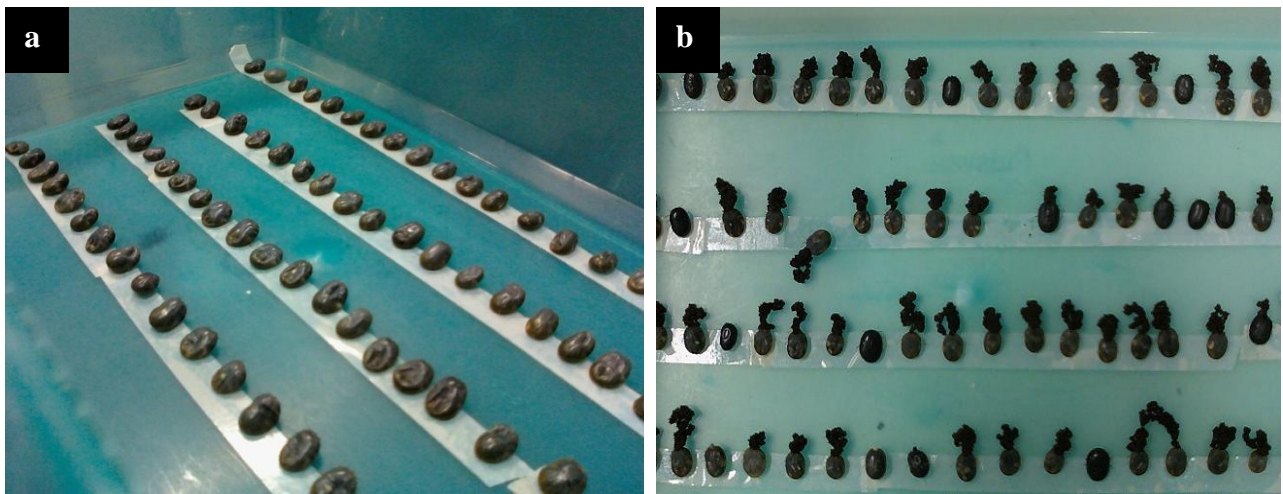


Figura 7. a: Fêmeas teleóginas de *R. microplus* no período de pré-postura (as fêmeas são coletadas, lavadas, secas com papel filtro e mantidas em estufa a 28°C e 80% de umidade para a postura dos ovos); **b:** Período final da oviposição onde os ovos são coletados e posteriormente processados.

Em *Ixodes* spp., assim como em todos Ixodidae, o ovo é relativamente pequeno, tendo aproximadamente volume e área superficial de somente 0,045 mm³ e 0,6 mm², respectivamente (Fig. 8) (LEES & BEATMENT, 1948). Em *R. microplus*, os ovos são alongados e possuem coloração castanha.

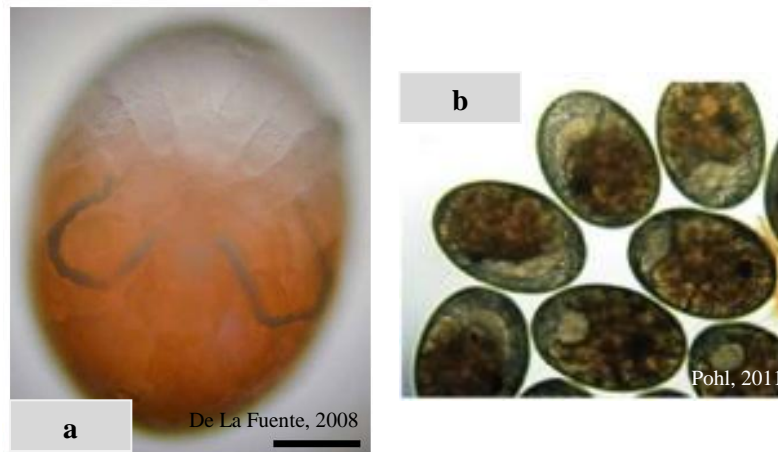


Figura 8. Ovos de *R. microplus*. **a:** Ovo após 19 dias da oviposição. Escala: 0,1 mm. Imagem de DE LA FUENTE *et al.*, 2008; **b:** Ovos após 17 dias da postura. Imagem de POHL *et al.*, 2011.

Uma característica notável do desenvolvimento do ovo de *R. microplus* é o fato da casca não ser secretada pelas células foliculares, mas pelo próprio oócito. A estrutura microscópica da casca é simples. Três camadas distintas estão presentes quando o ovo é posto: a camada de cera externa, a camada de grânulos com propriedades redutoras e uma camada de casca inata. Uma quarta camada, a membrana interna, é composta de proteínas, sendo adicionada somente após vários dias de incubação (Fig. 9) (BOOTH, 1992; SEIXAS, 2008). A espessura da camada de cera é de aproximadamente 0,5 a 2 μm (LEES & BEATMENT, 1948). Entretanto, esta espessura pode variar entre as espécies de carrapatos.

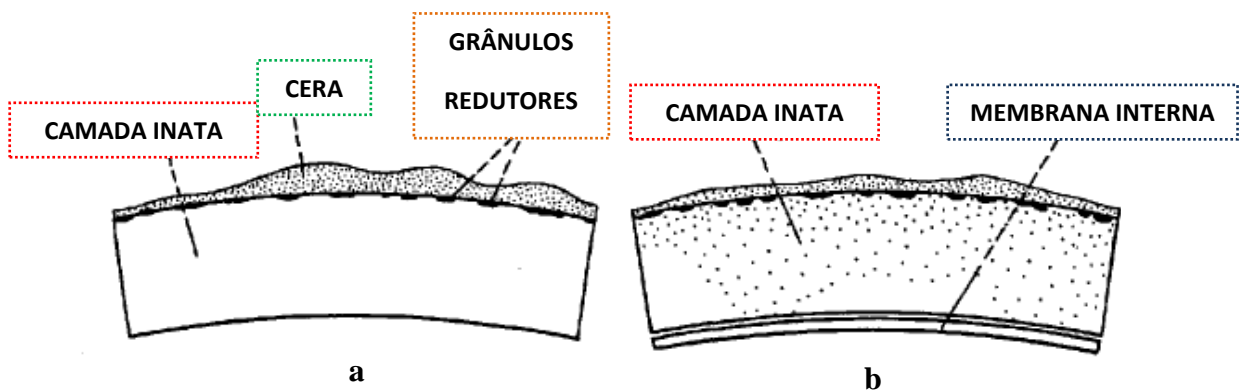


Figura 9. Esquema ilustrativo da casca do ovo de carrapatos (neste caso o exemplo é o carrapato *O. moubata*). **a:** 0-1 dia após a postura; **b:** 6 dias após a postura. Adaptado de LEES & BEATMENT, 1948.

1.7. Produção de metabólitos por microrganismos associados a invertebrados

Artrópodes podem exibir uma variedade de associações microbianas. Alguns microrganismos podem habitar de maneira estável em células e tecidos do hospedeiro. Uma fonte potencial de novas substâncias antimicrobianas tem sido reportada de simbiontes de insetos (GEBHARDT *et al.*, 2002). Muitos compostos produzidos por bactérias ou fungos associados a insetos são utilizados pelo hospedeiro como precursores de novas moléculas. Estes compostos muitas vezes possuem estrutura química complexa e podem vir a ser compostos terapêuticamente valiosos (DETTNER, 2011).

Diacetilfloroglucinol e pioluteorina são exemplos de compostos produzidos por um simbionte bacteriano de *Sogatella furcifera* (GEBHARDT *et al.*, 2002). Diacetilfloroglucinol também é produzido por um fungo ectosimbionte do besouro *Scolytotrupes mikado* (DETTNER, 2011). Um antibiótico peptídico, polimixina E1, foi isolado a partir do caldo de cultura de *Bacillus polymyxa*, um simbionte intracelular do percevejo *Plautia stali* (DETTNER, 2011). Além disso, polimixina M1 pode ser encontrada em *Nilaparvata lugens*, sendo produzida por espécies de *Bacillus* (JIGAMI *et*

al., 1986). Igualmente, um simbiote bacteriano de *N. lugens* produz o antibiótico andrimida (FREDENHAGEN *et al.*, 1987).

Amicoumacina é um exemplo de antibiótico isolado a partir do intestino da larva de uma libélula. Amicoumacina é produzida por uma espécie de *Bacillus* encontrada no intestino desse invertebrado (GEBHARDT *et al.*, 2002).

Philanthus triangulum é protegido de infecção fúngica graças à bactéria simbiótica *Streptomyces philanthi*. As bactérias estão localizadas nas glândulas antenais de abelhas fêmea pertencentes a várias espécies de *Philanthus*. A bactéria é aplicada às células da cria antes da oviposição (KALTENPOTH *et al.*, 2005).

CETPI foi isolado do fungo *Cytospora*, o qual encontra-se associado a formiga *Pogonomyrmex badius* e funciona como uma proteína inibidora de transferência de ésteres de colesterila (LEE *et al.*, 1996).

Maculosina, uma ciclo-dicetopiperazina, foi isolada do intestino do besouro *Laccophilus minuta*, sendo *Bacillus pumilus* o responsável pela sua produção (DETTNER, 2011).

Bacitracina é outro exemplo. Este peptídeo cíclico foi isolado do tecido de espécies de *Ceratophyllus* sendo produzida por espécies de *Bacillus*. Bacitracina é bactericida contra Gram-positivos e ativa contra poucas bactérias Gram-negativas. Além disso, ela possui alta atividade antifúngica (GEBHARDT *et al.*, 2002).

Beauveria brongniartii, outro fungo entomopatogênico que pode infestar larvas de *Melolontha melolontha* excreta um metabólito vermelho tóxico, denominado oosporeína que apresenta atividade antifúngica (NAGAOKA *et al.*, 2004).

Um exemplo interessante de interação hospedeiro-microrganismo é o da espécie do besouro *Dendroctonus frontalis* com o fungo *Entomocorticium sp.* Este besouro utiliza uma bactéria para proteger sua fonte de alimento de outros fungos competidores. O fungo *Entomocorticium sp.*, o qual é carregado num compartimento especializado do besouro (denominado micângio), serve como alimento para o desenvolvimento da larva. O mutualismo besouro-fungo é desafiado quando um fungo antagonista, *Ophiostoma minus*, o qual compete pela mesma fonte de alimento, interrompe o desenvolvimento larval. Para manter a relação de mutualismo e permitir o desenvolvimento das larvas, *D. frontalis* engaja uma relação de mutualismo adicional, neste caso com a bactéria *Streptomyces*

thermosacchari. Esta bactéria produz um antibiótico que seletivamente suprime o fungo antagonista, *O. minus*. Desta forma o desenvolvimento da larva permanece garantido (SCOTT *et al.*, 2008).

Frequentemente, artrópodes hematófagos como carrapatos apresentam relações especializadas com bactérias simbióticas. Carrapatos podem ser co-infectados por múltiplos patógenos, funcionando neste caso como vetores de doenças, e ao mesmo tempo abrigar uma variedade de simbioses (BENSON *et al.*, 2004; SATTA *et al.*, 2011; ANDREOTTI *et al.*, 2011). Esses microrganismos simbioses podem estar associados a funções vitais como nutrição do hospedeiro, defesa, interações microbianas, tolerância ao estresse ou ainda funções não estabelecidas. Interações entre microrganismos e artrópodes poderiam afetar a sua sobrevivência assim como a densidade, transmissão e virulência de patógenos por eles transmitidos (RYMASZEWSKA, 2007).

Bactérias simbióticas podem persistir em artrópodes por transmissão vertical. Simbioses comprovadamente transmitidos verticalmente incluem *Rickettsia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Coxiella spp.*, *Enterobacteria spp.*, *Moraxella spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Francisella spp.* e *Wolbachia spp.* (NODA *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2000; MORIMOTO *et al.*, 2006; PEROTTI *et al.*, 2006). Esses microrganismos já foram identificados em carrapatos de ambas às famílias, Ixodidae e Argasidae (RYMASZEWSKA, 2007). Como insetos, carrapatos podem ser fonte potencial de uma ampla variedade de moléculas bioativas já que hospedam em seus tecidos diversos microrganismos. Apesar do conhecimento de que carrapatos utilizam um rico arsenal de moléculas para driblar a defesa imune inata e adaptativa do seu hospedeiro e manter assim a sua sobrevivência (TAYLOR, 2006; KOPÁCEK *et al.*, 2010), não há estudos explorando a potencialidade de microrganismos associados a esses artrópodes como produtores de biomoléculas.

1.8. Biofilmes microbianos

1.8.1. Histórico e a evolução no conceito de biofilme

A formação de biofilme faz parte do ciclo de vida de muitos organismos procarióticos e é um fator chave para a sobrevivência dos mesmos em diversos ambientes.

Ao longo da história da microbiologia, microrganismos têm sido caracterizados primeiramente como células vivendo livremente, planctônicas (ROMANOVA *et al.*, 2006; JAIN *et al.*, 2007). A redescoberta de um fenômeno microbiológico, primeiramente descrito por Van Leeuwenhoek (1623-1723) revelou que alguns microrganismos aderiam e cresciam universalmente quando expostos a superfícies (JAIN *et al.*, 2007). Efetivamente, Van Leeuwenhoek foi a primeira pessoa a visualizar e ilustrar através de seu invento, o microscópio, microrganismos em próprios seus dentes, denominando-os como “animálculos”. Essa observação pode ser considerada a primeira relatando a existência de biofilmes microbianos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Um esforço maior no estudo de biofilmes microbianos iniciou somente há três décadas com a redescoberta que em sistemas aquáticos naturais, bactérias são encontradas predominantemente aderidas a superfícies (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Uma das primeiras observações relatadas abordando biofilmes surge no artigo de Henrici em 1933 no qual ele diz: “é evidente que a maior parte de bactérias da água não são organismos livres flutuantes, mas crescem em superfícies submersas” (O'TOOLE *et al.*, 2000; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). No início do século XXI, Claude Zobell e colaboradores notaram que bactérias aquáticas eram drasticamente mais numerosas em superfícies que no meio circundante como, por exemplo, na água do mar (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

Interessantemente, a formação de biofilme é também uma característica de 'fósseis vivos' procarióticos nas linhagens mais antigas da árvore filogenética em ambos os Archaea e Bacteria – os Korarchaeota e Aquificales, respectivamente (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

A definição do conceito de biofilme evoluiu nos últimos 25 anos. Em 1976, MARSHALL observou o desenvolvimento de fibrilas poliméricas extracelulares muito finas que ancoravam bactérias a uma superfície (DONLAN & COSTERTON, 2002). COSTERTON e colaboradores (1978) observaram que comunidades de bactérias aderidas em sistemas aquáticos eram encapsuladas por uma matriz de glicocálix de natureza polissacarídica, sendo este material importante para mediar a adesão. Já em 1987, COSTERTON expandiu o conceito definindo que biofilmes consistiam de células individuais e microcolônias, todas embebidas em uma matriz altamente hidratada predominantemente composta de exopolímero aniônico. Em 1990, CHARACKLIS &

MARSHALL descreveram outros aspectos de biofilmes, tais como heterogeneidade temporal e espacial e envolvimento de substâncias abióticas ou inorgânicas presentes na matriz dessas comunidades.

Além disso, COSTERTON & LAPPIN-SCOTT (1995) demonstraram que a adesão desencadeava a expressão de genes responsáveis pela produção de componentes bacterianos necessários para a formação de biofilme, enfatizando que o processo de formação de biofilme era regulado por genes específicos transcritos durante o processo de adesão inicial.

Com a evidência de que muitos, talvez mesmo a maioria dos microrganismos exista naturalmente vivendo em biofilme (ROMANOVA *et al.*, 2006; JAIN *et al.*, 2007), o interesse nesse tema tem aumentado consideravelmente.

O conceito atual de biofilme o define como comunidades de microrganismos aderidas de maneira irreversível a uma superfície biótica ou abiótica e encapsulados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana. Nesta comunidade de microrganismos há canais de água que atuam como um sistema circulatório primitivo para a liberação de nutrientes e a remoção de restos metabólicos (KARATAN & WATNICK, 2009).

A formação de biofilmes é um processo orquestrado, bem regulado e diferenciado (SIMÕES *et al.*, 2010) sendo mediada por fatores mecânicos, bioquímicos e genéticos (KERKSIEK, 2008). A “cidade” de microrganismos é construída, pois oferece de uma maneira geral, vantagens aos membros dessa comunidade como: (i) proteção contra condições nocivas no hospedeiro; (ii) sequestro para uma área rica em nutrientes; (iii) utilização de benefícios cooperativos (de viver em comunidade) e (iv) propicia um modo de vida padrão (KERKSIEK, 2008).

A formação e desenvolvimento de biofilmes envolvem passos sequencias (Fig. 10). Primeiramente, bactérias aderem por ligação específica ou inespecífica ao substrato (biótico ou abiótico). A ligação pode ser fraca e reversível podendo as células bacterianas desligarem-se do substrato (Fig. 10a). Entretanto, quando ligadas firmemente ao substrato, uma ligação irreversível se forma (Fig. 10b) e posteriormente as bactérias iniciam uma sinalização célula-célula (denominada de *quorum sensing*) (Fig. 10c). O sistema *quorum*

sensing controla o crescimento, replicação, secreção de vários fatores de virulência e secreção de polissacarídeos extracelulares, os quais podem levar ao desenvolvimento e formação de uma matriz tridimensional do biofilme maduro (Fig. 10d). Finalmente, células individuais ou mesmo pedaços do biofilme podem desprender da superfície, podendo assim colonizar e estabelecer um novo biofilme em outra superfície (Fig. 10e) (BRYERS, 2008).

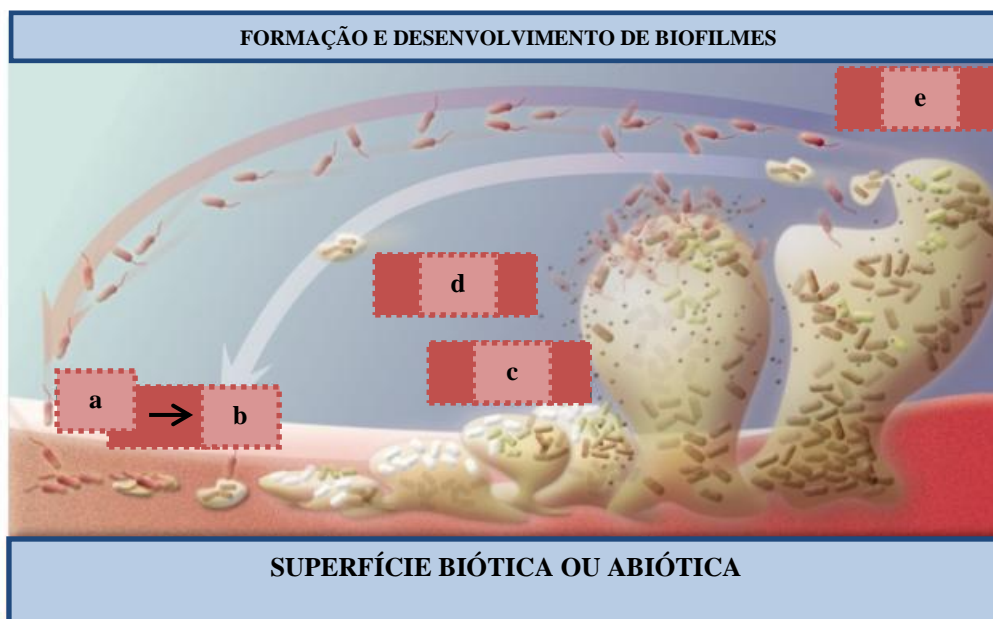


Figura 10. Passos sequenciais de formação e desenvolvimento de biofilme em uma superfície abiótica ou biótica. **a:** Adesão reversível das células bacterianas a uma superfície; **b:** Adesão irreversível a superfície; **c:** Comunicação bacteriana (*quorum sensing*); **d:** Desenvolvimento e estruturação do biofilme com produção de componentes da matriz do biofilme; **e:** Dispersão de células bacterianas individuais ou agregados de células. Adaptado de <http://woundsinternational.wordpress.com>.

1.8.2. Fatores que afetam a adesão, formação e desenvolvimento de biofilmes

A adesão de microrganismos a superfícies e subsequente desenvolvimento de biofilmes compreende processos muito complexos que são afetados por muitas variáveis (SIMÕES *et al.*, 2010).

Em geral, a adesão ocorre principalmente em superfícies rugosas, hidrofóbicas e cobertas por filmes condicionantes. Além disso, propriedades da superfície celular bacteriana, particularmente a presença de apêndices extracelulares, interações envolvendo a comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e a produção de substância polimérica extracelular são importantes para a formação e desenvolvimento do biofilme. Um aumento na velocidade do fluxo do líquido circundante e a concentração de nutrientes no local podem também interferir na adesão bacteriana (SIMÕES *et al.*, 2010). A Tabela 1 resume diferentes fatores que podem afetar a formação de biofilmes.

Tabela 1. Fatores importantes na adesão celular bacteriana, formação e desenvolvimento de biofilmes. Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2010.

Adesão à superfície	Fluido	Célula
Textura ou rugosidade	Velocidade do fluxo	Hidrofobicidade da superfície celular
Hidrofobicidade	pH	Apêndices extracelulares
Carga	Temperatura	Substâncias poliméricas extracelulares
Química da superfície	Cátions	Moléculas de sinalização
Filme condicionante	Presença de produtos antimicrobianos	
	Disponibilidade de nutrientes	

1.8.2a. Estruturas de adesão especializadas e propriedades de superfície da célula

Adesão a um substrato envolve a superfície celular bacteriana na qual pode ser encontrada proteínas, ácidos teicóicos ou lipoteicóicos, polissacarídeos e em algumas espécies, uma cápsula e vários apêndices (DONLAN, 2002). A presença de apêndices filamentosos extracelulares pode influenciar na taxa e extensão da adesão microbiana (DONLAN, 2002). Muitas células produzem apêndices filamentosos extracelulares. Há

diferentes estruturas deste tipo tais como: flagelos e pili ou fímbrias (SIMÕES *et al.*, 2010).

Apêndices como flagelo e pili são provavelmente as estruturas da bactéria que primeiramente fazem contato com a superfície quando do início da formação de biofilme (Fig. 11 e Fig. 12) (SIMÕES *et al.*, 2010).

- **Flagelo**

O flagelo bacteriano é a organela mais importante de motilidade e tem papel chave em muitos estilos de vida bacterianos, incluindo a virulência. Além do seu papel na motilidade, o flagelo também funciona como uma adesina (PALLEN *et al.*, 2005). Flagelos são filamentos muito finos da proteína flagelina com uma estrutura helicoidal estendendo-se do citoplasma através da parede celular bacteriana (Fig. 11). Flagelos podem ter um diâmetro entre 0,01 e 0,02 μm , e um comprimento de até 10 μm (PALLEN *et al.*, 2005).

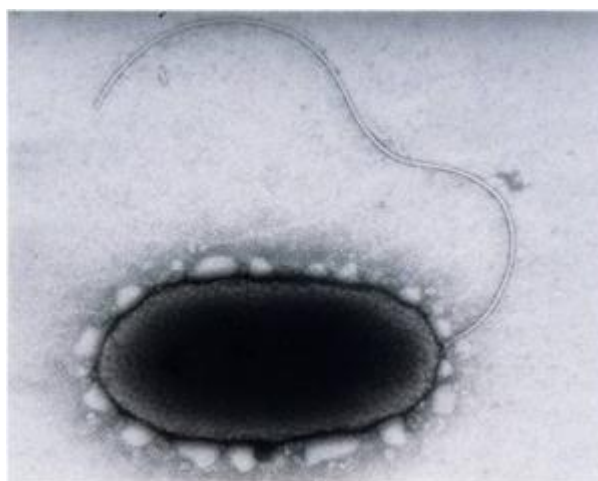


Figura 11. Micrografia eletrônica do flagelo de *P. aeruginosa* (micrografia de LANDCARE RESEARCH).

A função primária do flagelo na formação de biofilme é transportar a célula bacteriana até a superfície, permitindo assim, as interações iniciais entre célula e superfície. Acredita-se que a motilidade mediada pelo flagelo seja capaz de sobrepor as forças repulsivas da superfície do substrato, e como consequência, uma monocamada de células se forma na superfície de adesão. O envolvimento do flagelo na formação de

biofilme não é limitado à fase inicial (SIMÕES *et al.*, 2010). Foi sugerido que a motilidade mediada por flagelo é necessária para o crescimento do biofilme de *Listeria monocytogenes* (LEMON *et al.*, 2007). Além disso, a arquitetura de biofilmes mono-espécies de *P.aeruginosa* e *E.coli* depende da motilidade (BARKEN *et al.*, 2008; WOOD *et al.*, 2006).

Entretanto, o efeito do flagelo ou da motilidade na formação e desenvolvimento de biofilmes é dependente de vários fatores incluindo as condições de cultura, material que constitui a superfície, idade do biofilme e espécie bacteriana (HOURY *et al.*, 2010).

- **Pili**

Pili ou fímbrias são encontrados em virtualmente todas as bactérias Gram-negativas, mas não estão presentes em muitas das bactérias Gram-positivas (Fig. 12). Eles são apêndices filamentosos finos, também de proteína de 4 a 35 nm de largura e até vários micrômetros de comprimento (HARBRON & KENT, 1988). Os pili são compostos pela proteína chamada pilina. Sua função geral é tornar as células mais adesivas, já que a bactéria com pili pode aderir fortemente a outras células bacterianas e a partículas inorgânicas. Alguns autores sugerem que pili são importantes para a adesão e colonização de superfícies, provavelmente sobrepondo a barreira de repulsão inicial eletrostática que existe entre a célula bacteriana e a superfície ou a célula do hospedeiro. Na verdade, uma vez aderido à célula do hospedeiro, pili podem despolimerizar e permitir a adesão da parede celular bacteriana através de um contato mais íntimo. Bactérias estão constantemente perdendo e refazendo os pili. Uma mesma bactéria pode modificar a porção adesiva localizada na extremidade do pili com o objetivo de aderir a diferentes tipos de células do hospedeiro e evadir das defesas imunes. Alguns exemplos de bactérias que usam pili para inicialmente colonizar a célula do hospedeiro incluem *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* e *E. coli*. No entanto, pili nem sempre estão envolvidos no processo de adesão, mesmo se estiverem presentes (CHARACKLIS & COOKSEY, 1983).

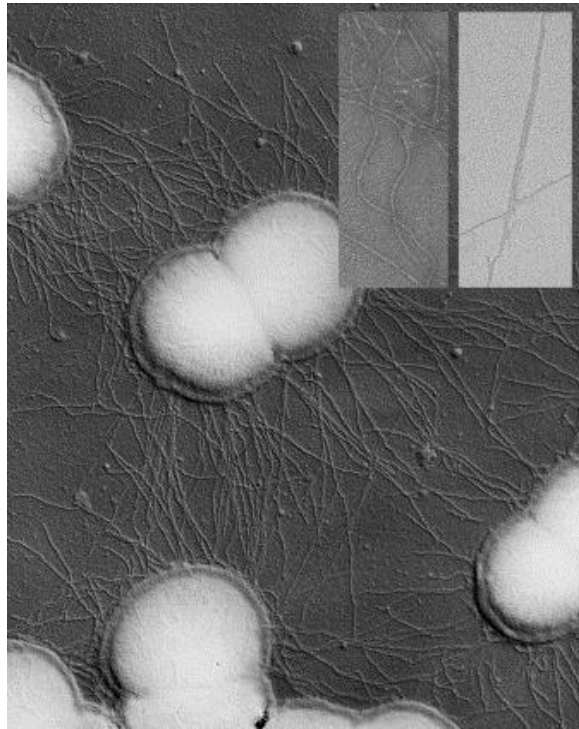


Figura 12. Pili de *Neisseria gonorrhoeae* (microscopia eletrônica de varredura). Imagem retirada de CRAIG *et al.*, 2006.

A Figura 13 demonstra detalhadamente a possível função de flagelos e pili na formação e desenvolvimento de biofilmes.

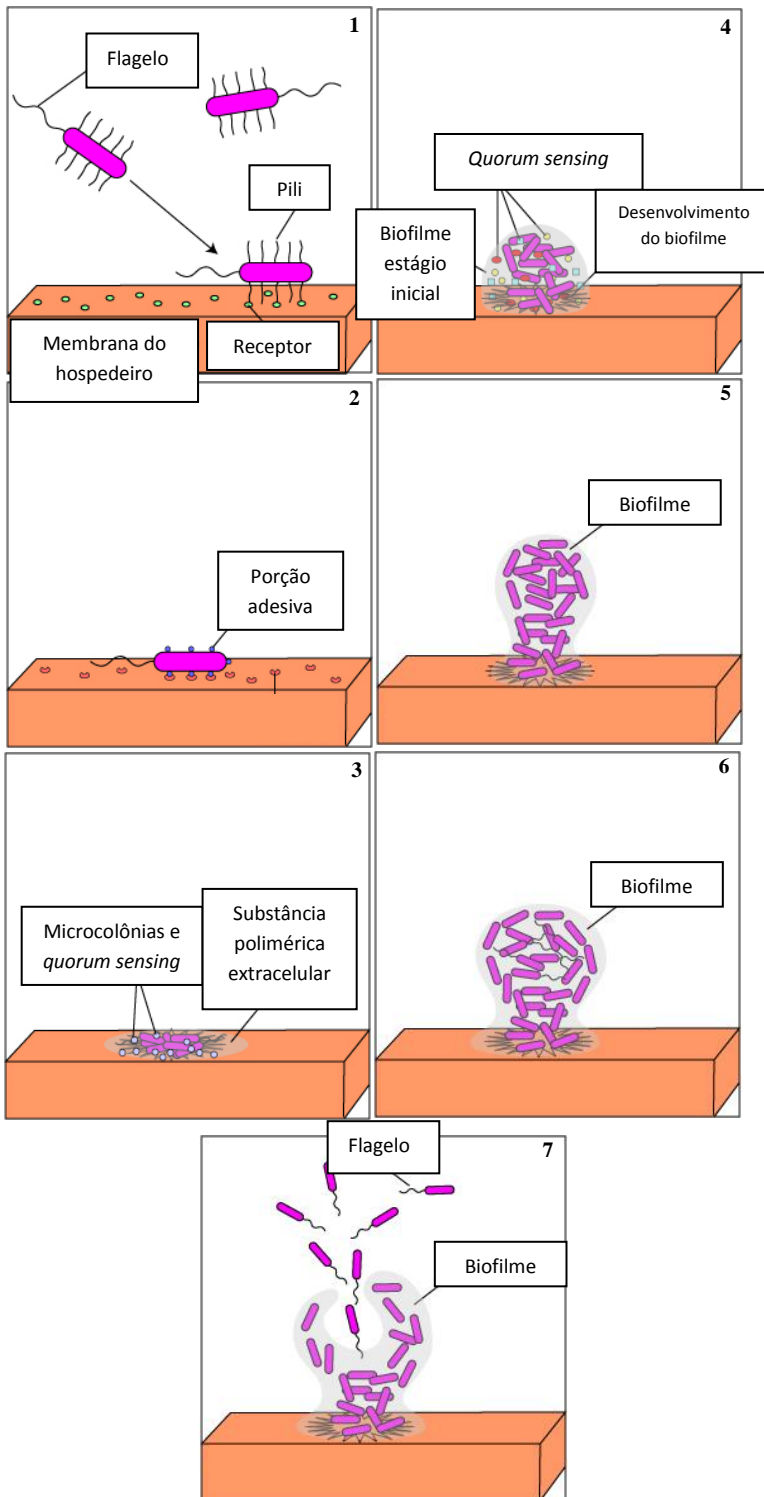


Figura 13. Importância de apêndices como flagelos e pili na formação do biofilme de *P. aeruginosa*. Adaptado da página de Doc Kaiser's Microbiology.

1: Células planctônicas utilizam seu flagelo polar e quimiotaxia para mover-se em direção às membranas mucosas do hospedeiro. Pili então ligam-se a receptores da célula do hospedeiro para iniciar o processo de adesão bacteriana.

2: Os pili retraem e as adesinas da parede celular bacteriana permitem uma adesão mais íntima da bactéria à célula do hospedeiro.

3: Enquanto a bactéria replica, auto-indutores são produzidos via comunicação bacteriana, além de polissacarídeos extracelulares para iniciar a formação do biofilme.

4: A bactéria continua a replicar-se e o biofilme continua seu desenvolvimento.

5: À medida que a bactéria replica, o biofilme continua seu crescimento apresentando um formato característico, no caso de *P. aeruginosa*, formato de “cogumelo”. Canais de água se formam permitindo a liberação de água e nutrientes para a população do biofilme.

6: Dependendo das condições encontradas, como em situações de falta de nutrientes, o sistema de comunicação bacteriano sinaliza para que algumas células presentes no biofilme produzam novamente o flagelo.

7: O processo de dispersão é iniciado, onde células planctônicas movem-se em busca de um novo local para colonização.

1.8.2b. Matriz do biofilme

Quando da formação do biofilme, bactérias produzem vários biopolímeros mediando à adesão célula-célula e superfície-célula. Estas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são principalmente polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que fornecem por um lado a estabilidade mecânica dos biofilmes e a adesão à superfície, e por outro, sustentam a arquitetura tridimensional que interconecta e imobiliza as células do biofilme (Fig. 14 a-c) (JAHN & NIELSEN, 1998; SUTHERLAND, 2001; WINGENDER *et al.*, 1999). Há uma notável diversidade na composição dessas matrizes dependendo dos microrganismos presentes (SUTHERLAND, 2001).

Os principais componentes da matriz do biofilme incluem: células microbianas, polissacarídeos extracelulares e água. A matriz, portanto, demonstra grande microheterogeneidade, onde podem existir numerosos microambientes dentro dela. Embora exopolissacarídeos forneçam a “armação” da matriz, uma ampla gama de atividades enzimáticas pode ser encontrada dentro do biofilme, algumas das quais afetam grandemente sua integridade estrutural e estabilidade (FLEMMING & WINGENDER, 2010; ABEE *et al.*, 2011).

Em muitos biofilmes, os microrganismos representam menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz representa mais de 90% da sua composição. Componentes tais como fímbrias, pili, flagelos e DNA extracelular podem funcionar como componentes extracelulares da matriz (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A matriz do biofilme permite a geração de um sistema digestivo externo versátil, sequestrando, dissolvendo e particulando nutrientes da fase água e fazendo com que estes sejam utilizados como fonte de energia e nutrientes. A matriz também atua como um centro de reciclagem mantendo os componentes das células lisadas disponíveis (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A matriz extracelular que circunda os microrganismos no biofilme parece também oferecer proteção contra vários fatores adversos incluindo a predação por patógenos do ambiente, a defesa imune do hospedeiro e a antibioticoterapia (CHIANG & TOLKER-NIELSEN, 2010).

1.8.2b.1. Substância polimérica extracelular (EPS)

Polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos constituem a principal fração da matriz do biofilme. Muitos são moléculas longas, lineares ou ramificadas com massa molecular de 0,5 a 2×10^6 Da (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Em muitas bactérias, exopolissacarídeos são indispensáveis para a formação do biofilme, onde mutantes deficientes na sua síntese são severamente comprometidos ou incapazes de formar biofilmes maduros (WATNIK & KOLTER, 1999; DANESE *et al.*, 2000; FRIEDMAN & KOLTER, 2004; MA *et al.*, 2009). EPS possuem várias funções no biofilme tais como proteção contra a dessecação, crioproteção, estabilização de enzimas através do controle do pH e de flutuações de salinidade, funcionando como uma superfície aderente, estocando nutrientes e sequestrando compostos tóxicos (CARVALHO & FERNANDES, 2010).

Polissacarídeos representam em geral 40-95% do EPS (CARVALHO & FERNANDES, 2010). A composição química e as propriedades físicas dos polissacarídeos da matriz do biofilme podem variar grandemente devido ao tipo de unidades monoméricas, tipo de ligações glicosídicas (por exemplo: β -1,4, β -1,3 ou α -1,6) e a presença de diferentes substituintes orgânicos ou ligação a componentes inorgânicos. Celulose, PNAG (poli-*N*-acetilglucosamina), PIA (adesina intercelular polissacarídica) (FREDHEIM *et al.*, 2011), Pel e Psl são alguns exemplos de polissacarídeos encontrados na matriz do biofilme de certas espécies bacterianas (PAMP *et al.*, 2007).

P. aeruginosa pode, dependendo da cepa e das condições de crescimento, produzir pelo menos três diferentes polissacarídeos: alginato, Pel e Psl (RYDER *et al.*, 2007). O principal componente de Pel é glicose (FRIEDMAN & KOLTER, 2004a; RYDER *et al.*, 2007) enquanto Psl apresenta alto conteúdo de manose (FRIEDMAN & KOLTER, 2004a; FRIEDMAN & KOLTER, 2004b; RYDER *et al.*, 2007; MANN & WOZNIAK, 2012). Estudos utilizando ensaio de adesão estático sugerem que Psl é importante nos estágios iniciais do desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, enquanto a síntese de Pel parece ser importante nos estágios mais tardios do desenvolvimento do biofilme (PAMP *et al.*, 2007).

A formação e manutenção da comunidade microbiana dependem da produção e da quantidade de EPS produzida. A natureza dos componentes individuais do EPS, bem como a arquitetura tridimensional da matriz (as densas áreas, poros e canais), determina a morfologia do biofilme resultante, podendo esta ser lisa, plana, macia, rugosa, filamentosa entre outros tipos (PAMP *et al.*, 2007).

1.8.2b.2. Proteínas extracelulares

A matriz do biofilme pode conter quantidades consideráveis de proteína. Diferentes enzimas extracelulares foram encontradas em biofilmes, muitas das quais estão envolvidas na degradação de biopolímeros. Os substratos destas enzimas extracelulares incluem polímeros solúveis em água (tais como muitos polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos) e compostos insolúveis na água (celulose, quitina e lipídeos), bem como partículas orgânicas presentes no biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010; PAMP *et al.*, 2007).

Algumas enzimas podem estar envolvidas na degradação estrutural do EPS, promovendo a dispersão do biofilme. Outras enzimas atuam como fatores de virulência em biofilmes durante processos infecciosos (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

As proteínas não enzimáticas presentes na matriz tais como proteínas ligando carboidratos extracelulares associadas à superfície estão envolvidas na formação e estabilização da matriz polissacarídica e constituem uma ligação entre superfície bacteriana e EPS extracelular (PAMP *et al.*, 2007; FLEMMING & WINGENDER, 2010).

CdrA é uma proteína estrutural de biofilme. Ela é secretada e liga-se diretamente a Psl em biofilmes de *P. aeruginosa*. CdrA faz ligação cruzada com moléculas de Psl e assim fortalece a matriz do biofilme dessa bactéria (BORLEE *et al.*, 2010).

Apêndices proteináceos, como pili (VAN SCHAIK *et al.*, 2005) e flagelos podem também atuar como elementos estruturais interagindo com outros componentes do EPS da matriz do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

1.8.2b.3. DNA extracelular (eDNA)

Biofilmes de diferentes origens contêm eDNA, mas ele está presente particularmente em grandes quantidades em biofilmes de sistemas contendo águas residuais. A presença de eDNA foi primeiramente observada em biofilmes de *P. aeruginosa*, *Streptococcus intermedius*, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus sp.* (MONTANARO *et al.*, 2011). A quantidade de eDNA produzida é variável e a origem do eDNA pode também ser distinta, sendo a autólise o mecanismo mais comum de liberação de eDNA (PAMP *et al.*, 2007; MONTANARO *et al.*, 2011). eDNA é por exemplo, o principal componente da matriz do biofilme de *S. aureus*, enquanto parece ser o componente minoritário de biofilmes de *S. epidermidis*. eDNA é também um componente majoritário do biofilme de *P. aeruginosa*, onde sua função é atuar com um conector intercelular (MA *et al.*, 2009). *Bacillus cereus* utiliza DNA como adesina (DAS *et al.*, 2010). Tratamento com DNase inibe a formação de biofilmes destas duas espécies bacterianas (*P. aeruginosa* e *B. cereus*) (Fig. 14c) (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

1.8.2b.4. Surfactantes e lipídeos

Lipídeos podem também ser encontrados na matriz do biofilme (CARVALHO & FERNANDES, 2011). Lipopolissacarídeos são cruciais na aderência de *Thiobacillus ferrooxidans* a superfícies de pirita (SAND & GEHRKE, 2006). Outras substâncias incluem surfactina, viscosina e emulsana, as quais dispersam substâncias hidrofóbicas deixando-as disponíveis para utilização (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Além disso, ramnolipídeos, os quais atuam como surfactantes, têm sido encontrados na matriz de *P. aeruginosa* (DAVEY *et al.*, 2003). Foi proposto que eles atuam na formação da microcolônia inicial facilitando a migração bacteriana associada à superfície e a formação de estruturas com formato de cogumelo, tendo também papel na dispersão do biofilme (BOLES *et al.*, 2004; PAMP *et al.*, 2007).

1.8.2b.5. Água

A água é o componente majoritário da matriz de biofilmes. O EPS juntamente com a água da matriz fornece um ambiente altamente hidratado para as células bacterianas (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

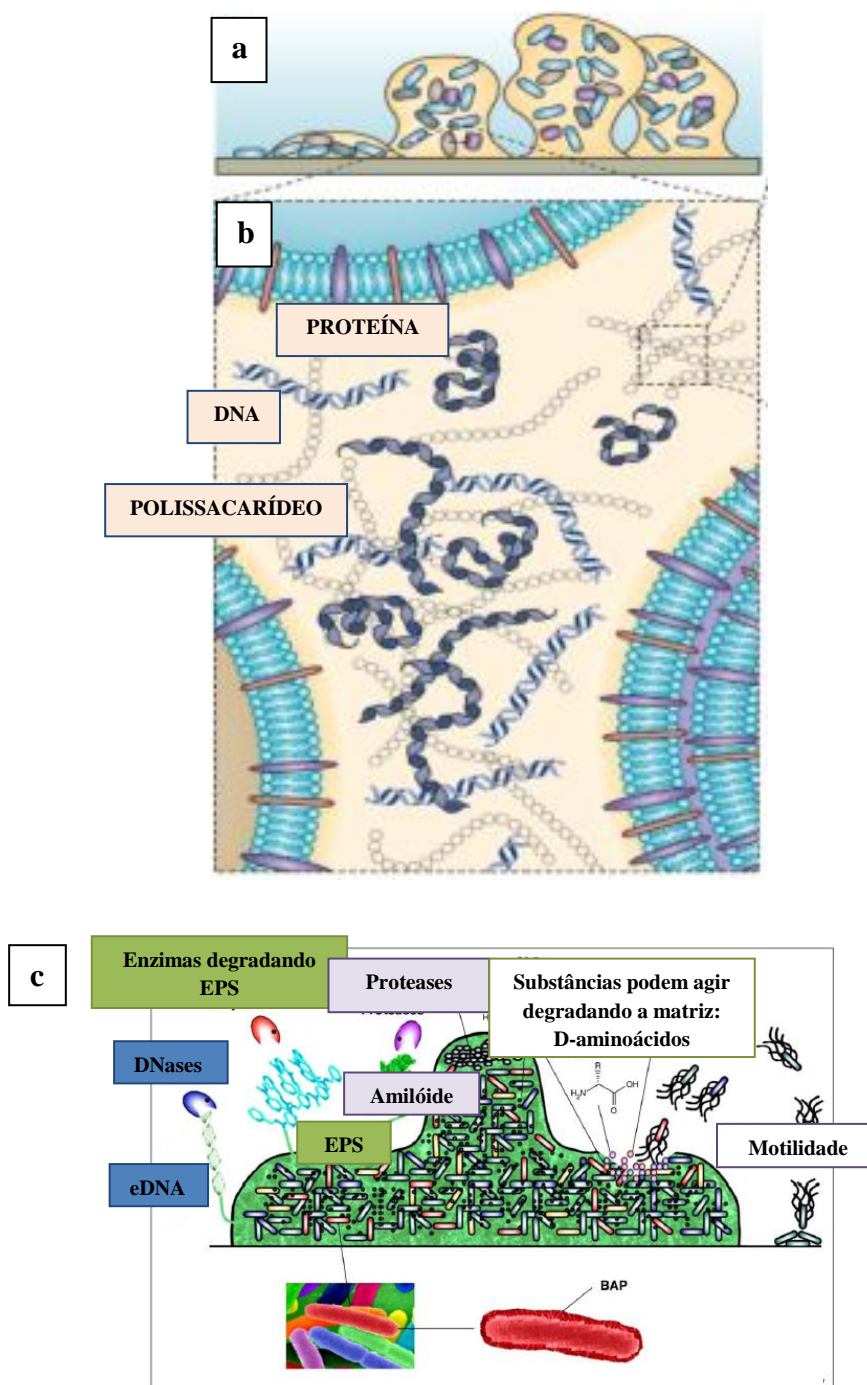


Figura 14. Representação ilustrativa de substâncias presentes na matriz de um biofilme. **a** e **b**: Os principais componentes da matriz – polissacarídeos, proteínas e DNA – estão distribuídos entre as células com um padrão heterogêneo, criando diferentes regiões no biofilme. Imagens a e b adaptadas de FLEMMING & WINGENDER, 2010; **c**: Apresentação esquemática de mecanismos envolvidos na dispersão do biofilme. Biofilmes podem conter proteínas associadas e específicas ao fenótipo biofilme (BAP). Os

componentes da matriz podem ser alvos de enzimas como DNases e proteases. Substâncias como D-aminoácidos podem agir na dispersão de biofilmes. A motilidade é um fator importante no estabelecimento de novos biofilmes e para a dispersão de células de biofilmes maduros. Imagem c adaptada de ABEE *et al.*, 2011.

1.8.3. Resistência do biofilme a agentes antimicrobianos e às defesas imunes do hospedeiro

Resistência aumentada à antibioticoterapia e às defesas imunes do hospedeiro é uma característica geral associada a bactérias vivendo em biofilmes (PARSEK & SINGH, 2003). Quando aderidas, bactérias apresentam uma grande resistência, fazendo com que as células do biofilme sejam 10 a 1000 vezes menos susceptíveis a vários agentes antimicrobianos que a mesma bactéria vivendo na forma livre ou planctônica (JÉFFERSON, 2004). Por exemplo, hipoclorito de sódio, um biocida oxidante e considerado bastante efetivo, requer um aumento de 600 vezes na sua concentração para matar células do biofilme de *S. aureus*, comparado a células planctônicas (DAVIES, 2003).

Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a extraordinária resistência apresentada pelas bactérias do biofilme a antibióticos (DAVIES, 2003):

- A matriz de EPS do biofilme pode atuar como um adsorvente ou reagente, desta forma reduzindo a quantidade de agente antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme (adicionalmente a estrutura do biofilme poderia fisicamente reduzir a penetração do antimicrobiano impedindo o acesso a algumas regiões);
- Taxas metabólicas e de crescimento reduzidas, particularmente das células presentes na parte mais profunda do biofilme, tornando-as inerentemente menos sensíveis aos agentes antimicrobianos. Estabelecimento de microambientes no biofilme tais como zonas de oxigênio reduzidas levam a um lento crescimento bacteriano;
- Uma pequena população de bactérias dentro do biofilme parece diferenciar-se em células *persisters*, com sensibilidade muito reduzida aos agentes antimicrobianos;
- As células do biofilme são fisiologicamente distintas das planctônicas e expressam fatores de proteção específicos como bombas de efluxo multi-drogas.

A Figura 15 mostra de maneira representativa a atividade de antibióticos contra um biofilme, demonstrando que o tratamento inicial é usualmente efetivo matando somente as bactérias presentes nas margens das microcolônias do biofilme. Bactérias presentes na profundidade das microcolônias não são sempre atingidas pelo agente antimicrobiano.

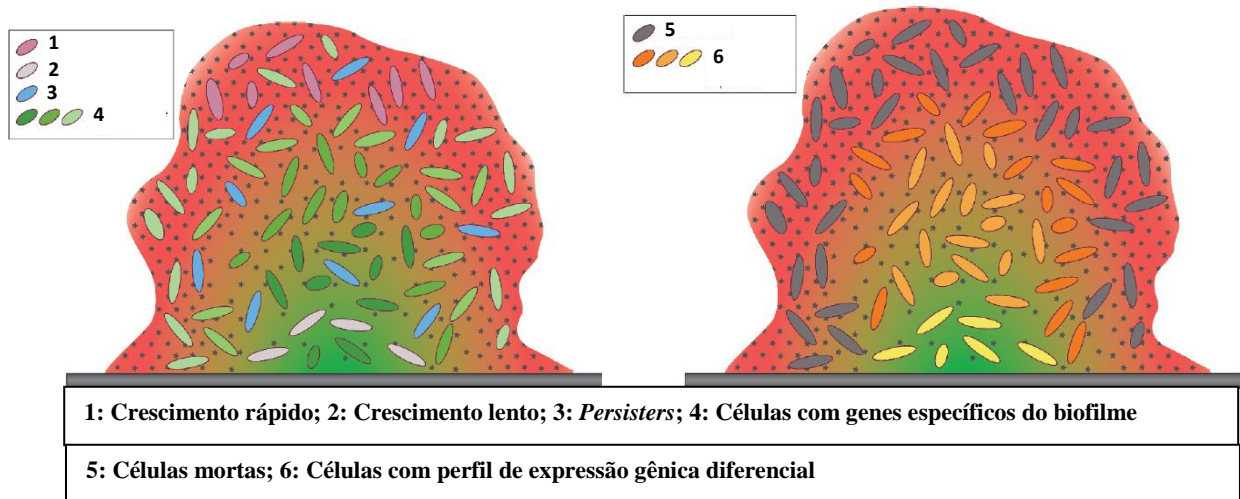


Figura 15. Mecanismos de resistência de biofilmes a antibióticos. Limitada difusão de antibióticos através da matriz protege as bactérias das partes mais internas do biofilme enquanto bactérias presentes na parte externa podem ser rapidamente mortas pelo agente antibiótico (elipses cinzas). Concentrações de nutrientes e oxigênio também decrescem nas partes mais profundas do biofilme simbolizadas pelo gradiente de cor vermelha (altas concentrações de nutrientes e condição aeróbica) para verde (baixas concentrações de nutrientes e condição anaeróbica). Estes gradientes de lento crescimento de muitas bactérias (elipses lilás) facilitam sua sobrevivência na presença de antibióticos, os quais matam geralmente microrganismos em crescimento rápido (elipses violeta). Células *persisters*, também consideradas apresentando baixo crescimento ou não crescendo, podem estar presentes (elipses azuis). A expressão diferencial de genes específicos do biofilme (diferentes colorações de verde) em resposta a sinais ambientais pode influenciar o estado de resistência a antibióticos. O próprio tratamento com antibióticos pode induzir a expressão de fatores de resistência bacterianos. Lenta e diminuída difusão do

antimicrobiano devido à inibição pela matriz e outros fatores podem estabelecer um gradiente do antibiótico. Este gradiente pode induzir a expressão gênica diferencial de fatores induzidos pelo antibiótico (elipses laranja e amarelo). Figura adaptada de ANDERSON & O'TOOLE, 2008.

1.8.3a. Penetração do antibiótico

Quando o agente antimicrobiano entra em contato com o biofilme, o primeiro obstáculo que ele encontra é a matriz do biofilme. Antibióticos devem atravessar esta camada composta de EPS, DNA e proteínas para assim atingirem seus alvos. Entretanto, essa matriz acaba funcionando como uma barreira impedindo a difusão e incapacitando o antibiótico de penetrar em todas as áreas do biofilme (Fig. 15 a e b). Alguns experimentos mostraram que o agente antimicrobiano é capaz de reduzir significativamente o biofilme, mas não inteiramente (DAVIES, 2003; PARAJE, 2011).

Poucos estudos tem se dedicado ao entendimento da matriz como um limitador na penetração de antibióticos. Alginato, um EPS produzido por *P. aeruginosa*, tem sido estudado e parece ter a habilidade de capturar agentes antimicrobianos. Esta habilidade parece ser relatada à natureza aniônica do exopolímero. Moléculas catiônicas podem também ser retidas dentro da matriz e prevenir a sua atuação nas bactérias do biofilme (MYSZKA & CZACZYK, 2011). Alginato oferece proteção contra compostos de amônio quaternário, atuando como um campo hidrofóbico que decresce a atividade desses biocidas. Além disso, alginato pode ligar-se a antibióticos carregados positivamente, tais como aminoglicosídeos inibindo assim sua atividade. Tobramicina também se liga rápido a alginato. Um estudo recente mostrou que a difusão de tobramicina em colônias de biofilme de *P. aeruginosa* é severamente retardada (KIEREK-PEARSON & KARATAN, 2005). Assim, a adsorção de agentes antimicrobianos carregados positivamente por componentes da matriz aniônica parece ser uma ferramenta de sobrevivência efetiva empregada por certas bactérias.

Entretanto, a limitada difusão do antibiótico não parece ser uma característica universal para todos os biofilmes nem seria a única explicação para a extrema resistência

apresentada por essas comunidades de microrganismos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

1.8.3b. Estímulo da produção de EPS por antibióticos

De forma intrigante, alguns antibióticos podem atuar estimulando a produção de EPS (YIM *et al.*, 2007). Concentrações sub-inibitórias de tetraciclina, quinupristina-dalfopristina e eritromicina ativam a expressão de genes que codificam PIA em *S. epidemidis*, o qual é vital para a formação de biofilme desta bactéria (RACHID *et al.*, 2000).

Em *P. aeruginosa*, a expressão de alginato é altamente regulada por concentrações sub-inibitórias do aminoglicosídeo imipenem. HOFFMAN e colaboradores (2005) demonstraram que o aminoglicosídeo em concentração sub-inibitória aumenta a formação de biofilme em *P. aeruginosa* e *E. coli*. Estes pesquisadores identificaram um gene em *P. aeruginosa* (nomeado *arr* para regulador de resposta a aminoglicosídeos) que parece mediar este efeito modulando os níveis intracelulares de c-di-GMP (diguanilato cíclico) (HOFFMAN *et al.*, 2005).

1.8.3c. Reduzido crescimento bacteriano em biofilmes

Bactérias nessas comunidades apresentam taxas reduzidas de crescimento sendo este um fator que contribui para a resistência incomum de biofilmes a antibioticoterapia (DAVIES, 2003). Durante as fases iniciais de desenvolvimento do biofilme todas as células colonizando a superfície são altamente ativas e crescem rapidamente. Passado o período de colonização primária e havendo a formação de pequenas microcolônias, a atividade das células decresce gradualmente, inicialmente nas partes centrais da microcolônia e eventualmente também na superfície do biofilme (DAVIES, 2003). Além disso, a privação de oxigênio e nutrientes, uma característica que pode ser encontrada em biofilmes, resulta em um decréscimo na atividade metabólica bacteriana e cessação do crescimento (DAVEY & O'TOOLE, 2000). Como antibióticos geralmente tem como alvos mecanismos envolvidos no crescimento bacteriano, microrganismos com lento crescimento ou sem crescimento estariam protegidos da ação desses compostos (CLATWORTHY *et al.*, 2007).

1.8.3d. Persistência

O fenômeno de persistência foi reconhecido em 1940 (ANDERSON & O'TOOLE, 2008; JAYARAMAN, 2008). Na época a subpopulação de bactérias sobreviventes à penicilina foi denominada como *persisters*. Células *persisters* têm sido propostas como um mecanismo inato adicional para a resistência do biofilme (LEWIS, 2007).

Na teoria *persisters*, uma pequena subpopulação de bactérias, em biofilme ou na forma planctônica, apresentam-se dormentes ou diferenciam-se como esporos e assim sobrevivem ao tratamento com antibióticos (LEWIS, 2005; LEWIS, 2007).

Desta forma, um mecanismo proposto para explicar a habilidade de *persisters* resistirem à ação de antibióticos é a lenta taxa de crescimento bacteriano (LEWIS, 2007). Entretanto, *persisters* podem sobreviver mesmo após tratamento com ofloxacina, que exerce atividade bactericida contra microrganismos que não estão crescendo, sugerindo que a taxa de crescimento limitada não pode por si só explicar a resistência destas células (ANDERSON & O'TOOLE, 2008).

1.8.3e. Fisiologia singular do modo de vida biofilme

Observações iniciais de diferentes estudos levantaram a hipótese que as bactérias do biofilme são fisiologicamente distintas das células planctônicas (DONLAN & COSTERTON, 2002; STEWART & FRANKLIN, 2008). Efetivamente, bactérias no biofilme apresentam padrões de expressão gênica únicos e, além disso, esses padrões não são observados em células vivendo na forma livre (COSTERTON *et al.*, 1995; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). A adesão da bactéria à superfície leva ao início da expressão de genes específicos relacionados a biofilmes, culminando no que foi descrito por Costerton como “o fenótipo biofilme”. Estas mudanças fenotípicas ocorrem como resultado da associação de fatores sigma à RNA polimerase, o que resulta em bactérias morfológica e bioquimicamente distintas das células de vida livre (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Monitorando mudanças nos padrões globais de expressão de genes em células de *P. aeruginosa* aderidas, BRÖZEL *et al.* (1995) encontraram que o nível de expressão de ao menos 11 proteínas foi alterado durante os diferentes estágios de adesão. WHITELEY *et*

al. (2001) detectaram uma expressão diferencial de 72 genes nas populações de biofilme de *P. aeruginosa*, comparada a células livres. Outro trabalho, comparando células do biofilme maduro de *P. aeruginosa* com células planctônicas, revelou que 800 proteínas apresentaram uma mudança no nível de expressão de 6 vezes ou mais, o que é mais do que 50% do proteoma (SAUER *et al.*, 2002).

Talvez o melhor exemplo de fator específico a biofilme é o gene *ndvB* em *P. aeruginosa*. O gene *ndvB* parece codificar uma enzima envolvida na síntese de glucanas cíclicas. Essas glucanas ligam-se à tobramicina e previnem a morte celular bacteriana, muito provavelmente pelo sequestro do antibiótico. *ndvB* é expresso em biofilme mas não em bactérias planctônicas (ANDERSON & O'TOOLE, 2008).

As diferenças na expressão gênica e perfis de proteínas que são observados comparando células livres e biofilmes indicam que vários fatores são provavelmente responsáveis pelas diferenças observadas na resistência aos antibióticos por esses dois modos de vida bacterianos (Fig. 16 a e b).

1.8.4. Regulação do biofilme

Bactérias são capazes de adaptarem-se a condições externas, o que torna possível que se estabeleçam em quase todos os habitats da biosfera. Numerosos sinais ambientais determinam a decisão de uma espécie bacteriana formar ou não um biofilme. Alguns destes sinais foram identificados enquanto outros permanecem não elucidados.

Um sinal mecânico pode ser um desses determinantes. Quando a bactéria se aproxima de uma superfície, ela faz a escolha entre o estilo de vida livre ou sésil. Isto sugere que a própria superfície deve ser percebida para a formação de biofilme ser desencadeada (KUCHMA & O'TOOLE, 2000). Embora não haja evidência definitiva, estudos sugerem que o flagelo pode ser a estrutura operacional na detecção de superfícies por bactérias móveis (SIMÕES *et al.*, 2010).

Outro fator importante na formação do biofilme são as condições nutricionais e metabólicas. Bactérias monitoram e respondem ao tipo e quantidade de nutrientes em seu ambiente. Logo, o estado nutricional deste ambiente pode ser um fator determinante na decisão da bactéria em viver em comunidade, devido aos custos energéticos que isso

demanda. Portanto, a formação de biofilme satisfaz necessidades diferentes, dependendo do ambiente onde a bactéria está inserida (KUCHMA & O'TOOLE, 2000). Alguns sinais nutricionais já identificados que afetam a formação de biofilme incluem glicose, indol e poliaminas. Moléculas inorgânicas como ferro e fosfato podem também estar envolvidas neste processo, enquanto a osmolaridade pode regular a formação de biofilme em diferentes espécies bacterianas (GOLOVLEV, 2002). Entretanto, é importante ressaltar que a resposta a cada um desses determinantes não segue um único padrão podendo variar dependendo da espécie bacteriana em questão.

Dois sistemas têm sido especialmente estudados e explorados no controle e regulação de biofilmes: o sistema de comunicação bacteriano *quorum sensing* (QS) (MILLER & BASSLER, 2001) e o sistema envolvendo o segundo mensageiro c-di-GMP (HENGGE, 2009).

1.8.4a. *Quorum sensing*

Atualmente, sabe-se que existem diversas interações e comunicação entre as células bacterianas pertencentes a uma mesma espécie e a espécies diferentes. Essa comunicação celular, denominada de *quorum sensing*, desempenha um papel central na fisiologia e no desenvolvimento dessas bactérias (READING & SPERANDIO, 2006; NG & BASSLER, 2009).

Quorum sensing foi descoberto e descrito há aproximadamente 30 anos em duas espécies bacterianas marinhas, *Vibrio fischeri* e *V. harveyi* (NEALSON & HASTINGS, 1979). A enorme explosão de estudos nesta área mostrou que muitas bactérias se comunicam por meio da produção e liberação de moléculas químicas coordenando assim o comportamento em grupo.

Quorum sensing é um sistema de comunicação entre bactérias dependente da densidade populacional. Nesses sistemas, as bactérias produzem moléculas químicas sinalizadoras de baixo peso molecular, os auto-indutores (AI) bacterianos, que são liberados no ambiente (MILLER & BASSLER, 2001). Quando uma quantidade crítica dessas moléculas é atingida, as bactérias detectam a presença de um número suficiente ou “*quorum*” de bactérias e respondem por meio da ativação ou repressão de certos genes (GONZÁLEZ & KESHAVAN, 2006; RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006). A expressão

coordenada destes genes é mediada pelas moléculas-sinal (AI), especialmente na forma de acil-homoserina lactonas (AHL) em bactérias Gram-negativas e de oligopeptídeos modificados em bactérias Gram-positivas (GONZÁLEZ & KESHAVAN, 2006). Esses sistemas, encontrados em muitas bactérias, atuam como reguladores centrais da expressão de virulência. As bactérias utilizam o QS para regular uma série de características fenotípicas, tais como formação de biofilmes, produção de toxinas, produção de antibióticos, produção de pigmento, diferenciação celular, crescimento, competência para captação de DNA, transferência de plasmídeos, esporulação, expressão de genes de virulência e motilidade (SMITH *et al.*, 2002 ; SMITH & IGLEWSKI, 2003; GONZÁLEZ & KESHAVAN, 2006). Além disso, o QS bacteriano favorece o acesso a nutrientes ou nichos ambientais mais favoráveis, permitindo que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos (SMITH *et al.*, 2002; SMITH & IGLEWSKI, 2003).

Este fenômeno de comunicação celular é amplamente empregado por uma grande variedade de espécies Gram-positivas e Gram-negativas.

- ***Quorum sensing* em bactérias Gram-negativas: acil-homoserinas lactonas (AHL)**

Os mecanismos de QS mais estudados são os encontrados nas *Proteobacterias* Gram-negativas, que usam os AI conhecidos como acil-homoserinas lactonas (AHLs) como moléculas sinalizadoras (Fig. 16 e Fig. 18). Com poucas exceções, as proteínas que sintetizam esses auto-indutores constituem uma família evolutivamente conservada de homólogos conhecidos como sintases de auto-indutores LuxI. As proteínas que atuam como elementos de resposta específica para esses auto-indutores formam outra família evolutivamente conservada conhecida como família de reguladores transcricionais LuxR. Entretanto, cada espécie de bactéria Gram-negativa produz uma AHL ou uma combinação de AHL, se possuir mais de uma proteína LuxI. Assim, apenas os membros das mesmas espécies reconhecem e respondem ao auto-indutor (MILLER & BASSLER, 2001; RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006).

Após a síntese da AHL dirigida por LuxI, esse AI difunde-se livremente pela célula. Assim, a concentração de AHL no meio extracelular torna-se equivalente àquela

presente no meio intracelular, esse fenômeno aumenta proporcionalmente com o aumento da densidade celular. Uma vez atingida a concentração crítica, o AI liga-se a proteína LuxR. Esse complexo LuxR-AI liga-se a um promotor específico no DNA e ativa a transcrição de genes alvo (Fig. 16) (MILLER & BASSLER, 2001).

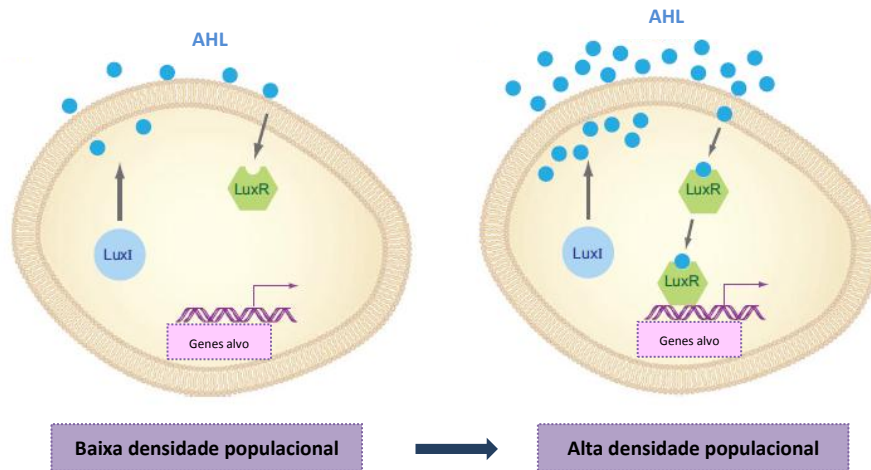


Figura 16. Representação esquemática do QS em bactérias Gram-negativas. AHL (círculos azuis) são produzidas por homólogos da enzima LuxI que ligam-se a homólogos de LuxR ativando assim a expressão de genes alvo. Quando a densidade celular é baixa, a concentração de sinal também é baixa dentro e fora da célula bacteriana, com uma ativação mínima de LuxR. Quando a densidade populacional é alta, acil-homoserina lactona ativa LuxR ligando-se a ele e desencadeando a expressão de genes alvo. Figura adaptada de JAYARAMAN & WOOD, 2008.

- **Quorum sensing em bactérias Gram-positivas: peptídeos pequenos**

Como citado anteriormente, bactérias Gram-positivas não fazem uso de AHL para se comunicarem, mas produzem e transportam oligopeptídeos como auto-indutores. Esses oligopeptídeos também são conhecidos como peptídeos auto-indutores (PAI) (Fig. 17 e Fig. 18). Outro contraste com o sistema das Gram-negativas é que a membrana não é permeável aos PAI, sendo necessária a existência de transportadores de superfície celular para facilitar a secreção no ambiente externo. A detecção dos PAI é mediada por sistemas de transdução de dois componentes. Esses sistemas bacterianos funcionam por meio de uma cascata de fosforilação envolvendo um sensor quinase e um regulador de resposta. Os

PAI se ligam a sensores quinases de dois componentes ativando cascatas de fosforilação, transmitindo informação a célula sobre a densidade populacional. O componente final do circuito, o regulador de resposta, quando fosforilado liga-se ao DNA e regula assim a transcrição de genes alvos (Fig. 17) (MILLER & BASSLER, 2001; WILLIAMS, 2007; NG & BASSLER, 2009).

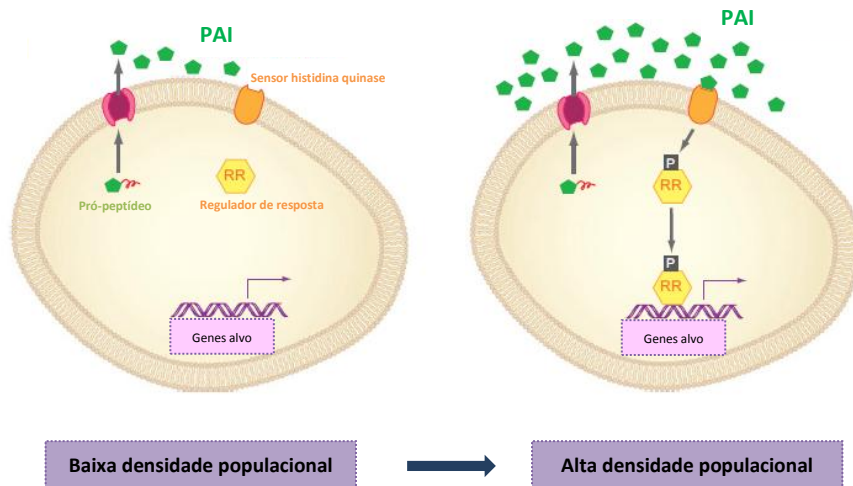


Figura 17. Representação esquemática do QS em bactérias Gram-positivas. Peptídeos (PAI, pentagrama verde) são produzidos como pró-peptídeos, processados e então exportados via um receptor para fora da célula. Quando a densidade celular é baixa, a concentração do sinal PAI é baixa fora da célula e não há ativação do regulador de resposta (RR). Quando a densidade populacional torna-se alta, o PAI se liga ao receptor histidina quinase levando a fosforilação do RR e a expressão de genes alvo. Figura adaptada de JAYARAMAN & WOOD, 2008.

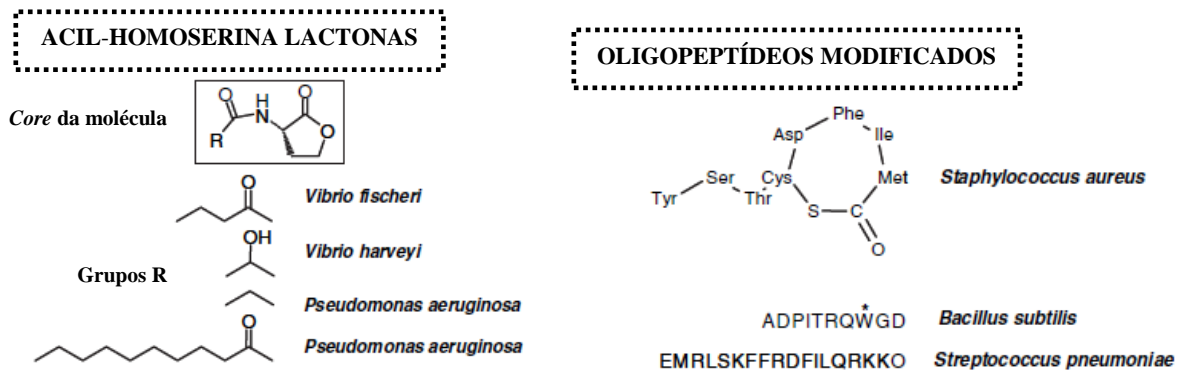


Figura 18. Exemplos de moléculas auto-indutoras utilizadas na comunicação célula-célula em Gram-negativas e Gram-positivas. O asterisco no resíduo triptofano do oligopeptídeo de *B. subtilis* representa uma modificação isoprenila. Figura adaptada de CAMILLI & BASSLER, 2006.

É importante ressaltar que embora haja alta especificidade entre um AI e seu receptor, várias espécies bacterianas produzem mais de um sinal e múltiplos circuitos QS. Exemplos desses múltiplos circuitos incluem àqueles produzidos por *V. harveyi*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os sinais auto-indutores desses sistemas não necessitam ser similares, pois em *P. aeruginosa* dois sinais AHL (produzidos por LasI e RhII) são sintetizados em adição a um terceiro sinal baseado em uma quinolona (PQS) (JAYARAMAN & WOOD, 2008).

Além disso, apesar das restrições estruturais e dos mecanismos regulatórios envolvidos na garantia da especificidade do QS, algum grau de sinalização inespecífico ou sinalização cruzada já foi observado em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Um exemplo é a interação entre *P. aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, ambas encontradas em pulmões de pacientes com fibrose cística. Pesquisadores demonstraram que a sinalização cruzada do QS ocorre entre as duas bactérias, mas é unidirecional. Os sinais AHL produzidos por *P. aeruginosa* são reconhecidos por *B. cepacia* e ativam o sistema QS desta bactéria. Entretanto, *P. aeruginosa* não é capaz de utilizar o sinal produzido por *B. cepacia* e assim ativar seu sistema de comunicação bacteriano. Esta sinalização cruzada tem implicações significativas no desenvolvimento de biofilmes multi-espécies e na sua patogênese (JAYARAMAN & WOOD, 2008).

Além da existência de comunicação intra e inter-espécies, comunicação intra-reino já foi também descrita (DIGGLE *et al.*; 2007; JAYARAMAN & WOOD, 2008).

1.8.4b. O segundo mensageiro: c-di-GMP

Recentemente foi descoberto um novo tipo de mecanismo de sinalização em bactérias envolvendo monosfosfato de guanosina dimérico cíclico (c-di-GMP). A quase universalidade deste segundo mensageiro em bactérias combinada com a relevância biomédica e importância comercial de biofilmes, tem gerado muito interesse em pesquisa envolvendo a sinalização via c-di-GMP (COTTER & STIBITZ, 2007).

O sistema básico envolvendo c-di-GMP foi descoberto por ROSS e colegas (1987) ao mostrarem que esse segundo mensageiro é um ativador alostérico positivo da enzima celulose sintase usada por *Gluconacetobacter xylinus* para produzir a celulose da matriz extracelular. Entretanto, o papel de c-di-GMP no controle da formação de biofilmes foi proposto somente em 2002 por BOLES & MCCARTER e D'ARGENIO e colaboradores, trabalhando com *Vibrio parahaemolyticus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

c-di-GMP é um segundo mensageiro bacteriano que regula diversos processos celulares em bactérias (Fig. 19). Ele é produzido a partir de duas moléculas de GTP por diguanilato ciclases (DGC) e é degradado gerando 5'-fosfoguanilil-(3'-5') guanosina (pGpG) por fosfodiesterases específicas (PDE). pGpG é subsequentemente degradado dando origem a duas moléculas de GMP. Desta forma, DGC e PDE controlam o metabolismo e a homeostasia deste segundo mensageiro (Fig. 19) (COTTER & STIBITZ, 2007).

A atividade de DGC está associada com o domínio GGDEF, identificado como parte essencial do sítio ativo da enzima. Já a atividade de PDE está associada com o domínio EAL ou HD-GYP. Esses motivos de aminoácido em ambos os domínios são essenciais para a atividade enzimática (Fig. 19) (SIMM *et al.*, 2004).

A atual explosão no interesse por esse mecanismo de sinalização foi estimulada em parte quando constatou-se que domínios GGDEF e EAL são ubíquos em bactérias e muitas espécies codificam um grande número de proteínas contendo estas sequências (JENAL & MALONE, 2006).

c-di-GMP atua como um mensageiro universal bacteriano envolvido na decisão molecular entre dois estilos de vida bacterianos distintos: planctônico/móvel e sésil/biofilme. Em geral, c-di-GMP estimula a biossíntese de adesinas e EPS da matriz do biofilme e inibe vários tipos de motilidade. Além disso, c-di-GMP controla a virulência de patógenos de animais e plantas, progressão através do ciclo celular, produção de antibióticos e metabólitos secundários, entre outras funções celulares (Fig. 19). Interessantemente, c-di-GMP é um imunomodulador específico, podendo influenciar a resposta celular do hospedeiro a patógenos bacterianos, resultando assim em um controle maior da infecção (JENAL & MALONE, 2006; COTTER & STIBITZ, 2007; SCHIRMER & JENAL, 2009).

Resumidamente, o centro deste sistema regulatório parece ser as proteínas contendo domínios GGDEF e EAL ou HD-GYP, bem como o domínio PilZ (Tabela 2) (SCHIRMER & JENAL, 2009). Proteínas contendo o domínio PilZ parecem ter um papel central como receptores de c-di-GMP, porém moléculas efetoras adicionais ainda não identificadas parecem participar deste processo (TAMAYO *et al.*, 2007; SCHIRMER & JENAL, 2009).

Entretanto, os mecanismos que afetam esses processos moleculares, em particular os alvos diretos que são afetados pelos efetores ligantes de c-di-GMP, apenas começaram a ser desvendados. A ampla gama de funções celulares moduladas por c-di-GMP sugere a existência de múltiplos receptores para este segundo mensageiro bem como mecanismos de sinalização em cascata (TAMAYO *et al.*, 2007; SCHIRMER & JENAL, 2009).

É importante salientar que alguns estudos sugerem que a sinalização envolvendo c-di-GMP e QS pode estar de alguma forma conectada, já que ambos processos de sinalização regulam os mesmos eventos complexos incluindo formação de biofilme e virulência. Recentemente, UEDA & WOOD (2009) demonstraram que TpbA, uma tirosina fosfatase que é controlada por LasR, regula a formação de biofilme diminuindo as concentrações intracelulares de c-di-GMP.

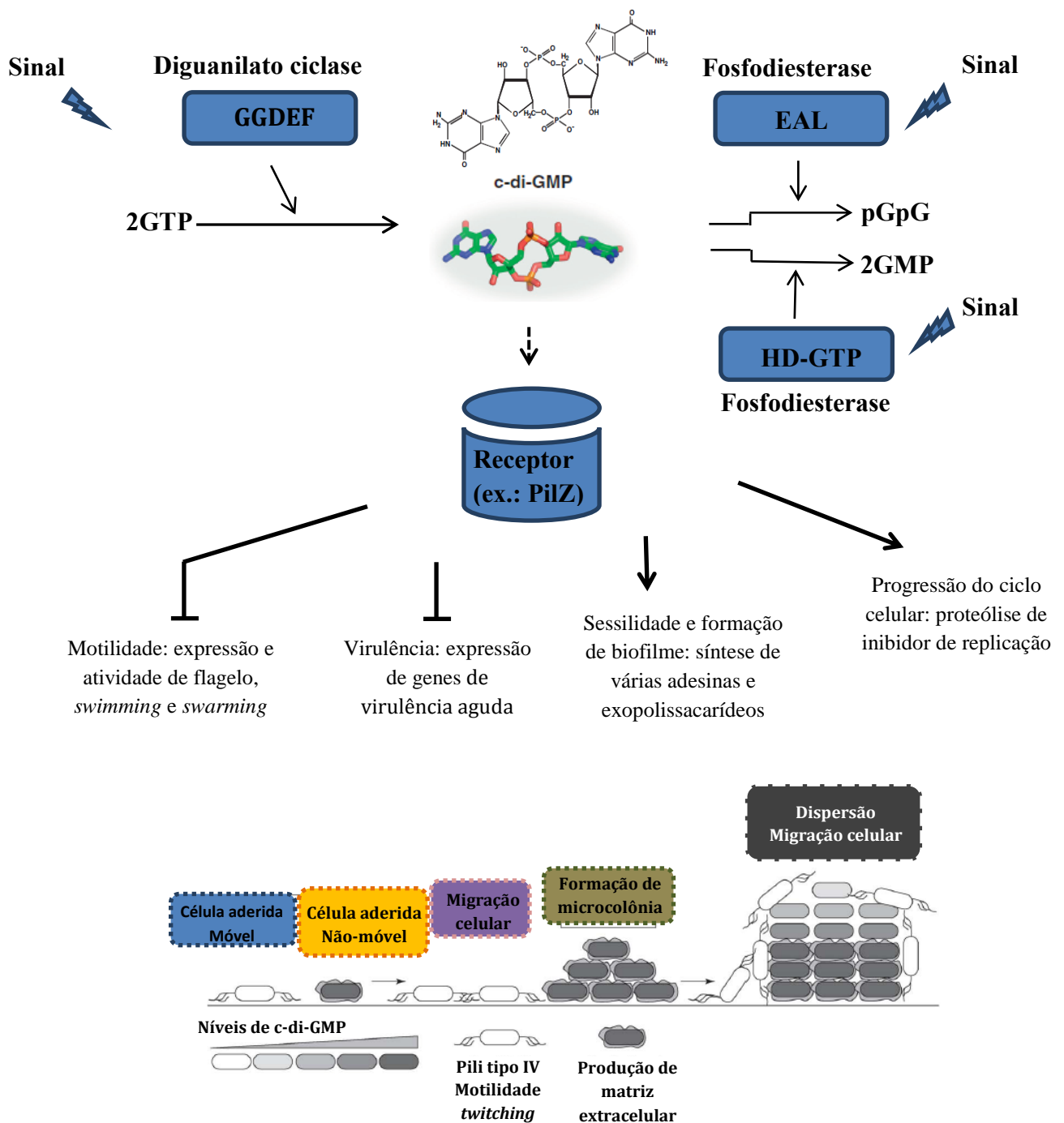


Figura 19. c-di-GMP é um segundo mensageiro que controla a transição entre o estilo de vida móvel/flutuante e o estilo de vida sésil/biofilme. c-di-GMP é produzido por proteínas DGC contendo o domínio GGDEF e degradado por proteínas PDE contendo o domínio EAL ou HD-GYP. Ele liga-se a proteínas receptoras (com o domínio PilZ por exemplo). Proteínas receptoras interagem com alvos em cascata para então afetar uma função celular

particular. Figura adaptada de RÖMLING & AMIKAM, 2006 e SCHIRMER & JENAL, 2009.

Tabela 2: Exemplos de proteínas ligantes de c-di-GMP. Adaptado de HENGGE, 2009.

Proteínas Efetoras*	Exemplo	Espécies	Funções**
PilZ(+)	Alg44	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de alginato (+)
PilZ(+)	BcsA	Várias Gram-positivas	Síntese de celulose (+)
PilZ(+)	DgrA	<i>Caulobacter crescentus</i>	Atividade flagelar (-)
PilZ(+)	PilZ	<i>P. aeruginosa</i>	Motilidade <i>twitching</i> (-)
PilZ(+)	Proteínas Plz	<i>Vibrio cholerae</i>	Expressão de genes de virulência
PilZ (+)	YcgR	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella spp.</i>	Atividade flagelar (-)
FleQ(-)	FleQ	<i>P. aeruginosa</i>	Expressão flagelar (+) e síntese de Pel (-)
PelD(+)	PeLE	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de Pel (+)

* + indica que o efetor é ativado por c-di-GMP e – que a atividade do efetor é reduzida por c-di-GMP.

** + indica que a função é positivamente regulada pelo efetor e – negativamente controlada pelo efetor.

1.9. Estratégias anti-virulência

O aumento no número de infecções causadas por patógenos resistentes a múltiplas drogas é considerado um dos principais problemas da medicina moderna. O descompasso entre a capacidade de desenvolver novos antibióticos e a necessidade real desses medicamentos torna a era pós-antibiótica cada vez mais próxima (WILLIAMS & BAX, 2009; RASKO & SPERANDIO, 2010). Ao invés de focalizar em terapêuticas que têm como alvo o crescimento bacteriano, como antibióticos convencionais, uma abordagem alternativa é a busca por novos mecanismos de ação, tendo como alvos funções bacterianas essenciais para a infecção, ou seja, os fatores de virulência. O conceito convencional de virulência é definido pela capacidade de um patógeno em causar doença; determinantes de virulência são definidos como fatores bacterianos (por exemplo, toxinas, citolisinas ou proteases) ou mecanismos que ativamente causam danos aos tecidos do hospedeiro. Assim, esforços no desenvolvimento de terapias antivirulência têm como objetivo 'desarmar' o patógeno através da inibição de fatores de virulência que podem causar danos diretos ao hospedeiro, tornando mais fácil para o sistema imune deste hospedeiro se livrar da

infecção. Esta abordagem tem várias vantagens potenciais, incluindo a expansão do repertório de alvos bacterianos e podendo preservar a microbiota do hospedeiro. Uma vantagem potencial desta abordagem (embora ainda não comprovada) é que estes novos agentes antimicrobianos poderiam impor uma menor pressão seletiva, resultando assim em resistência bacteriana diminuída (CLATWORTHY *et al.*, 2007; RASKO & SPERANDIO, 2010).

Além disso, estas drogas antivirulência poderiam potencialmente ser utilizadas em combinação com agentes antimicrobianos já estabelecidos de uma forma sinérgica, para assim estender o tempo de vida destas drogas (RASKO & SPERANDIO, 2010).

Alguns dos principais alvos das pesquisas antivirulência ou anti-infectivas são toxinas, QS, biofilme, sistema envolvendo c-di-GMP, sistema de secreção tipo II e III e adesão (Fig. 20).

Quorum sensing pode ser um alvo importante, já que controla vários processos fisiológicos bacterianos incluindo a regulação de biofilmes. Há grande interesse em desenvolver sistemas para interromper ou manipular o processo de sinalização célula-célula em bactérias, utilizando-se compostos análogos ou antagonistas de QS ou, ainda, enzimas que degradem as moléculas sinalizadoras, a fim de alterar comportamentos regulados por QS. Em particular, uma classe de análogos estruturais de AHL, as furanonas halogenadas, apresentam propriedades inibitórias do QS e parecem funcionar acelerando o *turnover* de homólogos de LuxR. Em *P. aeruginosa*, furanonas halogenadas inibem a produção de exotoxinas e reprimem a expressão de genes regulados por QS (CEGELSKI *et al.*, 2008). Outro exemplo é a enzima acil-homoserina lactonase, produzida por espécies de *Bacillus*, ela hidrolisa o anel lactona de AHL, rendendo-as assim incapazes de mediar à sinalização (DONG *et al.*, 2002).

A adesão a células do hospedeiro é um passo inicial crítico na colonização bacteriana e um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas (CLATWORTHY *et al.*, 2007). Na busca por inibidores de adesão, um grupo de compostos designado de pilicidas tem sido identificado. Estes compostos inibem a síntese de pilus por *E. coli*, tornando assim a bactéria menos adesiva. Recentemente, modificações feitas em um determinado pilicida, tornaram-o efetivo contra a produção de curli,

aumentando suas propriedades anti-adesivas (SVENSSON *et al.*, 2001; CLATWORTHY *et al.*, 2007).

Em bactérias Gram-negativas, a produção de c-di-GMP por DGC é o principal gatilho para a produção de polissacarídeos extracelulares e assim para a formação de biofilme. Mutantes defeituosos na biossíntese de c-di-GMP não formam biofilme adequadamente, tornando DGC alvos interessantes para o descobrimento de novos agentes antimicrobianos com atividade antibiofilme. Um estudo identificou sulfatiazol, uma droga já conhecida, apresentando atividade inibitória na síntese de c-di-GMP. Interessantemente, outro inibidor da biossíntese de nucleotídeos é fluorouracil, o qual pode afetar a formação de biofilme em *E. coli* e *P. aeruginosa* (ANTONIANI *et al.*, 2010; ATTLA *et al.*, 2009).

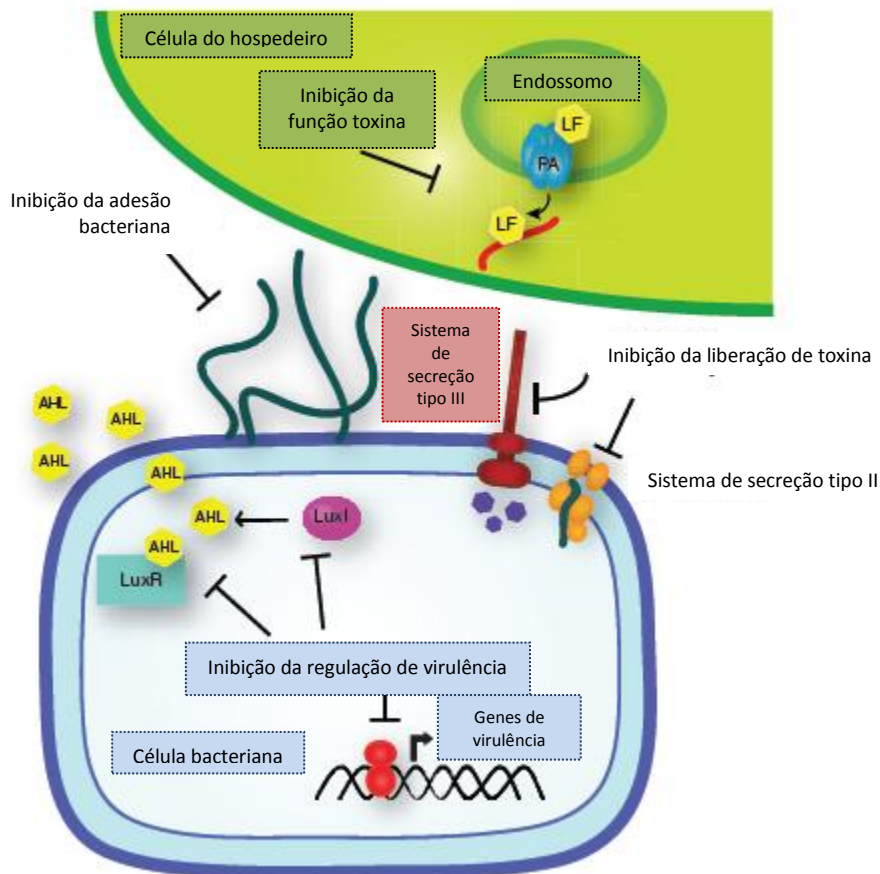


Figura 20. Funções bacterianas que podem ser alvos para a inibição da virulência. Inibidores de virulência podem afetar: função toxina (por exemplo, atividade catalítica do fator letal (LF) de *Bacillus anthracis* ou translocação através do antígeno protetor (PA)); liberação de toxina, inibindo vários sistemas bacterianos tais como sistema de secreção

tipo II e III; virulência de genes (por exemplo, interferindo no circuito *quorum sensing* mediado por acil-homoserina lactonas (AHL) (nos homólogos de LuxI e LuxR); ou adesão bacteriana as células do hospedeiro (por exemplo, inibição de formação de pili por pilicidas). Figura adaptada de CLATWORTHY *et al.*, 2007.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivos:

- a) Testar a hipótese da presença de atividade antibiofilme e/ou antibiótica nos ovos do carrapato bovino *R. microplus*,
- b) Isolar e elucidar a estrutura química do composto com ação antibiofilme e/ou antibiótica presente na cera dos ovos do carrapato *R. microplus*,
- c) Identificar as vias afetadas pelo composto antibiofilme e/ou antibiótico,
- d) Isolar bactérias de diferentes tecidos de *R. microplus* e avaliar o potencial antibiofilme/e ou antibiótico de metabólitos produzidos por essas bactérias.

3. RESULTADOS

Este capítulo da tese será apresentado na forma de artigos. Ele está dividido em três subcapítulos (3.1, 3.2 e 3.3).

CAPÍTULO 3.1. Cera do ovo do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inibe o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

Artigo I - Egg-wax from cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

Karine Rigon Zimmer, Alexandre José Macedo, Gianluca Nicastro, Regina Lúcia Baldini,
Carlos Termignoni

Ticks and Tick-Borne Diseases

Trabalho realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP)

Egg-wax from cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

Karine R. Zimmer^a, Alexandre J. Macedo^{a,b}, Gianlucca Nicastro^c, Regina L. Baldini^c,
Carlos Termignoni^{a,*}

^aCentro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil,

^bFaculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil,

^cDepartamento de Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author. Phone: +55 51 33086082, Fax: +55 51 33087309,

E-mail adress: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br (C. Termignoni).

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is constantly challenged during its life cycle by microorganisms present in their hosts or in the environment. Tick eggs may be especially vulnerable to environmental conditions, since they are exposed to a rich and diverse microflora in the soil. Despite being oviposited in such hostile sites, tick eggs remain viable, raising the hypothesis that egg surface has defense mechanisms against opportunistic and/or pathogenic organisms. *Rhipicephalus microplus* engorged females deposit a superficial wax layer in their eggs during oviposition. This egg-wax is essential for the viability of the eggs, preventing desiccation and acting as a barrier against attack by microorganisms. In this study, we report the detection of antibiofilm activity of *Rhipicephalus microplus* egg-wax against *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Genes involved in the functions of production and maintenance of the biofilm extracellular matrix, *pelA* and *cdrA*, respectively, were markedly downregulated by a tick egg-wax extract. Moreover, this extract strongly inhibited *fliC* gene expression. Instead of a compact extracellular matrix, *P. aeruginosa* PA14 treated with egg-wax extract produces a fragile one. Also, the colony morphology of cells treated with egg-wax extract is different from that of untreated cells. Colonies appear much paler and brownish, instead of bright purple. Swarming motility was also inhibited by treatment with the egg-wax extract. The inhibition of *P. aeruginosa* biofilm does not seem to depend on inhibition of the quorum sensing system, since mRNA levels of the three regulators of this system were not inhibited by egg-wax extract. This study shows that *R. microplus* presents a mechanism to protect its eggs against *P. aeruginosa* biofilm.

Keywords: biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; egg-wax; protective mechanisms.

Introduction

Arthropods have different defense mechanisms against infections. In this context, different active molecules have been identified in tick species, such as antimicrobial compounds (Pavis et al., 1994; Potterat et al., 1997; Sonenshine et al., 1998; Fogaça et al., 1999; Lai et al., 2004; Arrieta et al., 2006; Esteves et al., 2009; Kopáček et al., 2010; Oldiges et al., 2012; Yu et al., 2012), lysozymes (Kopáček et al., 1999; Grunclová et al., 2003), protease inhibitors (Fogaça et al., 2004), and lectins (Grubhoffer et al., 2005).

Oviposition is a vulnerable stage in the tick life cycle. Considering the environmental conditions in the soil where tick eggs are deposited, a microbial attack on egg surface is an expected phenomenon (Booth, 1992; Esteves et al., 2009). However, eggs remain viable in the ground, with no signs of bacterial colonization. *Rhipicephalus microplus*, like all Ixodidae and Argasidae, has a specialized gland, called Gené's organ, which produces a wax that is smeared on egg surface during oviposition. In addition to restricting excessive water loss, wax acts as a barrier to attack by invading organisms (Booth, 1992).

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that can be found in a variety of soils (Kaszab et al., 2011). Also, *Pseudomonas aeruginosa* has been extensively utilized as a model organism for the study of biofilm formation (Friedman and Kolter, 2004a). Among the virulence factors that account for the pathogenicity of this bacterium is biofilm formation. In this process, extracellular polysaccharide (EPS) produced by bacteria acts as a glue, which keeps microbial cells together. Microorganisms living in biofilms exhibit high resistance to antibiotics and host immune defenses, and are difficult to eradicate (Wang et al., 2008).

Many bacterial virulence factors, including biofilm formation, are controlled by a system of bacterial communication, the quorum sensing system (QS) (Hengge, 2009). *Pseudomonas aeruginosa* possesses two *N*-acylhomoserine lactone (AHL)-regulated systems: *lasR-lasI* and *rhlR-rhII*, with the cognate signal molecules *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-*L*-homoserine lactone and *N*-butyryl-*L*-homoserine lactone, respectively. A third cell-signaling system, *myfR* (multiple virulence factor R), regulates *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) biosynthesis (Zhu et al., 2004).

A second messenger, bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), controls a transition between a motile and a biofilm lifestyle (Hengge, 2009). c-di-GMP is a positive regulator of biofilm formation, EPS production, and pellicle formation, and a negative regulator of swarming motility. Regulation of c-di-GMP levels involves two types of enzymes: diguanylate cyclases, with GGDEF motifs (DGCs), and phosphodiesterases, with EAL motifs (PDEs), responsible for synthesis and breakdown of c-di-GMP, respectively (Römling and Amikan, 2006; Cotter and Stibitz, 2007; Hengge, 2009).

The discovery of compounds capable of inhibiting biofilm formation is an issue of extreme interest, since it is estimated that biofilms affect at least 65 % of human bacterial infections (Costerton et al., 2003). Also, biofilm related-infections are found in plants and animals (Olson et al., 2002).

In the current work, we report the detection of antibiofilm activity of *R. microplus* cattle tick egg-wax against *P. aeruginosa* PA14. We show that genes involved in the production and maintenance of the biofilm extracellular matrix, *pelA* and *cdrA*, were repressed by egg-wax extract. We also demonstrated that this extract inhibits *fliC* gene

expression. The structure and other properties of the molecule responsible for this activity will be described elsewhere.

Materials and Methods

Animals and eggs

Rhipicephalus microplus were obtained from the colony maintained at the Faculdade de Veterinária at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Engorged females were rinsed with water, dried with tissue paper and stored in the incubator for oviposition (28 °C and high relative humidity). The eggs were collected and processed for extraction of the egg-wax.

Extraction of the tick egg-wax

We adapted the method developed by Arrieta et al. (2006). Briefly, we added chloroform and methanol (2:1, v/v) to eggs (10 mL/g) under mild agitation for 60 min. The supernatant was transferred to a tube. After, Milli-Q water was added to the eggs (5 mL/g) and maintained under mild agitation again for 60 min. This supernatant was collected and mixed with the first supernatant collected. The solvent mixture was centrifuged for 10 min at 1000 rpm to separate the phases. The solvents were evaporated under a nitrogen stream (chloroform:methanol extract) or lyophilized (water:methanol extract). The samples were stored at -80 °C until use. The extracts were prepared in Milli-Q water at the following concentrations in order to be used in the assays: 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, and 5.0 mg/mL. In some assays only the extract at the lowest active concentration (2.5 mg/mL) was used. In controls (untreated sample), extract was replaced by Milli-Q water.

Bacterial strain and growth conditions

In all assays, *P. aeruginosa* strain PA14 (Rahme et al., 1995) was grown in Luria-Bertani (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, and NaCl 10 g/L) broth (LB) at 37 °C on a rotary shaker (150 rpm) (Incubator Shaker Series Excella E25, New Brunswick Scientific) and adjusted to an optical density (OD) at 600 nm equivalent to 10⁸ CFU/mL.

Antibiofilm assay

Standard sterile 96-well polystyrene flat bottom microtiter plates (Costar 3599 Corning, Inc. NY, USA) were used to evaluate biofilm formation according a protocol adapted from Trentin et al. (2011). In the biofilm formation inhibition assay (antibiofilm assay), 100 µL of diluted bacterial suspension (equivalent to 10⁸ CFU/mL), 50 µL of LB broth and 100 µL of extract were added to the wells and incubated at 37 °C for 24 h. In preformed biofilm assay (biofilm eradication assay), 100 µL of diluted bacterial suspension (equivalent to 10⁸ CFU/mL) and 100 µL of LB broth were added to wells and incubated at 37 °C for 24 h. Then the wells were washed three times with 200 µL of sterile saline 0.9 % and filled with 100 µL of egg-wax extract and 100 µL of LB broth, and incubated again at 37 °C for 24 h. Controls (untreated) were prepared with Milli-Q water replacing the extract. Following this incubation time (antibiofilm and biofilm eradication assays), the content of wells was removed and washed three times with 200 µL of sterile saline 0.9 %. The remaining attached bacteria were heat-fixed by exposing them to hot air at 60 °C for 1 h. The adherent biofilm layer formed was stained with 200 µL of crystal violet 0.4 % for 15 min at room temperature. The stain was rinsed off by placing plates under running tap water until water wash was free of stain. The dye bound to the cells was solubilized with DMSO 99.5 % (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the absorbance (570

nm) was measured (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Biofilm formation was also evaluated on glass tubes by inoculating a bacterial suspension in each tube (2 mL, equivalent to 10^8 CFU/mL), LB broth (1 mL), and tick egg-wax extract (2 mL at a concentration of 2.5 mg/mL). The tubes were left to stand at 37 °C for a period of 24 h. They were washed with sterile saline 0.9 %, stained with crystal violet 0.4 %, and then the dye bound to the cells was solubilized with DMSO 99.5 % (Sigma, St. Louis, MO, USA). Next, absorbance at 570 nm was measured (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Antibacterial assay

The bacterial growth assay was evaluated by the difference of initial ($t = 0$) and final ($t = 24$ h) absorbance at 600 nm (Musk et al., 2005). Gentamicin sulphate 6.5 μ g/mL (Sigma Aldrich[®], Co-USA) was utilized as growth inhibition control in all assays.

Scanning electron microscopy (SEM)

Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilm was grown in sterile 96-well polystyrene flat bottom microtiter plates (Costar 3599 Corning, Inc. NY, USA) holding a coverslip using LB broth and Milli-Q water in the control sample (untreated) and LB broth and extract (at concentration 2.5 mg/mL) in the treatment group for 24 h at 37 °C. The samples were washed with sterile saline 0.9 % to remove planktonic cells. Afterwards, the biofilm was fixed with 2.5 % glutaraldehyde for 3 h, and washed with 100 mM cacodylate buffer pH 7.2. The samples were then dehydrated with increasing concentrations of acetone, dried to the CO₂ critical point using a Bal-Tec 030 apparatus (CPD 030 Balzers, Liechtenstein),

and placed on a mounting base. Finally, the samples were coated with gold and examined under a scanning electron microscope (model JEOL Instrument JSM-6060) at 10 kV.

RNA extraction and quantitative real-time (qRT-PCR)

Static cultures were grown as mentioned above in antibiofilm assay and utilized for RNA extraction. In this assay, we used the extract at a concentration of 2.5 mg/mL. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen), treated with DNase I and used for cDNA synthesis with Improm II (Promega) and random primers. cDNA was amplified with specific primers using SYBR Green PCR Master Mix in the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The threshold cycle data analysis (Livak and Schmittgen, 2001) was employed, with *nadB* used for normalization of cDNA amount. The primer sequences used throughout this study are listed in Table 1.

P. aeruginosa PA14 colony morphology

Bacterial cells from cultures (cultured in 10 g/L tryptone) treated with tick egg-wax extract (2.5 mg/mL), as described in antibiofilm assay, were spotted (15 μ L) on Congo-Red (CR) plates (10 g/L tryptone, 40 μ g/mL Congo-Red, 20 μ g/mL Coomassie Brilliant Blue, and agar 1 %). Plates were incubated at 37 °C for 6 days for visualization of the colony morphology (adapted from the method developed by Friedman and Kolter, 2004a).

Colony morphology was also evaluated spotting bacterial cells (5 μ L) from cultures (cultured in 10 g/L tryptone) as described in antibiofilm assay in Congo-Red plates (10 g/L tryptone, 40 μ g/mL Congo-Red, 20 μ g/mL Coomassie Brilliant Blue, and agar 1 %). Plates were incubated at room temperature for 6 days for visualization of colony morphology (adapted from the method described by Friedman and Kolter, 2004a).

Congo-Red assay

Luria-Bertani broth supplemented with Congo-Red (40 µg/mL) was used to evaluate pellicle morphology and the ability of *P. aeruginosa* PA14 to absorb the dye present in the medium. Bacteria ($2 \text{ mL}/10^8 \text{ CFU/mL}$), 1 mL of LB broth supplemented with Congo- Red and 2 mL of tick egg-wax extract (2.5 mg/mL) were placed in glass tubes and left at room temperature for 6 days. The pellicles were removed with a bacteriological loop and placed in water (adapted from the method developed by Friedman and Kolter, 2004a). Control samples (untreated) were included, in which the extract was replaced by Milli-Q water.

Matrix weight

Considering that in most biofilms microorganisms account for less than 10 % of the dry mass and that the matrix can account for over 90 % (Flemming and Wingender, 2010), matrix weight was evaluated. The *P. aeruginosa* PA14 matrix from the assay mentioned above (Congo-Red assay) was collected, washed with water, lyophilized, and its weight was recorded.

Pyocyanin and LasB elastase measurements/ proteolytic activity in culture supernatants

Pyocyanin, LasB elastase, and proteolytic activity assays were carried out using the culture supernatants. Bacterial suspensions of *P. aeruginosa* PA14 ($8 \text{ mL}/10^8 \text{ CFU/mL}$) cultured with LB broth (4 mL) and treated with tick egg-wax extract (8 mL) for 24 h at 37 °C were utilized. After this period, the culture supernatants were collected by centrifugation. The amount of pyocyanin in culture supernatants was measured spectrophotometrically at 695 nm according to Fothergill et al. (2007).

LasB activity in the culture supernatants was determined by the elastin Congo-Red (ECR) assay, adapted from Tron et al. (2004). Briefly, 10 mg of ECR beads were incubated with 0.1 mL supernatant in 0.9 mL 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, rotating overnight at 37 °C. Insoluble ECR was precipitated by centrifugation and the absorbance of the supernatant measured at 495 nm.

Proteolytic activity was measured on casein agar plates. Supernatant (50 µL) was added to wells in the plates. The plates were incubated for 24 h at 37 °C (Kong et al., 2005). The zone of casein hydrolysis was measured.

The control sample consisted of Milli-Q water instead of extract.

Sensitivity to oxidative stress

Aliquots from bacterial cultures of *P. aeruginosa* PA14 (100 µL) cultivated in LB broth (50 µL) for 24 h in the presence of tick egg-wax extract (100 µL) were spread uniformly onto LB agar plates. The control sample contained Milli-Q water instead of the extract. Then, cylinders with a diameter of 6 mm were placed in triplicate on each plate and loaded with 100 µL of H₂O₂ 3 %. The area of growth inhibition was measured following incubation at 37 °C (Fonseca et al., 2004).

Swimming motility

We utilized the method described by Malapaka et al. (2007). Motility agar was prepared (10 g/L tryptone, 0.5 g/L NaCl, and 0.3 g/L agar) and distributed on the plates (100 µL in each well). The extract (100 µL) was added to the wells and then mixed to ensure the distribution of the tick egg-wax extract within the well and the culture medium was allowed to solidify overnight. Then, 10 µL of bacterial cells extract-treated and

untreated were inoculated in the wells. The plates were then incubated for 15 h at 37 °C. Absorbance measurements were performed at a 550 nm wavelength (Spectramax M2e, Multimode Microplate Reader) (Malapaka et al., 2007).

Swarming motility

Swarming motility assay was performed as described by Tremblay and Déziel (2008), with slight modifications. Briefly, modified M9 medium (20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 11 mM dextrose, 0.5 % casamino acids, and 0.5 % Bacto-agar [Difco]), with and without tick egg-wax extract (2.5 mg/mL) were distributed in polystyrene Nunc Multidishes and dried for 25 min. Afterwards, 2 µL of early stationary culture (OD₆₀₀ = 3) were inoculated and incubated at 30 °C for 16 h.

Cell Surface Hydrophobicity (CSH)

Microbial adhesion to a hydrocarbon was used to evaluate the effect of tick egg-wax extract on bacterial cell surface hydrophobicity (CSH). We adapted the method developed by Limsuwan and Voravuthikunchai (2008). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 collected by centrifugation from a culture (2 mL) cultivated in LB broth (1 mL) in the presence of different concentrations of tick egg-wax extract (2 mL) were washed three times with saline solution 8.5 %. Bacterial cells were then suspended in saline solution 8.5 % to obtain an OD₆₀₀ of 0.4 (OD initial). Three milliliters of bacterial suspension was placed in tubes and 250 µL of toluene was added. The tubes were shaken for 1 min and remained at room temperature for 1 h. The toluene phase was separated from the aqueous phase, whose OD was determined spectrophotometrically at 600 nm (OD final). Control

consisted of bacterial cells incubated with Milli-Q water. The hydrophobicity index (HI) was determined by $OD_{initial} - OD_{final} / OD_{initial} \times 100 \%$.

Pseudomonas aeruginosa c-di-GMP content

c-di-GMP was extracted as described by Simm et al. (2004) with slight modifications. *P. aeruginosa* (8 mL) were cultivated overnight in M63 glucose medium (4 mL) at 37 °C with the tick egg-wax extract at a concentration of 2.5 mg/mL (8 mL). Cells were harvested (20 mL culture volume) by quick centrifugation at 4 °C; then, the resulting pellets were resuspended in 300 µL water, heated at 100 °C for 5 min and nucleotides were extracted twice with 0.5 mL of 70 % ice-cold ethanol. The extract was lyophilized, resuspended in 300 µL of water and then 100 µL was subjected to HPLC MS/MS analysis as described by Spangler et al. (2010). Control sample consisted of bacterial cells incubated with Milli-Q water.

Statistical analyses

All experiments were performed in biological triplicates using three independent cultures. Statistical significance was tested using unpaired two-tailed Student's *t*-tests (GraphPad Prism[®] version 5.00). A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Antibiofilm activity

Water:methanol tick egg-wax extract (WME) exerted antibiofilm activity when concentrations of 2.5 and 5 mg/mL were utilized, inhibiting up to 43 % of *P. aeruginosa* PA14 biofilm in polystyrene plates (Fig. 1A). Chloroform:methanol tick egg-wax extract did not exert any antibiofilm activity. Interestingly, the water:methanol tick egg-wax

extract (2.5 mg/mL) inhibited biofilm by over 90 % (pellicles) in glass tubes (Fig. 1C). However, none of the extracts tested was able to eradicate preformed biofilm (data not shown). All other assays were performed only with water:methanol tick egg-wax extract.

Antibacterial activity

Since antibiofilm effect may be due to antibiotic activity, experiments were performed to determine whether the extract interfered in the bacterial growth. Water:methanol tick egg-wax extract demonstrated no inhibitory effect on *P. aeruginosa* PA14 growth. On the contrary, at all concentrations tested, bacterial growth was stimulated by water:methanol tick egg-wax extract (Fig. 1A).

Detection of biofilm formation inhibition in coverslip by SEM

Antibiofilm activity was confirmed by scanning electron microscopy (SEM). In the untreated sample, a typical biofilm covering the glass surface can be visualized, in which the matrix involving the bacterial cells is evident (Fig. 2A, B and C). Interestingly, no biofilm formation on coverslips was observed for the water:methanol tick egg-wax extract-treated cells (Fig. 2D and E).

Effects of the water:methanol tick egg-wax extract in quorum-sensing (QS), virulence, and biofilm-related gene expression

Given that the decrease in biofilm formation could be due to lower expression of QS-related genes, we investigated whether the mRNA levels of the QS regulators *lasR*, *rhlR* and *mvfR* are altered after water:methanol tick egg-wax extract treatment. We detected no changes in treated samples, compared to untreated samples (Fig. 3). Interestingly, mRNA levels of *pelA* and *cdrA* (also annotated as PA4625 in PAO1 and

PA14_61200 in PA14 genomes), whose products are important for the EPS matrix synthesis and scaffolding, respectively, were markedly downregulated by water:methanol tick egg-wax extract treatment (Fig. 3). Also, *fliC* gene expression, whose product is important for flagellum synthesis, was strongly repressed after treatment with tick egg-wax extract (Fig. 3).

Effect of water:methanol tick egg-wax extract in the biofilm matrix

Pseudomonas aeruginosa PA14 cells treated with water:methanol tick egg-wax extract (2.5 mg/mL) were defective to absorb the Congo-Red (CR) dye (Fig. 4D). Congo-Red accumulated in the supernatant and not in the biofilm matrix (Fig. 4D). Moreover, a fragile biofilm formation was noticed in the air-liquid interface (Fig. 4D). The matrix weight was markedly distinct between untreated (Fig. 4B and C) and treated samples (Fig. 4E and F). The average matrix weight was 1.25 ± 0.4 mg (Fig. 4B and C) and 0.35 ± 0.4 mg (Fig. 4E and F) for non-treated and treated samples, respectively.

P. aeruginosa PA14 colony morphology

When spotted on Congo-Red/Coomassie Brilliant Blue agar plates, *P. aeruginosa* PA14 (untreated sample) colonies were dark violet (Fig. 5A), whereas in the treated samples with water:methanol tick egg-wax extract the colonies appear much paler, with a brownish shade instead of bright purple (Fig. 5B). Moreover, when evaluated at room temperature, *P. aeruginosa* PA14 colonies grown in Congo-Red/ Coomassie Brilliant Blue agar plates gave rise to highly structured wrinkled colonies (Fig. 5C), while the water:methanol tick egg-wax extract-treated colonies were smooth (Fig. 5D).

Pyocyanin, LasB elastase and proteolytic activity

Quorum sensing system-regulated exoproducts such as pyocyanin and elastase LasB were also evaluated after water:methanol tick egg-wax extract treatment. No significant effect was observed on the production of pyocyanin or proteolytic activity (Table 2). However, elastase activity (LasB) fell by 18 and 20 % when *P. aeruginosa* PA14 cells were treated with the extract at 2.5 and 5 mg/mL, respectively (Table 2).

Sensitivity to oxidative stress

The extract had no significant effect on the growth of *P. aeruginosa* PA14 when it was confronted with the stressor agent (Table 2).

Cell Surface Hydrophobicity (CSH)

A decline in cell surface hydrophobicity was observed during the growth of *P. aeruginosa* PA14 cells exposed to all concentrations of extract tested, especially when the bacterial cells were treated with the water:methanol tick egg-wax extract at concentrations of 2.5 and 5 mg/mL (Fig. 6).

Bacterial motility (swimming and swarming)

Since bacterial motility is involved in the initial stages of biofilm formation, we evaluated swimming and swarming motilities in *P. aeruginosa* PA14. Regarding swimming motility, bacterial cells treated with water:methanol tick egg-wax extract at a concentration of 2.5 mg/mL behaved similarly to non-treated samples (data not shown). However, water:methanol tick egg-wax extract at a concentration of 2.5 mg/mL inhibited swarming motility (Fig. 7).

c-di-GMP levels

pelA and *cdrA* genes are upregulated in an elevated c-di-GMP background (Starkey et al., 2009), and here we show that those genes were downregulated by water:methanol tick egg-wax extract. With these data, we speculate that water:methanol tick egg-wax extract could regulate intracellular levels of c-di-GMP. However, no significant differences were found when c-di-GMP levels were evaluated (Fig. 8).

Discussion

The results presented here support the hypothesis that *R. microplus* prevents *P. aeruginosa* biofilm on eggs, interfering in biofilm formation, and not killing bacterial cells. This antibiofilm mechanism involves repression of bacterial genes related to the production of biofilm matrix (*pelA* and *cdrA*) and flagellum synthesis (*fliC*).

Friedman and Kolter (2004b) showed that *pel* has a critical role in biofilm formation, since *pel* mutants did not form mature biofilms on surfaces such as polystyrene, polyvinylchloride and borosilicate glass. Our results demonstrated a complete inhibition of the biofilm on glass surfaces (Fig. 1C); however, on polystyrene the inhibition observed was about 40 % (Fig. 1A) after treatment of bacterial cells with the tick egg-wax extract. In *pel* mutants, biofilm can be damaged by the washing procedure to remove planktonic cells (Friedman and Kolter, 2004a; Friedman and Kolter, 2004b), as also observed in our study. We noticed that, when treated with egg-wax extract, a biofilm was present on glass surface. Yet, the gentle washing procedure performed completely detached the biofilm from the surface.

The inhibition of *P. aeruginosa* PA14 biofilm matrix by egg-wax extract was also verified by colony morphology and the ability of bacterial cells to bind the Coomassie

Brilliant Blue and Congo-Red dye, both of which are indicators of matrix production (Fig. 5). Congo-Red is used to observe colony morphology because it detects EPS production and EPS impacts biofilm formation (Ueda and Wood, 2009). This dye has been shown to bind to extracellular matrix components in several organisms, among which *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *S. enteritidis*, and *Escherichia coli* (Zogaj et al., 2001; Solano et al., 2002). In our study, the Congo-Red assay clearly showed that bacterial cells treated with egg-wax extract are impaired in respect to bind the dye present in the culture medium (Fig. 4D). Moreover, when egg-wax extract was present, *P. aeruginosa* PA14 produced considerably less matrix (Fig. 4E and F).

Matrix production is important in biofilm development, and occurs when cells exhibit a high degree of autoaggregation (Friedman and Kolter, 2004a). The ability to autoaggregate leads to different macroscopic phenotypes, including production of pellicles at the air-liquid interface of standing liquid cultures and the production of highly structured colonies on agar plates. Pel is the major polysaccharide of *P. aeruginosa* PA14 biofilm matrix. The *pel* locus contains seven genes (*pelA-G*) whose products are required for matrix formation and which are therefore critical for the autoaggregative properties of the strain (Friedman and Kolter, 2004a; Ryder et al., 2007). *Pel* mutants do not form pellicles or mature solid-surface-associated biofilms. In addition, while the wild-type strain gives rise to wrinkled colonies under some growth conditions, the *P. aeruginosa* PA14 *pel* mutant colonies are flat and smooth (Friedman and Kolter, 2004a; Friedman and Kolter, 2004b). Our results are in accordance with these studies, where extract-treated bacterial cells form smooth colonies in agar plates, and do not develop pellicles adequately.

Egg-wax extract significantly decreases the cell surface hydrophobicity of *P. aeruginosa* PA14 (Fig. 6). A decrease in bacterial hydrophobicity is generally suggested as

a cause of bacterial adhesion inhibition (Thenmozhi et al., 2009). This fact, together with the inhibition of matrix components and flagella synthesis explains the decrease in bacterial adhesion and thus in biofilm formation.

Inhibition of *P. aeruginosa* biofilm by tick egg-wax extract does not seem to be directly related to QS system inhibition (Fig. 3). Corroborating the hypothesis of non-interference in the QS system, virulence factors (pyocyanin, and proteolytic activity) were not affected by treatment with egg-wax extract (Table 2).

Since tick egg-wax extract did not affect genes related to *P. aeruginosa* QS system, we evaluated c-di-GMP levels. In Gram-negative bacteria, production of c-di-GMP by DGCs is the main trigger for production of extracellular polysaccharides and for biofilm formation (Hengge, 2009). Tick egg-wax extract might be involved in degrading c-di-GMP binding proteins or competing with them, since c-di-GMP levels not were altered (Fig. 8) while *pelA* and *cdrA* were downregulated. Lory et al. (2009) showed that c-di-GMP controls polysaccharide synthesis primarily through the action c-di-GMP binding proteins. During biosynthesis of Pel and alginate, c-di-GMP binds to specific receptors such as PelD and Alg44. PelD mutants were unable to bind c-di-GMP (Lory et al., 2009).

We also observed that the tick egg-wax extract inhibited *fliC* gene expression (Fig. 3). Extracellular appendages including flagella and pili probably are the bacterial structures that first establish contact with the adhesion surface in the initial stages of biofilm formation. It is possible that the flagellum itself may form an adhesive bond with the adhesion surface (Simões et al., 2010). It is assumed that the primary function of flagella in biofilm formation involves transport and initial contacts between bacterial cell and adhesion surface (Sauer and Camper, 2001). Flagella-mediated motility is believed to

overcome repulsive forces at the surface of the adhesion surface and, as a consequence, a monolayer of cells forms (Simões et al., 2010). Indeed, *P. aeruginosa* mutants defective in flagella-mediated motility and mutants defective in biogenesis of the polar-localized type IV pili are unable to start the biofilm process on abiotic surfaces (O'Toole and Kolter, 1998).

Flagellum role in biofilm formation is not limited to the initial phase (Houry et al., 2010). It has been suggested that flagellum-mediated motility is required in the biofilm growth of *Listeria monocytogenes* (Renier et al., 2011).

Several studies have indicated that motility and the presence of flagella in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) have a role in the pathogenesis (Lane et al., 2005; Haugen et al., 2007; Schwan, 2008). Recently, Hidalgo et al. (2011) evaluated the effect of cranberries and purified cranberry-derived proanthocyanidins (cPACs) displaying activity against UPEC. In that study, the authors showed that cranberry compounds inhibit UPEC motility via repression of the *fliC* gene, suggesting that flagellum-mediated motility might be a key mechanism by which cPACs prevents urinary tract infections.

Flagella are also required for bacterial motility. Swarming, considered as a model of bacterial social behavior, is a flagella-dependent movement observed in viscous environments such as semisolid agar surfaces (Tremblay and Déziel, 2008). Here, we also showed that *fliC* gene expression and swarming motility were inhibited by tick egg-wax extract.

Borlee et al. (2010) characterized one of the components of the biofilm matrix in *P. aeruginosa*, named CdrA. It is a large non-fimbrial β -helical adhesin that contributes to biofilm structural integrity. We demonstrated that tick egg-wax extract represses *cdrA* gene

expression (Fig. 3). The *cdrAB* locus comprises a two-partner secretion (TPS) system with a large adhesin (CdrA) and its transporter (CdrB). Evidence was provided showing that CdrA binds directly to the mannose moiety of Psl (Flemming and Wingender, 2010), and it was suggested that CdrA is a multivalent adhesin able to recognize multiple carbohydrates (Borlee et al., 2010).

CdrA and *cdrB* mutants are defective in biofilm initiation (1 h and 2 h) as well as final biofilm formation (24 h), suggesting that both gene products influence biofilm formation (Ueda and Wood, 2009).

In summary, the cattle tick *R. microplus* has a mechanism to protect its eggs against *P. aeruginosa* PA14 biofilm. We showed that *R. microplus* egg-wax extract inhibits three critical pathways for the establishment of *P. aeruginosa* biofilm: one responsible for the synthesis of flagella (*fliC*) and two responsible for the synthesis of structural components of the biofilm matrix (*pelA* and *cdrA*). Biofilm inhibiting substances are a matter of great interest, since they make biofilms more fragile and susceptible to host immune defenses and antibiotics.

Acknowledgments

K.R.Z. was a recipient of a CAPES PhD studentship. This study was supported by Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., Kaufman, W.R. 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 39, 297-313.
- Booth, T.F. 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 14, 137-149.
- Borlee, B.R., Goldamn, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microb.* 75, 827-842.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Erlich, G. 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1466-1477.
- Cotter, P.A., Stibitz, S. 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Cur. Opin. Microbiol.* 10, 17-23.
- Esteves, E., Fogaça, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P., Pelajo-Machado, M., Valle, D., Daffre S. 2009. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 913-919.
- Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.

- Fogaca, A.C., da Silva, P.I. Jr., Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E., Daffre, S. 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J. Biol. Chem. 274, 25330-25334.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S. 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Dev. Comp. Immunol. 28, 191-200.
- Fonseca, A.P., Extremina, C., Fonseca, A.F., Sousa, J.C. 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 53, 903-910.
- Fothergill, J.L., Panagea, S., Hart, C.A., Walshaw, M.J., Pitt, T.L., Winstanley, C. 2007. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. BMC Microbiol. 23, 7-45.
- Friedman, L., Kolter, R. 2004a. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. J. Bacteriol. 186, 4457-4465.
- Friedman, L., Kolter, R. 2004b. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Mol. Microb. 51, 675-690.
- Grubhoffer, L., Golovchenko, M., Vancová, M., Zacharovová-Slavícková, K., Rudenko, N., Oliver, J.H. Jr. 2005. Lyme borreliosis: insights into tick-/host-borrelia relations. Folia Parasitol. 52, 279-294.

- Grunclová, L., Fouquier, H., Hypsa, V., Kopáček, P. 2003. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 651-660.
- Haugen, B.J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H.L., Roesch, P.L., Welch, R.A. 2007. In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 *dsdA*. *Infect. Immun.* 75, 278-289.
- Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263-273.
- Hidalgo, G., Chan, M., Tufenkji, N. 2011. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6852-6857.
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M. 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology.* 156, 1009-1018.
- Kaszab, E., Szoboszlay, S., Dobolyi, C., Hahn, J., Pék, N., Kriszt, B. 2011. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresour. Technol.* 102, 1543-1548.
- Kong, K.F., Jayawardena, S.R., Indulkar, S.D., Del Puerto, A., Kohl, C.L., Hoiby, N., Mathee, K. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49, 4567-4575.

- Kopáček, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C., Safarik, I. 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 989-997.
- Kopáček, P., Hajdusek, O., Buresová, V., Daffre, S. 2010. Tick innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 137-162.
- Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L.O., Jonczyk, J., Rigden, D.J., Rees, H.H., Turner, P.C. 2004. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18, 1444-1449.
- Lane, M.C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Mobley, H.L. 2005. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect. Immun.* 73, 7644-7656.
- Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S.P. 2008. *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and anti-quorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 429-436.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. 25, 402-408.
- Lory, S., Merighi, M., Hyodo, M. 2009. Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 53, 51-52.
- Malapaka, V.R., Barrese, A.A., Tripp, B.C., Tripp, B.C. 2007. High-throughput screening for antimicrobial compounds using a 96-well format bacterial motility absorbance assay. *J. Biomol. Screen.* 12, 849-854.

- Musk, D.J., Banko, D.A., Hergenrother, P.J. 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* 12, 789-796.
- Oldiges, D.P., Parizi, L.F., Zimmer, K.R., Lorenzini, D.M., Seixas, A., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I., Termignoni, C. 2012. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *Int. J. Parasitol.* 42, 635-645.
- Olson, M., Howard, C., Morck, D., Buret, A., Read, R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66, 86-92.
- O'Toole, G.A., Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304.
- Pavis, C., Mauleon, H., Barre, N., Maibeche, M. 1994. Dermal gland secretion of tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* (Acarina: Ixodidae): biological activity on predators and pathogens. *J. Chem. Ecol.* 20, 1495-1503.
- Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzel, A., Jung, G., Diehl, P.A., Petrini, O. 1997. Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helv. Chim. Acta.* 80, 2066-2072.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science.* 268, 1899-1902.
- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M. 2011. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.* 13, 835-850.

- Römling, U., Amikam, D. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Cur. Opin. Microbiol.* 9, 218-228.
- Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 644-648.
- Sauer, K., Camper, A.K. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183, 6579-6589.
- Schwan, W.R. 2008. Flagella allow uropathogenic *Escherichia coli* ascension into murine kidneys. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 441-447.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* 53, 1123-1134.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573-583.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43, 793-808.
- Shonenshine, J.R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L. 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J. Med. Entomol.* 35, 458-464.
- Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., Kaefer, V. 2010. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J. Microbiol. Methods.* 81, 226-231.

Starkey, M., Hickman, J.H., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, J., Starner, T.D., Wozniak, D.J., Harwood, C.S., Parsek, M.R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* 191, 3492-3503.

Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J., Pandian, S.K. 2009. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 57, 284-294.

Tremblay, J., Déziel, E. 2008. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J. Basic. Microbiol.* 48, 509-515.

Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Da Silva, A.G., Da Silva, M.V., Correia, M.T., Baumvol, I.J., Macedo, A.J. 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol.* 137, 327-335.

Tron, E.A., Wilke, H.L., Petermann, S.R., Rust, L. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis externa exhibit a quorum sensing deficiency. *Vet. Microbiol.* 99, 121-129.

Ueda, A., Wood, T.K. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PloS. Pathog.* 5, 1-15.

Wang, E.W., Agostini, G., Olomu, O., Runco, D., Jung, J.Y., Chole, R.A. 2008. Gentian violet and ferric ammonium citrate disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Laryngoscope.* 118, 2050-2056.

Yu, Z., Thomson, E.L.S., Liu, J., Dennis, J.J., Jacobs, R.L., Kaufman, W.R. 2012. Antimicrobial activity in the egg of the *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. Exp. Appl. Acarol. In press (available at doi 10.1007/s10493-012-9586-1).

Zhu, H., Bandara, R., Conibear, T.C., Thuruthyil, S.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Willcox, M.D. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45,1897-1903.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol. Microbiol. 39, 1452-1463.

Legends to illustrations

Fig. 1. (A) Effect of growing concentrations of tick egg-wax extract on the biofilm formation and on growth of *P. aeruginosa* PA14 upon polystyrene surface. The mean values of triplicate independent experiments and SDs are shown. * and ** represents a significant difference in relation to control samples for biofilm formation and bacterial growth, respectively (Student's *t* test, $p \leq 0.05$). Effect of tick egg-wax extract against *P. aeruginosa* PA14 biofilm upon glass tube. (B) Untreated and (C) tick egg-wax extract-treated (at a concentration of 2.5 mg/mL) samples.

Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) of the *P. aeruginosa* PA14 biofilm on coverslip. (A), (B), and (C) untreated sample, (D) and (E) bacterial cells grown in the presence of 2.5 mg/mL of the tick egg-wax extract.

Fig. 3. Evaluation of the expression of biofilm and virulence-related genes in *P. aeruginosa* PA14. The mean values of triplicate independent experiments and SDs are shown. *represents a significant difference in relation to untreated samples (Student's *t* test, $p \leq 0.05$).

Fig. 4. Pellicle formation in LB supplemented with Congo-Red: (A) untreated, and (B) egg-wax extract-treated (at a concentration of 2.5 mg/mL) samples. Images of untreated pellicle (B and C) and egg-wax extract-treated pellicle (E and F) removed from culture, and rinsed in water.

Fig. 5. Colony morphology of *P. aeruginosa* PA14 (A), and treated with 2.5 mg/mL of egg-wax extract (B) on Congo-Red plates after 6 days at 37 °C. Colony morphology was

also evaluated at room temperature (C- untreated, and D-treated with 2.5 mg/mL of egg-wax extract).

Fig. 6. Effect of tick egg-wax extract (2.5 and 5 mg/mL) on bacterial cell surface hydrophobicity. The data are shown as averages \pm standard deviations. * p value of ≤ 0.05 compared between non-treated and egg-wax extract-treated *P. aeruginosa* PA14 samples.

Fig. 7. Swarming motility of *P. aeruginosa* PA14 untreated (A) and egg-wax extract-treated (B) (at the concentration of 2.5 mg/mL).

Fig. 8. Quantification of c-di-GMP of untreated and egg-wax extract-treated *P. aeruginosa* PA14 samples by HPLC tandem mass spectrometry. The mean values of triplicate independent experiments and SDs are shown.

Fig. 1

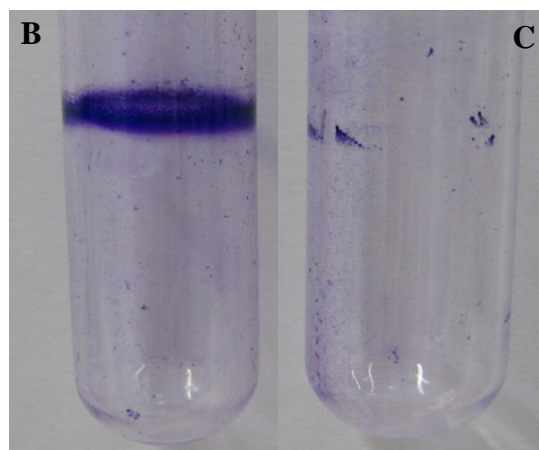
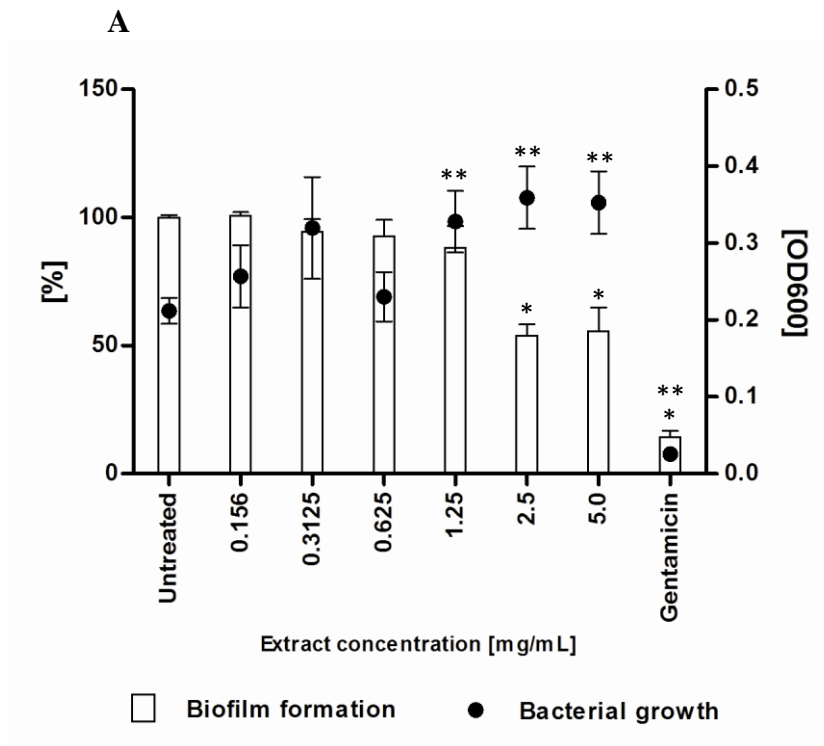


Fig. 2

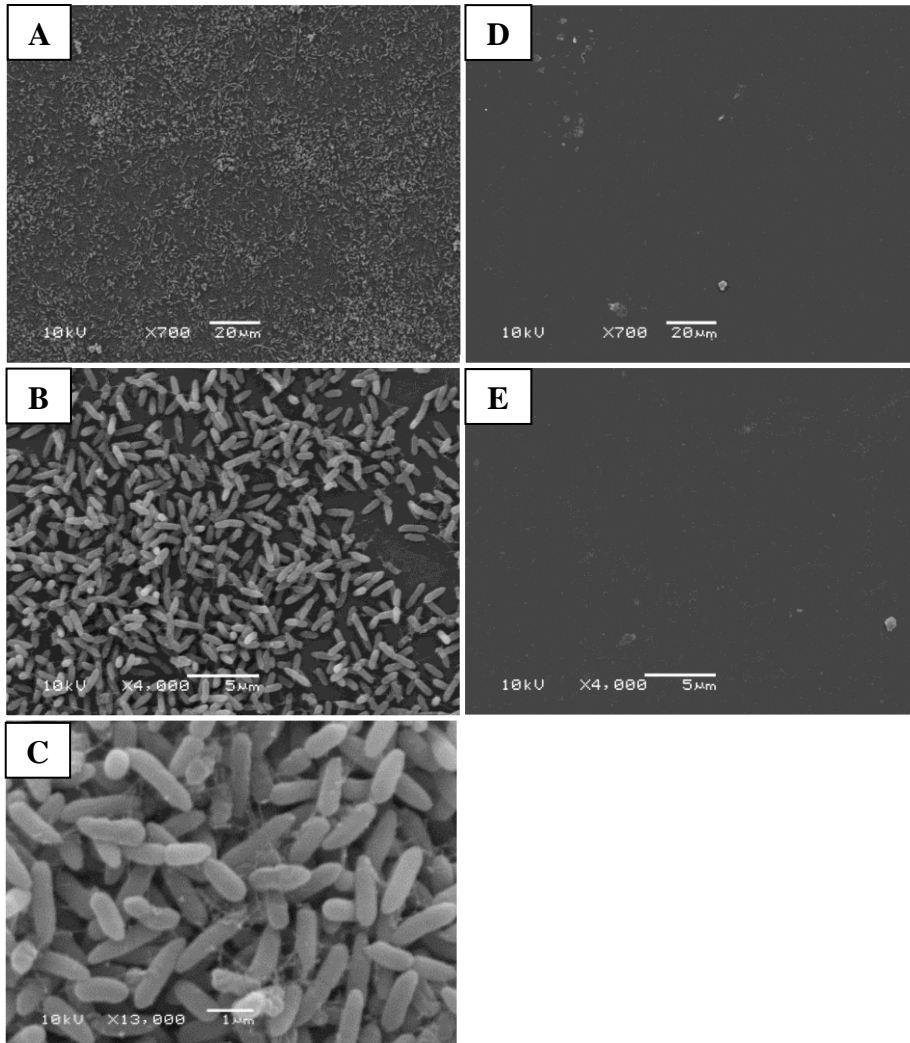


Fig. 3

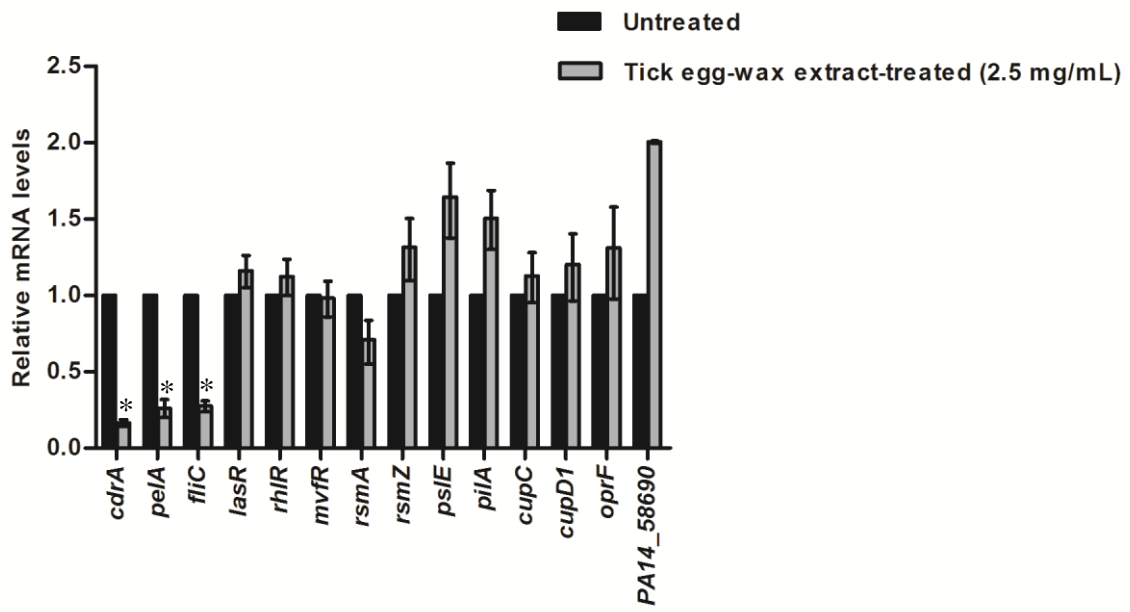


Fig. 4

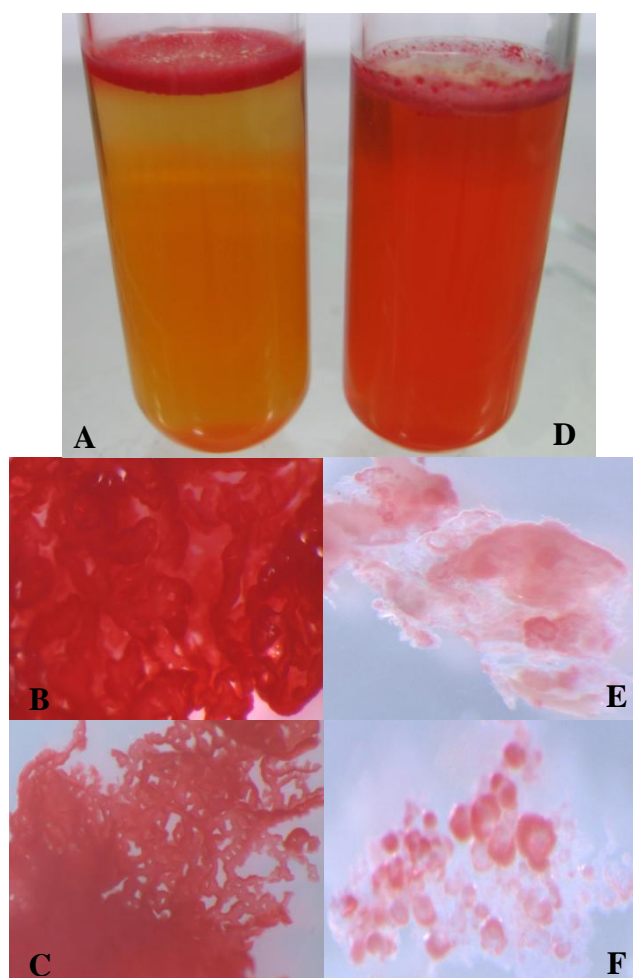


Fig. 5

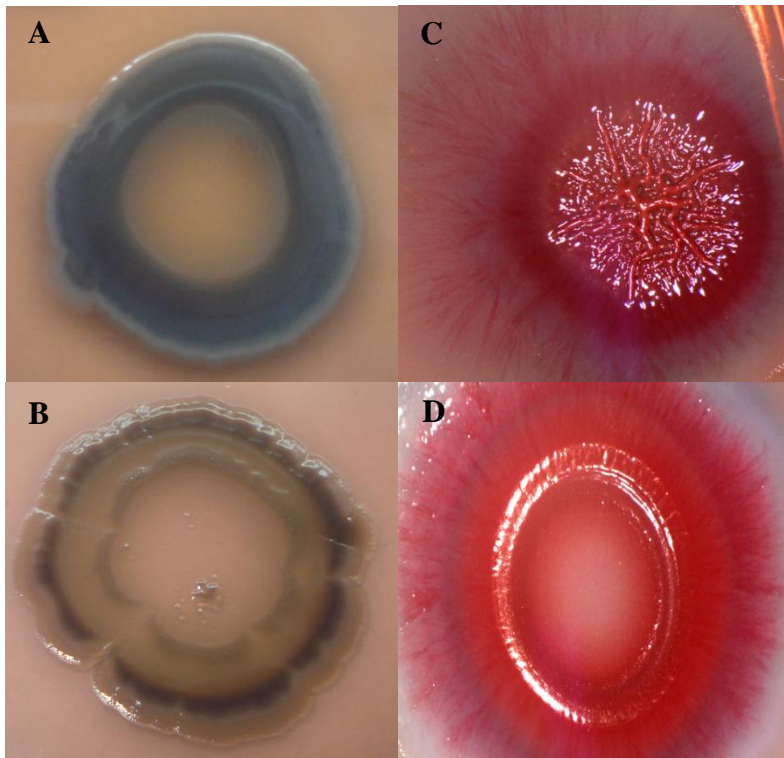


Fig. 6

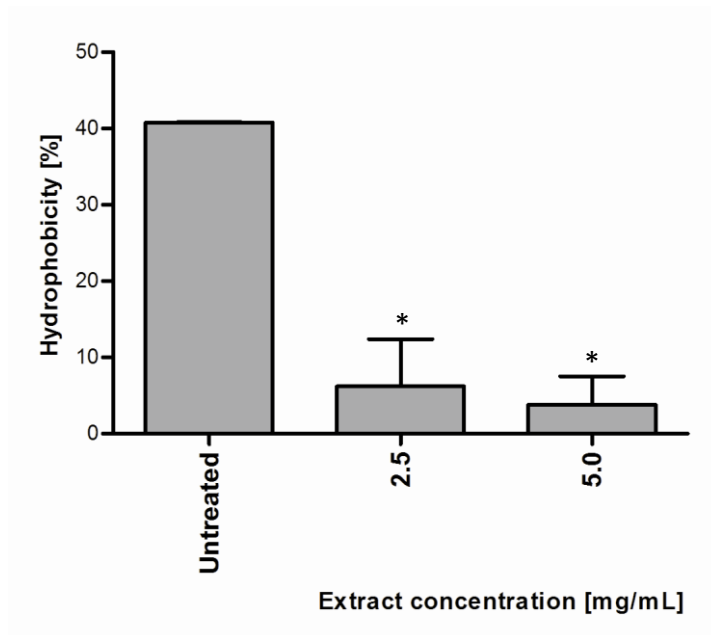


Fig. 7

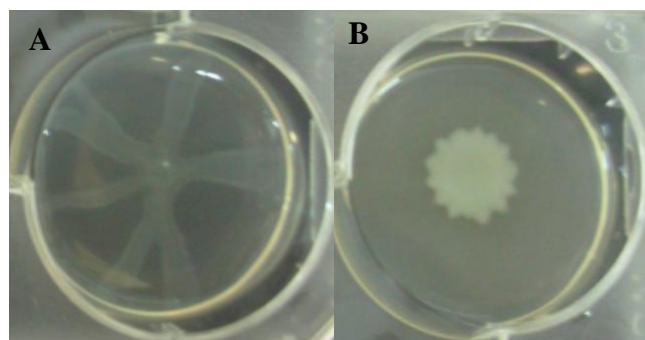


Fig. 8

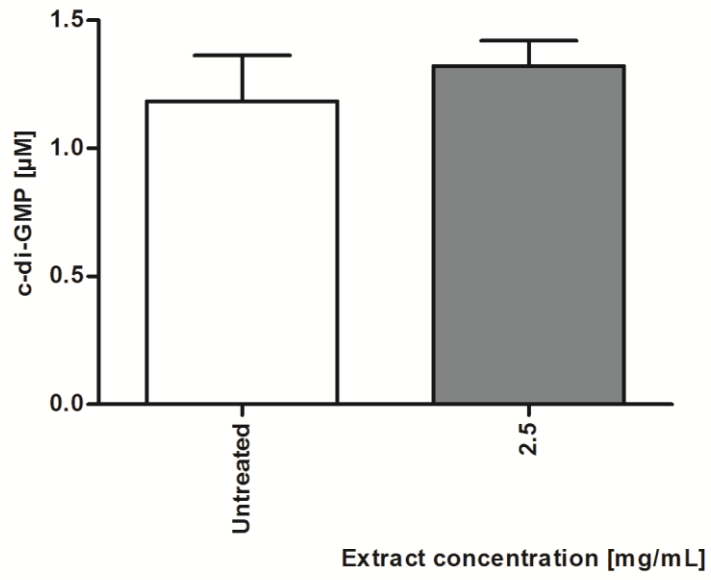


Table 1. Primers used in qRT-PCR.

Primer name	Sequence	Use
rhIR_up	CCACACGATTCCCTTCACC	qRT-PCR
rhIR_low	TCGCTCCAGACCACCATTT	qRT-PCR
lasR_up	CGCGAAAGCAGCACGAGTT	qRT-PCR
lasR_low	TTCCGCTTCCACGCTGAGG	qRT-PCR
mvfR_up	GCCATCCCGCCGTCGTTCT	qRT-PCR
mvfR_low	TCCGCGTTGTCTGCTTGAT	qRT-PCR
pelA_up	CACTTCTATTCGGGGACCAA	qRT-PCR
pelA_low	TGTAGTCGCTCATCCACAGC	qRT-PCR
PA14_61200 up	ACAGCCAGTTCAACGACCTC	qRT-PCR
PA14_61200 low	TGAAATACTCGCTGCCATTG	qRT-PCR
fliC L	GCAACAGGCCGAAGTAC	qRT-PCR
fliC R	GGTCTCGTAGGCGTTGGA	
rsmA up	GGGTCGGAGAGACCCTGA	qRT-PCR
rsmA low	GTGCACGGCGACTTCCTT	qRT-PCR
rsmZ up	ACACGCAACCCCGAAGGA	qRT-PCR
rsmZ low	GTATTACCCGCCACTCT	qRT-PCR
pilA-LEFT	TGCCGGCATATCAGGATT	qRT-PCR
pilA-RIGHT	CGTTACCGGCTTGAGCAT	qRT-PCR
psIE up	GTCGACAGCCTGGAGAAATC	qRT-PCR
psIE down	AACAGCATCAGCAGGGTTTT	qRT-PCR
cupC L	ATGGCAAGCTGCTGAACC	qRT-PCR
cupC R	TAAGCAGCCCGCAGATTC	qRT-PCR
cupD1 L	ACTATCGCCGCATTTCTC	qRT-PCR
cupD1 R	ACGGTGTCGAGTATCACG	qRT-PCR
oprF L	ACAGCGTTCGCAACATGA	qRT-PCR
oprF R	TAGGTGCCACGAACGTCA	qRT-PCR
PA14_58690 up	TGACGTCATCAACCTGGTGT	qRT-PCR
PA14_58690 down	CGGCTGAAGAAGGTCTTGTC	qRT-PCR

Table 2. Effect of egg-wax extract on pyocyanin production, elastase activity (LasB), proteolytic activity, and sensitivity of *P. aeruginosa* PA14 to oxidative stress.

PA14	Pyocyanin production	LasB activity	Proteolytic activity	Oxidative stress
Untreated	0.18 ± 0.02	1.52 ± 0.003	27 ± 0.11	23 ± 0.19
0.156 ^a	0.20 ± 0.003	1.70 ± 0.07	22 ± 0.07	24 ± 0.09
0.3125 ^a	0.17 ± 0.007	1.48 ± 0.04	25 ± 0.33	20 ± 0.13
0.625 ^a	0.20 ± 0.004	1.66 ± 0.34	26 ± 0.11	25 ± 0.13
1.25 ^a	0.18 ± 0.002	1.38 ± 0.20	27 ± 0.10	22 ± 0.22
2.5 ^a	0.17 ± 0.003	1.28 ± 0.16 [*]	26 ± 0.05	20 ± 0.15
5.0 ^a	0.19 ± 0.001	1.23 ± 0.06 [*]	25 ± 0.34	23 ± 0.13

^a Sample treated with different concentrations of egg-wax extract (mg/mL)

^b Pyocyanin production : OD₆₉₀ values mean in PA14 culture supernatants

^c LasB activity: measured as absorbance at 495 nm

^d Proteolytic activity: measured by zone of casein hydrolysis (in millimeters)

^e Oxidative stress: sensitivity of PA14 to H₂O₂ 3 % measured by bacterial growth inhibition zone (in millimeters)

^{*} *p* value of ≤ 0.05 compared between non-treated PA14 and test samples – (egg-wax extract-treated PA14)

The mean values of triplicate independent experiments and SDs are shown.

**CAPÍTULO 3.2. Uma molécula esteroidal presente na cera do ovo do carrapato
Rhipicephalus (Boophilus) microplus inibe biofilmes bacterianos**

**Artigo II - A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus*
(Boophilus) microplus inhibits bacterial biofilms**

Karine Rigon Zimmer, Alexandre José Macedo, Raquel Brandt Giordani, Jordan Martins
Conceição, Gianluca Nicastro, Ana Laura Boechat, Regina Lúcia Baldini, Wolf-Rainer
Abraham, Carlos Termignoni

Environmental Microbiology

Trabalho realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS) e no Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da Universidade
de São Paulo (USP)

A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus)*

***microplus* inhibits bacterial biofilms**

Karine R. Zimmer¹, Alexandre J. Macedo^{1,2}, Raquel B. Giordani³, Jordan M. Conceição¹, Gianluca G. Nicastro⁴, Ana Laura Boechat⁴, Regina L. Baldini⁴, Wolf-Rainer Abraham⁵, Carlos Termignoni^{1,6*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Centro de Ciências da Saúde e Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁴Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵Chemical Microbiology, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Germany.

⁶Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Carlos Termignoni, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, Brazil. Phone: +55 51 33086082, Fax: +55 51 33087309, *E-mail: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br

Running title: *R. microplus* protects their eggs against biofilms

Summary

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* lays eggs in the soil near the roots of grass, or in similar highly moist environments that are prone to biofilm formation. Tick eggs have a protective wax coating that may be a source of nutrients for microorganisms. However, as the eggs remain viable and show no visible signs of microbial colonization, we hypothesized that the coating might have anti-biofilm properties. We show here that the coating inhibits biofilm formation by both Gram-negative and Gram-positive bacteria, though by different mechanisms. We have identified the anti-biofilm molecule as *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (boophiline), and we show that it inhibits the expression of *fliC* (flagellin) and *cdrA* (biofilm scaffold), whose products are necessary for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Boophiline is a novel biofilm inhibitor being also effective against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. In our study we show evidences of the boophiline mode of action in the protection of arthropod eggs against biofilm colonization.

Keywords: biofilm inhibition/ eggs /*N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine/
R. microplus

Introduction

Rhipicephalus (Boophilus) microplus eggs have a wax coating which prevents desiccation (Lees and Beament, 1948; Booth, 1992) and acts as a barrier against microorganisms (Booth, 1992; Arrieta *et al.*, 2006; Esteves *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012). *Rhipicephalus microplus* lays eggs in the soil (Booth, 1992), an environment abundant in bacteria and prone to biofilm formation. Accordingly, we confirmed the hypothesis that, in addition to

the known antibiotic activity (Arrieta *et al.*, 2006; Esteves *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012), tick eggs also possess specific mechanisms to prevent biofilm formation (K.R. Zimmer, unpublished) and now we identified the molecule responsible for this activity. Many bacteria exist predominantly as biofilms (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole, 2002), sessile, organized communities, in which the bacteria adhere to surfaces and are surrounded by complex matrices of extracellular polymeric substances (Costerton *et al.*, 1999; Flemming and Wingender, 2010). Bacteria living in these communities are extremely recalcitrant to host immune defense and antimicrobial therapies (Rendueles *et al.*, 2012). Biofilm is a prevalent mode of growth found in natural, industrial and clinical settings (Rendueles *et al.*, 2012). In animals of economic importance, bacterial biofilms are recognized as a determinant for disease and chronicity. Examples of infections involving biofilms in these animals include mastitis, pneumonia, liver abscess, lymphadenitis, enteritis, and wound infections (Olson *et al.*, 2002). In humans, examples of infections that have been associated with biofilm formation include colitis, urethritis, conjunctivitis, vaginitis, ear infections, pneumonia in cystic fibrosis, infected burn wounds, and colonization of a wide variety of medical devices (Donlan and Costerton, 2002; Davies, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2011).

In this study we explored how *R. microplus* protects their eggs from bacterial biofilm colonization. We report here that *R. microplus* egg wax contains a compound which has anti-biofilm and antibiotic activities against two important opportunistic pathogens.

Results and discussion

Rhipicephalus microplus eggs without wax coating are colonized by *P. aeruginosa* biofilm

Pseudomonas aeruginosa was unable to form a biofilm on the surface of intact tick eggs (Fig. 1A), which ended up harboring only a few bacterial cells (Fig. 1B). Conversely, biofilms formed readily on eggs lacking their wax coatings (Fig. 1C, 1D). Corroborating with these results, in a previous study we demonstrated that *R. microplus* egg wax extract prevents biofilm formation by *P. aeruginosa* (K.R. Zimmer, unpublished).

N-(3-sulfoxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (boophiline) was identified in *R. microplus* egg wax and this compound inhibits *P. aeruginosa* biofilm formation

From the *R. microplus* egg wax we isolated an active compound of 609 Da (Supporting information), thought to be responsible for the observed anti-biofilm activity. Analyses of the ¹H and ¹³C NMR spectra revealed the presence of a 3,26-disubstituted cholest-5-ene (Supporting information), identified by comparing our results with NMR data of related compounds. Although cholesterol and cholesterol derivatives have been identified in *R. microplus* cuticular wax (Chery, 1969) their physiologic role remained unknown until now. The presence of a 3-sulphate-residue (Sadownik *et al.*, 1995) and a carboxy moiety at C-26 (Starchenkov *et al.*, 2000) allowed us to identify the compound as *N*-(3-sulfoxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (Supporting information), also known as boophiline (Potterat *et al.*, 1997) (Fig. 2A). Boophiline has been shown to have antibiotic activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Cladosporium cucumerinum*, and *Candida albicans* (Potterat *et al.*, 1997). Our results show that it also prevents *P. aeruginosa* biofilm formation, without affecting cell viability (Fig. 2B), suggesting that it inhibits a biofilm-specific pathway instead of killing bacteria. The minimum concentration of boophiline

required to inhibit *P. aeruginosa* biofilm formation was 0.51 mM (Fig. 2B). Bacterial cells treated with boophiline were strongly defective in adhesion (Fig. 2C3, 2C4) compared with untreated cells (Fig. 2C1, 2C2).

Inhibition of P. aeruginosa biofilm formation is independent of the inhibition of quorum sensing system

Pseudomonas aeruginosa biofilm formation inhibition was not due to a quorum quenching (QQ) mechanism, as the treated and untreated cells showed similar levels of mRNA for the three major quorum sensing (QS) regulators LasR, RhIR and MvfR (Fig. 2D).

Boophiline dot not reduce overall c-di-GMP levels of P. aeruginosa cells but it is not able to inhibit biofilm of a strain overexpressing diguanilate cyclase

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is an important second messenger, characteristic of Gram-negative bacteria (Verstraeten *et al.*, 2008; Hengge, 2009). High levels of c-di-GMP promote a sessile mode of growth, while low intracellular levels promote motile behavior (Hengge, 2009; Schirmer and Jenal, 2009). In line with this, we found that boophiline increased swarming motility (Fig. 3), which raised the question whether it acts by altering c-di-GMP levels. However, we did not detect any lowering of overall c-di-GMP levels in the treated cells ($1.36 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and $1.23 \pm 0.07 \mu\text{M}$ for untreated and treated-samples, respectively).

When c-di-GMP levels were increased by overexpression of a diguanilate cyclase, boophiline no longer inhibited biofilm initiation (Fig. 4). One explanation of these results is that boophiline interferes with a specific c-di-GMP-regulated pathway, blocking the switching of planktonic cells into biofilm-forming variants, which is consistent with the increased swarming motility of treated cells. Once cells have high c-di-GMP levels due to

overexpression of the guanylate cyclase, biofilm formation has been initiated and boophiline is no longer effective in preventing biofilm formation, since there are several redundant mechanisms by which c-di-GMP levels are regulated that can overcome boophiline inhibition. Therefore, the mode of action of boophiline cannot be understood as an overall lowering of c-di-GMP, which would be expected if this compound also acted on preformed biofilms.

*Boophiline strongly represses *cdrA* and *fliC* expression*

Next, we asked whether boophiline could repress *cdrA*, a gene that encodes an extracellular protein acting as a scaffold for the biofilm matrix regulated by c-di-GMP (Hengge, 2009; Borlee *et al.*, 2010; Flemming and Wingender, 2010). In boophiline-treated cells, transcription of *cdrA* was reduced by 83% (Fig. 2D). Nevertheless a *cdrA* mutant strain formed biofilms almost like the wild type, and biofilm formation was inhibited by boophiline (Fig. 5). This finding suggests that repression of *cdrA* alone is insufficient to prevent *P. aeruginosa* biofilm formation, and that boophiline acts via other mechanisms to inhibit biofilm initiation or maintenance.

The primary role of bacterial flagella in biofilm formation is to accomplish the initial interaction with the substratum (O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998; Petrova and Sauer, 2009). It is assumed that flagellum-mediated motility overcomes the repulsion forces of the surface, allowing the bacteria to form a cell monolayer (Simões *et al.*, 2010). O'Toole and Kolter (1998) showed that mutants deficient in flagellum-mediated motility were also defective in biofilm initiation. We confirmed that the flagellar gene *fliC* was required for biofilm formation on the experimental conditions used in our study (Fig. 5C) (O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998), but was not essential for swarming

motility (Fig. 3). We found that boophiline-treated cells had lower *fliC* mRNA levels (Fig. 2D) and that, in a proteomic analysis, FliC concentrations were correspondingly reduced (data not shown).

Staphylococcus epidermidis biofilm formation is inhibited by boophiline via a bactericidal effect

Boophiline also had a bactericidal effect against *S. epidermidis* (used as a model for Gram-positive bacteria), with a minimum inhibitory concentration of 1.4 mM (Fig. 6A and 6B). Significant morphological changes were observed in the boophiline-treated *S. epidermidis* cells, which appeared to be severely damaged (Fig. 6C3-6C6; compare Fig. 6C1, 6C2). Some cells exhibited aberrant morphology (Fig. 6C3), and ghost cells were observed (Fig. 6C6). Moreover, boophiline was found to cause abnormal septum formation (Fig. 6C6) and heterogeneity of cytoplasmic electron density (Fig. 6C4). The treated cells appeared to undergo lysis and to release intracellular material (Fig. 6C3, 6C4). A similar potent antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria has previously been observed with some steroidal compounds (Moore *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 1997; Epanand *et al.*, 2008).

To identify the active moiety of boophiline, we tested the effect of cholesterol sulphate, cholesterol and *L*-isoleucine on *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. Evaluated separately or in combination, these compounds were ineffective and/or less effective in both models, suggesting that the whole molecule is essential for anti-biofilm and antibiotic activities (Fig. S2A, S2B; Fig. S3A, S3B).

In summary, our novel evidence indicates that boophiline protects *R. microplus* eggs of biofilm colonization. These findings provide new insights into how egg-laying organisms

protect their eggs against bacterial biofilms, and may be useful for developing new strategies for tick and biofilm control.

Experimental procedures

Animals and eggs

Engorged females of *R. microplus* were obtained from the colony maintained at the Faculdade de Veterinária at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Engorged females were stored in the incubator for oviposition and the eggs were collected for extraction of the egg wax.

Chemicals

Cholesterol[®], cholesterol sulphate[®], *L*-isoleucine[®], gentamicin sulphate[®], rifampicin[®], and DMSO[®] were purchased from Sigma Aldrich[®] (USA). All other solvents were purchased from Merck[®] (Germany). Cholesterol and cholesterol sulphate were prepared in DMSO 1% while *L*-isoleucine in water.

Extraction of the egg wax, purification and structural elucidation of N-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-L-isoleucine

Egg wax was extracted (Arrieta *et al.*, 2006) and separated by solid phase extraction (Bond Elut[®] C18 cartridges 500 mg/6 mL, Agilent[®], Germany) using an elution gradient. The elution steps of solid phase extraction were performed with 5, 10, 15, 20, 50, and 75% of methanol in water and final elution steps using 100% methanol, 100% acetonitrile and 100% chloroform. Melting point was analysed in Buchi B-545 Melting Point apparatus and

IR spectra in BOMEM MB-100 spectrometer. The 1D and 2D NMR spectra were obtained on Bruker DMX 500 and DMX-600 spectrometers in methanol-d₄ and DMSO-d₆. ESI-MS/MS and ESI-MS were performed in Esquire 3000 Plus Bruker Daltonics and Bruker Daltonics MicroTOF spectrometers, respectively. C, H, and N were quantified using a 2400 CHN Elemental Analyzer (Perkin Elmer), while S content was determined by plasma atomic emission spectroscopy (Spectro Arcos SOP).

Bacterial strains and growth conditions

Pseudomonas aeruginosa strain UCBPP-PA14 (Rahme *et al.*, 1995) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C on a rotary shaker (150 rpm) (Incubator Shaker Series Excella E25, New Brunswick Scientific) and adjusted to an optical density at 600 nm equivalent to 10⁸ CFU/mL. PA14-derived *cdrA* and *fliC* transposon mutants were obtained from the PA14NR library (Liberati *et al.*, 2006), and strain RB211 was constructed by inserting the coding region of *PA14_72420* behind an arabinose-inducible promoter at the *ctx* site of PA14.

Anti-biofilm and antibacterial assays

Biofilm formation was assayed as described by Trentin *et al.* (2011) with slight modifications. Briefly, 100 µL of the bacterial suspension, 100 µL *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (concentration ranging from 0.128 to 4.0 mM) and 50 µL of LB broth were added to standard sterile 96-well polystyrene microtiter plates (Corning, Inc. NY, USA). *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (boophilin) was solubilized in DMSO 1%. Following the incubation period (37°C and 16 h), the content of the wells was removed, and the wells were washed three times with sterile saline 0.9%. The remaining attached bacteria were heat-fixed at 60°C for 1 h. The

adherent biofilm layer formed was stained with 0.4% crystal violet for 15 min at room temperature. The stain bound to the cells was solubilized with 99.5% DMSO and absorbance was measured at 570 nm (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA). DMSO 1% was used as biofilm formation control.

We confirm that the inhibitory activity of boophilin against *P. aeruginosa* biofilm was not due to a physical effect performing an additional experiment. In this assay *P. aeruginosa* cells were previously treated with boophilin for a period of 16 h (37°C). After the treatment, bacterial cells were washed three times with sterile saline 0.9% and thus evaluated in the anti-biofilm assay. Boophilin-treated bacterial cells were defective in the biofilm formation demonstrating that the effect caused by the compound is not physical.

The bacterial growth was evaluated based on the difference between initial ($t = 0$) and final ($t = 16$ h or 24 h for *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively) absorbance values at 600 nm in 96-well microtiter plates (Costar 3599, Corning, Inc., USA). Gentamicin sulphate 0.013 mM and rifampicin 0.07 mM were utilized as growth control agents in all assays for *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively.

Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM)

Scanning (Trentin *et al.*, 2011) and transmission (Giordani *et al.*, 2011) electron microscopy were performed according to published protocols and established by our group.

Swarming motility

The swarming motility assay was performed as described by Tremblay and Déziel (2008), with minor modifications. Bacterial cells from overnight cultures (cultured in LB)

untreated and treated with boophiline for 16 h (at a concentration of 4.0 mM) were spotted (5 μ L) in modified M9 medium (20 mM NH_4Cl , 12 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22 mM KH_2PO_4 , 8.6 mM NaCl , 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 11 mM dextrose, 0.5 g/L casamino acid, 0.5 g/L [Difco], Bacto-agar [Difco]) and incubated at 30°C for 16 h. The modified M9 medium was previously distributed in polystyrene plates and dried through for 45 min. The diameter of the zones was compared with that of the control sample (DMSO 1%).

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

qRT-PCR assays were carried out using total RNA extracted with Trizol from cultures grown for 16 h in the presence of boophiline at a concentration of 4.0 mM (treated-sample) and in the presence de DMSO 1% (untreated-sample). Afterwards, the samples were treated with DNase I, and used for cDNA synthesis with Superscript III (Invitrogen) and random primers. cDNA was amplified with specific primers (Table S1) using SYBR Green PCR Master Mix in the 7300 Real Time PCR System (Nicastro *et al.*, 2009). The threshold cycle data analysis (Livak and Schmittgen, 2001) was employed, with *nadB* used for normalization of cDNA amounts.

Isolation and detection of c-di-GMP from P. aeruginosa

c-di-GMP was extracted as described by Simm *et al.* (2004) with slight modifications. Boophiline (4.0 mM)-treated and untreated (DMSO 1%) *P. aeruginosa* cells were cultivated (16 h) in M63 glucose medium at 37°C with aeration. Cells were harvested by centrifugation (4°C). The pellets were resuspended in 300 μ L water, heated at 100°C for 5 min and nucleotides were extracted twice with 0.5 mL of 70% ice-cold ethanol. The extract was lyophilized, resuspended in 300 μ L of water and then 100 μ L was subjected to HPLC MS/MS analysis as described by Spangler *et al.* (2010).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) against S. epidermidis

Boophilin minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using microtiter plates (Corning, Inc. NY, USA) and testing in concentrations ranging from 0.4 to 2.0 mM. After incubation for 24 h at 37°C, MIC was defined as the lowest concentration of the agent tested which led to no growth at 600 nm. To determine the type of effect caused by the compound on *S. epidermidis* cells, a 50- μ L aliquot was retrieved of each well containing bacterial suspension with boophilin showing no visible sign of growth, serially diluted and subcultured on LB agar. After 24 h of incubation at 37°C, the number of surviving organisms was determined.

Statistical analyses

Three independent biological replicates were performed ($n=4$), and data are presented as mean \pm SD. Statistical significance was tested using unpaired two-tailed Student's *t*-tests (GraphPad Prism[®] version 5.00). A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

Acknowledgements

K.R.Z. was the recipient of a CAPES PhD studentship. The study was supported by Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The authors are grateful to Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFRGS) for technical assistance with electron microscopy.

References

- Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., and Kaufman, W.R. (2006) Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 39: 297-313.
- Booth, T.F. (1992) Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 14: 137-149.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microb* 75: 827-842.
- Esteves, E., Fogaça, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P., Pelajo-Machado, M. *et al.* (2009) Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Dev Comp Immunol* 33: 913-919.
- Chery, L.M. (1969) Cholesterol in the cuticular wax of *Boophilus microplus*. *Nature* 222: 777.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.

- Epand, R.M., Epand, R.F., and Savage, P.B. (2008) Ceragenins (cationic steroid compounds), a novel class of antimicrobial agents. *Drug News Perspect* 21: 307-311.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8: 623-633.
- Giordani, R.B., Vieira, P. de B., Weizenmann, M., Rosemberg, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C. *et al.* (2011) Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* 72: 645-650.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7: 263-273.
- Kikuchi, K., Bernard, E.M., Sadownik, A., Regen, S.L., and Armstrong, D. (1997) Antimicrobial activities of squalamine mimics. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1433-1438.
- Lees, A.D., and Beament, J.W.L. (1948) An organ-waxing in ticks. *QJMS* 3th, 7: 291-332.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G. *et al.* (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2833-2838.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Methods* 25: 402-408.

- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., and Filloux, A. (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 13: 1666-1681.
- Moore, K.S., Wehrli, S., Roder, H., Rogers, M., Forrest, J.N. Jr., Mccrimmon, D. *et al.* (1993) Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1354-1358.
- Nicastro, G.G., Boechat, A.L., Abe, C.M., Kaihami, G.H., and Baldini, R.L. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cupD transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiol Lett* 301: 115-123.
- Olson, M., Howard, C., Morck, D., Buret, A., and Read, R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66: 86-92.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304.
- O'Toole, G.A. (2002) A resistance switch. *Nature* 416: 695-696.
- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2009) A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathog* 5: 1-16.
- Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzel, A., Jung, G., Diehl, P.A., and Petrini, O. (1997) Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helv Chim Acta* 80: 2066-2072.

- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285-293.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
- Rendueles, O., Kaplan, J.B., and Ghigo J.M. (2012) Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x. [Epub ahead of print].
- Sadownik, A., Deng, G., Janout, V., Regen, S.L., Bernard, E.M., Kikuchi, K. *et al.* (1995) Rapid construction of a squalamine mimic. *J Am Chem Soc* 117: 6138-6139.
- Schirmer, T., and Jenal, U. (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signaling. *Nature* 7: 724-735.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Römling, U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53: 1123-1134.
- Simões, M., Simões, L.C., and Vieira, M.J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci and Technol* 43: 573-583.
- Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., and Kaefer, V. (2010) A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* 81: 226-231.
- Starchenkov, I., Trapencieris, P., Kauss, V., Jas, G., and Kalvinsh, I. (2000) A convenient synthesis of 5 β -cholestan-26-oic and 5 β -cholestan-26,27-dioic acids. *Steroids* 65: 143-147.

Tremblay, J., and Déziel, E. (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* 48: 509-515.

Trentin, D. da S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Da Silva, A.G., Da Silva, M.V., Correia, M.T. *et al.* (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* 137: 327-335.

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J. *et al.* (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* 16: 496–506.

Yu, Z., Thomson, E.L.S., Liu, J., Dennis, J.J., Jacobs, R.L., Liu, Z. *et al.* (2012) Antimicrobial activity in the egg of the *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. *Exp Appl Acarol* (in press).

Figure legends

Fig. 1. *P. aeruginosa* does not adhere to intact eggs. SEM images of *P. aeruginosa* PA14 biofilms on intact *R. microplus* eggs (A, B) and on eggs without their wax coatings (C, D). Arrows in (B) indicate isolated bacterial cells on the egg surface. Scale bars represent magnifications of x350 and x1700. Insert in panel (D) shows a typical biofilm with extracellular polymers on the surface of uncoated eggs (magnification x10000).

Fig. 2. Boophiline inhibits *P. aeruginosa* PA14 biofilm initiation. A. Chemical structure of boophiline. B. Dose-responses of *P. aeruginosa* PA14 growth and biofilm formation to boophiline. Biofilms were quantified by the crystal violet staining method (absorbance at 570 nm) in 96-well plates (see top of the figure). Bacterial growth was determined by measuring optical density at 600 nm. C. SEM images of a *P. aeruginosa* PA14 biofilm on a Permanox slide. Untreated (1 and 2) and boophiline (4.0 mM)-treated (3 and 4) biofilms. Scale bars: magnification x200 and x10000. Solid arrows: biofilm matrix. D. qRT-PCR assays were carried out with RNA extracted from untreated and boophiline-treated (4.0 mM) biofilms. In all assays the incubation time of the samples was 16 h. Data in (B) and (D) are presented as means±SD of three independent assays. Statistical significance was tested using unpaired Student's *t*-tests. * $p < 0.0001$, ** $p = 0.002$, and *** $p < 0.003$.

Fig. 3. Boophiline stimulates *P. aeruginosa* swarming motility. Representative images and diameters of swarming motility plates for *P. aeruginosa* cells with and without boophiline (4.0 mM) after 16 h of incubation. Results are presented as means±SD of three independent experiments. * $p = 0.03$ in unpaired Student's *t*-test.

Fig. 4. Boophiline does not inhibit biofilm formation by a strain that overexpresses diguanilate cyclase. Biofilm formation was quantified after 16 h of incubation using the crystal violet method. Bars represent the means±SD of three independent assays * $p = 0.025$ in unpaired Student's *t*-test.

Fig. 5. A. Boophiline inhibits biofilm formation by a *cdrA* mutant. PA14: *P. aeruginosa* PA14 wild-type (untreated); $\Delta cdrA$: mutant, and $\Delta cdrA$ +Boophiline (4.0 mM): $\Delta cdrA$ mutant treated with boophiline for 16 h. C. *fliC* mutant did not form biofilm. PA14: *P. aeruginosa* PA14 wild-type, and $\Delta fliC$: mutant. Results are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.0001$, ** $p < 0.006$, *** $p = 0.02$ in unpaired Student's *t*-test.

Fig. 6. Boophiline has a bactericidal effect on *S. epidermidis*. A. Determination of the minimum inhibitory concentration of boophiline (0.4–2.0 mM) against *S. epidermidis* after 24 h of incubation. B. *S. epidermidis* growth in a medium containing 1.4 mM boophiline. C. TEM images of untreated *S. epidermidis* cells (controls); panels (1) and (2); and boophiline-treated (1.4 mM) cells; panels (3) to (6). Solid arrows: loss of membrane integrity; dotted arrows: ghost cells. Results in (A) and (B) are presented as means \pm SD of three independent assays. Statistical significance was tested using unpaired Student's *t*-tests. * $p < 0.0002$, ** $p \leq 0.002$, *** $p \leq 0.003$, £ $p < 0.009$, and § $p < 0.02$.

Figure 1

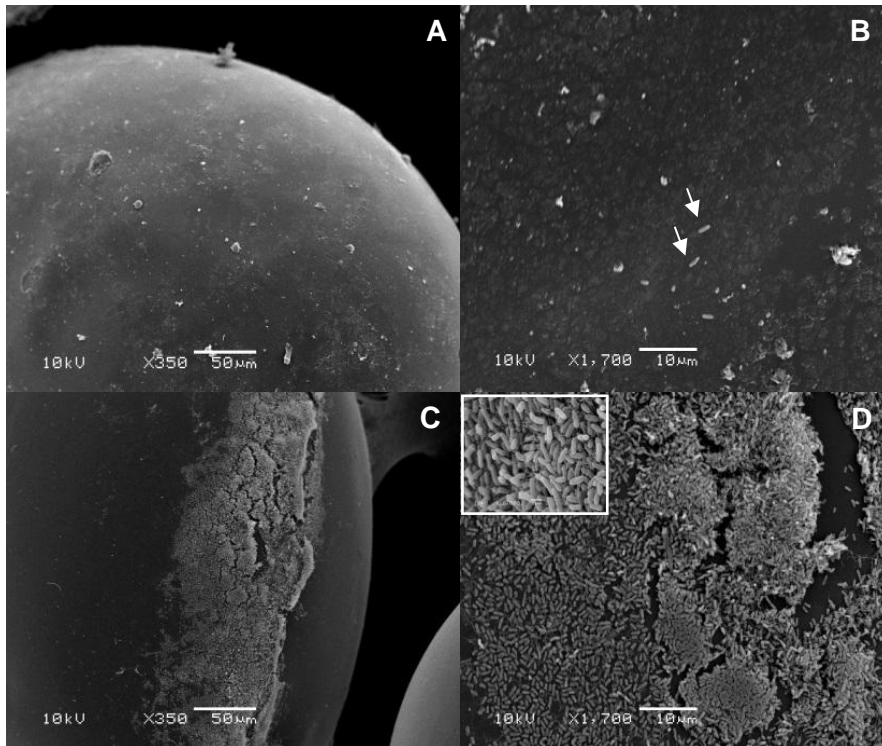


Figure 2

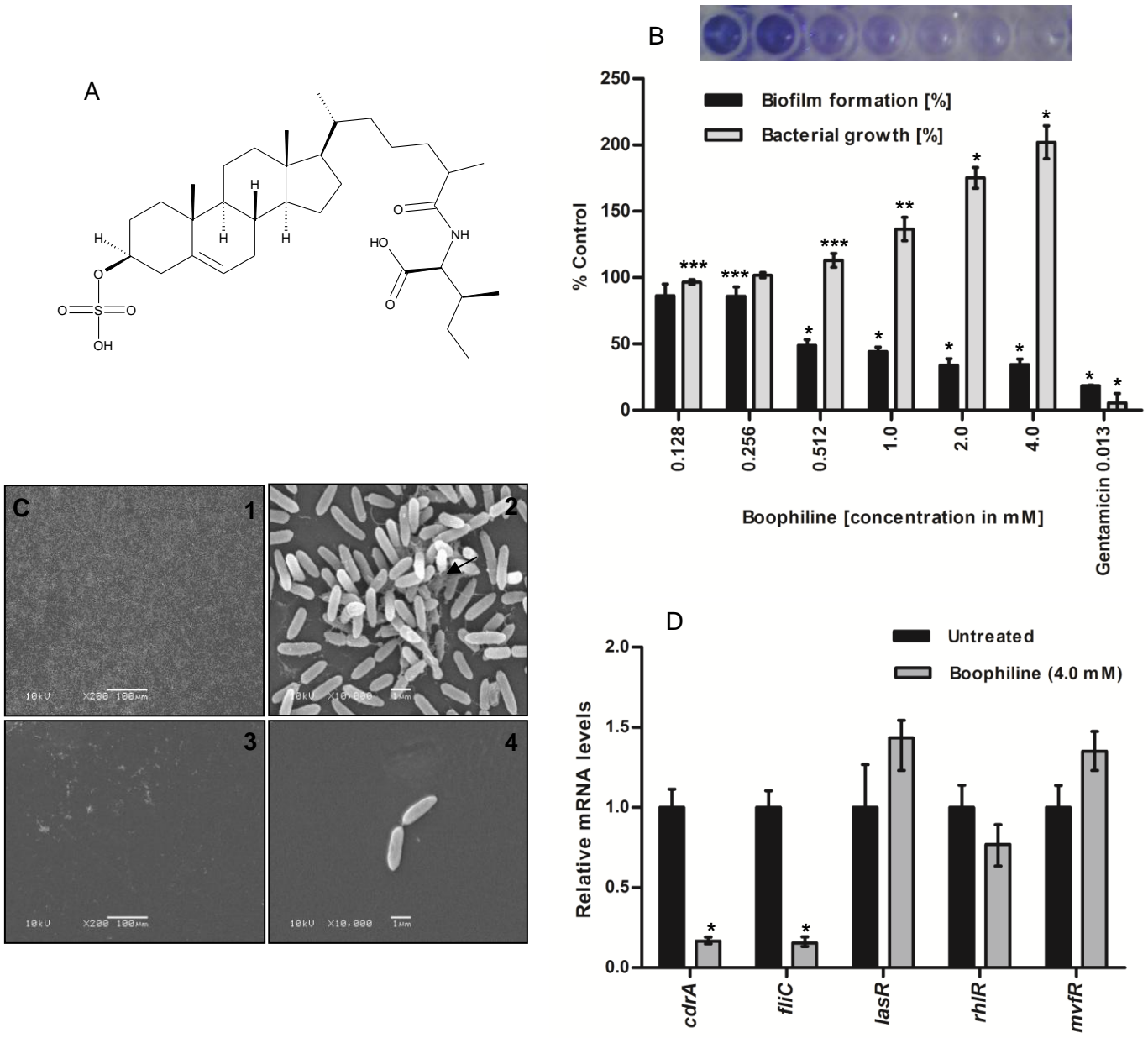


Figure 3

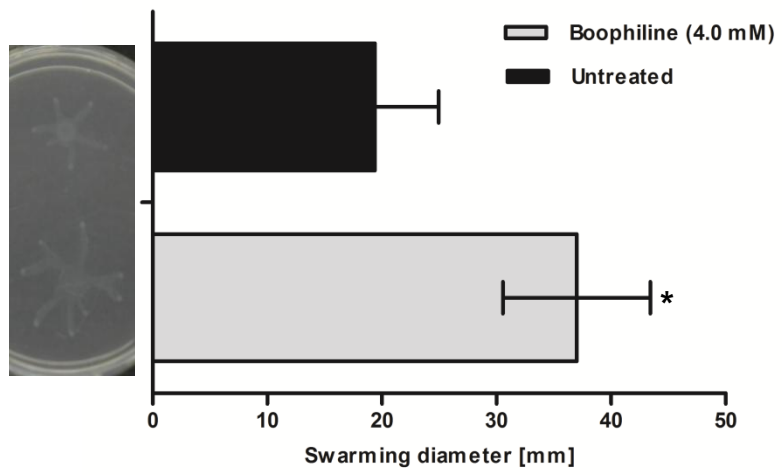


Figure 4.

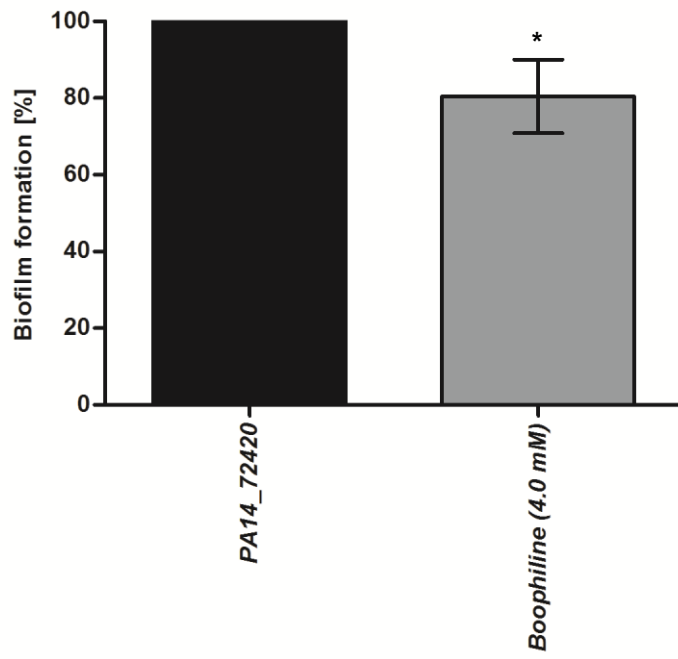


Figure 5

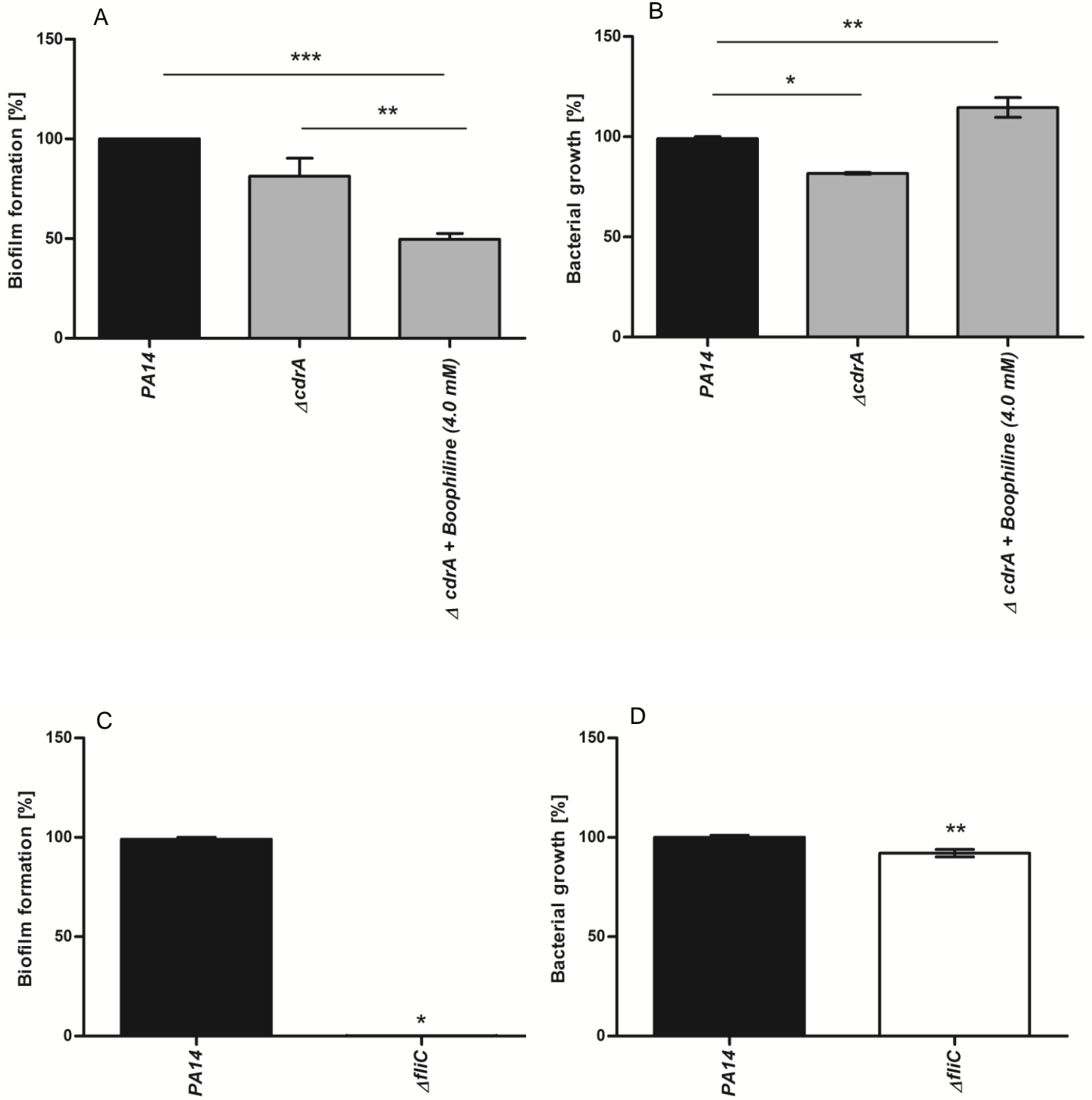
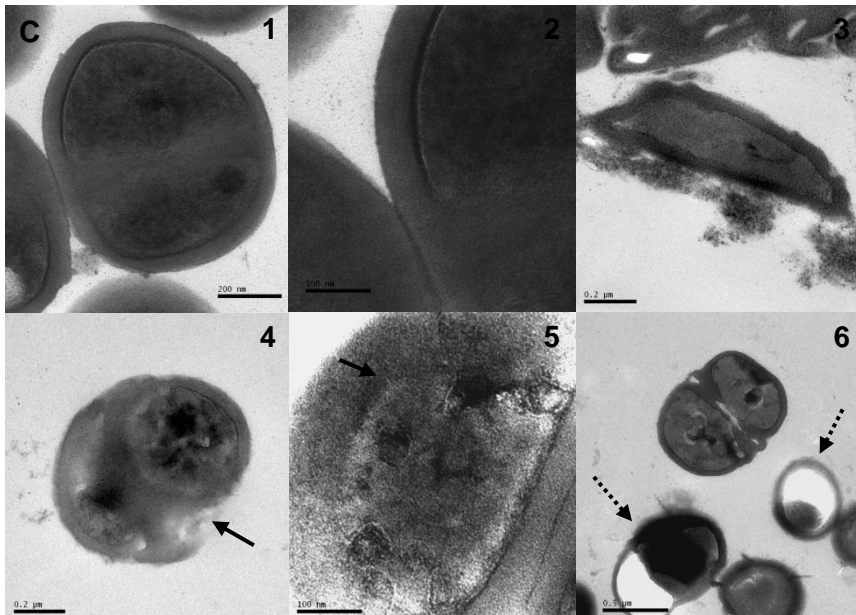
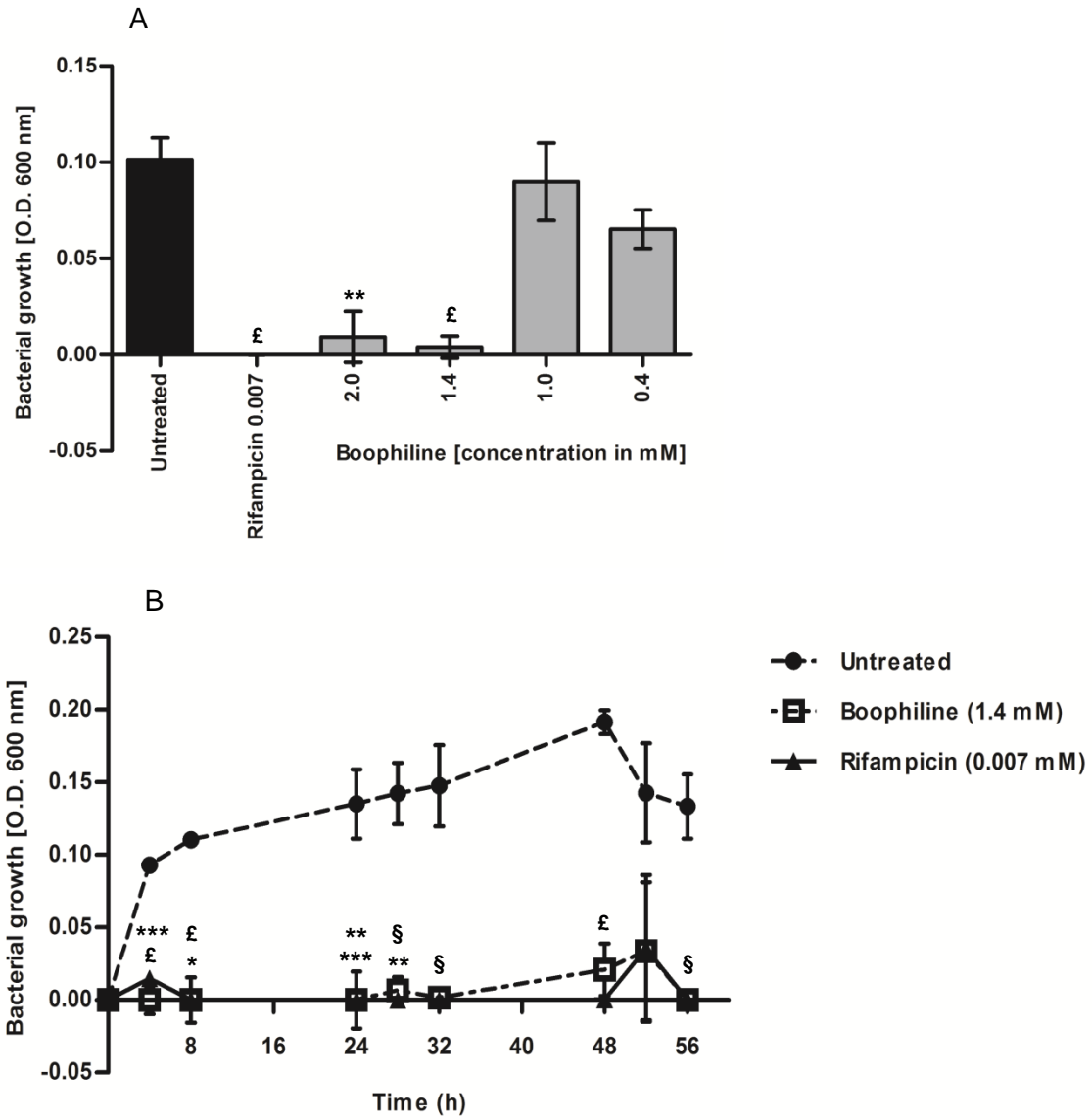


Figure 6



Supporting information legends

Fig. S1. *R. microplus* egg wax forms a rough layer surrounding the egg shell, and is completely removed during extraction. SEM images of an intact egg (A and B) and an egg subjected to extraction with solvents (B). Scale bars: magnification x250.

Fig. S2. (A) The effect of cholesterol sulphate (CS), cholesterol (C), *L*-isoleucine (L-ISO) and (B), their combinations (CS+L-ISO and C+L-ISO) on *P. aeruginosa* biofilm formation and bacterial growth. Results are presented as the means±SD of three independent assays. * $p \leq 0.0007$, ** $p < 0.005$, $\xi p < 0.008$, $\S p < 0.02$, and $\text{£} p < 0.05$ in unpaired Student's *t*-tests.

Fig. S3. (A) Effect of cholesterol sulphate (CS), cholesterol (C) and *L*-isoleucine (L-ISO) and (B), their combinations (CS+L-ISO and C+L-ISO) on *S. epidermidis* growth. Results are means±SD of three independent assays. * $p < 0.0006$, ** $p < 0.003$, $\S p < 0.007$, $\xi p < 0.02$, and *** $p < 0.05$ in unpaired Student's *t*-tests.

Table S1. Primers used in qRT-PCR assays.

Chemical description of *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine.

Figure S1

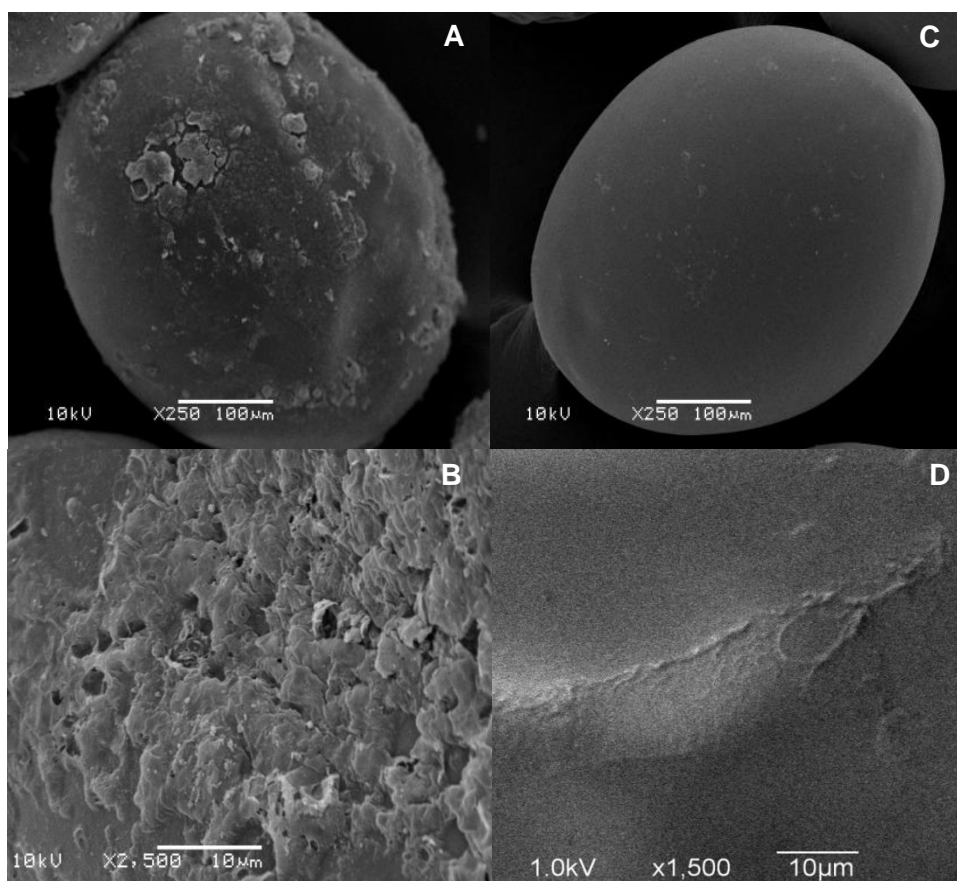


Figure S2

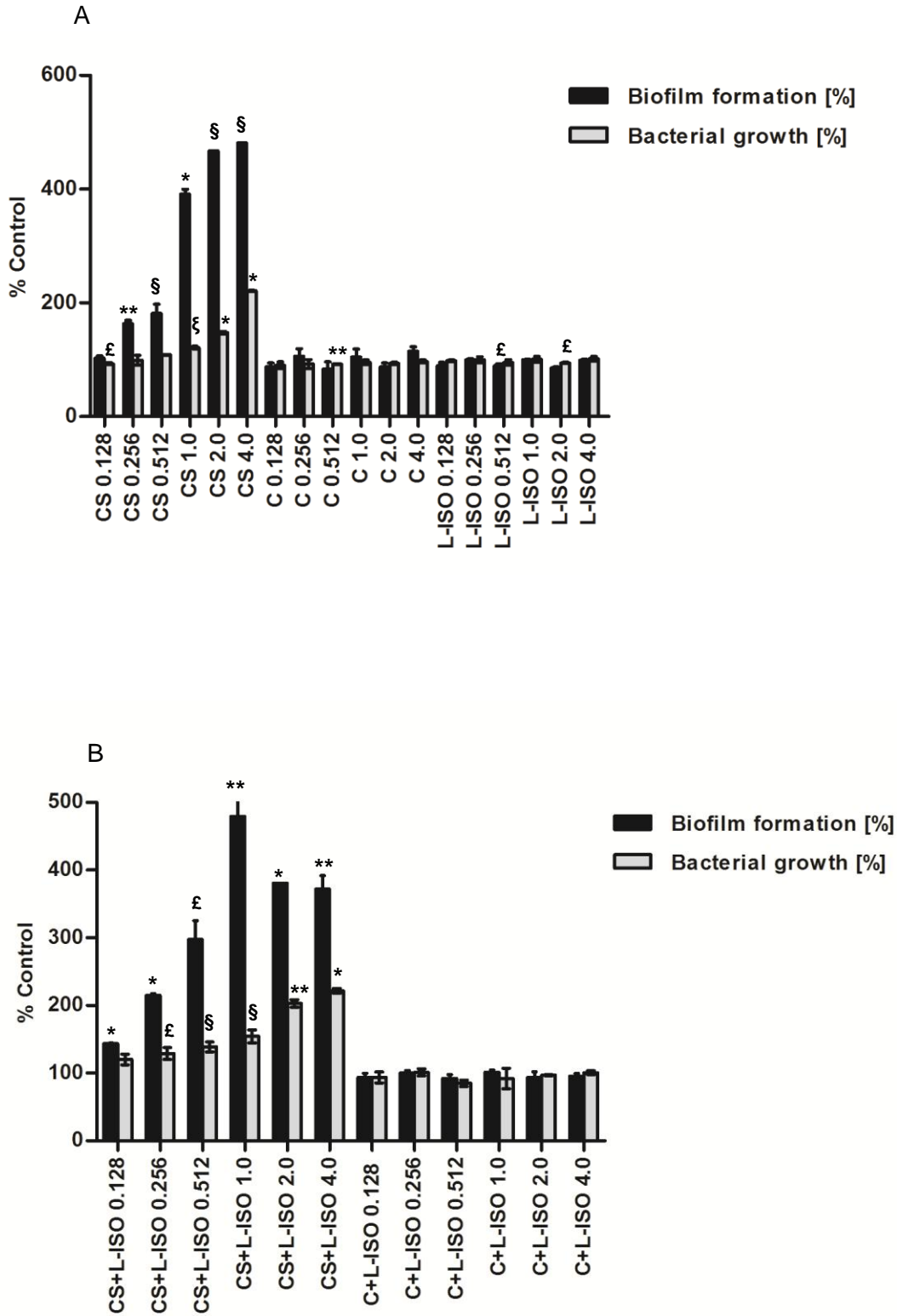


Figure S3

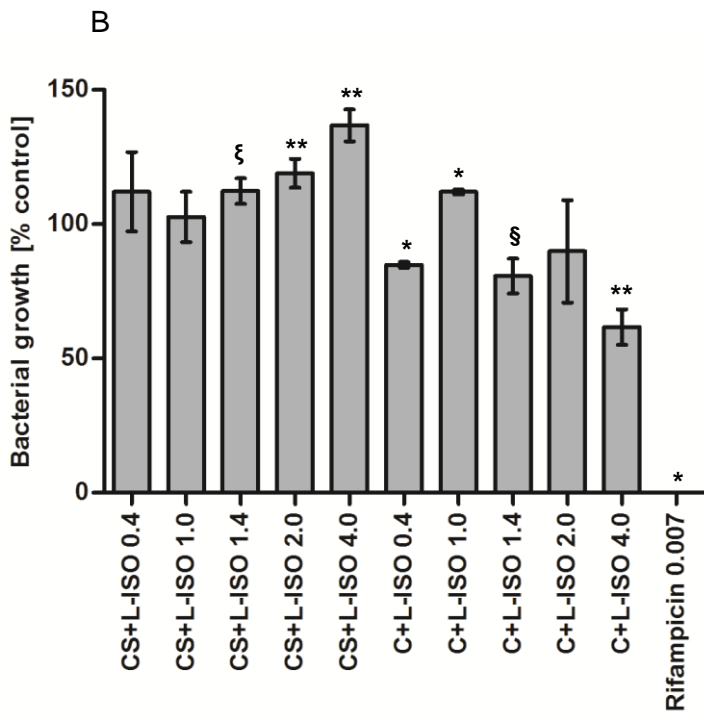
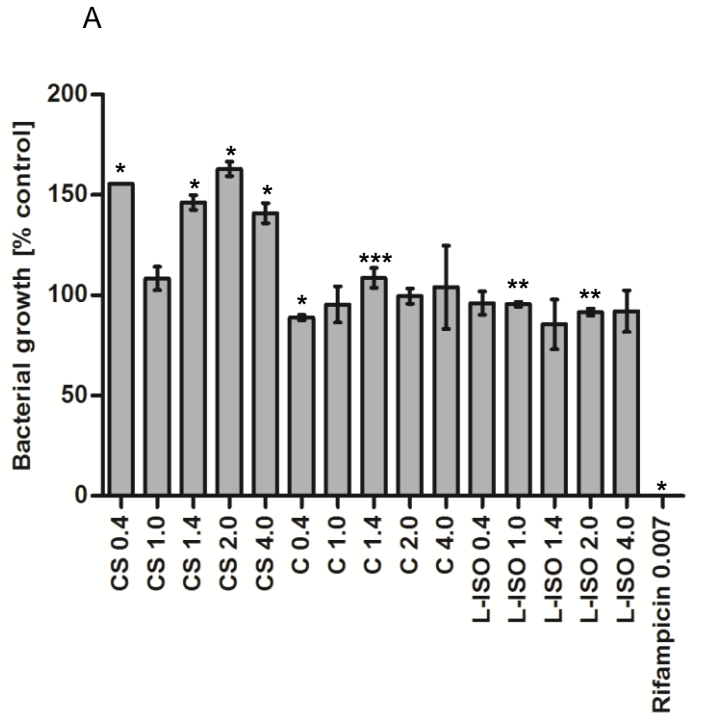


Table S1. Primers used in qRT-PCR assays.

Primer name	Sequence	Use
rhlR_up rhlR_low	CCACACGATTCCCTTCACC TCGCTCCAGACCACCATTT	qRT-PCR
lasR_up lasR_low	CGCGAAAGCAGCACGAGTT TTCCGCTTCCACGCTGAGG	qRT-PCR
mvfR_up mvfR_low	GCCATCCCGCCGTCGTTCT TCCGCGTTGTCCTGCTTGAT	qRT-PCR
pelA_up pelA_low	CACTTCTATTCGGGGACCAA TGTAGTCGCTCATCCACAGC	qRT-PCR
PA14_61200 up PA14_61200 low	ACAGCCAGTTCAACGACCTC TGAAATACTCGCTGCCATTG	qRT-PCR
fliC L fliC R	GCAACAGGCCGAAGTAC GGTCTCGTAGGCGTTGGA	qRT-PCR
rsmA up rsmA low	GGGTCGGAGAGACCCTGA GTGCACGGCGACTTCCTT	qRT-PCR
rsmZ up rsmZ low	ACACGCAACCCCGAAGGA GTATTACCCGCCCACTCT	qRT-PCR
pilA-LEFT pilA-RIGHT	TGCCGGCATATCAGGATT CGTTACCGGCTTGAGCAT	qRT-PCR
pslE up pslE down	GTCGACAGCCTGGAGAAATC AACAGCATCAGCAGGGTTTT	qRT-PCR
cupC L cupC R	ATGGCAAGCTGCTGAACC TAAGCAGCCCGCAGATTC	qRT-PCR
cupD1 L cupD1 R	ACTATCGCCGCATTTCTC ACGGTGTCGAGTATCACG	qRT-PCR
oprF L oprF R	ACAGCGTTCGCAACATGA TAGGTGCCACGAACGTCA	qRT-PCR
PA14_58690 up PA14_58690 down	TGACGTCATCAACCTGGTGT CGGCTGAAGAAGGTCTTGTC	qRT-PCR

Chemical description of N-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-L-isoleucine.

N-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-L-isoleucine: TLC (butanol/acetic acid/water, 75:25:7 v/v): RF=0.8; ¹H-NMR (500 MHz, methanol-d₄): δ 1.10 (m, 1H, 1 α -H), 1.88 (m, 1H, 1 β -H), 2.07 (m, 1H, 2 α -H), 1.63 (m, 1H, 2 β -H), 4.14 (ddt, 1H, 3 α -H, J=12, 10, 5), 2.52 (dd br, 1H, 4 α -H, J=14, 5), 2.34 (dd br, 1H, 4 β -H, J=14, 12) 5.38 (s, 1H, 6-H), 1.54 (m, 1H, 7 α -H), 1.99 (m, 1H, 7 β -H), 1.46 (m, 1H, 8 β -H), 0.94 (m, 9 α -H), 1.52 (m, 2H, 11-H), 1.17 (m, 1H, 12 α -H), 2.05 (m, 1H, 12 β -H), 1.11 (m, 1H, 14 α -H), 1.60 (m, 1H, 15 α -H), 1.10 (m, 1H, 15 β -H), 1.85 (m, 1H, 16 α -H), 1.29 (m, 1H, 16 β -H), 1.00 (m, 1H, 17 α -H), 0.70 (s, 3H, 18-H), 1.03 (s, 3H, 19-H), 1.38 (m, 1H, 20-H), 0.96 (s, 3H, 21-H), 1.25 (m, 1H, 22-H), 1.6 (m, 1H, 22'-H), 1.18 (m, 1H, 23-H), 1.38 (m, 1H, 23'-H), 1.05 (m, 1H, 24-H), 1.38 (m, 1H, 24'-H), 2.44 (m, 1H, 25-H), 0.96 (d, 3H, J=7, 26-H), 4.28 (m, 1H, AA- α -H), 2.12 (m, 2H, AA- γ -H), 0.96 (m, 3H, AA- δ -H), 0.9 (m, 3H, AA-Me- β -H), 0.75 (d, 3H, J=7, AA-Me- δ -H); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ 36.9 (C1), 29.0 (C-2), 75.2 (C-3), 38.5 (C-4), 140.7 (C-5), 121.0 (C-6), 31.4 (C-7 and C-8), 49.5 (C-9), 36.1 (C-10), 20.6 (C-11), 40.8 (C-12), 41.8 (C-13), 56.1 (C-14), 23.8 (C-15), 27.8 (C-16), 55.5 (C-17), 11.7 (C-18), 19.2 (C-19), 35.1 (C-20), 18.5 (C-21), 35.5 (C-22), 23.2 (C-23), 34.4 (C-24), 40 (C-25), 174.9 (C-26), 18.1 (C-27), 175.8 (AA-COOH), 57.0 (AA-C- α), 36.9 (AA-C- β), 24.7 (AA-C- γ), 15.6 (AA-C- δ), 11.2 (AA-C- β -Me); IR (KBr): 3463, 2938, 2868, 1719, 1654, 1534, 1459, 1361, 1199, 1061, 977 cm⁻¹; UV/vis: λ_{\max} 210 nm; HRMS (m/z): [M]⁻ calcd for C₃₃H₅₅NO₇S, 608.3621; found, (608.3618); analysis (% calcd, % found for C₃₃H₅₅NO₇S.5H₂O): C (57.5, 56.5), H (9.4, 8.7), N (2.0, 2.4), S (4.6, 4.3).

CAPÍTULO 3.3. Metabólitos de bactérias associadas ao carrapato bovino possuem notável atividade antibiofilme e anti-*Tritrichomonas foetus*

Artigo III - Cattle tick-associated bacteria possess remarkable antibiofilm and anti-*Tritrichomonas foetus* activity

Karine Rigon Zimmer, Adriana Seixas, Jordan Martins Conceição, Dejoara de Angelis Zvoboda, Muriel Primon de Barros, Tiana Tasca, Alexandre José Macedo, Carlos Termignoni

Journal of Applied Microbiology

Trabalho realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Metabolites from cattle tick-associated bacteria possess remarkable anti-biofilm and anti-*Tritrichomonas foetus* activity

K.R. Zimmer¹, A. Seixas¹, J.M. Conceição¹, D.A. Zvoboda², M.P. Barros², T. Tasca², A.J. Macedo^{1,2} and C. Termignoni^{1,3*}

¹Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Carlos Termignoni

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

Phone: +55 51 33086082, Fax: +55 51 33087309,

*E-mail: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br

Abbreviated running headline: Bioactivity of cattle tick-associated bacteria

Abstract

Aims: To investigate *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*-associated bacteria regarding their capacity to produce anti-biofilm and trichomonocidal compounds.

Methods and Results: Gut, ovary, salivary glands, and Gené organ were collected from engorged female *R. microplus*. Each tissue pool was inoculated onto 15 distinct culture media. Bacteria were submitted to a DNA extraction and analysis of 16S rDNA was performed using PCR. For metabolite production, each bacterium isolated was inoculated liquid culture medium and kept at 37°C for 96 h. The culture filtrates obtained were used in anti-biofilm, antibacterial, and antiprotozoal assays. Results showed that *R. microplus* cattle tick microflora differs among tissues (ovary, Gené organ, gut and salivary glands). Bacteria belonging to different genera (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Castelaniella*, *Comamonas*, *Kocuria*, and *Microbacterium*) were identified. The higher variety of cultivable bacteria was found in the salivary gland. Interestingly, all bacteria found were able to produce metabolites with pronounced activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, and also against the cattle pathogen *Trichostrongylus axei*.

Conclusions: Cattle-tick shows to be an important source of bacterial species able to produce metabolites against pathogens.

Significance and Impact of the Study: This is the first study showing bacteria isolated from a tick produce metabolites with anti-biofilm and trichomonocidal activities.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, microbiota, culture filtrates, anti-biofilm, trichomonocidal

Introduction

Ticks are well known as vectors of several pathogenic bacteria, including species of the genera *Borrelia*, *Rickettsia*, *Francisella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Coxiella* (Clay *et al.* 2008). Additionally, ticks harbour a variety of symbionts (Rymaszewska 2007). Several tick vital functions can be facilitated by these symbiotic microorganisms, such as feeding on host, defense, stress tolerance and function not yet established (Rymaszewska 2007). Host-microorganism symbioses could play a key role in the survival of both organisms that participate in this interaction (Scott *et al.* 2008).

Both in the environment and on its host, *R. microplus* is constantly in contact with microorganisms, including pathogens, being challenged by several of them. In addition to innate defense mechanism, ticks can benefit from metabolites produced by symbionts and/or associated-microorganisms, as a defense against predators (Gebhardt *et al.* 2002). Few studies have addressed efforts to identify bacteria living in tick tissues. They focused mostly on the determination of total tick microbiota, using a pool of entire ticks (Moreno *et al.* 2006; Sasser *et al.* 2006). Indeed, studies on tick-associated microbial communities can provide information about host tissue-bacterium interactions. In this context, some reports are focused on the microorganisms that live in symbiosis with arthropods, acting as bioactive metabolites producers (Fredenhagen *et al.* 1987; Kenny *et al.* 1989; Lee *et al.* 1996; Gebhardt *et al.* 2002). Diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, polymyxin E1, gramicidin S, tyrocidin, and bacitracin are some examples of defense metabolites produced by microorganisms living in symbiosis with arthropods (Gebhardt *et al.* 2002).

In the present study, the bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* and the protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* were used

as models to investigate the hypothesis that tick-associated bacteria produce metabolites with anti-biofilm and trichomonocidal activities.

Staphylococcus epidermidis and *P. aeruginosa* are associated to several human infections, being especially dangerous for immunocompromised patients (Schoenfelder *et al.* 2010; Tashiro *et al.* 2011).

In recent years, *S. epidermidis* has emerged as a human health problem. The bacterium is the causal agent of nosocomial infections, being also considered the main pathogen involved in bacteremia, endocarditis, osteomyelitis and skin infections. *S. epidermidis* is also associated to severe infections borne by medical devices (Schoenfelder *et al.* 2010). On the other hand, *P. aeruginosa* can colonize several environmental niches, such as soil and marine habitats, as well as animal and plant hosts. This bacterium is an opportunistic human pathogen, being responsible by nosocomial diseases and infections in cystic fibrosis and burn patient's (Tashiro *et al.* 2011).

Infections caused by *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* are extremely recalcitrant to therapy. This is due to the high antibacterial resistance rates presented by these bacteria and, most prominently, because of their ability to form biofilms (Schoenfelder *et al.* 2010; Breidenstein *et al.* 2011).

The protozoa *T. vaginalis* and *T. foetus* cause sexually transmitted infections in humans and cattle, respectively. *T. vaginalis*, the etiological agent of human trichomonosis, presents high prevalence and has a strong impact in global public health. *T. foetus* causes bovine trichomonosis and is cause of high economical loses in agriculture, since it is behind the high infertility and abortion rates among cows (WHO 2001; Duarte *et al.* 2009; Rae 1989). These pathogenic protozoa are usually treated by drugs belonging to the 5'-

nitroimidazole group, but concerning numbers of resistant isolates belonging to both trichomonads species are emerging (Upcroft *et al.* 2006; Kather *et al.* 2007).

Therefore, finding new drugs acting in these pathogens can be helpful in many application areas.

In this context, this study investigates *R. microplus* associated bacteria distributed in different tissues, namely gut, ovary, salivary glands, and Gené organ, regarding their capacity to produce anti-biofilm and trichomonocidal compounds.

Materials and methods

Tissues dissection

Gut, ovary, salivary glands, and Gené organ were collected from engorged adult female *R. microplus* which surface was previously sterilized by immersion in ethanol 70%. The tissues were rinsed in sterile saline 0.9%, and held on ice until 30 ticks were dissected. Each tissue pool was finally homogenized in sterile saline 0.9% and inoculated onto the following agar media: Luria Bertani (LB), Blood, Chromogenic, MacConkey, MRS (Man Rogosa Sharpe), EMB (Eosine Methylene Blue), Azide, SS (*Salmonella Shigella*), Mycosel, Chocolate, R2A, Mueller Hinton with 5% sheep blood, Anaerobe with 5% sheep blood, Baird-Parker (BP), and Enterococcosel.

DNA extraction

DNA extraction was done according to established methods. 16S rDNA PCR was performed using 0.2 μ M of each primer (27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 1492: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 1X PCR Buffer, 0.2 mM of each

deoxyribonucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 ng of template DNA and sterile Milli-Q water to a final volume of 25 µL. PCR was run for as follows: 94°C for 5 min.; 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 2 min.; and 72°C for 5 min. PCR products were purified using the UltraClean PCR Clean-Up kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) and submitted to sequencing. Sequencing with both forward and reverse primers (Abraham *et al.* 1999) was performed in an ABI Prism 3130xl System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The program SEQUENCHER™ Version 4.0.5 (Gene Codes Corporation, USA) was used to analyse sequences. The taxonomic identity of the 16S rRNA sequences was obtained using the BLAST tool from the NCBI's website.

Metabolite production

For metabolite production, each bacterium was grown on the same culture medium where it was previously isolated and kept at 37°C. The inoculum was made by resuspending colonies in sterile saline 0.9% and the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to 0.3. Ten millilitres of this suspension was added to 90 mL of fermentative medium (LB added of 0.1% of Tween 80) and maintained at 37°C with agitation (150 rpm) for 4 days. Once this period was over, each supernatant was obtained by centrifugation (10000 rpm/1 h) and filtered in a 0.22 µm pore membrane. These culture filtrates (at a concentration of 8 mg/mL) were used in the anti-biofilm, antibacterial, and antiprotozoal assay.

Anti-biofilm and antibacterial assays

Staphylococcus epidermidis ATCC 35984 and *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995) were used as model for the assessment of biofilm and bacterial growth

inhibition. For anti-biofilm assay, two surfaces (polystyrene and glass) were evaluated following protocol developed by Trentin *et al.* (2011) with minor modifications. The bacteria were cultured in LB broth at 37°C with agitation (Incubator Shaker Series Excella E25, New Brunswick Scientific) and a bacterial suspension adjusted to an OD₆₀₀ equivalent to 10⁸ CFU/mL was used in assays.

In anti-biofilm and antibacterial assays, 100 µL of bacterial suspension, 100 µL of culture filtrate (at a concentration of 8 mg/mL) and 50 µL of LB broth were added to each well of a standard sterile 96-well polystyrene microtiter plates (Corning, Inc. NY, USA) and incubated at 37°C for 24 h.

For anti-biofilm assay in glass tubes, 400 µL of bacterial suspension, 400 µL of culture filtrate (at a concentration of 8 mg/mL) and 200 µL of LB broth were used. Following the incubation period (24 h) the content of the wells and/or glass tubes was removed, and the wells and/or glass tubes were washed three times with sterile saline 0.9%. The adhered bacteria were heat-fixed at 60°C for 1 h. The biofilm layer attached was stained with 0.4% crystal violet for 15 min. The stain was solubilized with 99.5% DMSO (Sigma Aldrich) and absorbance was measured at 570 nm (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA). The fermentative medium (LB added of 0.1% of Tween 80) was used as biofilm formation control (untreated sample).

The bacterial growth was evaluated based on the difference between initial (t = 0) and final (t =24 h) absorbance values at 600 nm. Gentamicin sulphate 8 µg mL⁻¹ and rifampicin 8 µg mL⁻¹ (Sigma Aldrich) were utilized as growth control for *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively.

Anti-trichomonads assay

The isolates used in this study were *T. vaginalis* ATCC 30236 and *T. foetus* TFK, isolated by Dr. H. Guida (Embrapa, Rio de Janeiro, Brazil) from the urogenital tract of a bull; both kindly donated by Dr. Geraldo A. De Carli (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil). Parasites were cultured axenically in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (pH 6.0 and 7.2, respectively), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated serum, at 37°C (Diamond 1957). Organisms in the logarithmic growth phase and exhibiting more than 95% motility and normal morphology were used in the experiments. In 96-wells microtiter plates, 100 µL of TYM medium, 50 µL of parasites suspension containing 2.0×10^5 trophozoites mL⁻¹ and 50 µL of culture filtrates (at a concentration of 8 mg/mL) were added. A negative control with parasites suspension in 150 µL of TYM medium was prepared. After 24 h, the trophozoites were counted in a haemocytometer and the results were expressed as the percentage of living organisms compared with untreated parasites after 24 h of incubation, considering motility, normal morphology and trypan blue dye exclusion (Giordani *et al.* 2008). The fermentative medium (LB added of 0.1% of Tween 80) was used as trophozoites viability control (untreated sample).

Scanning electron microscopy (SEM)

The three most active culture filtrates displaying anti-biofilm activity in the two surfaces (polystyrene and glass) were selected and further evaluated by SEM. Biofilm was grown in sterile 96-well polystyrene flat bottom microtiter plates (Costar 3595 Corning, Inc. NY, USA), as described previously (100 µL of bacterial suspension + 100 µL of culture filtrate, and 50 µL of LB broth) holding a piece of Permanox slide (Nalge Nunc International,

USA) or glass coverslip for 24 h at 37°C. After this period, Permanox slide and glass coverslip were washed with sterile saline 0.9% to remove planktonic cells and prepared for microscopy analyze using a previously described protocol (Trentin *et al.* 2011). The fermentative medium (LB added of 0.1% of Tween 80) was used as biofilm formation control (untreated sample).

Statistical analyses

Three independent biological replicates were evaluated, and data are presented as mean±SD. Statistical significance was tested using Student's *t*-tests (GraphPad Prism[®] version 5.00). A *p*-value ≤0.05 was considered significant.

Results

Fourteen bacteria, belonging to the genera *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Castelaniella*, *Comamonas*, *Kocuria*, and *Microbacterium*, were isolated from *R. microplus* tissues. As in the case of other tick species, the majority of the bacteria isolated are Gram positive (78%) (Rudolf *et al.* 2009).

Indeed, all isolated bacteria from *R. microplus* tissues are able to produce metabolites with anti-biofilm activity. Also, the culture filtrates of almost (85%) all bacteria present in *R. microplus* tissues have a cytotoxic activity against *T. foetus*, but are ineffective against *T. vaginalis* (Table 1).

In both biofilm models tested, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, the levels of biofilm inhibition are higher when biofilm formation is evaluated on a glass surface. Almost all of the culture filtrates tested (92%) are able to inhibit more than 50% of *S. epidermidis* biofilm on a glass surface, while on polystyrene 71% of the filtrates inhibit more than 50%

of the biofilm (Table 1). Considering *P. aeruginosa*, most of the culture filtrates (85%) inhibit more than 50% biofilm on glass, while 71% of the filtrates show inhibitory effect when biofilm formation is evaluated on polystyrene surface (Table 1). It is important to note that only biofilm formation is affected, none of the culture filtrates has any antibiotic effect (data not shown), showing that this anti-biofilm activity does not depend on bacterial cell death.

In order to further evaluate the inhibition effect on *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* biofilms, scanning electronic microscopy (SEM) was performed with the three most active culture filtrates in two different surfaces: Permanox (mimicking the surface of the polystyrene), and glass coverslips. Images show a dense and compact biofilm with matrix covering bacterial cells in Permanox and glass surfaces in untreated biofilms (for *P. aeruginosa*: Fig. 1A and E; for *S. epidermidis*: Fig. 2I and M). Oppositely, biofilms treated with culture supernatants have a strong decrease in adherent cells. In many cases, the bacterial cells are found as single cells, with no indication of cell aggregates (Fig. 1B, C, D, F, G and H and Fig. 2J and L). In other cases, only small aggregates of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* are visualized in biofilm treated with culture filtrates of *Microbacterium oleivorans* GO22 (Fig. 1D), *Kocuria marina* SG25 (Fig. 1G), *Bacillus amyloliquefaciens* OV12 (Fig. 2L), *Aeromonas hydrophila* SG04 (Fig. 2N), and *Bacillus subtilis* SG05 (Fig. 2O). Biofilms treated with filtrates of *Brevibacillus borstelensis* SG08 and *Castelaniella denitrificans* SG06 were completely inhibited, since no cells of *S. epidermidis* could be seen attached to Permanox and glass surfaces (Fig. 2K and P).

Discussion

In ticks, studies addressing their microbial communities are still scarce. In our study, all bacterial culture filtrates evaluated were strongly active against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* biofilms. Given the current scenario, with the emergence of multi-resistant bacteria able to overcome available therapies, the search for compounds which inhibit one of the primordial bacterial virulence factors, the biofilm mode of life, can be helpful to find prototypes for new drugs.

Recently we found that an extract of egg wax of the tick *R. microplus* has activity against *P. aeruginosa* biofilm and it has also an antibiotic effect against *S. epidermidis*. Furthermore, we identified the molecule presenting both activities: *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucine (named boophiline) (K.R. Zimmer, unpublished, Potterat *et al.*, 1997).

Interestingly, in our study, the culture filtrates were effective against *T. foetus*, but they did not impair *T. vaginalis* viability (Table 1). This suggests that the metabolite produced is specific and brings up the high complexity of bacteria-tick-mammalian host interaction, since this parasite, unlike *T. vaginalis*, causes venereal disease in cattle (Duarte *et al.* 2009), but not in humans. Bovine trichomonosis is transmitted by coitus and artificial insemination. *T. foetus* is observed in cow urogenital tract and in bull preputial cavity (Honigberg 1978; López *et al.* 2000). This infection is related to a loss of up to 50% of all loss of cattle heads (Rae 1989). Taking into account the high prevalence of bovine trichomonosis, the economic importance of the disease in cattle and the growing resistance of the parasite to ronidazole (Kather *et al.* 2007), the drug used for trichomonosis treatment, our results are interesting, since anti-*T. foetus* activity by microorganisms metabolites has never been reported.

Our results demonstrated that each *R. microplus* tissue harbours a particular microbiota. Ovary and Gené organ have a lesser bacterial diversity than salivary gland (Table 1). However, as only cultivable bacteria were studied it is possible that the bacterial diversity is much higher in some or in all tissues evaluated. Recently, Andreotti and colleagues (2011) explored *R. microplus* microbiome. In that study, bacteria identified included *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Fingoldia magna*. However, the genera identified by Andreotti *et al.* (2011) differed from those found in our study even considering the same tissue evaluated, suggesting that geographical distribution could be an important issue in tick microbiota variability.

Other studies have evaluated the microbiota of a number of tick species (Moreno *et al.* 2006; Rudolf *et al.* 2009; Andreotti *et al.* 2011). Rudolf *et al.* (2009) showed that in *Ixodes ricinus* the most prevalent bacteria belongs to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*. Also *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Microbacterium* and *Rhodococcus* were present. Gram negative bacteria occurred less frequently, and included the genera *Advenella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Xanthomonas*. In the tick *Dermacentor reticulatus*, the most prevalent bacteria belonged to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*. Other Gram positive present in *D. reticulatus* belonged to genera *Kocuria*, *Rothia* and *Staphylococcus* (Rudolf *et al.* 2009). In the tick *Haemaphysalis concinna*, *Bacillus* and *Paenibacillus* were also the most prevalent genera. Other Gram positive strains inhabiting *H. concinna* belonged to the genera *Frigoribacterium*, *Microbacterium*, *Plantibacter*, *Rhodococcus* and *Staphylococcus* (Rudolf *et al.* 2009). Again, in *H. concinna* Gram negative bacteria occurred less frequently, belonging only the genera *Pseudomonas* and *Rahnella*. Similarly

to our results, the genera *Bacillus*, *Microbacterium* and *Kocuria* were detected in *I. ricinus*, *D. reticulatus* and *H. concinna*.

There are few studies showing microorganisms associated with arthropods as possible active metabolite producers (Fredenhagen *et al.* 1987; Kenny *et al.* 1989; Lee *et al.* 1996; Gebhardt *et al.* 2002). Diacetylphloroglucinol and pyoluteorin were found in a bacteria harbored by the white-backed planthopper *Wogatella furcifera*. The antibiotic polymyxin E1 was isolated of an intracellular symbiont of the oriental stinkbug *Plautia stali*, while cyclic peptides such as gramicidin S, tyrocidin and bacitracin, and lipopeptides such as iturines, bacillomycins and fengycins were identified in members of the genus *Bacillus* living in symbiosis with some arthropods (Gebhardt *et al.* 2002). Recently, Wang *et al.* (2010) showed that *Microbacterium testaceum*, has *N*-acylhomoserine lactones (AHLs)-degrading activity. Many Gram negative produce AHLs and regulate their virulence, including biofilm formation, by AHL-mediated quorum sensing. Many AHL-degrading genes have been cloned and characterized from various bacteria. Genes encoding AHL lactonase, which catalyzes AHL ring opening by hydrolyzing lactones, have been cloned from *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, and *Rhodococcus erythropolis* (Wang *et al.* 2010). It is possible that metabolites produced by bacteria isolated in the present study could prevent biofilm formation via inhibition of bacterial communication.

Studies on metabolites produced by ticks symbionts and/or associated microorganisms are quite scarce. Our study shed in light the importance to know and study bioactivity of arthropod associated microbiota. To the best of our knowledge, this is the first study concerning the production of anti-biofilm and anti-trichomonad activity by tick-associated bacteria.

Acknowledgments

This research was supported by grants from NANOBIOTEC-Brasil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES), Jovens Pesquisadores em Nanotecnologia and Edital Universal 2009 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. K.R.Z. was recipient of a CAPES PhD studentship. The authors acknowledge Regina Lúcia Baldini for the PA14 strain donation and Centro de Microscopia Eletrônica - UFRGS for technical support. The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Abraham, W.R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E.R., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B.J., Bennisar, A., Smit, J. and Tesar M. (1999) Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1053-1073.
- Anand, A.A., Vennison, S.J., Sankar, S.G., Prabhu, D.I., Vasani, P.T., Raghuraman, T., Geoffrey, C.J. and Vendan, S.E. (2010) Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci* **10**, 107.
- Andreotti, R., Pérez de León, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G. and Scoles, G.A. (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol* **11**, 1-11.

- Breidenstein, E.B.M., De la Fuente, C. and Hancock, R.E.W. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* **19**, 419-426.
- Clay, K., Klyachko, O., Grindle, N., Civitello, D., Oleske, D. and Fuqua, C. (2008) Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol Ecol* **17**, 4371-4381.
- Duarte, M., Giordani, R.B., Carli, G.A., Zuanazzi, J.A., Macedo, A.J. and Tasca, T. (2009) Cytotoxicity of solubilization vehicles for *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus* measured by the resazurin microtiter assay. *Vet Parasitol* **166**, 167-170.
- Fredenhagen, A., Tamura, S., Kenny, P.T.M., Komura, H., Naya, Y. and Nakanishi, K. (1987) Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper. *J Am Chem Soc* **109**, 4409-4411.
- Gebhardt, K., Schimana, J., Müller, J., Fiedler, H.-P., Kallenborn, H.G., Holzenkämpfer, M., , Krastel, P., Zeeck, A., Vater, J., Hölzel, A., Schmid, D.G., Rheinheimer, J. and Dettner K. (2002) Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 199-205.
- Giordani, R.B., De Almeida, M.V., Fernandes, E., da Costa, C.F., De Carli, G.A., Tasca, T. and Zuanazzi, J.A. (2008) Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. *Biomed Pharmacother* **63**, 613-617.
- Honigberg, B.M. (1978) Trichomonads of veterinary importance, In Parasitic Protozoa in Kreier J.P. ed., Academic Press, pp. 163–273, New York.
- Kather, E.J., Marks, S.L. and Kass, P.H. (2007) Determination of the in vitro susceptibility of feline *Tritrichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. *J Vet Intern Med* **21**, 966-970.

- Kenny, P.T.M., Tamura, S.Y., Fredenhagen, A., Naya, Y., Nakanishi, K., Nishiyama, K., Sugiura, M., Kita, H. and Komura, H. (1989) Symbiotic micro-organisms of insects: a potential new source for biologically active substances. *Pest Manag Sci* **27**, 117-131.
- Lee, J.C., Coval, S.J. and Clardy, J. (1996) A cholesteryl ester protein inhibitor from an insect-associated fungus. *J Antibiot* **49**, 693-696.
- López, L.B., Braga, M.B.M., López, J.O., Arroyo, R. and Silva Filho, F.C. (2000) Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *An Acad Bras Cienc* **72**, 173-186.
- Moreno, C.X., Moy, F., Daniels, T.J., Godfrey, H.P. and Cabello, F.C. (2006) Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environ Microbiol* **8**, 761-772.
- Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzel, A., Jung, G., Diehl, P.A., and Petrini, O. (1997) Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helv Chim Acta* **80**, 2066-2072.
- Rae, D.O. (1989) Impact of trichomonosis on the cow-calf producer's profitability. *J Am Vet Med Assoc* **194**, 771-775.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**, 1899-1902.
- Roy, N., Rana, M. and Uddin, S. (2003) Isolation and some properties of new xylanase from the intestine of a herbivorous insect (*Samia Cynthia Pryeri*). *J Biol Sciences* **4**, 27-33.
- Rudolf, I., Mendel, J., Sikutová, S., Svec, P., Masarikova, J., Novakova, D., Bunková, L., Sedláček, I. and Hubálek, Z. (2009) 16S rRNA gene-based identification of cultured

bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiol* **54**, 419-428.

Rymaszewska, A. (2007) Symbiotic bacteria in oocyte and ovarian cell mitochondria of the tick *Ixodes ricinus*: biology and phylogenetic position. *Parasitol Res* **5**, 917-920.

Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E.A., Sacchi, L., Fabbi, M. and Lo, N. (2006) 'Candidatus Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2535-2540.

Schoenfelder, S.M.K., Lange, C., Eckart, M., Henning, S., Kozytska, S. and Ziebuhr, W. (2010) Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* **300**, 380-386.

Scott, J.J., Oh, D.C., Yuceer, M.C., Klepzig, K.D., Clardy, J. and Currie, C.R. (2008) Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* **322**, 63.

Tashiro, Y., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2011) Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **14**, 1349-1362.

Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., da Silva, A.G., da Silva, M.V., Correia, M.T., Baumvol, I.J. and Macedo, A.J. (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* **137**, 327-335.

Upcroft, J.A., Dunn, L.A., Wright, J.M., Benakli, K., Upcroft, P. and Vanelle, P. (2006) 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 344-347.

Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N. and Ikeda, T. (2010) AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl and Env Microbiol* **76**, 2524-2530.

WHO. (2001) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. WHO, Geneva, p. 1-120.

Figure Legends

Table 1 Bacteria from *R. microplus* tissues and anti-biofilm and antitrichomonads activity of culture filtrates. The mean values of triplicate independent experiments and SDs are shown. *represents significant difference in relation to untreated samples (control for biofilm formation and viable trophozoite) (Student's t test, $p < 0.05$).

Figure 1 Scanning electronic microscopy (SEM) micrographs of *P. aeruginosa* PA14 untreated biofilm upon Permanox slide (A) and glass coverslips (E). In the Permanox surface: B (culture filtrate from *Kocuria marina* SG25-treated biofilm), C (culture filtrate from *Bacillus amyloliquefaciens* OV12-treated biofilm) and D (culture filtrate from *Microbacterium oleivorans* GO22-treated biofilm). In glass coverslips: F (culture filtrate from *Bacillus subtilis* SG05-treated biofilm), G (culture filtrate from *Kocuria marina* SG25-treated biofilm), and H (culture filtrate from *Bacillus amyloliquefaciens* OV12-treated biofilm). Scale bars: 15000x magnification (in the images: insert above 1000x magnification and insert below 5000x magnification). Dotted arrows: biofilm matrix.

Figure 2 Scanning electronic microscopy images of *S. epidermidis* ATCC 35984 untreated biofilm upon Permanox slide (I) and glass coverslips (M). In the Permanox surface: J (culture filtrate from *Microbacterium testaceum* GO18-treated biofilm), K (culture filtrate from *Brevibacillus borstelensis* SG08-treated biofilm) and L (culture filtrate from *Bacillus amyloliquefaciens* OV12-treated biofilm). In glass coverslips: N (culture filtrate from

Aeromonas hydrophila SG04-treated biofilm), O (culture filtrate from *Bacillus subtilis* SG05-treated biofilm), and P (culture filtrate from *Castelaniella denitrificans* SG06-treated biofilm). Scale bars: 15000x magnification (in the images: insert above 1000x magnification and insert below 5000x magnification). Dotted arrows: biofilm matrix.

1 **Table 1**

Bacteria Closest match	Tissue	Acc. number	Biofilm formation (% compared to untreated sample)				Trophozoites viability (% compared to untreated sample)	
			<i>S. epidermidis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>T. foetus</i>	<i>T. vaginalis</i>
			Polystyrene	Glass	Polystyrene	Glass		
<i>Aeromonas hydrophila</i> SG04	Salivary glands	HE681727	27.5 ± 3.3*	17.7 ± 1.1*	50.7 ± 7.4*	28.5 ± 7.8*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 9.2
<i>Bacillus subtilis</i> SG05	Salivary glands	HE681728	60.0 ± 6.3*	21.9 ± 1.5*	37.4 ± 4.4*	18.1 ± 5.3*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 18.2
<i>Castelaniella denitrificans</i> SG06	Salivary glands	HE681729	24.9 ± 4.8*	19.8 ± 5.1*	49.9 ± 7.3*	32.4 ± 8.3*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 4.0
<i>Brevibacillus borstelensis</i> SG08	Salivary glands	HE681730	18.6 ± 3.9*	31.6 ± 2.7*	44.2 ± 6.1*	39.0 ± 2.8*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 10.8
<i>Comamonas denitrificans</i> SG09	Salivary glands	HE681731	76.5 ± 5.0*	46.6 ± 7.3*	39.8 ± 11.3*	44.2 ± 5.1*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 14.6
<i>Aeromonas hydrophila</i> SG11	Salivary glands	HE681732	25.0 ± 3.4*	35.8 ± 7.0*	66.5 ± 7.2*	46.1 ± 9.3*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 25.4
<i>Kocuria marina</i> SG13	Salivary glands	HE681734	76.0 ± 3.5*	31.7 ± 5.8*	53.9 ± 6.5*	34.8 ± 6.1*	3.8 ± 1.8*	98.7 ± 13.4
<i>Comamonas denitrificans</i> SG14	Salivary glands	HE681735	83.9 ± 5.6*	32.0 ± 4.7*	41.3 ± 5.2*	27.1 ± 0.9*	3.1 ± 1.4*	100.0 ± 18.0
<i>Comamonas denitrificans</i> SG15	Salivary glands	HE681736	28.4 ± 0.5*	24.5 ± 5.5*	55.7 ± 2.4*	50.4 ± 4.4*	0.0 ± 0.0*	87.6 ± 7.2*
<i>Kocuria marina</i> SG25	Salivary glands	HE681740	20.3 ± 0.2*	32.2 ± 10.6*	34.9 ± 7.3*	31.4 ± 7.0*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 12.7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OV12	Ovary	HE681733	19.0 ± 2.7*	28.2 ± 8.4*	24.6 ± 3.4*	31.2 ± 4.1*	100.0 ± 3.5	100.0 ± 10.7
<i>Microbacterium testaceum</i> GO18	Gené organ	HE681737	12.5 ± 1.7*	26.1 ± 2.5*	46.5 ± 1.5*	33.2 ± 3.2*	0.0 ± 0.0*	83.3 ± 15.8
<i>Bacillus subtilis</i> GO19	Gené organ	HE681738	29.3 ± 2.1*	25.8 ± 15.8*	35.5 ± 13.7*	58.8 ± 6.1*	0.0 ± 0.0*	100.0 ± 10.2
<i>Microbacterium oleivorans</i> GO22	Gené organ	HE681739	39.7 ± 1.2*	69.3 ± 4.9*	27.8 ± 12.8*	45.4 ± 10.1*	100.0 ± 6.2	100.0 ± 14.5

Figure 1

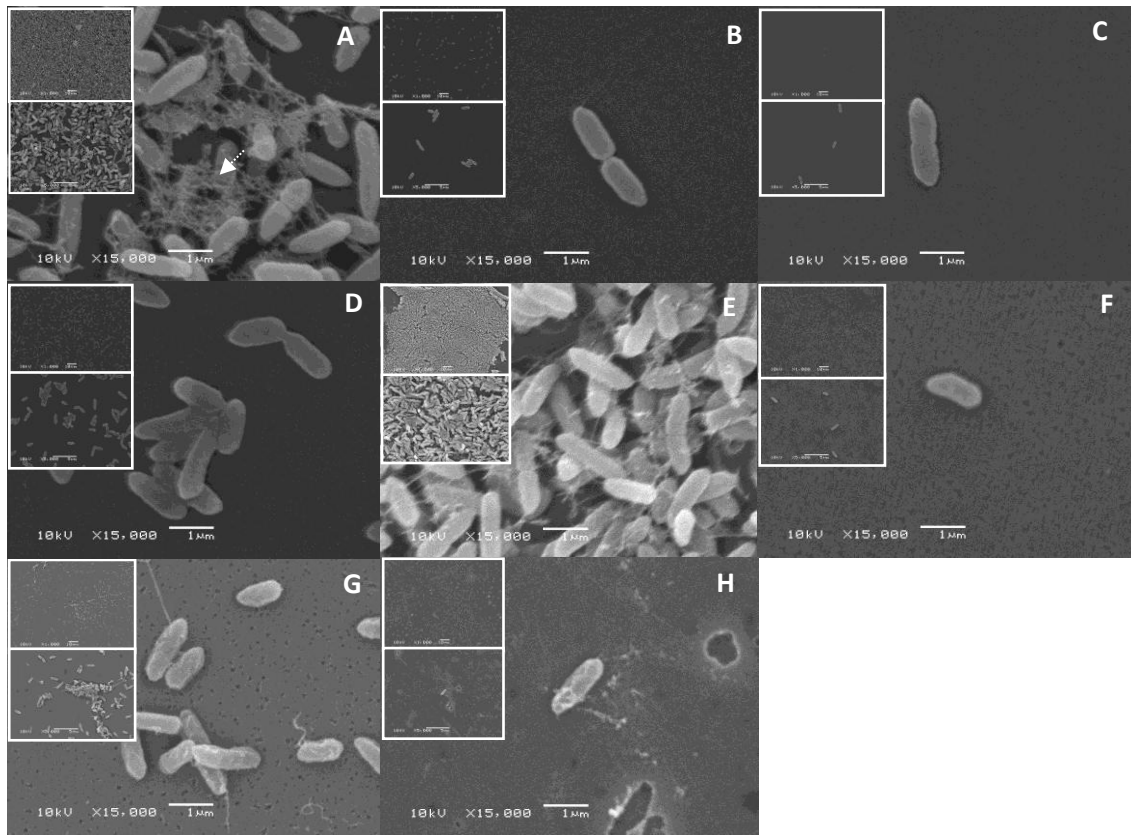
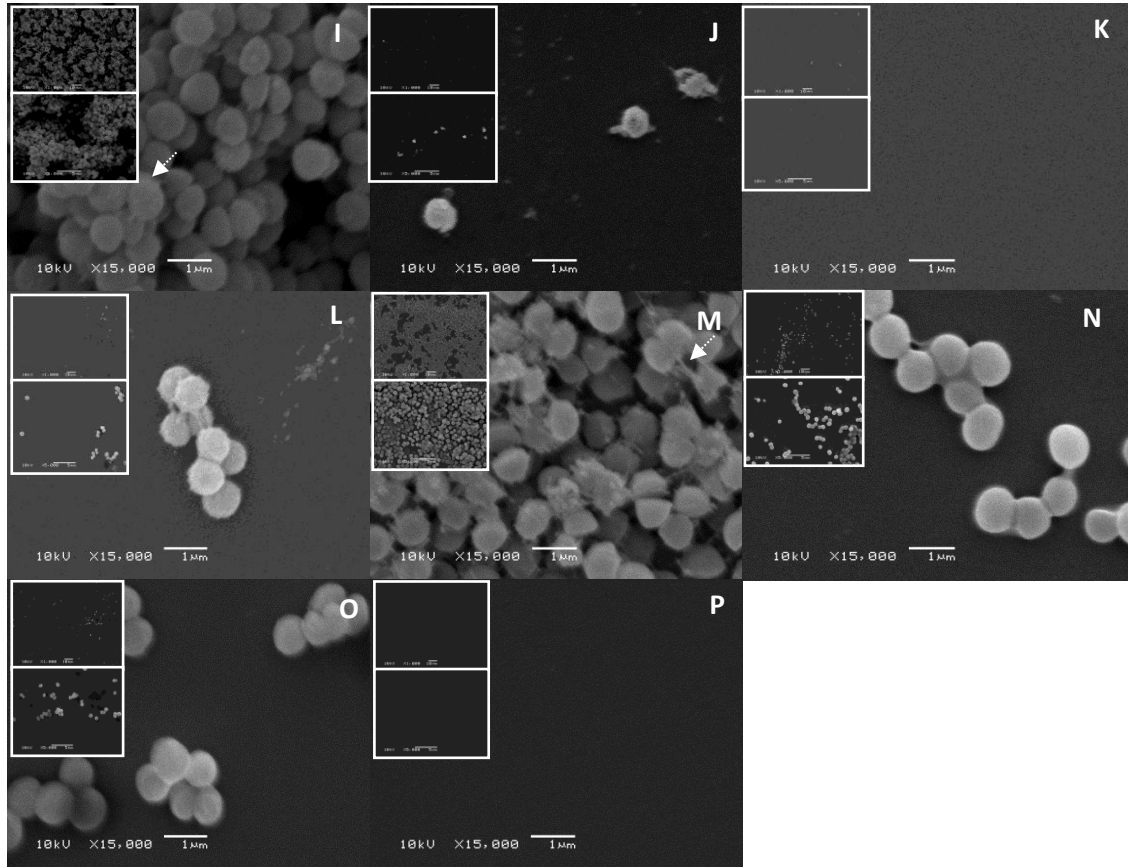


Figure 2



4. DISCUSSÃO

A presente tese teve como tema o estudo do mecanismo de proteção, mais precisamente a busca por compostos, nos ovos do carrapato bovino *R. microplus* com atividade contra biofilmes bacterianos.

Durante o ciclo biológico do carrapato, fêmeas copuladas e ingurgitadas tornam-se positivamente geotrópicas e negativamente fototáticas e, quase sempre, escondem-se em locais abrigados no solo para colocar os ovos. Estudos avaliando fatores interferentes no desenvolvimento dos ovos de Ixodidae verificaram que o ovo é um estágio extremamente susceptível a dessecação (LEES & BEATMENT, 1948; CHERY, 1976; YU *et al.*, 2012). Essa vulnerabilidade é ainda maior devido ao fato do ovo ser o único estágio imóvel no ciclo de vida do carrapato (ESTEVES, 2003). Segundo ESTEVES (2003), das etapas compreendidas no ciclo de vida do carrapato *R. microplus*, a fase de ovo é uma das mais importantes, cuja sobrevivência ocorre em um ambiente repleto de agentes infecciosos. Desta forma, mecanismos de defesa são fundamentais. Além da proteção interna, os ovos do carrapato podem apresentar uma proteção externa contra os microrganismos encontrados no solo (BOOTH, 1992; ESTEVES, 2003; ARRIETA *et al.*, 2006; OLDIGES *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012).

A importância da camada de cera depositada nos ovos do carrapato pelo órgão de Gené já é conhecida desde a época que Gené (1848) e posteriormente Bertkaut (1898) mostraram que perfurar ou impedir o contato dos ovos com o órgão comprometia severamente a viabilidade destes (LEES & BEATMENT, 1948). O papel fundamental atribuído à secreção do órgão de Gené na época se restringia em elaborar uma cera impermeabilizante de natureza lipídica, que impedia a dessecação dos ovos e mantinha o equilíbrio hidro-eletrolítico. Atualmente sabe-se que além dessa função, o órgão de Gené deposita sobre os ovos substâncias que possuem propriedades antibióticas (ARRIETA *et al.* 2006; ESTEVES *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2012) e antioxidantes (PEREIRA *et al.*, 2008).

Substâncias antimicrobianas foram identificadas em ovos de artrópodes, mas o número de estudos ainda é reduzido. Efetivamente, há somente quatro estudos relatando presença de atividade antimicrobiana em ovos de carrapatos (ARRIETA *et al.* 2006;

ESTEVEES *et al.*, 2009; OLDIGES *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). ARRIETA *et al.* (2006) avaliaram a atividade antibiótica de ovos intactos do carrapato *A. hebraeum* assim como dos extratos orgânico e aquoso da cera proveniente destes ovos. Ambos os extratos foram ativos contra bactérias Gram-positivas (*S. epidermidis*, *B. subtilis* e *M. luteus*), porém a identidade da(s) substância(s) com esta atividade não foi determinada (ARRIETA *et al.*, 2006). Em um estudo recente YU e colaboradores (2012) demonstraram que a cera de ovos de *A. hebraeum* é majoritariamente composta por ésteres de colesterol que não possuem atividade antibiótica (YU *et al.*, 2012). A atividade antibiótica da graxa de revestimento de ovos de *A. hebraeum* deve-se à presença dos ácidos graxos insaturados C16:1 e C18:2 (YU *et al.*, 2012). Por outro lado a atividade antibiótica presente no interior, mas não na superfície, de ovos de *R. microplus* advém da presença de microplusina (ESTEVEES *et al.*, 2009). Os autores concluíram que a atividade antibiótica da cera do ovo é uma adaptação para protegê-lo da microflora do solo.

Na primeira etapa do trabalho avaliou-se a atividade antibiofilme e antibiótica de diferentes extratos oriundos do carrapato *R. microplus*: (i) extratos da cera dos ovos; (ii) extratos do homogeneizado de ovos e, (iii) extratos de larvas. Dentre esses extratos, aquele que apresentou uma maior atividade contra os modelos bacterianos testados foi o extrato água/metanol da cera dos ovos. Entretanto, foi o extrato que apresentou um menor rendimento de extração variando de 0,5% a 0,9% (m/m). O extrato água/metanol apresentou atividades distintas dependendo do microrganismo avaliado: antibiofilme contra *P. aeruginosa* e antibiótica contra *S. epidermidis*. Essas duas espécies bacterianas são amplamente usadas como modelo de estudo na formação e desenvolvimento de biofilmes devido a sua ubiquidade e pela ampla gama de doenças que causam em diferentes hospedeiros (O'TOOLE & KOLTER, 1998; KLAUSEN *et al.*, 2003; BJARNSHOLT *et al.*, 2010; SCHOENFELDER *et al.*, 2010).

O extrato água/metanol inibiu o biofilme de *P. aeruginosa* em superfície de poliestireno e em superfície de vidro sem inibir o crescimento das células planctônicas. Na busca por explicações para a inibição do biofilme de *P. aeruginosa* por esse extrato a expressão de genes envolvidos com o processo de formação e desenvolvimento do biofilme foi avaliada. Três genes foram fortemente reprimidos pelo extrato (*pelA*, *cdrA* e *fliC*). Os testes fenotípicos realizados puderam corroborar com os resultados obtidos no

qRT-PCR. Constatou-se produção reduzida de matriz do biofilme, esta apresentando-se extremamente frágil ao manuseio e ligando-se fracamente ao corante *Congo Red*. A produção de carboidratos na matriz do biofilme pode ser avaliada pela coloração com *Congo red* em meio líquido, ou então, avaliando a morfologia da colônia. Em ambos os casos *Congo Red* funciona como um indicador de produção de matriz (SAKURAGI & KOLTER, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é capaz de formar biofilme não somente em superfícies sólidas e mucosas, mas também na interface ar líquido de culturas estáticas (RYDER *et al.*, 2007). Este tipo de biofilme na interface é conhecido como película e Pel parece estar envolvido fortemente na formação desse biofilme. Pel é o componente polissacarídico majoritário da matriz de *P. aeruginosa* PA14. O operon *pel* contém sete genes, *pelA-pelG*, que apresentam similaridade de sequência com genes que codificam enzimas processando açúcares. Deleções nestes genes resultam em defeitos severos na formação de biofilme. Os genes *pel* são necessários para manutenção e estrutura do biofilme em PA14 (FRIEDMAN & KOLTER, 2004a; FRIEDMAN & KOLTER, 2004b).

O outro gene reprimido pelo tratamento com o extrato foi *cdrA*. CdrA foi descrita recentemente em um estudo que avaliou fatores expressos em condições de altos níveis de c-di-GMP. PA4625 e PA4624 compreendem um sistema de secreção de dois componentes (TPS) que codificam uma proteína secretada e seu transportador. PA4625 e PA4624 foram designados como *cdrA* (componente A do TPS regulado por c-di-GMP) e *cdrB* (componente B do TPS regulado por c-di-GMP), respectivamente, baseado na sua regulação por c-di-GMP e sua similaridade com as proteínas do TPS (BORLEE *et al.*, 2010). Os autores demonstraram neste estudo que CdrA é expressa em resposta a altos níveis de c-di-GMP. Essa proteína é secretada e liga-se a Psl promovendo auto-agregação em cultura líquida e formação de biofilme em superfícies. CdrA fornece integridade estrutural ao biofilme mantendo a associação de Psl com a comunidade do biofilme (BORLEE *et al.*, 2010).

A expressão de *cdrA* é muito sensível a modificações nos níveis de c-di-GMP. Elevação artificial ou depleção nos níveis de c-di-GMP através de uma ciclase ou fosfodiesterase, aumenta e diminui a expressão de *cdrA*, respectivamente. Em um mutante caracterizado por altos níveis de c-di-GMP, *wspF*, a expressão de *cdrA* é elevada.

BORLEE e colaboradores (2010) demonstraram que a depleção de c-di-GMP, adquirida através da expressão de uma fosfodiesterase codificada pelo gene PA2133, leva a um redução de 7 vezes na expressão de *cdrA*. Em várias espécies Gram-negativas o sinal intracelular de c-di-GMP promove o estilo de vida biofilme pela supressão da motilidade e estímulo da produção de polissacarídeos (BORLEE *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* usa c-di-GMP para regular positivamente a produção de polissacarídeos chave do biofilme, Pel e Psl. Uma novidade do trabalho de BORLEE *et al.* (2010) reside no fato de c-di-GMP promover a formação de biofilme induzindo a expressão de componentes de matriz outros que exopolissacarídeos. Este trabalho foi o primeiro a relatar um componente estrutural proteico da matriz do biofilme de *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos com o extrato água/metanol forneceram evidências da existência de molécula(s) com atividade antibiofilme na cera dos ovos de *R. microplus*. Desta forma, a segunda etapa do trabalho consistiu em purificar, caracterizar estruturalmente a(s) molécula(s) com tal atividade e inferir o mecanismo responsável pela inibição do biofilme de *P. aeruginosa*.

Primeiramente nos preocupamos na avaliação do processo extrativo utilizado para a retirada da cera dos ovos e obtenção do extrato. Os três estudos utilizando extratos da cera de ovos (ARRIETA *et al.*, 2006; ESTEVES *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2012) não abordaram esse ponto. Desta forma, avaliamos os ovos *in natura* (não sujeitos a extração) bem como ovos submetidos ao processo de extração pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. O processo utilizado retira aparentemente apenas a camada superficial que recobre os ovos, sem afetar ou danificar a sua estrutura. Não há relato publicado descrevendo ou fornecendo dados sobre as características da cera quando revestindo ovos. Nós conseguimos observar que o aspecto dos ovos após a extração da cera é muito similar ao de ovos não extraídos (Fig. 21 e Fig. S1 do capítulo 3.2). Uma característica observada é que após o processo extrativo os ovos adquirem uma coloração avermelhada. Além disso, como já reportado por SAITO e colaboradores (2005), muitos ovos parecem entrar em processo de reabsorção após a extração (Fig. 21d, e).

Biofilme de *P. aeruginosa* foi formado somente na superfície dos ovos desprovidos da camada de cera. Um fenômeno físico poderia ser responsável por este fato. Este não é o caso, pois a cera de natureza lipídica espalhada sobre os ovos deixa a superfície

hidrofóbica, rugosa e irregular (Fig. S1 do capítulo 3.2) e a formação de biofilme é favorecida em superfícies hidrofóbicas e rugosas (SIMÕES *et al.*, 2010). Além disso, a hipótese de que o fenômeno seja puramente físico é definitivamente descartada devido à presença de atividade antibiofilme na cera extraída dos ovos.

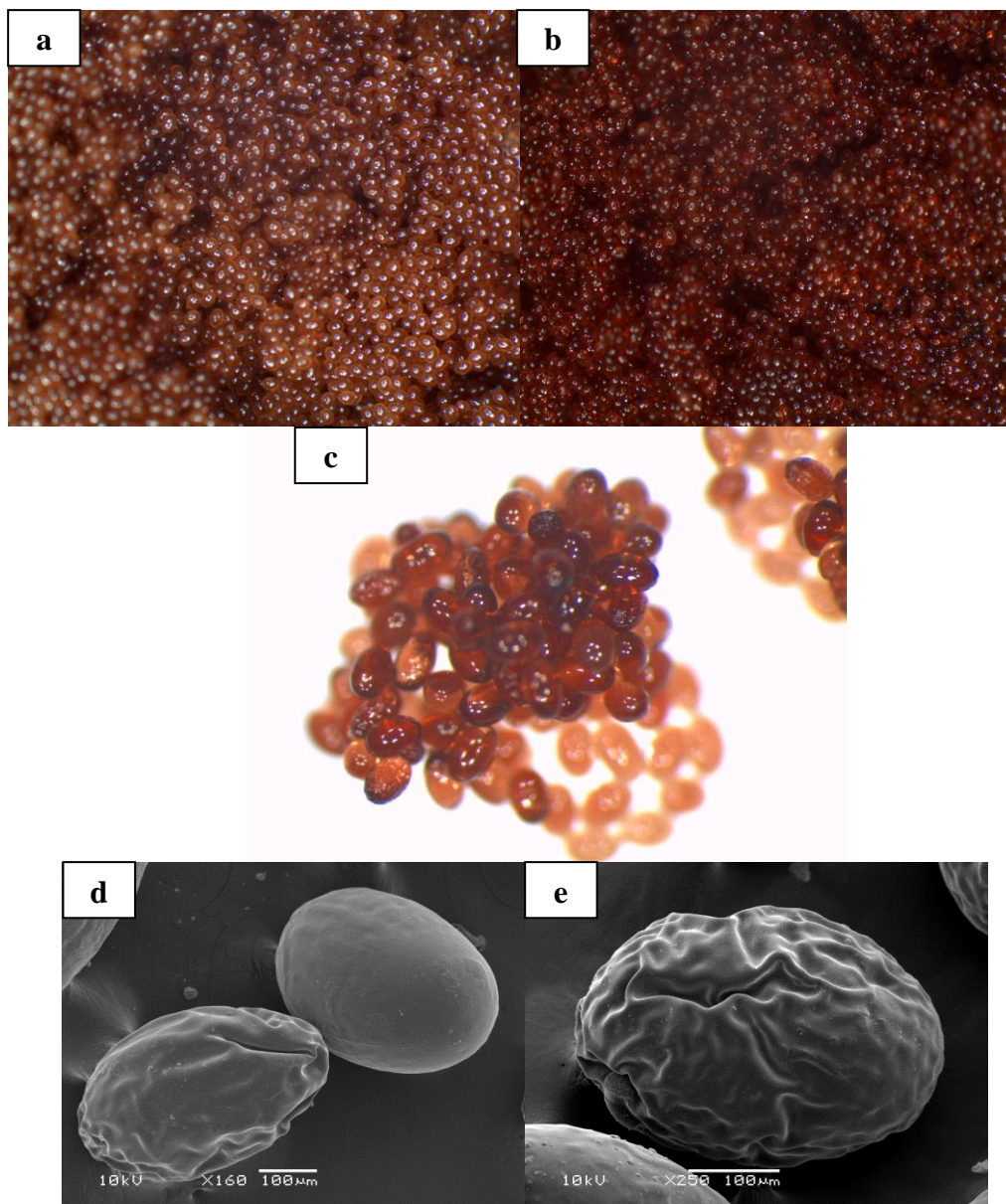


Figura 21. Ovos de *R. microplus* antes (a) e após a extração (b-e) da cera por solventes incluindo clorofórmio/metanol e água.

O rendimento da extração e a quantidade de amostra para os processos de purificação restringiram e tornaram lenta esta etapa do trabalho. Os métodos inicialmente usados para a purificação e isolamento dos compostos presentes no extrato da cera dos ovos não foram adequados, não rendendo bons resultados. As técnicas de cromatografia em camada delgada preparativa, separação por tamanho molecular (Sephadex LH-20) e também purificação por coluna de troca iônica foram utilizadas sem sucesso.

Desta forma, optamos por um método onde tivéssemos a alternativa de utilizar menores quantidades de amostra para o processo de purificação devido à dificuldade em obter a matéria-prima que origina o extrato. Assim, o processo de extração em fase sólida com coluna de fase reversa (C₁₈) foi escolhido usando um gradiente de solventes para a eluição dos compostos. Deste método obtivemos frações com bom grau de pureza e com as atividades desejadas (antibiofilme e antibiótica).

Outra dificuldade encontrada foi a baixa absorvidade da substância ativa no UV, o que dificultou em uma primeira etapa a avaliação da sua pureza em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjos de diodo. Além disso, apesar da metodologia de isolamento se mostrar adequada e simples com uma única etapa de purificação, o composto foi isolado com rendimento muito baixo e variável (0,0045 a 0,009%, m/m).

Devido à complexidade estrutural da molécula e da possível sobreposição de sinais importantes com aqueles do solvente nos espectros de RMN, a execução dessas análises foi realizada tanto em metanol como DMSO. A realização das análises de RMN em equipamentos com alta resolução nos permitiu chegar à determinação estrutural do composto. Os sinais mostraram-se característicos de compostos contendo um anel esteroide, compatível com o fato do composto ser revelado em cromatografia em camada delgada analítica por anisaldeído sulfúrico, reagente utilizado para detecção de terpenos e esteroides. O conjunto de dados obtidos por RMN de ¹H e ¹³C 1D e 2D (COSY, HETCOR e HMBC) nos levou à elucidação de *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina, composto descrito na literatura e conhecido como boophilina (POTERATT *et al.*, 1997). A boophilina consiste de uma unidade de colesterol com um grupo metil em C25 substituído por um grupo carbonil o qual mantém uma ligação amida com *L*-isoleucina.

O grupo sulfato em C3 (C₃-OSO₃) foi confirmado pela análise elementar e pelas diferenças nos deslocamentos químicos no espectro de ¹³C para C2, C3 e C4 quando comparado ao colesterol (C₃-OH) (REICH *et al.*, 1969; SADOWNIK *et al.*, 1995; SCHROEPFER, 1998; STARCHENKOV *et al.*, 2000).

POTERATT *et al.* (1997) relataram a dificuldade na elucidação desta molécula devido as sobreposições dos sinais no experimento bidimensional COSY. Essas sobreposições não permitiram aos autores naquele trabalho mensurar constantes de acoplamento essenciais para atribuir de forma indubitável todos os prótons metileno diastereotópicos do esqueleto esteroidal. Assim, foi necessária a utilização de algoritmos do programa INSIGHT II para auxiliar neste ponto. Nós nos deparamos com estas mesmas dificuldades, realizando assim análises espectrais de RMN em solventes distintos e usando a combinação desses dados para a elucidação e confirmação completa da estrutura do composto. Os sinais de ¹H foram atribuídos baseados nos dados obtidos a partir dos espectros em metanol enquanto os sinais de ¹³C foram atribuídos a partir dos espectros em DMSO. O conjunto de sinais foi muito similar aos sinais obtidos por POTERATT e colaboradores (1997) para boophilina.

Além disso, o espectro de massas ESI no modo negativo para o composto apresentou um pico de pseudo-íon molecular [M-H]⁻ *m/z* 608,3618 (massa calculada 608,3621) que em conjunto com os dados de RMN indicou uma fórmula molecular de C₃₃H₅₅NO₇S. A fragmentação desse composto, usando técnica de MS/MS produziu um pico de *m/z* 97 referente à perda de [H₂SO₄]⁻. Com o auxílio desta técnica, também observamos o aparecimento do pico referente à *L*-isoleucina com *m/z* 130 em modo negativo. Em concordância com a estrutura proposta, o espectro de absorção do composto no infravermelho apresentou bandas características da presença de carbonila de grupos de amida secundária (1654 cm⁻¹), de grupos de CH alifáticos (2938-2868 cm⁻¹) e hidroxila (3463). Desta forma, a completa elucidação estrutural do composto em questão, *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina, foi possível pela análise conjunta dos espectros obtidos a partir da realização de vários experimentos de RMN uni- e bidimensionais aliados a outras técnicas espectroscópicas desenvolvidas, incluindo espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar e espectrometria de massas.

Por fim, os dados já reportados na literatura desta molécula nos deram a base de apoio para a confirmação da estrutura química do composto.

O relato da presença de compostos esteroidais em carrapatos não é recente (CHERY, 1969; CHERY, 1976; BOOTH, 1992). CHERRY (1969) demonstrou a presença de colesterol livre e esterificado na cera que recobre o escudo de fêmeas adultas ingurgitadas de *R. microplus*. Neste estudo foram encontrados 0,8-0,9 µg e 3,2-3,8 µg de colesterol livre e esterificado, respectivamente, em cada carrapato. O autor demonstrou que o colesterol total correspondia a cerca de 17% do peso total da cera da cutícula de fêmeas ingurgitadas. A cera da cutícula parece fornecer a principal barreira para a passagem de água pela cutícula deste artrópode. Entretanto, se os esteróis são componentes necessários para manter a estrutura que impede a dessecação permanece a ser esclarecido. Além disso, tem sido proposto que a cera da cutícula pode funcionar como um veículo para a remoção de material lipídico derivado da alimentação (CHERY, 1969; CHERY, 1976).

Colesterol e seus ésteres parecem ser os únicos materiais esteroidais presentes em tecidos de fêmeas adultas de *R. microplus* e seus ovos. O conteúdo total de colesterol de fêmeas ingurgitadas que desprendem do hospedeiro (pesando entre 100 a 300 mg) é de cerca de 300 a 700 µg. Aproximadamente um terço do colesterol da fêmea ingurgitada é transferido para os ovos.

Em 1948 LEES & BEATMENT enfatizaram que material esteroidal é um componente necessário da cera dos ovos. Entretanto, deixaram a questão se esses esteroides afetam a eficiência da camada em proteger os ovos da dessecação e se há alguma outra função para a presença destes na cera dos ovos. Nossos achados mostram que a proteção contra a formação de biofilmes é uma função importante desempenhada por boophilina.

A síntese de esteróis por ácaros não foi relatada até o momento. Da mesma forma, insetos e crustáceos não são capazes de sintetizar esteróis (HOBSON, 1935). Em 1935, HOBSON demonstrou a necessidade da suplementação de esterol na dieta de *Lucilia sericata* para o sucesso no seu crescimento, sugerindo que esteróis podem possuir um papel vital no metabolismo de invertebrados.

Devido à alimentação com sangue, o suprimento de colesterol está garantido para os carrapatos. Embora existam pouquíssimas informações sobre a habilidade de carrapatos em transformar a molécula de colesterol (CHERY, 1976), é plausível de que a boophilina seja sintetizada a partir do colesterol da ingesta. A descrição desta via merece ser estudada não só pelo melhor conhecimento destes animais como também devido ao potencial de ser alvo para estratégias de controle do parasito.

A habilidade de carrapatos utilizarem componentes de seus hospedeiros para diferentes funções é conhecida. Por exemplo, tanto Argasidae e Ixodidae utilizam peptídeos derivados da clivagem da hemoglobina bovina como moléculas antimicrobianas (FOGAÇA *et al.*, 1999; TAYLOR, 2006).

A boophilina também é uma molécula obtida a partir do colesterol (ou de seus derivados) proveniente da dieta sanguínea (POTERATT *et al.*, 1997). Foi demonstrado que boophilina está presente na cutícula de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e apresenta atividade contra bactérias e fungos (POTERATT *et al.*, 1997). Agora, nós demonstramos que boophilina está também presente nos ovos e possui uma função que era desconhecida. Ela é capaz de inibir o biofilme de *P. aeruginosa* sem afetar a viabilidade da bactéria, portanto uma ação antibiofilme e não antibiótica. Preocupamos-nos em desvendar os mecanismos utilizados por esta molécula e que confere tal atividade. Para isto foi avaliado o efeito da boophilina sobre a expressão de 14 genes relacionados com formação e desenvolvimento de biofilme em *P. aeruginosa*. Dentre eles, dois foram fortemente reprimidos por boophilina: *fliC* e *cdrA*. O gene *fliC* codifica o componente flagelar majoritário. Esse apêndice extracelular é muito importante para a motilidade da célula bacteriana e ajuda a superar as forças repulsivas das superfícies de adesão (O'TOOLE & KOLTER, 1998). O evento inicial de desenvolvimento de biofilme ocorre quando é feito contato entre a superfície da célula e uma superfície biótica ou abiótica (SIMÕES *et al.*, 2010).

Um estudo recente avaliando o efeito de protoantocianidinas do *cranberry* sobre *E. coli* uropatogênica (UPEC) mostrou que há repressão de *fliC* por estes compostos, impedindo assim, a motilidade de UPEC (HIDALGO *et al.*, 2011). Os autores sugeriram que a inibição da motilidade poderia ser o mecanismo chave utilizado por protoantocianidinas para prevenir a colonização do trato urinário por esta bactéria.

Foi demonstrado que flagelo e pili IV têm participação nos estágios iniciais de formação de biofilme em *P. aeruginosa* PA14 (O'TOOLE & KOLTER, 1998). A adesão de *P. aeruginosa* em superfícies depende do flagelo e de pili IV quando em condições estáticas enquanto que não depende deles quando cultivada em câmaras sob condições nas quais há fluxo do meio de cultivo (DE KIEVIT *et al.*, 2001). Efetivamente, estudo com *P. aeruginosa* e os mutantes $\Delta fliM$, $\Delta pilA$ e $\Delta pilA fliM$ sugere que flagelo e pili IV não são necessários para o processo de adesão quando as condições experimentais envolvem cultivo em câmaras com fluxo de meio citrato. Entretanto, quando cultivados em microplacas estaticamente os mutantes $\Delta fliM$ e $\Delta pilA$ são deficientes na formação de biofilme (KLAUSEN *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que diferentes resultados e opiniões contraditórias são encontrados na literatura no que diz respeito ao papel do flagelo na formação de biofilme, principalmente porque biofilmes dependem da cepa e das condições experimentais utilizadas.

Nossos dados mostram que o gene *cdrA* é reprimido pelo tratamento com boophilina. Como já relatado anteriormente, CdrA é uma proteína constituinte da matriz de *P. aeruginosa* e possui papel na manutenção da integridade do biofilme desta bactéria (BORLEE *et al.*, 2010). Entretanto, observamos que o mutante $\Delta cdrA$ não é deficiente na formação de biofilme. Este mesmo dado foi previamente relatado no estudo de BORLEE e colaboradores (2010). Esses dados sugerem que a inibição de *cdrA* por boophilina não é suficiente para prevenir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, outros mecanismos devendo estar envolvidos. Boophilina agiu inibindo o biofilme deste mutante, o que corrobora a idéia de que CdrA parece estar envolvida em estágios tardios do desenvolvimento do biofilme (BORLEE *et al.*, 2010), enquanto o flagelo está intimamente ligado aos passos iniciais de formação de biofilme (O'TOOLE & KOLTER, 1998). A análise de proteínas por eletroforese bidimensional após o tratamento com boophilina confirmou a inibição da síntese da proteína FliC, mas não detectou inibição da produção de CdrA. A análise das proteínas afetadas pelo tratamento revelou que a maioria delas relaciona-se com o metabolismo de aminoácidos. Nós não encontramos na literatura dados que auxiliem na explicação desses resultados. AMADOR e colaboradores (2010) demonstraram que em *Pseudomonas putida* a alteração de um componente do sistema

CbrAB pode afetar funções não relatadas com as exercidas por este sistema, como desenvolvimento do biofilme, quimiotaxia e respostas ao estresse. O sistema de dois componentes CbrAB descrito em espécies de *Pseudomonas* é um regulador global necessário para a assimilação de vários aminoácidos, mas não tem relação direta com formação de biofilme.

Da mesma forma que CAIAZZA *et al.* (2007) e YEUNG *et al.* (2009), nós encontramos uma relação inversa entre motilidade *swarming* e formação de biofilme. *P. aeruginosa* é capaz de *swarm* em ágar semissólido em condições limitadas de nitrogênio (TREMBLAY & DÉZIEL, 2008). Este complexo tipo de motilidade é usualmente definido como uma translocação rápida e coordenada de uma população bacteriana em uma superfície semissólida. Além do flagelo, *swarming* de *P. aeruginosa* necessita da produção de dois biosurfactantes, ramnolipídeos e ácidos hidroxialcanoicos (TREMBLAY & DÉZIEL, 2008). Apesar de redução nos níveis de *fliC*, o tratamento com boophilina estimulou o *swarming* de *P. aeruginosa*. Recentemente foi descrito que esta bactéria possui um tipo de motilidade chamada de *sliding* (MURRAY & KAZMIERCZAK, 2008). Esta motilidade é vista nas mesmas condições que permitem o *swarming*, mas na ausência de pili IV e flagelos. Motilidade *sliding* é uma forma passiva de espalhamento na superfície e não requer um motor ativo, ao invés disso, baseia-se em surfactantes que reduzem a tensão superficial permitindo a colônia espalhar-se sobre uma superfície. Em nosso trabalho observamos uma expressão reduzida de *fliC*, mas não observamos repressão de *pilA*, o que poderia descartar a hipótese de termos motilidade *sliding* ao invés de *swarming*. Quando avaliamos o mutante $\Delta fliC$, observamos uma completa inibição da motilidade *swarming*. Em nosso trabalho a motilidade *swarming* não foi dependente da presença de flagelo, podendo outros fatores estar envolvidos neste tipo de motilidade nas amostras tratadas com boophilina. Como já demonstrado para o composto palmitoil-DL-carnitina, o aumento na motilidade pode ser devido à natureza anfifílica tipo detergente da boophilina. Além disso, boophilina pode levar a um estímulo na produção de ramnolipídeos, compensando assim a redução de flagelo e permitindo o *swarming*. Palmitoil-DL-carnitina inibe o biofilme de *P. aeruginosa*, mas estimula as motilidades *swimming* e *twitching* desta bactéria (WENDERSKA *et al.*, 2011).

Recentemente, OVERHAGE *et al.* (2007) demonstraram que uma ampla gama de genes incluindo aqueles que codificam para proteínas com função regulatória, metabólica, quimiosensorial e de secreção podem ter papel na motilidade *swarming* de *P. aeruginosa*. Assim, este comportamento bacteriano (*swarming*) pode envolver muito mais do que o simples fato da existência de flagelos. Por exemplo, para uma célula flagelada responder quimiotaticamente ao estímulo ambiental, a correta transmissão da mensagem ao flagelo é necessária para determinar sua direção rotacional (OVERHAGE *et al.*, 2007).

Em alguns casos, como no mutante $\Delta fleN$ de *P. aeruginosa* há presença de multiflagelos, e mesmo assim estes mutantes carecem de motilidade em meio semissólido (DASGUPTA *et al.*, 2000). Os autores propõem que este fato é explicado pela falta de sinal quimiotático para desencadear o *swarming*, mesmo flagelos estando presentes.

Levando-se em conta o que a literatura apresenta sobre regulação de biofilme nós avaliamos dois sistemas: QS e c-di-GMP. Boophilina não inibiu a expressão dos três reguladores de QS em *P. aeruginosa*: LasR, RhIR e MvfR. Os resultados fenotípicos obtidos com o extrato na primeira parte do trabalho de tese bem como os obtidos com o tratamento com boophilina, mostraram que boophilina não modifica a quantidade de piocianina secretada, um dos fatores de virulência controlado por QS. Assim, nós nos questionamos se boophilina agiria inibindo o biofilme desta bactéria via o segundo mensageiro c-di-GMP. Algumas evidências serviram de apoio a essa hipótese: (i) boophilina inibe *cdrA*, e este parece ser regulado por c-di-GMP, (ii) c-di-GMP regula inversamente a motilidade *swarming* e biofilme, fenômeno observado no tratamento com boophilina.

Quando os níveis totais de c-di-GMP foram avaliados não encontramos diferença entre amostras controle e tratadas. A hipótese de uma possível ação de boophilina sobre essa via de sinalização não pode ser completamente excluída. Boophilina poderia agir em vias específicas de regulação de c-di-GMP, sem refletir em redução nos níveis totais deste segundo mensageiro. Além disso, boophilina poderia agir em processos outros que a síntese ou degradação de c-di-GMP, como por exemplo, impedindo a sua ligação com efetores. Estas hipóteses são ainda suportadas pelo fato da boophilina não atuar efetivamente na inibição do biofilme de uma cepa de *P. aeruginosa* PA14 superexpressando uma guanilato ciclase e apresentando níveis elevados de c-di-GMP.

Neste caso, as bactérias já engajadas no processo de formação de biofilme devido a altos níveis de c-di-GMP, não foram afetadas por boophilina. Na cepa superexpressando a guanilato ciclase observamos maior formação de biofilme, se comparada ao tipo selvagem, enquanto a cepa superexpressando uma fosfodiesterase (com níveis reduzidos de c-di-GMP) forma uma quantidade mínima de biofilme. Essas duas cepas foram avaliadas quanto à expressão dos genes inibidos pela boophilina: *fliC* e *cdrA*. O gene *cdrA* está inibido na cepa com baixos níveis de c-di-GMP e estimulado na cepa com altos níveis de c-di-GMP. Entretanto, nós observamos apenas uma leve inibição de *fliC* na cepa superexpressando a fosfodiesterase.

Diferente da boophilina, palmitoil-DL-carnitina inibe a formação de biofilme em uma cepa de *P. aeruginosa* superexpressando RoeA, uma diguanilato ciclase. Os autores mostraram que mesmo em condições que promovem o modo de vida sésil palmitoil-DL-carnitina é capaz de atuar como inibidor de biofilme (WENDERSKA *et al.*, 2011).

A Fig. 22 compila de maneira esquemática os possíveis alvos de boophilina e do extrato da cera dos ovos que conferem a atividade antibiofilme em *P. aeruginosa*.

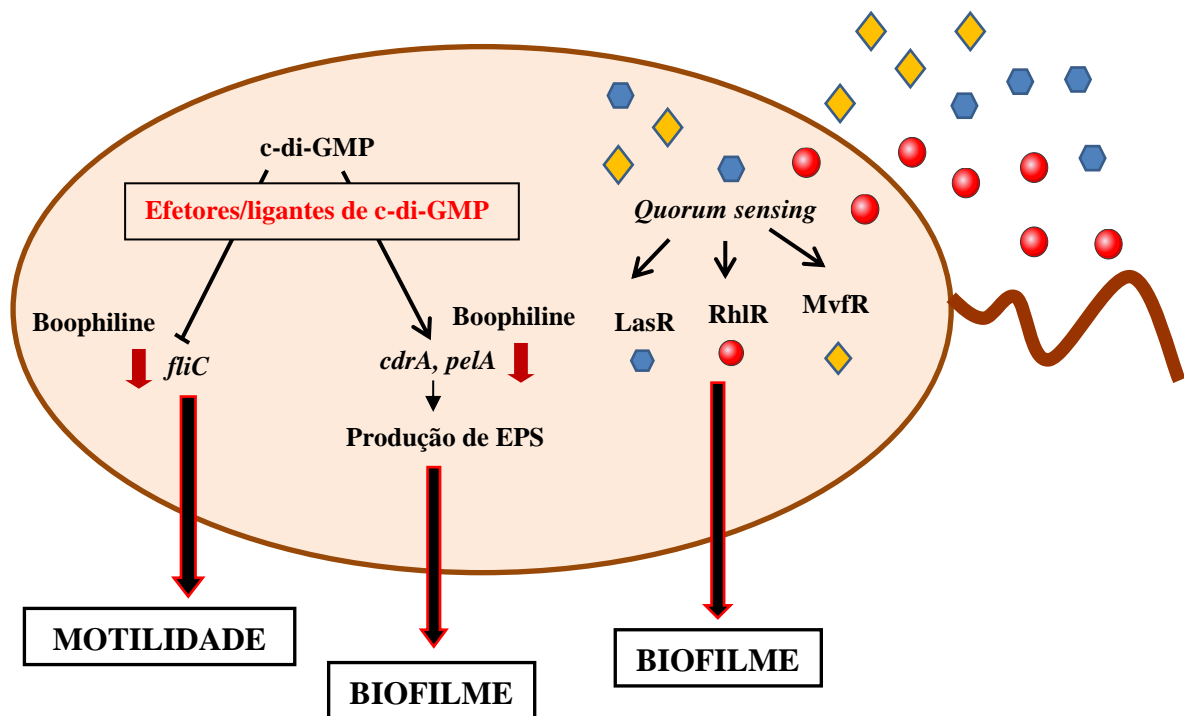


Figura 22. Representação esquemática dos alvos de boophiline (*fliC* e *cdrA*) e do extrato da cera dos ovos (*pelA*, *cdrA* e *fliC*) contra o biofilme de *P. aeruginosa*. Seta preta: estímulo; seta vermelha: inibição; hexágono azul: auto-indutor sintetizado por LasI; círculo vermelho: auto-indutor sintetizado por RhII e losango amarelo: auto-indutor do sistema QS MvfR. Esses dois sistemas (*quorum sensing* e sinalização via c-di-GMP) são bem conhecidos por regular a formação de biofilme em *P. aeruginosa*.

Diferentemente de sua ação sobre *P. aeruginosa*, boophiline atua como bactericida no modelo Gram-positivo (*S. epidermidis*), sendo a inibição do biofilme neste caso decorrente da morte celular bacteriana. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão nos permitiu visualizar os danos causados pela boophiline nesta espécie bacteriana. Efeito semelhante foi mostrado por ARRIETA *et al.* (2006) que avaliaram o efeito de um extrato da cera de ovos do carrapato *A. hebraeum* contra *S. epidermidis*, mas não identificaram a molécula responsável por este efeito.

Na natureza, esteroides ligados a aminoácidos são principalmente encontrados como constituintes da bile, nos quais ácidos derivados do colesterol são conjugados com glicina ou taurina (HOSHITA, 1989). Em espécies de sapos há a presença de bufotoxinas, geninas esteroidais esterificadas em C3 com suberoilaminoácidos (PETTIT *et al.*, 1987). Esteroides sulfatados têm sido encontrados em organismos marinhos. Squalamina, um antibiótico aminoesterol isolado do tubarão *Squalus acanthias*, exibe potente atividade contra fungos, bactérias e protozoários (MOORE *et al.*, 1993). Além disso, esteroides sulfatados com propriedades antibacterianas e antifúngicas têm sido encontrados em esponjas marinhas (FUSETANI *et al.* 1994) e equinodermas (BRUNO *et al.*, 1993).

Há diferentes trabalhos relatando esteroides sulfatados com atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, os quais foram isolados a partir de organismos marinhos (MOORE *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 2003; CHLUDIL & MAIER, 2005).

Na literatura científica existem até o momento apenas dois relatos de esteroides que inibem o biofilme de *P. aeruginosa*, mas por morte celular bacteriana (BUCKI *et al.*, 2010; NAGANT *et al.*, 2011). A molécula CSA-13 (ceragenina 13) descrita por SAVAGE (2002) possui modo de ação distinto de boophilina, pois atua como biocida (NAGANT *et al.*, 2011). Da mesma forma, D2S, um derivado de corticosteroide catiônico, apresenta um amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando no biofilme de *P. aeruginosa* por meio de inibição do crescimento bacteriano (BUCKI *et al.*, 2010). A ausência de inibição da viabilidade celular bacteriana é, na maioria das vezes, vantajosa já que há uma menor pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência bacteriana (SPERANDIO *et al.*, 2009).

Squalamina já mencionada anteriormente nesta tese é um antibiótico com potente atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O estudo do mecanismo de ação da squalamina foi realizado demonstrando que esse composto atua diferentemente em Gram-negativas e Gram-positivas, mas leva em ambos os casos a ruptura da membrana citoplásmica bacteriana. Nas espécies Gram-negativas ela causa desintegração da membrana externa em um mecanismo de ação tipo-detergente, enquanto nas espécies Gram-positivas causa despolarização e rompimento da membrana (ALHANOUT *et al.*, 2010). Além disso, squalamina é fungicida e induz lise osmótica de protozoários (MOORE *et al.*, 1993).

Outro exemplo é uma classe de antibióticos denominada cerageninas. Cerageninas baseiam-se em um núcleo esteroide com vários substituintes dispostos de tal maneira que uma face da molécula é hidrofílica, enquanto a outra face é hidrofóbica. Cerageninas são moléculas produzidas sinteticamente. Estas moléculas exibem um amplo espectro de atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias resistentes a múltiplas drogas. Elas têm sido incorporadas em dispositivos médicos para evitar a aderência de organismos (LAI *et al.*, 2008).

Moléculas com atividade antimicrobiana têm sido descritas em diferentes espécies de carrapatos. Fragmento de hemoglobina bovina (FOGAÇA *et al.*, 1999), microplusina (FOGAÇA *et al.*, 2004), ixodidina (FOGAÇA *et al.*, 2006), longicina (TSUJI *et al.*, 2007) e ixosinas (YU *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008) são alguns exemplos deste tipo de composto encontrado em diferentes tecidos de carrapatos duros e moles.

A terceira etapa do nosso trabalho foi motivada pela ampla gama de trabalhos disponíveis na literatura mostrando que artrópodes, especialmente insetos, são beneficiados por metabólitos produzidos por seus simbiossitos (JIGAMI *et al.*, 1986; FREDENHAGEN *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1996; GEBHARDT *et al.*, 2002; KALTENPOTH *et al.*, 2005; DETTNER, 2011). Sabendo-se da diversidade microbiana que carrapatos podem abrigar (NODA *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2000; BENSON *et al.*, 2004; RYMASZEWSKA, 2007; SATTA *et al.*, 2010; ANDREOTTI *et al.*, 2011), buscamos isolar a partir de técnicas de cultivo, bactérias de diferentes tecidos de *R. microplus*, com o objetivo de avaliá-las como possíveis produtoras de moléculas com propriedades contra bactérias e protozoários. Avaliamos esses dois tipos de microrganismos já que durante seu ciclo de vida o carrapato pode confrontar-se com bactérias, protozoários, fungos, entre outros predadores. Os filtrados de cultura das 14 bactérias isoladas de *R. microplus* apresentaram notável atividade antibiofilme contra ambos os modelos usados. Além disso, um ponto bastante interessante é que a maioria desses filtrados foi ativo somente contra *T. foetus*, não sendo citotóxico para *T. vaginalis*.

Tricomonose é uma doença venérea bovina, sendo que *T. foetus*, um protozoário flagelado, é o agente da doença (KUCKNOOR *et al.*, 2005). Ela causa perdas econômicas significativas em rebanhos de bovinos da América. Atualmente não há um tratamento aprovado efetivo para tricomonose (DALY, 2005). Assim, as bactérias que isolamos,

simbiontes ou patógenos de *R. microplus*, podem ser fonte de moléculas para o desenvolvimento de drogas efetivas no tratamento da tricomonose bovina.

A identificação de moléculas utilizadas por carrapatos na sua defesa pode fornecer oportunidades para o desenvolvimento de vacinas. Esta abordagem é de extrema relevância já que carrapatos representam um importante problema, pois além de atuarem como vetores de doenças infecciosas, causam significativa injúria a seus hospedeiros durante o período de hematofagia levando a grandes perdas econômicas na pecuária. No Brasil estas perdas podem ultrapassar dois bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2008).

O achado de uma molécula (boophilina) e de uma fonte de possíveis novas moléculas com atividade notável contra duas espécies bacterianas de relevância clínica não deve ser menosprezado. A resistência aos antibióticos é um dos grandes desafios do século XXI. As doenças infecciosas são a principal causa de morte no mundo, com infecções bacterianas contribuindo substancialmente para esta elevada taxa de mortalidade (RASKO & SPERANDIO, 2010).

Estudos como os realizados nesta tese contribuem para elucidar o papel de substâncias presentes nestes ectoparasitas, e muitas vezes pouco investigadas, visando o alargamento dos conhecimentos nesta área, de modo a possibilitar sua utilização no desenvolvimento de novas estratégias de controle de carrapatos como também em métodos de controle de biofilmes bacterianos, duas áreas de relevância científica e com potencial de uso tecnológico.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a ação inibitória de boophilina contra o biofilme de *P. aeruginosa* e sugerem o mecanismo de ação envolvido neste efeito. Ainda, a notável atividade bactericida contra *S. epidermidis* aponta para as diferentes potencialidades desta molécula. Os dados obtidos levam às seguintes conclusões:

1. A cera dos ovos de *R. microplus* contém, entre outros compostos, o esteroide sulfatado “*N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina” (boophilina) que apresentou atividade ainda não caracterizada, isto é, atividade antibiofilme;
2. Boophilina atua inibindo o biofilme de *P. aeruginosa* por um mecanismo que envolve a repressão dos genes *fliC* e *cdrA*. A inibição do biofilme através da repressão de *cdrA* é inédita;
3. Boophilina leva a danos irreversíveis em *S. epidermidis* que foi comprovado por microscopia eletrônica de transmissão sendo necessários novos estudos para o entendimento do seu mecanismo de ação;
4. As bactérias isoladas dos tecidos do carrapato *R. microplus* produzem metabólitos capazes de inibir significativamente a formação de biofilmes patogênicos, além de apresentar atividade citotóxica contra o protozoário *T. foetus*.

O conjunto de dados obtidos neste trabalho de tese aliado a sua multidisciplinaridade abre diferentes perspectivas incluindo a avaliação da presença de boophilina na cera dos ovos de outras espécies de carrapatos bem como em ovos de outros artrópodes. A utilização de mecanismo similar de proteção de ovos pode ser encontrada nesses organismos, boophilina podendo estar desempenhando essa função protetora. Além disso, devido à potencialidade de boophilina contra bactérias, é interessante avaliar a possibilidade de síntese dessa molécula antibiofilme. A investigação do local de produção de boophilina, com especial atenção ao órgão de Gené, surge igualmente como um ponto interessante a ser investigado.

O conhecimento obtido neste trabalho traz uma nova abordagem não só para o estudo da interação de artrópodes com o ambiente, mas também aponta para um novo alvo no desenvolvimento de métodos de controle de carrapatos e outros artrópodes.

A repressão do gene *cdrA*, uma atividade ainda não descrita na literatura, indica um novo alvo de investigação na área de biofilmes tanto no que se refere a ampliar o conhecimento deste fenômeno como do ponto de vista de desenhar estratégias de controle de biofilmes.

A produção de metabólitos antibiofilme e anti-*T. foetus* por bactérias associadas a *R. microplus* surge como um novo caminho na descoberta de moléculas com potencial utilidade terapêutica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KOVACS, A.T.; KUIPERS, O.P. & VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 172-179, 2011.

ABRAHAM, W.R.; STRÖMPL, C.; MEYER, H.; LINDHOLST, S.; MOORE, E.R.; CHRIST, R.; VANCANNEYT, C.; TINDALL, B.J.; BENNASAR, A.; SMIT, J. & TESAR, M. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1053-1073, 1999.

ADONIZIO, A.K.; KONG, F. & MATHEE, K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52: 198-203, 2007.

ALHANOUT, K.; MALESINKI, S.; VIDAL, N.; PEYROT, V.; ROLAIN, J.M. & BRUNEL, J.M. New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1688-1693, 2010.

AMADOR, C.I.; CANOSA, I.; GOVANTES, F. & SANTERO, E. Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environmental Microbiology*, 12: 1748–1761, 2010.

ANAND, A.A.; VENNISON, S.J.; SANKAR, S.G.; PRABHU, D.I.; VASAN, P.T.; RAGHURAMAN, T.; GEOFFREY, C.J. & VENDAN, E. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10: 107, 2010.

ANDERSON, G.G. & O'TOOLE, G.A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. In: ROMEO, T. *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 85-105, 2008.

ANDREOTTI, R.; PÉREZ DE LEÓN, A.A.; DOWD, S.E.; GUERRERO, F.D.; BENDELE, K.G.; & SCOLES, G.A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology*, 11: 1-11, 2011.

ANTONIANI, D.; BOCCI, P.; MACIAG, A.; RAFAELLI, N. & LANDINI, P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1095-1104, 2010.

ANTUNES, A.L.; TRENTIN, D.S.; BONFANTI, J.W.; PINTO, C.C.; PEREZ, L.R.; MACEDO, A.J.; & BARTH, A.L. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS*, 118: 873-877, 2010.

ARRIETA, M.C.; LESKIW, B.K. & KAUFMAN, W.R. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 39: 297-313, 2006.

ASHIDA, M. & BREY, P.T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: BREY, P. & HULTUMARK, D. Molecular mechanisms of immune response in insects, Chapman & Hall, New York, p. 135-172, 1998.

ATTILA, C.; UEDA, A. & WOOD, T.K. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 525-533, 2009.

BALASHOV, Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8: 159-376, 1972.

BARKEN, K.B.; PAMP, S.J.; YANG, L.; GJERMENSEN, M.; BERTRAND, J.J.; KLAUSEN, M.; GIVSKOV, M.; WHITCHURCH, C.B.; ENGEL, J.N. & TOLKER-NIELSEN, T. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10: 2331-2343, 2008.

- BARRET, N. J.; SMYTH, J. D. & ONG, J. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro. *International Journal for Parasitology*, 12: 315-322, 1982.
- BENSON, M.J.; GAWRONSKI, J.D.; EVELEIGH, D.E. & BENSON, D.R. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 616-620, 2004.
- BJARNSHOLT, T.; TOLKER-NIELSEN, T.; HØIBY, N. & GIVSKOV, M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12: e11, 2010.
- BOLES, B.R. & MCCARTER, L.L. *Vibrio parahaemolyticus* *scrABC*, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *Journal of Bacteriology*, 184: 5946-5954, 2002.
- BOLES, B.R.; THOENDEL, M. & SINGH, P.K. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United of States of America*, 101: 16630-16635, 2004.
- BOOTH, T.F.; BEADLE, D.J. & HART, R.J. The ultrastructure of Gene's organ in the cattle tick *Boophilus microplus* CANESTRINI. *Acarology* 6: 261-267, 1984.
- BOOTH, T.F. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gene's) organ in ixodid ticks. *Tissue & Cell*, 21: 113-22, 1989.
- BOOTH, T.F. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental & Applied Acarology*, 14: 137-149, 1992.
- BORLEE, B.R.; GOLDMAN, A.D.; MURAKAMI, K.; SAMUDRALA, R.; WOZNIAK, D.J. & PARSEK, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 75: 827-842, 2010.

BREIDENSTEIN, E.B.M.; DE LA FUENTE, C. & HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiology*, 19: 419-426, 2011.

BRÖZEL, V.S.; STRYDOM, G.M. & CLOETE T.E.E. A method for the study of *de novo* protein synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* after attachment. *Biofouling*, 8: 195–210, 1995.

BRUNO, I.; MINALE, L.; RICCIO, R.; CARIELLO, L.; HIGA, T. & TANAKA, J. Starfish saponins, Part 50. Steroidal glycosides from the Okinawan starfish *Nardoa tuberculata*. *Journal of Natural Products*, 56: 1057-1064, 1993.

BRYERS, J.D. Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100: 1-18, 2008.

BUCKI, R.; LESZCZYNSKA, K.; BYFIELD, F.J.; FEIN, D.E.; WON, E.; CRUZ, K.; NAMIOT, A.; KULAKOWSKA, A.; NAMIOT, Z.; SAVAGE, P.B.; DIAMOND, S.L. & JANMEY, P.A. Combined antibacterial and anti-inflammatory activity of a cationic disubstituted dexamethasone-spermine conjugate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54: 2525-2533, 2010.

BULET, P. & STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12: 3-11, 2005.

CAIAZZA, N.C.; MERRITT, J.H.; BROTHERS, K.M. & O'TOOLE, G.A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189: 3603-3612, 2007.

CAMILLI, A. & BASSLER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311: 1113-1116; 2006.

Center for Diseases Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/>.

CARVALHO, C.C.R. & FERNANDES, P. Production of metabolites responses to the marine environment. *Marine Drugs*, 8: 705-727, 2010.

- CEGELSKI, L.; MARSHALL, G.R.; ELDRIDGE, G.R. & HULTGREN, S.J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 17-27, 2008.
- CERAUL, S.M.; SONENSHINE, D.E. & HYNES, W.L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology*, 39: 376-383, 2002.
- CERAUL, S.M.; SONENSHINE, D.E.; RATZLAFF, R.E. & HYNES, W.L. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 1099-1103, 2003.
- CERENIUS, L. & SÖDERHÄLL, K. Coagulation in invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, 3: 3-8, 2011.
- CHARACKLIS, W.G. & COOKSEY, K.E. Biofilms and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology*, 29: 93-138, 1983.
- CHARACKLIS, W.G. & MARSHALL, K.C., Biofilms. In: CHARACKLIS, W.G. & MARSHALL, K.C., John Wiley & Sons, New York, 796 p., 1990.
- CHERY, L.M. Cholesterol in the cuticular wax of *Boophilus microplus*. *Nature*, 222: 777, 1969.
- CHERY, L.M. Utilization of cholesterol by the cattle tick *Boophilus microplus*: cholesterol economy in the engorged female adult. *Insect Biochemistry*, 6: 587-594, 1976.
- CHIANG, W.C. & TOLKER-NIELSEN, T. Extracellular DNA as matrix component microbial biofilms. In: KIKUCHI, Y. & RYKOVA, E. Extracellular Nucleic Acids, Springer, Berlin, Germany, p. 1–37, 2010.
- CHLUDIL, H.D. & MAIER, M.S. Minutosides A and B, antifungal sulfated steroid xylosides from the patagonian starfish *Anasterias minuta*. *Journal of Natural Products*, 68: 1279-1283, 2005.

- CIPRANDI, A.; DE OLIVEIRA, S.K.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, 114: 40-46, 2006.
- CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E. & HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3: 541-548, 2007.
- CLAY, K.; KLYACHKO, O.; GRINDLE, N.; CIVITELLO, D.; OLESKE, D. & FUQUA, C. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Molecular Ecology*, 17: 4371-4381, 2008.
- CRAIG, L.; VOLKMANN, N.; ARVAI, A.S.; PIQUE, M.E.; YEAGER, M.; EGELMAN, E.H. & TAINER, J.A. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Molecular Cell*, 23: 651-662, 2006.
- COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G. & CHENG, K.J. How bacteria stick. *Scientific American*, 238: 86-95, 1978.
- COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M. & MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41: 435-464, 1987.
- COSTERTON, J.W. & LAPIN-SCOTT, H.M. Introduction to Microbial Biofilms, In: COSTERTON, J.W. & LAPIN-SCOTT. *Microbial Biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R. & LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745, 1995.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. & GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322, 1999.
- COTTER, P.A. & STIBITZ, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 17-23, 2007.

DALY, R. "Bovine Trichomoniasis". *Range Beef Cow Symposium*. Paper 42. <http://digitalcommons.unl.edu/rangebeefcowsymp/42>, 2005.

DANESE, P.N.; PRATT, L.A. & KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 182: 3593-3596, 2000.

D'ARGENIO, D.A.; CALFEE, M.W.; RAINEY, P.B. & PESCI, E.C. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of Bacteriology*, 184: 6481-6489, 2002.

DAS, T.; SHARMA, P.K.; BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. & KROM, B.P. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 3405-3408, 2010.

DASGUPTA, N.; ARORA, S.K. & RAMPHAL, R. *flaN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182: 357-364, 2000.

DAVEY, M.E. & O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867, 2000.

DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C & O'TOOLE, G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185: 1027-1036, 2003.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 114-22, 2003.

DE KIEVIT, T.R.; GILLIS, R.; MARX, S.; BROWN, C. & IGLEWSKI, B.H. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied Environmental and Microbiology*, 67: 1865-1873, 2001.

DE LA FUENTE, J.; MARITZ-OLIVIER, C.; NARANJO, V.; AYOUBI, P.; NIJHOF, A.M.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.M.; GALINDO, R.C.; BLOUIN, E.F.; GORTAZAR, C.; JONGEJAN, F. & KOCAN, K.M. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics*, 9: 372, 2008.

- DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; SAITO, K.C. & CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 125: 379-395, 2004.
- DESJARDINS, M.; HOUDE, M. & GAGNON, E. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 207: 158-165, 2005.
- DETTNER, K. Potential Pharmaceuticals from Insects and their Co-Occurring Microorganisms, 95-119. In: VILCINSKAS, A. Insect Biotechnology, Series: Biologically-Inspired Systems, Vol. 2, Springer, Dordrecht, 2011.
- DIEHL, P.A.; AESCHLIMANN, A. & OBENCHAIN, F.D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: OBENCHAIN, F.D. & GALUN, R. Physiology of ticks, pp. 277-350. Pergamon Press, Oxford, 1982.
- DIGGLE, S.P.; GARDNER, A.; WEST, S.A. & GRIFFIN, A.S. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 362: 1241-1249, 2007.
- Doc Kaiser's Microbiology website, <http://student.ccbcmd.edu/~gkaiser>.
- DONG, Y.H.; GUST, I. AR.; ZHANG, Q.; XU, J.L. & ZHANG, L.H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1754-1759, 2002.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-93, 2002.
- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 881-890, 2002.
- DUARTE, M.; GIORDANI, R.B.; CARLI, G.A.; ZUANAZZI, J.A.; MACEDO, A.J. & TASCA, T. Cytotoxicity of solubilization vehicles for *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus* measured by the resazurin microtiter assay. *Veterinary Parasitology*, 166: 167-170, 2009.

EPAND, R.M.; EPAND, R.F. & SAVAGE, P.B. Ceragenins (cationic steroid compounds), a novel class of antimicrobial agents. *Drug News Perspectives*, 21: 307-311, 2008.

ESTEVEES, E.V. Da S. Caracterização bioquímica e molecular do peptídeo antimicrobiano microplusina em ovários e ovos de *Boophilus microplus*. Dissertação de mestrado, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ESTEVEES, E.; LARA, F.A.; LORENZINI, D.M.; COSTA, G.H.; FUKUZAWA, A.H.; PRESSINOTTI, L.N.; SILVA, J.R.; FERRO, J.A.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. & DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 568-580, 2008.

ESTEVEES, E.; FOGAÇA, A.C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D.; MANSO, P.P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D. & DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 913-919, 2009.

FAGOTTO F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14: 217-35, 1990.

FLEMMING, H.C. & WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 623-633, 2010.

FOGACA, A.C.; DA SILVA, P.I. JR.; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E. & DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 25330-25334, 1999.

FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVEES, E.; BULET, P. & DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*:

isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 191–200, 2004.

FOGACA, A.C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P. & DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*, 27: 667-674, 2006.

FONSECA, A.P.; EXTREMINA, C.; FONSECA, A.F. & SOUSA, J.C. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 903-910, 2004.

FOTHERGILL, J.L.; PANAGEA, S.; HART, C.A.; WALSHAW, M.J.; PITT, T.L. & WINSTANLEY, C. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiology*, 23: 7-45, 2007.

FREDENHAGEN, A.; TAMURA, S.; KENNY, P.T.M.; KOMURA, H.; NAYA, Y. & NAKANISHI, K. Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper. *Journal The American Chemical Society*, 109: 4409-4411, 1987.

FREDHEIM, E.G.; GRANSLO, H.N.; FAEGSTAD, T.; FIGENSCHAU, Y.; ROHDE, H.; SADOVSKAYA, I.; MOLLNES, T.E. & KLINGENBERG, C. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 63: 269-80, 2011.

FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186: 4457-4465, 2004.

FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51: 675-690, 2004.

FUSETANI, N.; TAKAHASHI, M. & MATSUNAGA S. Topsentiasterol sulfates, antimicrobial sterol sulfates possessing novel side chains, from a marine sponge, *Topsentia* sp. *Tetrahedron*, 50: 7765-7770, 1994.

GANZ, T. & LEHRER, R.I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 5: 297-297, 1999.

GARCIA, G.R. Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; FIEDLER, H.-P.; KALLENBORN, H.G.; HOLZENKÄMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HÖLTZEL, A.; SCHMID, D.G.; RHEINHEIMER, J. & DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 199-205, 2002.

GIORDANI, R.B.; DE ALMEIDA, M.V.; FERNANDES, E.; DA COSTA, C.F.; DE CARLI, G.A.; TASCA, T. & ZUANAZZI, J.A. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63: 613-617, 2009.

GIORDANI, R.B.; VIEIRA, P. DE B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG DB, SOUZA, A.P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A. & TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, 72: 645-650, 2011.

GJERMENSEN, M.; NILSSON, M.; YANG, L. & TOLKER-NIELSEN, T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular Microbiology*, 75: 815-826, 2009.

GOLOVLEV, E.L. The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Microbiology*, 71: 249-254, 2002.

GONZALES J.C. O controle do carrapato do boi. Sulina, Porto Alegre. 79 p., 1995.

GONZÁLEZ, J.E & KESHAVAN, N.D. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 859-875, 2006.

- GORMAN, M.J.; KANKANALA, P. & KANOST, M.R. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. *Insect Molecular Biology*, 13: 19-24, 2004.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E. & PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos na Brasil. *Hora Veterinária*, 125: 8-10, 2002.
- GRUBHOFFER, L.; GOLOVCHENKO, M.; VANCOVÁ, M.; ZACHAROVÁ-SLAVÍCKOVÁ, K.; RUDENKO, N. & OLIVER, J.H. JR. Lyme borreliosis: insights into tick-/host-borrelia relations. *Folia Parasitology*, 52: 279-294, 2005.
- GRUNCLOVA, L.; FOUQUIER, H.; HYPSE, V. & KOPÁČEK, P. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 651-660, 2003.
- GUDDERRA, N.P.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S. & ROE, R.M. Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology*, 48: 269-278, 2002.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W. & STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 95-108, 2004.
- HARBON, R.S. & KENT, C.A. Aspects of cell adhesion. In: MELO, L.F.; BOTT, T.R. & BERNARDO, C.A. NATO ASI Series, Vol. 145, p. 125-140, 1988.
- HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J. & HELDIN, C.H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224: 451-455, 1995.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Review Microbiology*, 7: 263-273, 2009.
- HIDALGO, G.; CHAN, M. & TUFENKJI, N. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Applied Environmental and Microbiology*, 77: 6852-6857, 2011.

- HICKMAN, J.W. & HARWOOD, C.S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69: 376-389, 2008.
- HOBSON, R.P. On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae II. Identity of the growth factor with cholesterol. *Journal of Biochemistry*, 29: 2023-2026, 1935.
- HOFFMAN, L.R.; D'ARGENIO, D.A.; MACCOSS, M.J.; ZHANG, Z.; JONES, R.A. & MILLER, S.I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436: 1171-1175, 2005.
- HONIGBERG B.M. Trichomonads of veterinary importance, In: KREIER, J.P, *Parasitic Protozoa*, Academic Press, New York, p. 163-273, 1978.
- HORAK, I.G.; CAMICAS, J.L. & KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental & Applied Acarology*, 28: 27-54, 2002.
- HOSHITA, T. Bile Alcohols and Primitive Bile Acids. In: DANIELSSON, H. Sterols and Bile Acids, New York-Oxford, p. 331-369, 1991.
- HOURY, A.; BRIANDET, R.; AYMERICH, S. & GOHAR, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156: 1009-1018, 2010.
- HYNES, W.L.; CERAUL, S.M.; TODD, S.M.; SEGUIN, K.C. & SONENSHINE, D.E. A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 19: 339-344, 2005.
- IJIMA, R.; KISUGI, J. & YAMAZAKI, M. Antifungal activity of aplysianin E, a cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 13-19, 1995.
- IWANAGA, S.; KAWABATA, S. & MUTA, T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *Journal of Biochemistry*, 123: 1-15, 1998.

JAHN, A. & NIELSEN, P.H. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37: 17–24, 1998.

JAIN, A.; GUPTA, Y.; AGRAWAL, R.; KHARE, P. & JAIN, S.K. Biofilms -a microbial life perspective: a critical review. *Critical Reviews in Therapeutical Drug Carrier Systems*, 24: 393-443, 2007.

JAYARAMAN, R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences*, 33: 795-805, 2008.

JAYARAMAN, A. & WOOD, T.K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10: 145-167, 2008.

JÉFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236: 163-173, 2004.

JENAL, U. & MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Reviews in Genetics*, 40: 385-407, 2006.

JIGAMI, Y.; HARADA, N.; UERMURA, H.; TANAKA, H.; ISHIKAWA, K.; NAKASATO, S.; KITA, H. & SUGIURA, M. Identification of a polymyxin produced by a symbiotic microorganism isolated from the brown planthopper, *Nilaparavata lugens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 1637-1639, 1986.

JOHNS, R.; OHNISHI, J.; BROADWATER, A.; SONENSHINE, D.E.; DE SILVA, A.M. & HYNES, W.L. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38: 99-107, 2001.

KALTENPOTH, M.; GÖTTLER, W.; HERZNER, G. & STROHM, E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, 15: 475-479, 2005.

- KARATAN, E. & WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73: 310-347, 2009.
- KASZAB, E.; SZOBOSZLAY, S.; DOBOLYI, C.; HAHN, J.; PÉK, N. & KRISZT, B. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresource Technology*, 102: 1543-1548, 2010.
- KATHER, E.J.; MARKS, S.L. & KASS, P.H. Determination of the in vitro susceptibility of feline *Tritrichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 966-970, 2007.
- KENNY, P.T.M., TAMURA, S.Y., FREDENHAGEN, A., NAYA, Y., NAKANISHI, K., NISHIYAMA, K., SUGIURA, M.; KITA, H. & KOMURA, H. Symbiotic micro-organisms of insects: a potential new source for biologically active substances. *Pest Management Science*, 27: 117-131, 1989.
- KERKSIEK, K. A life in slime-biofilms rule the world. *Infect. Res. (Perspectives)*, 2008.
- KIEREK-PEARSON, K. & KARATAN, E. Biofilm development in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 57: 79-111, 2005.
- KIKUCHI, K.; BERNARD, E.M.; SADOWNIK, A.; REGEN, S.L. & ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities of squalamine mimics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 1433-1438, 1997.
- KISUGI, J.; OHYE, H.; KAMIYA, H. & YAMAZAKI, M. Biopolymers from marine invertebrates. X. Mode of action of an antibacterial glycoprotein, aplysianin E, from eggs of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 37: 3050-3053, 1989.
- KLAUSEN, M.; HEYDORN, A.; RAGAS, P.; LAMBERTSEN, L.; AAES-JØRGENSEN, A.; MOLIN, S. & TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48: 1511-1524, 2003.

- KLOWDEN, M.J. *Physiological Systems in Insects*, 2^{ed}. Academic Press, Boston, MA, 2007.
- KOPÁČEK, P.; VOGT, R.; JINDRAK, L.; WEISE, C. & SAFARIK, I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 989-997, 1999.
- KOPÁČEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVÁ, V. & DAFFRE, S. Tick innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708: 137-162, 2010.
- KUCHMA, S.L. & O'TOOLE, G.A. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 429-433, 2000.
- KUCKNOOR, A.S.; MUNDODI, V. & ALDERETE, J.F. Heterologous expression in *Trichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. *BMC Molecular Biology*, 6: 1-13, 2005.
- LABRUNA, M.B. & VERISSÍMO, C.J. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. *Arquivo Instituto Biológico*, 68: 115-120, 2001.
- LAI, R.; LOMAS, L.O.; JONCZY, J.; TURNER, P.C. & REES, H.H. Two novel noncationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *The Biochemical Journal*, 379: 681-685, 2004.
- LAI, X.Z.; FENG, Y.; POLLARD, J.; CHIN, J.N.; RYBAK, M.J.; BUCKI, R.; EPAND, R.F.; EPAND, R.M. & SAVAGE, P.B. Ceragenins: cholic acid based mimics of antimicrobial peptides. *Accounts of Chemical Research*, 41: 1233-1240, 2008.
- LEE, J.C.; COVAL, S.J. & CLARDY, J. A cholesteryl ester protein inhibitor from an insect-associated fungus. *The Journal of Antibiotics*, 49: 693-696, 1996.
- LEES, A.D. & BEAMENT, J.W.L. An organ-waxing in ticks. *QJMS*, 3th, 7: 291-332, 1948.

- LEMON, K.P.; HIGGINS, D.E. & KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189: 4418-4424, 2007.
- LEWIS K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry*, 70: 267-274, 2005.
- LEWIS K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 48-56, 2007.
- LIBERATI, N.T.; URBACH, J.M.; MIYATA, S.; LEE, D.G.; DRENKARD, E.; WU, G.; VILLANUEVA, J.; WEI, T. & AUSUBEL, F.M. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United of States of America*, 103: 2833-2838, 2006.
- LIMSUWAN, S. & VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and antiquorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53: 429-436, 2008.
- LIU, Z.; LIU, H.; LIU, X. & WU, X. Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 149: 557-561, 2008.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Methods, 25: 402-408, 2001.
- LOPEZ, L.B.; BRAGA, M.B.M.; LOPEZ, J.O.; ARROYO, R. & SILVA FILHO, F.C. Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72: 173-186, 2000.
- LORY, S.; MERIGHI, M. & HYODO, M. Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symposium Series*, 53: 51-52, 2009.
- MA, L.; CONOVER, M.; LU, H.; PARSEK, M.R.; BAYLES, K. & WOZNAK, D.J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5: 1-11, 2009.

MALAPAKA, V.R.; BARRESE, A.A. & TRIPP, B.C. High-throughput screening for antimicrobial compounds using a 96-well format bacterial motility absorbance assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 12: 849-854, 2007.

MANETTI, A.G.; ROSETTO, M.; FILIPPIS, T.; MARCHINI, D.; BALDARI, C.T. & DALLAI, R. Juvenile hormone regulates the expression of the gene encoding ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*. *Journal of Insect Physiology*, 43: 1161-1167, 1997.

MANN, E.E. & WOZNIAK, D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 893-916, 2012.

MARCHINI, D.; GIORDANO, P.C.; AMONS, R.; BERNINI, L.F. & DALLAI, R. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 591-598, 1993.

MARCHINI, D.; MARRI, L.; ROSETTO, M.; MANETTI, A.G.O. & DALLAI, R. Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240: 657-663, 1997.

MAYA-MONTEIRO, C.M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F.A.; ALVES, E.W.; CAPURRO, M.L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I.C. & OLIVEIRA, P.L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 36584-36589, 2000.

MICHELITSCH, A.; RÜCKERT, U.; RITTMANNBERGER, A.; SEGER, C.; STRASSER, H. & LIKUSSAR, W. Accurate determination of oosporein in fungal culture broth by differential pulse polarography. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52: 1423-1426, 2004.

MIKKELSEN, H.; SIVANESON, M. & FILLOUX, A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13: 1666-1681, 2011.

- MILLER, M.B. & BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199, 2001.
- MONTANARO, L.; POGGI, A.; VISAI, L.; RAVAIOLI, S.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P. & ARCIOLA, C.R. Extracellular DNA in biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*, 34: 824-831, 2011.
- MOORE, K.S.; WEHRLI, S.; RODER, H.; ROGERS, M.; FORREST, J.N. JR.; MCCRIMMON, D. & ZASLOFF, M. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United of States of America*, 90: 1354-1358, 1993.
- MORENO, C.X.; MOY, F.; DANIELS, T.J.; GODFREY, H.P. & CABELLO, F.C. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environmental Microbiology*, 8: 761-772, 2006.
- MORIMOTO, S.; KURTTI, T.J. & NODA, H. In vitro cultivation and antibiotic susceptibility of a *Cytophaga*-like intracellular symbiont isolated from the tick *Ixodes scapularis*. *Current Microbiology*, 52: 324-329, 2006.
- MURRAY, T.S. & KAZMIERCZAK, B.I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190: 2700–2708, 2008.
- MURRELL, A. & BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172, 2003.
- MELO, M.N.; FERRE, R. & CASTANHO, M.A.R.B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 245-250, 2009.
- MUSK, D.J.; BANKO, D.A. & HERGENROTHER, P.J. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*, 12: 789-796, 2005.

- MYSZKA, K. & CZACZYK, K. Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61: 173-180, 2011.
- NAGANT, C.; FENG, Y.; LUCAS, B.; BRAECKMANS, K.; SAVAGE, P. & DEHAYE, J.P. Effect of a low concentration of a cationic steroid antibiotic (CSA-13) on the formation of a biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 763-772, 2011.
- NAGAOKA, T.; NAKATA, K.; KOUNO, K. & ANDO, T. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 59: 302-304, 2004.
- NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D. & YAMAKAWA, M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 747-751, 2001.
- NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D. & YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, 40: 78-81, 2003.
- NAPPI, A.J. & OTTAVIANI, E. Citotoxicity and citotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22: 469-480, 2000.
- NAPPI, A.; POIRIE, M. & CARTON Y. The role of melanization and cytotoxic by products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Advances in Parasitology*, 70: 99-121, 2009.
- NEALSON, K.H. & HASTINGS, J.W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43: 496-518, 1979.
- NG, W.L. & BASSLER, B.L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43: 197-222, 2009.
- NICASTRO, G.G.; BOECHAT, A.L.; ABE, C.M.; KAIHAMI, G.H. & BALDINI, R.L. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cupD transcription is activated by the RcsB response

regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiology Letters*, 301: 115-123, 2009.

NODA, H.; MUNDERLOH, U.G. & KURTTI, T.J. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3926-3932, 1997.

NUNN, M.A.; SHARMA, A.; PAESEN, G.C.; ADAMSON, S.; LISSINA, O.; WILLIS, A.C. & NUTTALL, PA. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Immunology*, 174: 2084-2091, 2005.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.R.; LORENZINI, D.M.; SEIXAS, A.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ JR., I. & TERMIGNONI, C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *International Journal for Parasitology*, 42: 635-645, 2012.

OLIVER, J.D. Ecological, organismal, and cellular explorations of three medically significant species of ticks in Iowa. Dissertation Iowa State University, Iowa State, 2011.

OLSON, M.; HOWARD, C.; MORCK, D.; BURET, A. & READ, R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66: 86-92, 2002.

ÖNFELT T.O.; ROOS, E. & ENGSTRÖM, Y. The GATA factor serpent is required for the onset of the humoral immune response in *Drosophila* embryos. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United of States of America*, 98: 3884-3888, 2001.

O'TOOLE, G.A. & KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30: 295-304, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54: 49-79, 2000.

O'TOOLE, G.A. A resistance switch. *Nature*, 416: 695-696, 2002.

- OVERHAGE, J.; LEWENZA, S.; MARR, A.K. & HANCOCK, R.E.W. Identification of Genes Involved in Swarming Motility Using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-*lux* Mutant Library. *Journal of Bacteriology*, 189: 2164-2169, 2007.
- PALLEN, M.J.; PENN, C.W. & CHAUDHURI, R.R. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiology*, 13: 143-149, 2005.
- PAMP, S.J.; GJERMENSEN, M. & TOLKER-NIELSEN, T. In: KJELLEBERG, S. & GIVSKOV, M. The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations, Horizon Bioscience, Norfolk, UK, p. 37-69, 2007.
- PARAJE, M.G. Antimicrobial resistance in biofilms. In: MÉNDEZ-VILAS, A. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 2011.
- PARSEK, M.R. & SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57: 677-701, 2003.
- PEREIRA, M. de C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. & KLAFKE, G.M. In: PEREIRA, M. de C.; LABRUNA, M.B. & SZABÓ, M.P.J. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* biologia, controle e resistência. 1ª ed, MedVet Livros., 2008.
- PEROTTI, M.A.; CLARKE, H.K.; TURNER, B.D. & BRAIG, H.R. *Rickettsia* as obligate and mycetomic bacteria. *FASEB Journal*, 20: 2372-2374, 2006.
- PETROVA, O.E. & SAUER, K. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens*, 5: 1-16, 2009.
- PETTIT, G.R.; KAMANO, Y.; DRASAR, P.; INOUE, M. & KNIGHT, J.C. Steroids and related natural products. 104. Bufadienolides. 36. Synthesis of bufalitinol and bufotoxin. *The Journal of Organic Chemistry*, 52: 3573-3578, 1987.
- PICHU, S.; RIBEIRO, J.M. & MATHER, T.N. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390: 511-515, 2009.

POHL, P.C.; KLAFFKE, G.M.; CARVALHO, D.D.; MARTINS, J.R.; DAFFRE, S.; DA SILVA VAZ JR., I. & MASUDA, A. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal for Parasitology*, 41: 1323-1333, 2011.

POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K.; HÖLTZEL, A.; JUNG, G.; DIEHL, P.A. & PETRINI, O. Boophiline, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 2066-2072, 1997.

PRATT, L.A. & KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30: 285-293, 1998.

PRATT, J.T.; TAMAYO, R.; TISCHLER, A.D. & CAMILLI, A. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 12860-12870, 2007.

Queensland Government Agriculture, Fisheries and Forestry, <http://daff.qld.gov.au/home>.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J. & ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3357-3363, 2000.

RAE, D.O. Impact of trichomonosis on the cow-calf producer's profitability. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 194: 771-775, 1989.

RAHME, L.G.; STEVENS, E.J.; WOLFORT, S.F.; SHAO, J.; TOMPKINS, R.G. & AUSUBEL, F.M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902, 1995.

RASKO, D.A. & SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 117-128, 2010.

RASMUSSEN, T.B. & GIVSKOV, M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*, 152: 895-904, 2006.

RATCLIFFE, N.A. & GAGEN S.J. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28: 373-382, 1976.

READING, N.C. & SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 254: 1-11, 2006.

REICH, H.J.; JAUTELAT, M.; MESSE, M.T.; WEIGERT, F.J. & ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of steroids. *Journal of the American Chemical Society*, 91: 7445-7454, 1969.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J.B. & GHIGO J.M. Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology* doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x. [Epub ahead of print], 2012.

REY, L. Parasitologia. Guanabara Koogan, p. 633–641, 1973.

RIBEIRO, J.M.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.R. & SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of Experimental Medicine*, 161: 332-344, 1985.

ROMANOVA, Y.M.; SMIRNOVA, T.A; ANDREEV, A.L.; IL'INA, T.S.; DIDENKO, L.V.; & GINTSBURG, A.L. Formation of biofilms as an example of the social behavior of bacteria. *Microbiology*, 75: 481–485, 2006.

RÖMLING, U. & AMIKAM, D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 218-228, 2006.

ROSETTO, M.; MANETTI, A.G.; GIORDANO, P.C.; MARRI, L.; AMONS, R.; BALDARI, C.T.; MARCHINI, D. & DALLAI, R. Molecular characterization of ceratotoxin C. a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitidis capitata*. *European Journal of Biochemistry*, 241: 330-337, 1996.

ROSS, P.; WEINHOUSE, H.; ALONI, Y.; MICHAELI, D.; WEINBERGER- OHANA, P.; MAYER, R.; BRAUN, S.; VROOM, E.V.; VAN DER MAREL, G.A.; VAN BOOM, J.H.

& BENZIMAN, M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325: 279–281, 1987.

ROWLEY, A.F. & POWELL, A. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, 179: 7209-7214, 2007.

ROY, N.; RANA, M. & UDDIN, S. Isolation and some properties of new xylanase from the intestine of a herbivorous insect (*Samia Cynthia Pryeri*). *Journal of Biological Sciences*, 4: 27-33, 2003.

RUDOLF, I.; MENDEL, J.; SIKUTOVÁ, S.; SVEC, P.; MASARIKOVA, J.; NOVAKOVA, D.; BUNKOVÁ, L.; SEDLÁČEK, I. & HUBÁLEK, Z. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiology*, 54: 419-428, 2009.

RYDER, C.; BYRD, M. & WOZNIAK, D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 644-648, 2007.

RYMASZEWSKA, A. Symbiotic bacteria in oocyte and ovarian cell mitochondria of the tick *Ixodes ricinus*: biology and phylogenetic position. *Parasitology Research*, 5: 917-920, 2007.

SADOWNIK, A.; DENG, G.; JANOUT, V.; REGEN, S.L.; BERNARD, E.M.; KIKUCHI, K. & ARMSTRONG, D. Rapid construction of a squalamine mimic. *Journal of The American Chemical Society*, 117: 6138-6139, 1995.

SAITO, K.C.; BECHARA, G.H.; NUNES, E.T.; DE OLIVEIRA, P.R.; DENARDI, S.E. & MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 15, 129: 299-311, 2005.

SAKURAGI, Y. & KOLTER, R. Quorum-Sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189: 5383-5386, 2007.

SAND, W. & GEHRKE, T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*, 157: 49-56, 2006.

SANTOS, G.A.G.; MURRAY, A.P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. & MAIER, M.S. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids*, 68: 125-132, 2003.

SASAKI, S.D.; DE LIMA, C.A.; LOVATO, D.V.; JULIANO, M.A.; TORQUATO, R.J. & TANAKA, A.S. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Parasitology*, 118: 214-20, 2008.

SASSERA, D.; BENINATI, T.; BANDI, C.; BOUMAN, E.A.; SACCHI, L.; FABBI, M. & LO, N. '*Candidatus Midichloria mitochondrii*', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2535-2540, 2006.

SATTA, G.; CHISU, V.; CABRAS, P.; FOIS, F. & MASALA, G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 63-68, 2011.

SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRLICH, G.D.; COSTERTON, J.W. & DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184: 1140-1154, 2002.

SAVAGE, P.B. Cationic steroid antibiotics. *Current Medicinal Chemistry Anti-Infective Agents*, 3: 293-304, 2002.

SAVAGE, P.B. Design, synthesis and characterization of cationic peptide and steroid antibiotics. *European Journal of Organic Chemistry*, 5: 759-768, 2002.

SAVAGE, P.B.; LI, C.; TAOTAFU, U.; DING, B. & GUAN, Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 1-7, 2002.

SCHIRMER, T. & JENAL, U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 724-735, 2009.

SCHOENFELDER, S.M.K.; LANGE, C.; ECKART, M.; HENNING, S.; KOZYTSKA, S. & ZIEBUHR, W. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 380-386, 2010.

SCHÖL, H.; SIEBERZ, J.; GÖBEL, E. & GOTHE, R. Morphology and structural organization of gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 25: 327-352, 2001.

SCHROEPFER, G.J.JR. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, 80: 361-553, 2000.

SCOTT, J.J.; OH, D.C.; YUCEER, M.C.; KLEPZIG, K.D.; CLARDY, J. & CURRIE, C.R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science*, 322: 63, 2008.

SEIXAS, A. A reprodução em carrapatos e a avaliação de uma enzima de destaque neste processo como antígeno vacinal contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tese de doutorado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SIEBERZ, J. & GOTHE, R. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 24: 63-76, 2000.

SIMM, R.; MORR, M.; KADER, A.; NIMTZ, M. & RÖMLING, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 53: 1123-1134, 2004.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. & VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 573-583, 2010.

SMITH, R.S.; KELLY, R.; IGLEWSKI, B.H. & PHIPPS, R.P. The *Pseudomonas* autoinducer N-(3-oxo-dodecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *Journal of Immunology*, 169: 2636–2642, 2002.

SMITH, R.S. & IGLEWSKI, B.H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 56-60, 2003.

SÖDERHÄLL, S. & CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28, 1998.

SPANGLER, C.; BÖHM, A.; JENAL, U.; SEIFERT, R. & KAEVER, V. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *Journal of Microbiology Methods*, 81: 226-231, 2010.

SPERANDIO, V. Deciphering bacterial language. *Nature Chemical Biology*, 5: 870-871, 2009.

SONENSHINE, D.E. In: *Biology of ticks* Vol. 1, New York; Oxford University Press, 1991.

SONENSHINE, D.E. & HYNES, W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 13: 7046-7063, 2008.

STARCHENKOV, I.; TRAPENCIERIS, P.; KAUSS, V.; JAS G. & KALVINSH, I. A convenient synthesis of 5 β -cholestan-26-oic and 5 β -cholestan-26,27-dioic acids. *Steroids*, 65: 143-147, 2000.

STARKEY, M.; HICKMAN, J.H.; ZHANG, N.; DE LONG, S.; HINZ, A.; PALACIOS, S.; MANOIL, C.; KIRISITS, J.; STARNER, T.D.; WOZNIAK, D.J.; HARWOOD, C.S. & PARSEK, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *Journal of Bacteriology*, 191: 3492-34503, 2009.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I. & RUZICKA, F.A. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115: 891-899, 2007.

- STEWART, P.S. & FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 199-210, 2008.
- SUN, L.V.; SCOLES, G.A.; FISH, D. & O'NEILL, S.L. *Francisella*-like endosymbionts of ticks. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 301-303, 2000.
- SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiology*, 9: 222-227, 2001.
- SVENSSON, A.; LARSSON, A.; EMTENÄS, H.; HEDENSTRÖM, M.; FEX, T.; HULTGREN, S.J.; PINKNER, J.S.; ALMQVIST, F. & KIHLEBERG, J. Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli*. *ChembioChem*, 2: 915-918, 2001.
- TAMAYO, R.; PRATT, J.T. & CAMILLI, A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 61: 131-148, 2007.
- TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H. & NOMURA, N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 14: 1349-1362, 2012.
- TAYLOR, D. Innate immunity in ticks: a review. *Journal of The Acarological Society of Japan*, 15: 109-127, 2006.
- TEIXEIRA, V.; FEIO, M.J. & BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51: 149-177, 2012.
- THENMOZHI, R.; NITHYANAND, P.; RATHNA, J. & PANDIAN, S.K. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 57: 284-294, 2009.
- THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K. & DUSHAY, M.S. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25: 289-294, 2004.

TODD, S.M.; SONENSHINE, D.E. & HYNES, W.L. Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology*, 21: 141-147, 2007.

TREMBLAY, J. & DÉZIEL, E. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology*, 48: 509-515, 2008.

TRENTIN, D.S. ; GIORDANI, R.B. ; ZIMMER, K.R.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.; BAUMVOL, I.J. & MACEDO, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 327-335, 2011.

TRON, E.A.; WILKE, H.L.; PETERMANN, S.R. & RUST, L. *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis externa exhibit a quorum sensing deficiency. *Veterinary Microbiology*, 99: 121-129, 2004.

TSUJI, N.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; MIYOSHI, T.; XUAN, X.; OLIVER, J.H. JR. & FUJISAKI, K. Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infection and Immunity*, 75: 3633-3640, 2007.

TYSON, K.; ELKINS, C.; PATTERSON, H.; FIKRIG, E. & DE SILVA, A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Molecular Biology*, 16: 469-479, 2007.

UEDA, A. & WOOD, T.K. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathogens*, 5: 1-15, 2009.

University of Edinburgh, The Natural History Collections, <http://www.nhc.ed.ac.uk/>.

UPCROFT, J.A.; DUNN, L.A.; WRIGHT, J.M.; BENAKLI, K.; UPCROFT, P. & VANELLE, P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 344-347, 2006.

VAN SCHAİK, E.J.; GILTNER, C.L.; AUDETTE, G.F.; KEIZER, D.W.; BAUTISTA, D.L.; SLUPSKY, C.M.; SYKES, B.D. & IRVIN, R.T. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 187: 1455-1464, 2005.

VAVRICKA, C.J.; CHRISTENSEN, B.M. & LI, J. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. *Protein Cell*, 1: 830-841, 2010.

VERSTRAETEN, N.; BRAEKEN, K.; DEBKUMARI, B.; FAUVART, M.; FRANSAER, J.; VERMANT, J. & MICHIELS, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiology*, 16: 496-506, 2008.

VIZIOLI, J. & SALZET, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23: 494-496, 2002.

WANG, E.W.; AGOSTINI, G.; OLOMU, O.; RUNCO, D.; JUNG, J.Y. & CHOLE, R.A. Gentian violet and ferric ammonium citrate disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Laryngoscope*, 118: 2050-2056, 2008.

WANG, W.-Z.; MOROHOSHI, T.; IKENOYA, M.; SOMEYA, N. & IKEDA, T. AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2524-2530, 2010.

WATNICK, P. & KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. *Molecular Microbiology*, 34: 586-595, 1999.

WAXMAN, L.; SMITH, D.E.; ARCURI, K.E. & VLASUK, G.P. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, 248: 593-596, 1990.

WENDERSKA, I.B.; CHONG, M.; MCNULTY, J.; WRIGHT, G.D.; & BURROWS, L.L. Palmitoyl-DL-carnitine is a multitarget inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *ChemBioChem*, 12: 2759-2766, 2011.

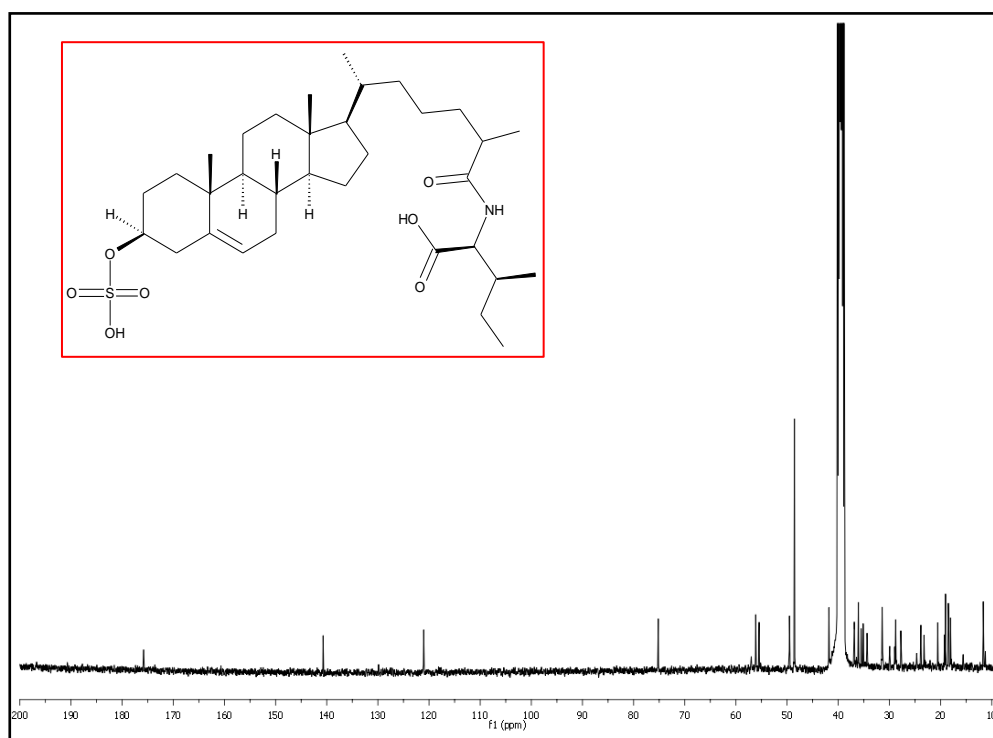
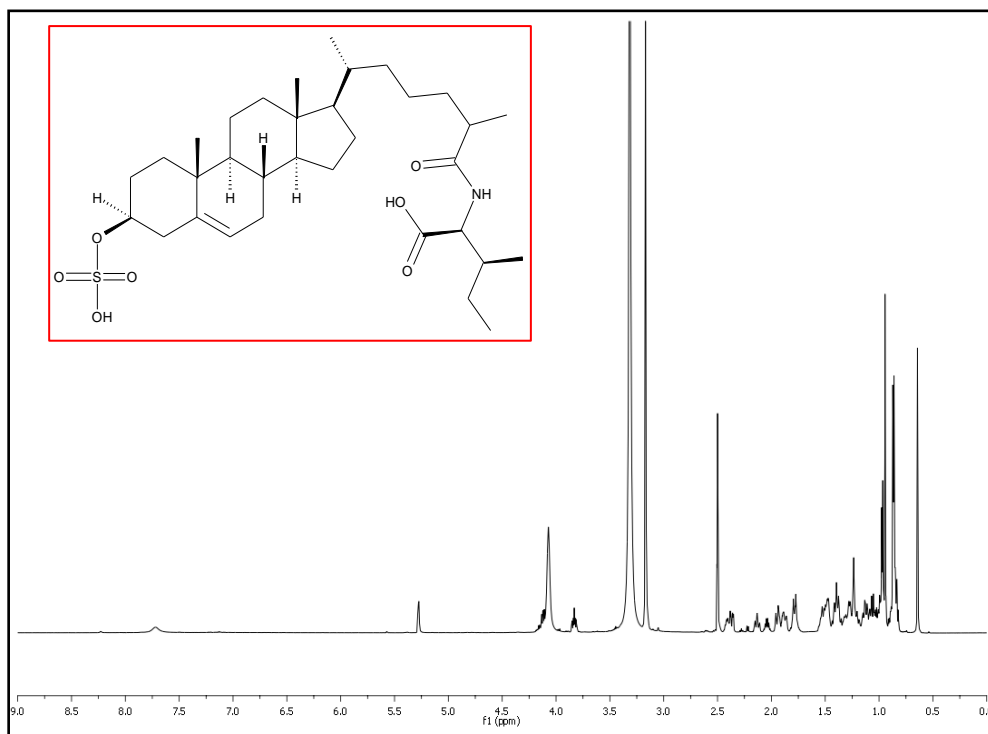
- WHITELEY, M.; BANGERA, M.G.; BUMGARNER, R.E.; PARSEK, M.R.; TEITZEL, G.M.; LORY, S. & GREENBERG, E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413: 860-864, 2001.
- WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. WHO, Geneva, p. 1-120, 2001.
- WILLADSEN, P. & JONGEJAN, F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitology Today*, 15: 258-262, 1999.
- WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology*, 153: 3923-3938, 2007.
- WILLIAMS, K.J. & BAX, R.P. Challenges in developing new antibacterial drugs. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 10: 157-163, 2009.
- WINGENDER, J.; NEU, T.R. & FLEMMING, H.C. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. Springer, 1999.
- WOOD, T.K.; GONZÁLEZ BARRIOS, A.F.; HERZBERG, M. & LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 361-367, 2006.
- YEUNG, A.T.; TORFS, E.C.; JAMSHIDI, F.; BAINS, M.; WIEGAND, I.; HANCOCK, R.E. & OVERHAGE, J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of Bacteriology*, 191: 5592-5602, 2009.
- YIM, G.; WANG, H.H. & DAVIES, J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 362: 1195-1200, 2007.
- YU, D.; SHENG, Z.; XU, X.; LI, J.; YANG, H.; LIU, Z.; REES, H.H. & LAI, R. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides*, 27: 31-35, 2006.

YU, Z.; THOMSON, E.L.S.; LIU, J.; DENNIS, J.J.; JACOBS, R.L. & KAUFMAN, W.R. Antimicrobial activity in the egg of the *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. *Experimental & Applied Acarology*, In press (available at doi 10.1007/s10493-012-9586-1), 2012.

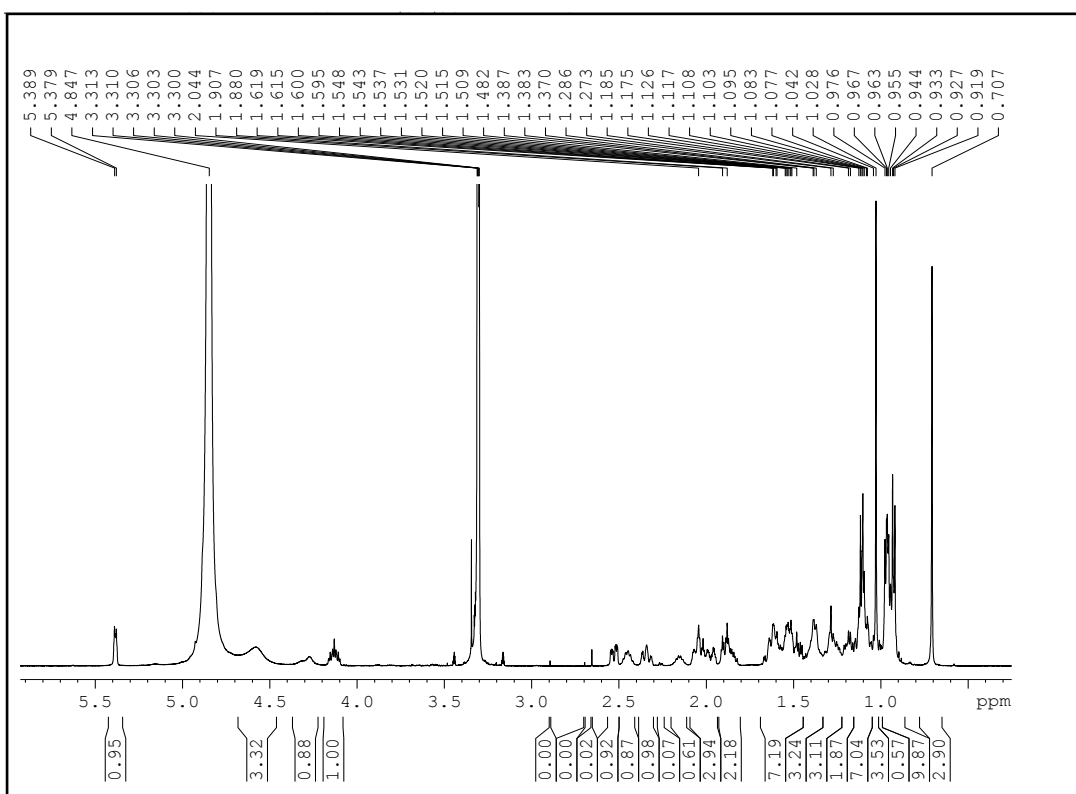
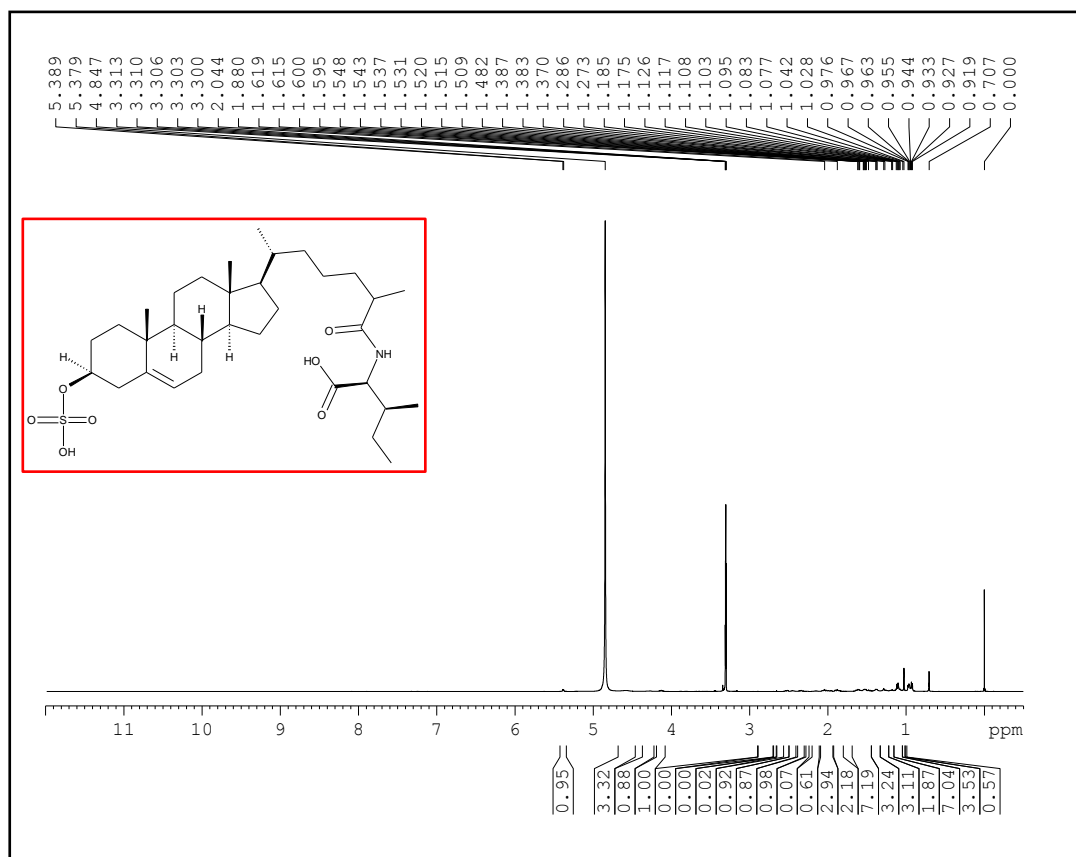
ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395, 2002.

7. ANEXOS

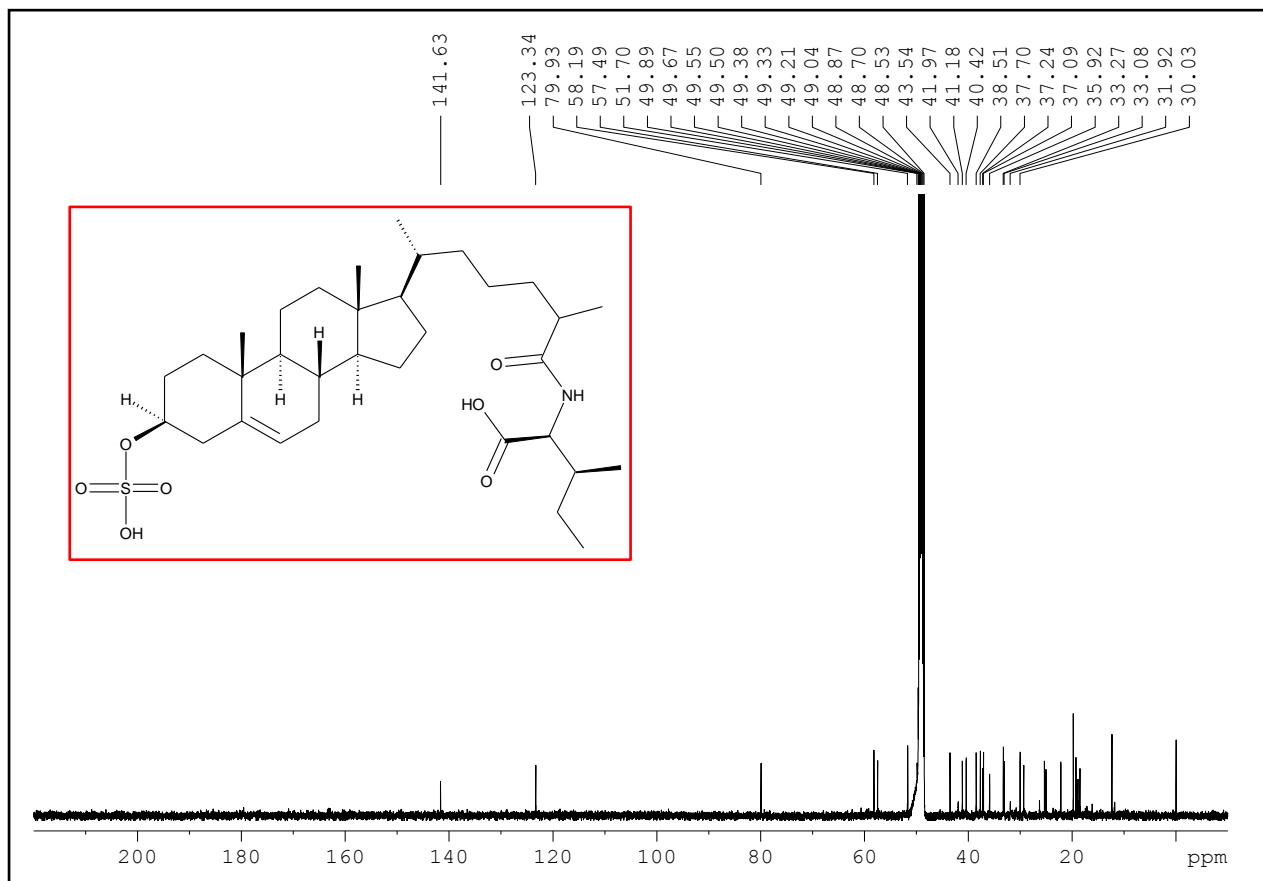
Anexo I. ^1H RMN (superior) e ^{13}C RMN (inferior) de *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina em DMSO (d_6).



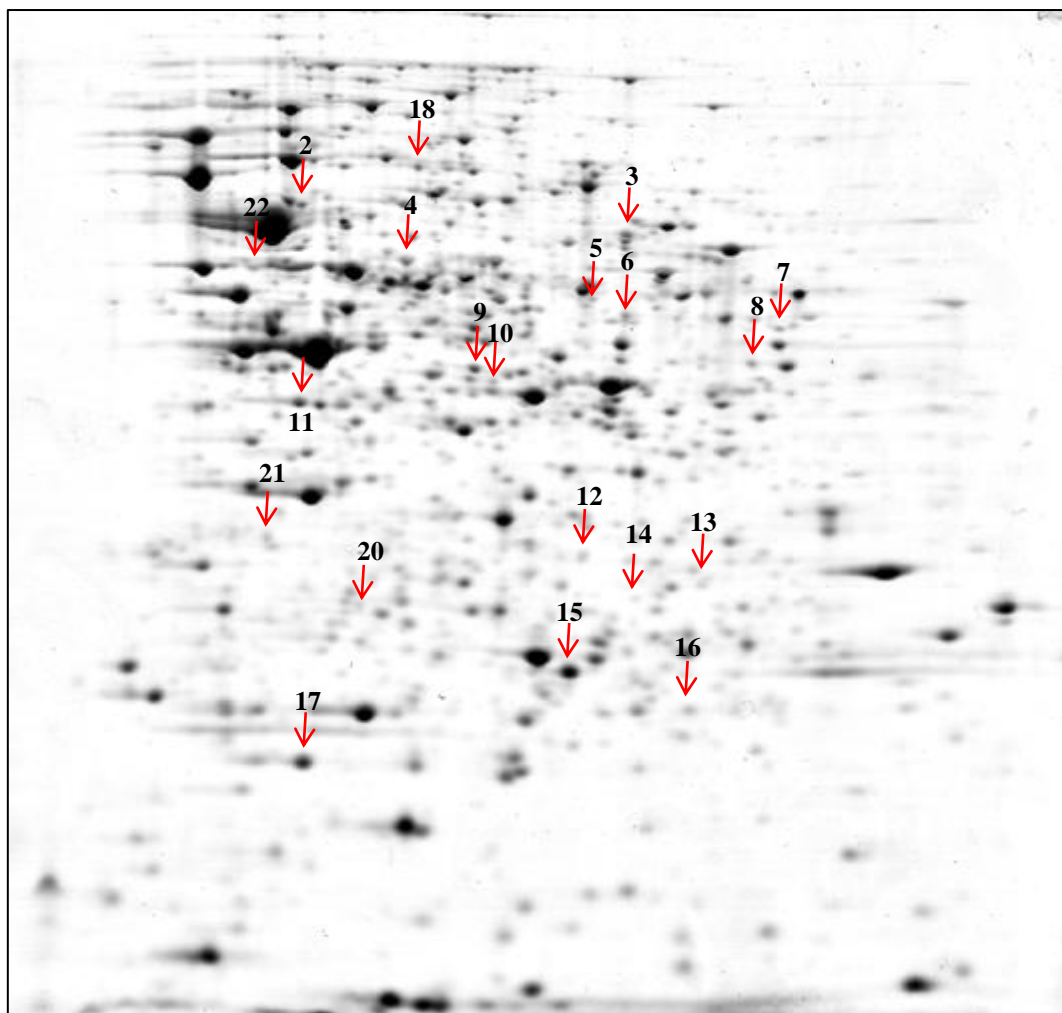
Anexo II. ^1H RMN de *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina em CD_3OD .



Anexo III. ^{13}C RMN de *N*-(3-sulfooxy-25-cholest-5-en-26-oyl)-*L*-isoleucina em CD_3OD .



Anexo IV. Perfil proteômico de *P. aeruginosa* PA14 por eletroforese bidimensional (a figura mostra um gel fusionado da amostra não-tratada (controle) e tratada com boophilina (4.0 mM)).



Anexo V. Proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com boophilina (4.0 mM) por eletroforese bidimensional

PROTEÍNA COM MELHOR HOMOLOGIA	SPOT	CATEGORIA	EFEITO DO TRATAMENTO
Succinil homoserina sulfidrilase	10	Transporte e metabolismo de aminoácidos	Repressão
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	11	Transporte e metabolismo de aminoácidos	Repressão
Acetilglutamato quinase	13	Transporte e metabolismo de aminoácidos	Repressão
Proteína hipotética PA14_09400	9	Produção e conversão de energia/metabolismo	Repressão
Alquil hidroperóxido redutase (subunidade C)	15	Modificações pós-traducionais/ <i>turnover</i> de proteínas/chaperona	Repressão
Superóxido dismutase	17	Transporte de íons inorgânicos e metabolismo	Repressão
Gamma-carboxigeranoil-CoA hidratase	20	Metabolismo lipídico	Repressão
Desidrogenase de cadeia curta (putativa)	21	Biossíntese de metabólitos secundários, transporte, catabolismo	Repressão
Flagelina tipo B	22	Motilidade celular e secreção	Repressão
Glutamina sintetase	2	Transporte e metabolismo de aminoácidos	Repressão

PROTEÍNA COM MELHOR HOMOLOGIA	SPOT	CATEGORIA	EFEITO DO TRATAMENTO
Proteína hipotética PA3981	8	Mecanismos de transdução de sinais	Estímulo
Beta-alanina-piruvato transaminase	6	Metabolismo de coenzima	Estímulo
Piruvato quinase	3	Transporte e metabolismo de carboidratos	Estímulo
Aldeído desidrogenase (putativa)	4	Produção e conversão de energia	Estímulo
L-ornitina N5-oxigenase	5	Biosíntese de metabólitos secundários, transporte, catabolismo	Estímulo
Proteína hipotética PA3539	14	Desconhecida	Estímulo
Uracil fosforibosiltransferase	16	Transporte e metabolismo de nucleotídeos	Estímulo
Metionil-tRNA sintetase	18	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	Estímulo
Fator inibitório de CFTR (Cif)	12	Hidrolase (fator de virulência)	Estímulo

8. CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Karine Rigon Zimmer

Local e data de nascimento: Santo Ângelo, RS, Brasil, 14/02/1980

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, laboratório 217

Telefone profissional: (51) 3308 6082

E-mail: karorzimmer@gmail.com

2. FORMAÇÃO

2008-2012: Doutorado em Biologia Celular e Molecular - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Título da tese : Atividade Antibiofilme e Antibiótica da Cera dos Ovos e de Metabólitos Produzidos por Bactérias Associadas ao Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2006-2007: Master en Microbiologie – Mention : Santé, Spécialité : Interactions Moléculaires et Pathologies Humaines, Recherche Thérapeutique – Faculté de Pharmacie - Université de Picardie Jules Verne – UPJV, Amiens, France.

Título da Dissertação: Impact d'une Colostomie sur la Flora Intestinale et la Translocation Bactérienne chez les rats : Effet Régulateur de *L. acidophilus* Souche LB.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Catherine Demailly-Mullié

Bolsista: Alban Office/Co-operation Office (Bolsas de Alto Nível da Comunidade Européia).

Equivalência para fins de validade Nacional: Título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular** de acordo com o parecer do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) conforme processo nº23078.003981/08-42.

2004-2004: Especialização em Análises Clínicas. Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. Total de curso teórico e curso prático: 420 horas.

Título da Monografia: Avaliação de Métodos Fenotípico e Genotípico de Detecção de Resistência à Oxacilina em *Staphylococcus aureus*.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

1998-2002: Graduação em Farmácia – Farm. Bioquímico - Pontifícia Universidade Católica do RS (PUCRS), Porto Alegre, RS.

Título da Monografia: A Influência do Gênero e da Atividade Física nos Níveis de Colinesterase em Indivíduos Sadios.

Orientador: Prof^a Dr^a. Flávia Valladão Thiesen

3. ESTÁGIOS

3.1. Estágio Docente

Local: Departamento de Produção de Matéria Prima (Disciplina de Tecnologia Bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Nº de horas: 60 horas

Período: agosto de 2008 a setembro de 2010

Atividades realizadas: Acompanhou e auxiliou o professor da disciplina na preparação da parte prática e teórica. Auxiliou os alunos de Tecnologia Bioquímica no desenvolvimento das aulas práticas, assim como na resolução de problemas e exercícios dos conteúdos ministrados.

3.2. Demais Atividades Docentes

3.2.1. Participação em Banca de Trabalhos de Conclusão de Curso de Especialização

A) Aluno: Andresa Neckel Batalha

Título: Fatores de interferência nos níveis de colinesterase plasmática

Local: Instituto de Toxicologia, Especialização em Toxicologia Aplicada - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Data: 13 de agosto de 2010

3.2.2. Participação em Banca de Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação

A) Aluno: Carine Lavarda

Título: Validação de método analítico e determinação da uniformidade de conteúdo de cápsulas de bromazepam produzidas em algumas farmácias de Santa Rosa e Santo Ângelo - RS

Local: Faculdade de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS

Data: 13 de julho de 2006

B) Aluno: Eduardo Mousquer Ritter

Título: Estudo preliminar da estabilidade de cremes de hidroquinona em farmácias do município de Santo Ângelo - RS

Local: Faculdade de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS

Data: 07 de julho de 2006

3.3. Estágio Curricular

Local: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS

Vínculo: Estágio integrante da Especialização em Análises Clínicas

Atividade: Estagiou junto ao Farmacêutico responsável em todos os setores do

Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Período: março de 2004 a dezembro de 2004

Local: Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, RS

Vínculo: Estágio curricular de Graduação

Atividade: Estagiou junto ao Farmacêutico responsável em todos os setores do Laboratório de Análises Clínicas do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

Período: agosto de 2002 a dezembro de 2002

3.4. Estágios em Laboratórios de Pesquisa: Bolsista de Iniciação Científica

Local: Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Atílio De Carli

Atividade: Bolsista de Iniciação Científica (BPA- PUCRS)

Período: março de 1999 a dezembro 1999

4. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

A) Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Dom João Becker, Gravataí, RS

Vínculo: Celetista

Atividade: Farmacêutica Bioquímica

Período: julho de 2004 a novembro de 2004

B) Farmácia Couto, Gravataí, RS

Vínculo: Celetista

Atividade: Farmacêutica responsável técnica

Período: setembro de 2004 a março de 2005

C) Farmácia Tiaraju, Santo Ângelo, RS

Vínculo: Celetista

Atividade: Farmacêutica responsável técnica e gerente

Período: abril de 2003 a abril de 2004

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

A) Título: *A Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual activity: peptidase and antimicrobial.

Autores: Oldiges D. P., Parizi L. F., **Zimmer K. R.**, Lorenzini, D., Seixas A., Masuda A., Da Silva Vaz Jr I., Termignoni C. *International Journal for Parasitology*, 42: 635-645, **2012**.

B) Título: Influence of physical exercise and gender on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in human blood samples.

Autores: **Zimmer K. R.**, Lencina, C. L., Zimmer A. R., Thiesen F. V. *International Journal of Environmental Health Research*, 22: 279-286, **2011**

C) Título: Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles.

Autores: Trentin, D. S., Giordani R. B., **Zimmer K. R.**, Gomes-Silva A., Silva M. V, Correia M.T.S., Baumvol I. J. R., Macedo A.J. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 327-335, **2011**.

D) Título: Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico

Autores: Zimmer K. R., Borré G. L., Trentin D. S., Junior C. W., Frasson A. P., Graeff A. A., Macedo, A. J. *Revista Liberato* (Novo Hamburgo), 10: 123-137, **2009**.

E) Título: Impact of colostomy on intestinal microflora and bacterial translocation in young rats fed with heat-killed *Lactobacillus acidophilus* Strain LB

Autores: Rigon-Zimmer K., Mullié C., Tir-Touil-Meddah A., Buisson P., Léké L., Canarelli J.P. *Folia Microbiologica* 53: 89-93, **2008**.

F) Título: Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis and biological evaluation of novel *N*-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-*O*-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents

Autores: Gnoatto, S. C. B., Susplugas, S., Vechia, L. D., Ferreira, T. B., Dassonville-Klimpt, A., Zimmer, K. R., Demailly, C., Nascimento, S. D., Guillon, J., Grellier, P., Verli, H., Gosmann, G., Sonnet, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 771-782, **2008**.

6. RESUMOS E TRABALHOS EM CONGRESSOS

A) Nome do Trabalho: Modulação de biofilmes bacterianos por compostos obtidos dos ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Autores: Zimmer K. R., Giordani, R. B., Macedo A.J., Nicastro G.G., Baldini R.L., Termignoni, C.

Congresso: 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Local: Foz do Iguaçu/PR, Brasil

Data: 2011

B) Nome do Trabalho: Stem-bark extracts from Brazilian Caatinga plants prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation through bacteriostatic properties

Autores: Trentin D. S., Amaral M.W., Giordani R. B., **Zimmer K. R.**, Silva M. V., Macedo A.J.

Congresso: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Local: Foz do Iguaçu/PR, Brasil

Data: 2011

C) Nome do Trabalho: VTDC: a cathepsin L-like enzyme with antimicrobial properties

Autores: Seixas A., Oldiges D.P., Parizi L.F., **Zimmer K. R.**, da Silva Vaz Junior I., Termingnoni C.

Congresso: Sixth International Symposium on Molecular Insect Science

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Local: Amsterdã/Bélgica

Data: 2011

D) Nome do Trabalho: Modulation of bacterial biofilms by compounds obtained from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs

Autores: **Zimmer K. R.**, Giordani R. B., Nicastro G.G., Boechat A.L., Baldini R.L., Macedo A.J., Termingnoni C.

Congresso: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP)

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Local: Ouro Preto/MG, Brasil

Data: 2011

E) Nome do Trabalho: Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles

Autores: Trentin D. S., Giordani R. B., **Zimmer K. R.**, Gomes-Silva A., Da Silva M.V., Correia M. T. S., Baumvol I. J.R.

Congresso: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP)

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Local: Ouro Preto/MG, Brasil

Data: 2011

- F) Nome do Trabalho:** Antibacterial activity of Brazilian Caatinga plants and its potential to avoid adherence and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*
Autores: Giordani R. B., Trentin D. S., Amaral M.W., **Zimmer K. R.**, Da Silva M.V., Macedo A.J.
Congresso: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP)
Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento
Local: Ouro Preto/MG, Brasil
Data: 2011
- G) Nome do Trabalho:** Atividade antibiofilme de extratos oriundos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
Autores: **Zimmer K. R.**, Macedo A. J., Termignoni C.
Congresso: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia
Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento
Local: Porto de Galinhas/RE, Brasil
Data: 2009
- H) Nome do Trabalho:** Modulation of microbial biofilms by compounds obtained of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs
Autores: **Zimmer K. R.**, Macedo A. J., Termignoni C.
Congresso: 38º Reunião Anual da SBBq
Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento.
Local: Águas de Lindóia/SP, Brasil
Data: 2009
- I) Nome do Trabalho:** Impact of colostomy on intestinal microflora and bacterial translocation in young rats fed heat-killed *Lactobacillus acidophilus*
Autores: **Zimmer K. R.**, Mullié C., Fontaine N., Tir-Touil-Meddah A., Buisson P., Léké L., Canarelli J.P.
Congresso: 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento
Local: Nice, França
Data: 2006

J) Nome do Trabalho: Disco de cefoxitina é comparável ao disco de oxacilina para detectar resistência à metilicina mediada pelo gene *mecA* em *Staphylococcus aureus*?

Autores: Barth A. L., Zimmer K. R., Machado A. B. M. P., Lutz L.

Congresso: 23º Congresso Brasileiro de Microbiologia

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos

Local: Santos/SP, Brasil

Data: 2005

K) Nome do trabalho: Avaliação de métodos fenotípico e genotípico na detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*

Autores: Zimmer K. R., Machado A. B. M. P., Lutz L., Barth A. L.

Congresso: VI Sul Encontro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, IV Encontro Gaúcho de Microbiologia Aplicada ao Controle de Infecção Hospitalar

Local: Gramado/RS, Brasil

Forma de apresentação: Pôster e Resumo publicado no caderno de resumos do evento

Data: 2005

9. TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Oldiges D. P., Parizi L. F., **Zimmer K. R.**, Lorenzini D., Seixas A., Masuda A., Da Silva Vaz Jr I., Termignoni C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual activity: peptidase and antimicrobial. *International Journal for Parasitology*, 42: 635-645, **2012**.

Zimmer K. R., Lencina, C. L., Zimmer A. R., Thiesen F. V. Influence of physical exercise and gender on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in human blood samples, *International Journal of Environmental Health Research*, 22: 279-286, **2011**.

Trentin D. S., Giordani R. B., **Zimmer K. R.**, Gomes-Silva A., Silva M. V., Correia M.T.S., Baumvol I. J. R., Macedo A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 327-335, **2011**.

Zimmer K. R., Borré G. L., Trentin D. S., Junior C. W., Frasson A. P., Graeff A. A., Macedo, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato* (Novo Hamburgo), 10: 123-137, **2009**.