

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

**DETECÇÃO DE NANO-PARTÍCULAS CALCIFICANTES
(NPC) EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

**Cíntia de David
Farmacêutica-Bioquímica – UFSM**

**Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril, 2006.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Amauri Simonetti, pela oportunidade, pela amizade, e pela orientação neste trabalho.

Ao professor Paulo Roehe, pela oportunidade de trabalhar com uma equipe tão boa, pela amizade e incentivo prestados ao longo desses dois anos, além da grande colaboração na orientação deste trabalho.

Ao Frans Rijsewijk, pela amizade, pelo grande auxílio no laboratório e pelo incentivo constante para contribuir com a pesquisa, e também à Ana Cláudia, pela amizade.

À professora Gelsa Englert, em nome do PPGEM, pela obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica e interpretação dos resultados.

Ao Dr. Carlos Teodósio da Ros, pela gentileza de ceder as amostras de cálculos renais para análise.

Ao Laboratório Adolpho Lutz de Santa Rosa, pelas amostras de soros de humanos gentilmente cedidas.

Aos queridos Paulo Augusto Esteves e Alessandra D'ávila da Silva pelo carinho de sempre, e por acreditarem em mim e me apoiarem sempre, me incentivando na vida pessoal e profissional.

À minha amiga Anna Paula de Oliveira, pela ajuda e paciência, pelo companheirismo e pelo apoio em todas as horas.

Às amigas do mestrado, Melissa, Daniele e Ana Carolina, pelo carinho e companheirismo.

Aos colegas de laboratório, Samuel, Diógenes, Ricardo, Thaís, Fernanda, Juliana, Karine, Paula, Daniel, Tamahine, Marco, Helena, Eduardo, pela amizade, pelo apoio e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos funcionários do IPVDF, pelo apoio e suporte na realização dos experimentos.

Às amigas que sempre estiveram me apoiando, Adriana, Raquel, Andressa, Lilia, Sabrina, Clarissa, Ângela e Daiane.

Ao Arthur Pereira Filho e a sua família querida, por todo o apoio e carinho que me deram durante o tempo em que estivemos juntos.

Em especial à minha família que sempre foi a base de tudo, estando do meu lado em todos os momentos e me incentivando. Agradeço a cada um: Pai, Mãe, Gustavo, Felipe, Henrique e Vô, pelo amor e carinho dedicados sempre.

DETECÇÃO DE NANO-PARTÍCULAS CALCIFICANTES (NPC) EM MATERIAIS BIOLÓGICOS

Autor: Cíntia de David

Orientador: Dr. Amauri Braga Simonetti

Co-orientador: Dr. Paulo Michel Roehe

¹RESUMO

Nanobactérias (NB) são estruturas não convencionais, com tamanho de 100 a 1000 vezes menor do que bactérias comuns; além disso, sua taxa de crescimento é muito lenta, o que torna sua detecção difícil pelos métodos convencionais. Estas estruturas têm sido isoladas do meio ambiente e, também, em amostras de sangue e urina de animais e humanos, com um envoltório de apatita (fosfato de cálcio) em sua parede celular, relacionando-as à formação de cálculos renais e de outras calcificações patológicas. Os objetivos deste estudo foram analisar diversos materiais biológicos por diferentes metodologias para se verificar a presença de estruturas morfológicamente semelhantes a NB, às quais denominamos de Nano-Partículas Calcificantes (NPC), além de padronizar um teste de ELISA para detecção de anticorpos contra estas estruturas. As amostras foram analisadas utilizando-se as técnicas de microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, imunofluorescência indireta e ELISA. O uso de microscopia ótica e eletrônica permitiu a observação de partículas com morfologia muito semelhante às NB nas amostras de linhagens celulares, de soro fetal bovino comercial e de cálculos renais humanos. Utilizando-se soros de animais imunizados com NPC, resultados preliminares evidenciaram que o teste de ELISA mostrou boa especificidade.

¹Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69 p). Abril, 2006.

DETECTION OF CALCIFYING NANO-PARTICLES (CNP) IN BIOLOGICAL MATERIALS

Author: Cíntia de David

Advisor: Amauri Braga Simonetti

Co-advisor: Paulo Michel Roehe

²ABSTRACT

Nanobacteria (NB) are unconventional agents, 100 to 1000-fold smaller than common bacteria; furthermore, their multiplication rate is very slow, making their detection difficult using standard microbiological methods. These structures have been isolated as from environment as human and animal blood and urine. They produce a carbonate apatite (calcium phosphate) layer and they have been associated to kidney stone formation and other pathological calcifications. The aims of this study were analyze various biological materials using different methods to verify the presence of these structures morphologically similar to NB, named as Calcifying Nano-Particles (CNP), and to develop an ELISA test to detect antibodies against these structures. The samples were analyzed using optical microscopy, scanning electron microscopy, indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The optical and electron microscopy allowed us to observe particles with morphology closely similar to NB on cell lineages, commercial fetal bovine sera and human kidney stones samples. Using sera collected from animal immunized with CNP, preliminary results displayed a good specificity of ELISA test.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69 p). April, 2006.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
RELAÇÃO DE TABELAS.....	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.Descoberta das nanobactérias.....	3
2.2.Propriedades das nanobactérias.....	4
2.3.Nanobactérias em materiais biológicos.....	6
2.4.Nanobactérias associadas a patologias.....	8
2.5.Doenças renais.....	8
2.6.Doenças vasculares/cardíacas.....	10
2.7.Câncer.....	11
2.8.Outras doenças humanas.....	12
2.9.Experimentos em animais.....	13
2.10.Nanobactérias e o meio ambiente.....	14
2.11.Nanobactérias frente a agentes físicos, químicos e antimicrobianos....	15
2.12.Controvérsia.....	18
2.13.Detecção e identificação das nanobactérias.....	20
2.13.1.Colorações.....	20
2.13.2.Cultivo.....	21
2.13.3.Testes imunológicos.....	21
2.13.3.1.ELISA.....	21
2.13.3.2.Imunohistoquímica.....	22
2.13.3.3.Imunofluorescência.....	23
2.13.3.4.SDS-PAGE/Western blot.....	23
2.13.4.Microscopia ótica e eletrônica.....	24
2.13.5.Testes moleculares.....	26
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Materiais biológicos analisados.....	28
3.1.1.Soros utilizados como suplemento de cultivos.....	28
3.1.2. Soros de bovinos.....	29
3.1.3. Soros humanos.....	29
3.1.4. Linhagens celulares.....	30
3.1.5. Cálculos renais.....	30
3.2. Microscopia.....	32
3.2.1. Microscopia ótica.....	32
3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
3.3. Produção de antígeno.....	33
3.4. Produção de anticorpos policlonais.....	34
3.5. Padronização do método de imunofluorescência indireta (IFI).....	34
3.6. Padronização do método de ELISA.....	35
3.6.1.Procedimento geral.....	35
3.6.2.Teste com soros de camundongos.....	36
3.6.3.Teste com soros de coelhos.....	36
3.6.4.Teste com soros de humanos.....	37

3.6.5. Teste com soros de bovinos.....	37
3.6.6. Teste de especificidade do ELISA.....	37
3.7. Teste da hidroxiapatita.....	38
3.8. Extração de DNA.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Cultivo de NPC.....	39
4.2. Microscopia ótica.....	40
4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
4.4. Padronização do método de imunofluorescência indireta (IFI).....	42
4.5. Padronização do método de ELISA.....	43
4.5.1. Teste com soros de camundongos.....	43
4.5.2. Teste com soros de coelhos.....	43
4.5.3. Teste com soros de humanos.....	44
4.5.4. Teste com soros de bovinos.....	44
4.5.5. Especificidade do teste de ELISA.....	44
4.6. Teste da hidroxiapatita.....	44
4.7. Extração de DNA.....	45
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE.....	68
VITA.....	69

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades das NB e de vírus, bactérias e prions ^a (adaptado de Aho & Kajander, 2003).....	6
Tabela 2	Amostras de soro fetal bovino comercial analisadas neste estudo.....	29
Tabela 3	Linhagens celulares examinadas neste estudo.....	31

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	NB cultivadas em DMEM com 10% SFB.....	25
Figura 2	NB cultivadas em DMEM com 10% SFB após 3 meses.....	25
Figura 3	Calcita retirada de fonte de água quente, na Itália.....	25
Figura 4	Aspecto do soro fetal bovino (SFB) antes e após incubação a 37 °C por 8 semanas.....	39
Figura 5	Cultivo de células MDBK após uma semana de incubação a 37 °C.....	40
Figura 6	SFB após 8 semanas de cultivo.....	41
Figura 7	Cultivo de células MDBK.....	41
Figura 8	Cálculo renal sem tratamento prévio por HCl.....	41
Figura 9	Cálculo renal após tratamento com HCl.....	42
Figura 10	Células MDBK ao microscópio de fluorescência.....	42
Figura 11	ELISA de soros de coelhos imunizados e controles negativos.....	43
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose de hidroxiapatita ligada ao DNA de <i>E.coli</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- DMEM:** [Dulbecco's Modified Eagle Medium](#)
DNA: ácido desoxirribonucléico
EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*
EDX: *Energy Dispersive X-Ray*
ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
E-MEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*
EUA: Estados Unidos da América
HCl: ácido clorídrico
H₂SO₄: ácido sulfúrico
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IFI: imunofluorescência indireta
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
kD: *kilo Dalton*
MDBK: *Madin-Darby Bovine Kidney*
MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney*
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA: ácido ribonucléico – mensageiro
NaOH: hidróxido de sódio
NB: nanobactéria
NPC: nano-partículas calcificantes
OPD: ortofenilenodiamina
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: reação em cadeia da polimerase
RNAr: ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR: transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase
SFB: soro fetal bovino
^{99m}Tc: Tecnécio 99
SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography*
SDS-PAGE: *Sodium dodecil sulfato-poliacrylamide gel electrophoresis*

1. INTRODUÇÃO

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

Nanobactérias (NB) são estruturas não convencionais, com tamanho de 100 a 1000 vezes menor do que bactérias comuns; além disso, sua taxa de crescimento é muito lenta, o que torna sua detecção difícil pelos métodos convencionais. As NB produzem uma cápsula de apatita biogênica em sua superfície sob condições fisiológicas e, portanto, são suspeitas de mediar a

formação de calcificações patológicas em tecidos biológicos, contribuindo assim, com o desenvolvimento de muitas doenças crônicas.

Para a identificação destas estruturas têm sido relatados métodos de cultivo, microscopia eletrônica, métodos imunológicos e moleculares. Até o momento, somente um trabalho sobre a presença destas estruturas em mineral oriundo de Carajás e de Urucum foi publicado no Brasil. Portanto, seria de grande importância em nosso meio o desenvolvimento de estudos sobre estas estruturas devido à sua ampla distribuição na natureza e possíveis patologias às quais poderiam estar associadas. Uma vez padronizados os métodos de detecção, os mesmos poderão servir de auxílio na identificação de possíveis contaminações de cultivos celulares, além de possibilitar estudos epidemiológicos e de interesse ambiental. Levando em consideração esses aspectos, os objetivos deste estudo foram padronizar um teste de ELISA para detecção de anticorpos contra estruturas semelhantes, que denominamos de Nano-Partículas Calcificantes (NPC), além da análise de diversos materiais biológicos por diferentes metodologias para se verificar a presença destas estruturas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descoberta das nanobactérias

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

Na década de 90, pesquisadores da Universidade de Kuopio, na Finlândia, descobriram partículas ultrafiltráveis como contaminantes em culturas celulares humanas, nas quais as células sofriam apoptose após algum tempo de incubação (Kajander & Çiftçioglu, 1998). Estas estruturas semelhantes a bactérias foram inicialmente observadas em cultivos de longa duração e a pista inicial sobre sua natureza foi durante a realização de cultivos onde se utilizava o mesmo tipo de células em meios, cuja única diferença era o soro utilizado como suplemento. Na presença de um determinado lote de soro, que continha tais estruturas, as células morriam dentro de quatro semanas. O frasco desta cultura apresentava uma camada esbranquiçada na sua base (Kajander *et al.*, 1997). A partir daí foram realizados vários testes para a

identificação destas estruturas, assim como para determinar as suas propriedades microbiológicas, bioquímicas e moleculares (Kajander *et al.*, 1997; Åkerman *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioğlu, 1998). O mesmo grupo de pesquisadores também observou estruturas similares em amostras de sangue e urina de humanos, com um envoltório de apatita (fosfato de cálcio) ao seu redor, relacionando-as à formação de cálculos renais (Çiftçioğlu & Kajander 1998). O nome sugerido, *Nanobacterium sanguineum*, refere-se ao seu pequeno tamanho e ao seu habitat, o sangue. (Kajander *et al.*, 2001a).

2.2. Propriedades das nanobactérias

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

As NB produzem efeitos citotóxicos em cultivos celulares, invadindo células de mamíferos de diferentes maneiras (Kajander *et al.*, 1997). Elas podem produzir vacuolização e lise celular, apresentando uma maneira especial de invadir as células: ativam células, que normalmente não são fagocíticas, a fazê-lo (Çiftçioğlu & Kajander, 1998). Utilizando fibroblastos 3T6,

Çiftçioglu & Kajander (1998) demonstraram que as NB produzem células apoptóticas que se caracterizam por uma série de alterações morfológicas definidas, incluindo condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento do citoplasma, alterações na membrana celular e separação das células vizinhas.

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

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

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

^a+, presente; -, ausente.

2.3. Nanobactérias em materiais biológicos

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

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

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

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

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

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

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

2.4.Nanobactérias associadas a patologias

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

2.5.Doenças renais

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

A biomineralização em meio de cultivo celular resultou em biofilmes e agregados minerais extremamente semelhantes aos encontrados em calcificações de tecidos e em cálculos renais (Çiftçioglu & Kajander, 1998). Um estudo comparou 72 cálculos renais de pacientes finlandeses com amostras de NB utilizando a MEV, e ressaltou a semelhança no tamanho e na morfologia das NB e das menores unidades de apatita dos cálculos renais. Após tratamento com 1N HCl, NB puderam ser cultivadas de 93,1% dos cálculos (Çiftçioglu *et al.*, 1999). O produto microbiano mais encontrado em fluidos de Doença do Rim Policístico é a endotoxina bacteriana. Foram cultivadas NB de 11 dos 13 rins doentes, visualizados em 8 de 8 rins por MET e detectados por métodos imunológicos em todos os 13 rins doentes. Antígenos de NB foram detectados na urina de 7 dos 7 homens doentes, 1 de 7 mulheres doentes, 3 de 10 homens saudáveis e 1 de 10 mulheres saudáveis (Hjelle *et al.*, 2000). Conte e cols. pesquisaram a presença de NB em 1000 cálculos renais, detectando-as em apenas 5, ou seja, 0,5%. Concluíram, com isso, que as NB podem exercer um papel importante no desenvolvimento de cálculos, induzindo a formação de núcleos de oxalato de cálcio e ácido úrico. Segundo eles, no entanto, este mecanismo não é comum e deveria ser associado a outros fatores de risco litogênicos (Conte *et al.*, 2001).

Observações da ocorrência de um aumento na formação de cálculos renais em astronautas durante ou após missões de longa duração à gravidade zero, por Neva Çiftçioglu *et al.*, levou-os a investigar os efeitos da microgravidade no desenvolvimento de cálculos renais. Com base em suas pesquisas anteriores, em que se associou a presença de NB em cálculos

renais a uma função ativa na deposição de fosfato-carbonato de cálcio nos rins, resolveram estudar o efeito da microgravidade na multiplicação e calcificação das NB *in vitro*. O estudo revelou um aumento no grau de multiplicação de NB em condições simuladas de microgravidade. Assim, infecções por NB podem ter um papel importante na formação de cálculos renais em membros do grupo durante vôos espaciais (Çiftçioglu *et al.*, 2005).

2.6. Doenças vasculares/cardíacas

Um estudo recente sugere que calcificações desencadeadas por NB podem exercer alguma função no desenvolvimento da doença arterial coronariana (Maniscalco & Taylor, 2004). As nanopartículas isoladas de cálculos renais de humanos são encapsuladas com hidroxiapatita, o mineral de cálcio encontrado em tecidos ateroscleróticos (Kajander & Çiftçioglu, 1998). Miller *et al.* (2004) identificaram a presença de estruturas semelhantes a NB em tecidos humanos calcificados de 4 diferentes origens: placa da carótida, válvula cardíaca, aneurisma da aorta e placa da artéria femoral. As estruturas estavam presentes em áreas contendo fosfato de cálcio pela coloração de Von Kossa e microanálise de raio-X, e eram semelhantes às estruturas descritas como NB cultivadas de cálculos renais (Kajander & Çiftçioglu, 1998). Estruturas auto-replicáveis contendo ácidos nucleicos foram cultivadas de homogeneizados filtrados de dois aneurismas calcificados da aorta, ao passo que a aorta não calcificada usada como controle não revelou tais estruturas (Miller, *et al.*, 2004). Preece *et al.* demonstraram que os bifosfonados (etidronato e clodronato) inibem a calcificação arterial (Preece *et al.* 2001). Um estudo mostrou que estes

compostos inibiram completamente o crescimento de NB bloqueando a agregação, o crescimento e a mineralização desses cristais (Çiftçioglu *et al.*, 2002).

2.7.Câncer

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

formação de depósitos de cálcio conhecidos como corpos de psammoma (Hudelist, *et al*, 2004).

2.8.Outras doenças humanas

Várias outras doenças têm sido relacionadas com o processo de calcificação atribuído às NB (Kajander *et al.*, 2001b); dentre elas a catarata, Doença de Alzheimer, calcificação da artéria coronária, doença aterosclerótica vascular calcificante e cardiovascular, artrite, calcificação do tecido mole na mama e tecido prostático, psoríase e eczema, calcificação na glândula pineal, autismo, calcificação de tecido canceroso, cálculos renais e doença do rim policístico. É possível que o significado médico das NB seja mais extenso, incluindo sua participação em cálculos biliares e nos processos de demência, artropatias e depósitos de cálcio no organismo, tais como observado na esclerodermia (Carson, 1998; Travis, 1998).

Têm-se demonstrado que as NB infectam fibroblastos e, assim, elas poderiam aumentar a formação de colágeno, pela ativação dos fibroblastos. Em casos de implantes mamários, isso poderia causar a retração da cápsula fibrosa mamária. A formação de biofilmes em culturas negativas da cápsula mamária pode ser explicada pela presença de NB, que não são detectadas normalmente, com os métodos microbiológicos comuns (Gundeslioglu *et al.*, 2005).

Um estudo realizado na Turquia utilizando placas dentárias indicou a presença de antígenos de NB nas placas desmineralizadas. Além disso, encontrou-se uma alta incidência de cálculos renais e cálculos biliares no grupo

de pacientes e em seus familiares. Estudos *in vitro* foram realizados utilizando-se dentes molares. Os dentes foram incubados com NB, onde se observou que as NB podem provocar a formação de placas de apatita na superfície do dente (Çiftçioglu *et al.*, 1998b). Além disso, tem-se estudado a aterosclerose coronária como sendo uma doença inflamatória em que infecções dentárias crônicas podem desencadear mecanismos patogênicos nas paredes das artérias. Çiftçioglu *et al.* (2003) propõem que as NB sejam uma potencial ligação entre doenças periodontais e doenças coronarianas periféricas, o que requer estudos complementares.

2.9.Experimentos em animais

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

calcificações nos túbulos renais e várias manifestações de infecção (Shiekh, 2006).

2.10. Nanobactérias e o meio ambiente

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

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

Folk, durante um estudo em fontes de calcáreo, encontrou através da microscopia eletrônica de varredura, objetos minúsculos com formas esferoidais e ovóides na calcita e na aragonita. Devido às semelhanças entre esses objetos e as eubactérias (*Cocci*, *Bacilli*, *Streptococci* e *Staphylococci*), e devido a sua tendência em aparecer em cachos ou correntes, inicialmente foi proposto que se tratavam de “formas anãs” ou “nannobacterias” (Folk, 1992; 1993b), ou seus equivalentes fossilizados (McKay *et al.*, 1996). Desde então, esses objetos em escala nanométrica têm sido associados a microorganismos fossilizados em carbonatos, sulfitos, óxidos, argilas e outros silicatos (Folk, 1992, 1993a, 1993b, 1995; Pedone and Folk, 1996; Vasconcelos and McKenzie, 1997; Sillitoe *et al.*, 1996; Folk and Lynch, 1997), e em rochas extraterrestres, incluindo o meteorito de Marte ALH84001, e os meteoritos

carbonáceos Allende and Murchison (McKay *et al.*, 1996; Tsuchiyama, 1996; Folk and Lynch, 1997, 1998; Folk *et al.*, 1998; Thomas-Keprta *et al.*, 1998); e ainda o meteorito de Tataouine (Benzerara *et al.*, 2003).

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

Uwins *et al.* (1998) observaram o aparecimento de “nano-organismos” ou “nanobes” em amostras de arenito e outros substratos provenientes da Austrália. De acordo com as propriedades encontradas em seus estudos, eles acreditam tratar-se realmente de estruturas biológicas. Estes organismos possuem características muito semelhantes às isoladas por Kajander e Çiftçioglu (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu *et al.*, 1994).

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

2.11.Nanobactérias frente a agentes físicos, químicos e antimicrobianos

NB calcificadas são muito resistentes à ação química, ao calor, às radiações ultravioleta e gama, podendo sobreviver em estado liofilizado por longos períodos de tempo (Kajander *et al.*, 1997, 1998b; Kajander & Çiftçioglu, 2004). Uma maneira que se mostrou efetiva na eliminação de NB por agentes

químicos foi a desmineralização. A apatita pode ser dissolvida em pH muito baixo ou com quelantes de cálcio, como o EDTA. Em doses elevadas, a irradiação gama é um método eficiente de eliminação de NB; doses de 3 mega Rad são necessárias para destruí-las completamente (Kajander *et al.*, 1997, 1998b). A utilização tradicional de esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos é um método ineficiente para a esterilização de materiais contaminados com NB, havendo apenas uma redução na quantidade desses organismos. O mesmo ocorre após tratamento com radiação ultravioleta (Kajander *et al.*, 1997, 1998b; Björklund *et al.*, 1998). O aquecimento a 100 °C por 30 minutos previne o seu crescimento em subcultivos (Kajander *et al.*, 1997).

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

As cápsulas sólidas de cálcio-apatita que envolvem as NB conferem-lhes proteção contra muitos antibióticos, embora sejam bastante sensíveis às tetraciclina (Çiftçioğlu *et al.*, 2002). As tetraciclina são conhecidas por se ligarem ao cálcio. Acredita-se que as tetraciclina ligam-se e acumulam-se sobre o revestimento de cálcio das NB, persistindo por longos períodos de tempo, o que seria um fator relevante devido ao lento crescimento destes

organismos (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu *et al.*, 2002). Por este motivo, as tetraciclina têm sido utilizadas para o tratamento de doenças onde ocorrem calcificações patológicas, como artrites (Dorrell, 1999), aterosclerose e doenças coronarianas (Maniscalco & Taylor, 2004; Puskas *et al.*, 2005) e cálculos prostáticos (Shoskes *et al.*, 2005).

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

Para desinfecção de objetos contaminados com NB, propõe-se a exposição das mesmas a uma solução desinfetante contendo persulfato de

potássio e ácido sulfaminóico em água, preferencialmente destilada. Alternativamente, propõe-se a mistura de glutaraldeído, glioxil, ácido glioxílico, cloreto de lauril dimetil benzil amônio em água, de preferência destilada. O estudo propõe que as NB podem ser erradicadas de líquidos através da sonicação, cujo tempo deverá variar conforme a potência do sonicador, além do volume e das características do líquido a ser desinfetado (Kajander & Çiftçioğlu, 2004).

2.12. Controvérsia

Nanobactérias são consideradas por muitos cientistas como muito pequenas para conter o material genético e enzimático essencial para uma célula manter-se viva (Maniloff, 1997; Neelson, 1997; Psenner & Loferer, 1997; Harvey, 1997). Outros cientistas sustentam que estas minúsculas estruturas são formadas por processos geológicos e não biológicos, por elas possuírem um tamanho que pode ser até 1000 vezes menor do que o tamanho de bactérias típicas. Cisar *et al.* (2000) acreditam que a aparente replicação das NB poderia ser devido à cristalização do meio de cultivo e que se tratam de compostos minerais capazes de se auto-replicarem. Os mesmos autores, utilizando a técnica de PCR, contestaram a presença de ácidos nucleicos nas NB, afirmando que os resultados encontrados por Kajander & Çiftçioğlu (1998), utilizando a mesma técnica, detectaram ácidos nucleicos de um contaminante das amostras.

Para os críticos, até agora, os experimentos realizados para confirmar a presença de NB em soro humano, cálculos renais e urina falharam.

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

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

Como mencionado anteriormente, embora sugerido no artigo de Uwins *et al.* (1998) que as estruturas denominadas por eles de “nanobes” se tratam de organismos biológicos, outro autor do mesmo artigo (Taylor,

comunicação via eletrônica) discorda desta conclusão e sugere que estas estruturas não seriam biológicas, mas compostos de silicone auto-agregáveis.

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

2.13.Detecção e identificação das nanobactérias

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

2.13.1.Colorações

As NB podem ser detectadas através de algumas colorações especiais. A coloração de Gram, quando realizada após fixação do material a 70 °C por 10 min, revelou a presença de partículas fracamente gram-negativas

(Kajander *et al.*, 1997). Elas podem ser bem visualizadas com as colorações de Jones e de Bielschowsky (pela prata), coloração por thioflavin-S e pelo vermelho Congo (Kajander *et al.*, 1997). A coloração de von Kossa, que demonstra a presença de cálcio ou sais de cálcio em tecidos ou cultivos celulares, tem sido utilizada juntamente com outras técnicas para determinar a presença de NB em calcificações patológicas (Çiftçioğlu *et al.*, 1998a).

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

2.13.2.Cultivo

NB crescem sob as condições utilizadas em cultivos celulares de mamíferos (Kajander & Çiftçioğlu, 1997; Kajander *et al.*, 2001a), porém, podem ser igualmente cultivadas na ausência de células de mamíferos (Çiftçioğlu & Kajander, 1998).

2.13.3.Testes imunológicos

2.13.3.1.ELISA

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

No caso das NB, os únicos kits comerciais existentes são fornecidos pela empresa NANOBAC Life Sciences, Inc. (Kuopio, Finlândia) e que foram

desenvolvidos para a detecção quantitativa de NB/antígeno nanobacteriano em plasma/soro humano ou anticorpos IgG anti-NB, utilizando anticorpos monoclonais específicos e conjugado anti-IgG marcado com peroxidase (<http://www.nanobaclifesciences.com/nanocapture-elisa.asp>).

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

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

2.13.3.2. Imunohistoquímica

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

2.13.3.3. Imunofluorescência

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

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

2.13.3.4. SDS-PAGE/Western blot

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

2.13.4. Microscopia óptica e eletrônica

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

A microscopia eletrônica é outro método bastante utilizado para a visualização das NB. Em estudo realizado por Kajander & Çiftçioğlu (1997), as NB foram isoladas diretamente de soro fetal bovino diluído 1:5 em PBS, pelo processo de centrifugação a 40,000 x g por 1 h. Os autores utilizaram microscópio eletrônico de varredura (MEV) equipado com EDX (microanálise por energia dispersiva de raio-X). A Figura 1 mostra NB em grumos, de um cultivo em DMEM com 10% SFB, observadas ao MEV. A Figura 2 mostra o mesmo material, analisado pelo MET (Kajander & Çiftçioğlu, 1998). Em fibroblastos infectados com NB, a microscopia eletrônica revelou depósitos de cristais aciculares intra e extracelulares, coráveis com a coloração de von Kossa e lembrando esferas de cálcio encontradas em calcificações patológicas (Çiftçioğlu & Kajander, 1998). A análise por MEV ressaltou a semelhança no tamanho e na morfologia das NB e das menores unidades dos cálculos renais (Çiftçioğlu *et al.*, 1999).

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

Em um trabalho onde foi pesquisada a presença de NB em 10 cálculos retirados do trato urinário superior, observou-se a presença de

nanopartículas em 4 cálculos analisados através de MEV. A MET de monocamadas de células 3T6 revelou formações vacuolares intracitoplasmáticas, contendo partículas de 200 a 500 nm em 3 de 10 cultivos celulares (Drancourt *et al.*, 2003). Barr *et al.* (2003) realizaram um experimento para determinar a prevalência da formação de biofilme sob as condições de cultivos celulares em amostras de soros de gado, cabras, gatos e cães, e determinar a existência de alguma associação entre a formação desses biofilmes e a presença de NB. Na maioria das amostras de soros ocorreu a formação de biofilmes, onde a MEV e a espectrofotometria revelaram pequenas partículas cocóides, consistindo principalmente de cálcio e fosfato.

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

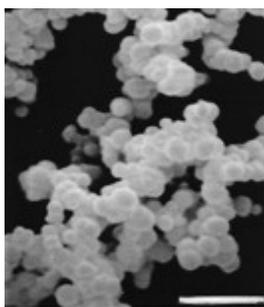


FIGURA 1 – MEV de NB cultivadas em DMEM com 10% SFB (11000X; barra 1 μ m) (Kajander & Çiftçioglu, 1998).

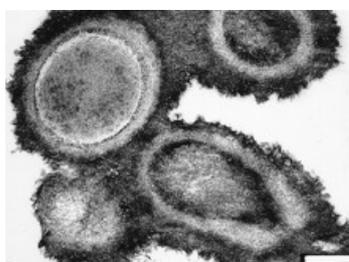


FIGURA 2 – MET de NB cultivadas em DMEM com 10% SFB após 3 meses (35000X; barra 0,2 μ m) (Kajander & Çiftçioglu, 1998).

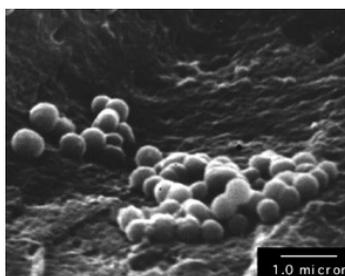


FIGURA 3 – MEV de calcita retirada de fonte de água quente, na Itália (8000X; barra 1 μ m) (Fonte = Mississippi State University).

2.13.5. Testes moleculares

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

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

Utilizando as mesmas seqüências de oligonucleotídeos de rDNA 16S (EMBL X98418 e X98419) da *Nanobacterium sanguineum* utilizadas por Çiftçioglu & Kajander (1998), Cisar *et al.* (2000) realizaram PCR em material extraído de amostras de cultivos de saliva de humanos. Foi observada amplificação de fragmentos de DNA com o tamanho esperado, após 35 ciclos da PCR. Entretanto, um fragmento de tamanho idêntico foi amplificado nas reações de controle realizadas sem adição de amostra (molde) sugerindo, assim, a detecção de 16S rDNA de um contaminante do ambiente. Esta possibilidade foi confirmada pela seqüência de nucleotídeos dos produtos da PCR realizada com os controles da reação, que se mostrou idêntica à seqüência rDNA 16S correspondente à bactéria *Pseudomonas sp.* (GenBank acesso no. AF195876), mas apenas 85,6% de similaridade com a região correspondente da seqüência de *N. sanguineum*.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi executado no laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia-ICBS-UFRGS e no IPVDF (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor-Eldorado do Sul, RS). As análises por microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Corrosão do Departamento de Metalurgia da UFRGS.

3.1.Materiais biológicos analisados

3.1.1.Soros utilizados como suplemento de cultivos

Porções de 1 mL de 8 lotes de soros e de 1 lote de suplemento nutricional de diferentes procedências foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (NUNC) contendo 9 mL de Eagle-Minimal Essential Medium com L-glutamina 2mM (E-MEM, Gibco-BRL) e incubadas em 5% CO₂ / 95% ar, a 37 °C por, pelo menos, 12 semanas. E-MEM livre de soro, incubado nas mesmas condições, foi usado como controle. Os soros incluídos neste estudo estão listados na Tabela 2:

TABELA 2 – Amostras de soro fetal bovino comercial e suplemento comercial analisadas neste estudo.

Soro/Suplemento	Procedência
C100 Supplement - Lote 1107512	*AMNIOMAX
Soro Fetal Bovino - Lote 004/00	CULTILAB, Campinas, SP
Soro Fetal Bovino - Lote 013/04	CULTILAB, Campinas, SP
Soro Fetal Bovino - Lote 014/04	CULTILAB, Campinas, SP
Soro Fetal Bovino - Lote 40F6245K	GIBCO
Soro Fetal Bovino - Lote 40G3329K	GIBCO
Pool de soros bovinos inativado com etilenimina binária	Líder laboratórios, Porto Alegre, RS
Soro eqüino	Faculdade Veterinária – UFSM, Santa Maria, RS
Soro fetal bovino	IPVDF, Eldorado do Sul, RS

Além disso, 2 mL de cada lote foram incubados a 37 °C, sem adição de E-MEM, até 12 semanas.

3.1.2. Soros de bovinos

Foram testados 64 soros de bovinos, provenientes de diferentes fazendas do Rio Grande do Sul, quanto à presença de anticorpos anti-NPC utilizando-se o método de ELISA.

3.1.3. Soros humanos

125 soros de pessoas sem disfunções renais e 32 soros de pacientes hemodialisados, provenientes do Laboratório Adolpho Lutz de Santa Rosa, RS, foram testados utilizando-se o método de ELISA. Todas as amostras utilizadas estavam sem identificação, sendo impossível o rastreamento das mesmas.

3.1.4. Linhagens celulares

Foram cultivadas linhagens de células provenientes do estoque do Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia da UFRGS e de outros locais, para se verificar a presença de contaminações por microorganismos.

Dezenove linhagens celulares foram incluídas neste estudo (Tabela 3). As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (NUNC) em E-MEM com L-glutamina 2mM (Gibco-BRL), suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 0.001% de enrofloxacin (Baytril, Bayer), e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram tripsinizadas (tripsina 0,05%, Gibco-BRL) a cada 3 a 5 dias e subcultivadas sob as mesmas condições descritas acima.

3.1.5. Cálculos renais

Foram analisados 30 cálculos renais, gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Teodósio da Ros, provenientes da Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS.

TABELA 3 – Linhagens celulares examinadas neste estudo.

LINHAGENS CELULARES	FORNECEDORES
BHK - BAYER	Lab Bayer Porto Alegre, RS, Brasil
BT	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
CER	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
CRFK	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
EBTR	Holanda (Lelystad)
HEP-2	Centro de Biotecnologia – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil
MDBK (ATCC22)	Faculdade Veterinária - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil
MDCK	Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP, Brasil
MDCK	Lab Virologia Animal - Centro Ciências Agrárias, UEL, PR, Brasil
MMTV	Cultivo primário de células de tumor mamário de murino (preparado em nosso laboratório)
N ₂ A	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
NS1	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
PK ₁₅	ATCC
PK ₁₅	Faculdade Veterinária - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil
RK ₁₃	Wizigmann et al 1972
SK ₆	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
SP ₂ O	Central Veterinary Agency, Surrey, UK
TT	Cultivo primário de testículo de carneiro (preparado em nosso laboratório)
VERO	Central Veterinary Agency, Surrey, UK

3.2. Microscopia

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

3.2.1. Microscopia óptica

Amostras de SFB e de cultivos celulares contaminados foram examinados através de microscópio ótico comum (Nikon Eclipse E400), diretamente em lâminas, com lamínulas, e no microscópio ótico invertido (Nikon TMS), em garrafas plásticas de 75 cm² (NUNC).

3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar amostras de soro fetal bovino, de cultivos celulares e de cálculos renais.

Cinco mililitros de células tripsinizadas ou SFB foram centrifugados (Sigma 2K15) a 10000 X g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet lavado 3x com PBS, intercalado por centrifugações.

Para destruir o envoltório de apatita, os cálculos renais foram tratados inicialmente com HCl 1M por 14-16 horas e, após neutralização com NaOH 1M, centrifugados em tubos Eppendorf. Os pellets foram lavados 3 vezes com PBS, sendo cada lavagem intercalada por centrifugação a 10000 x g por 10 min.

Os pellets assim obtidos, após ressuspensão em 0,1 mL de PBS, foram transferidos para lâminas, deixados secar à temperatura ambiente e

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

Os cálculos renais também foram analisados por MEV diretamente, sem tratamento prévio das amostras com HCl, simplesmente por trituração.

3.3. Produção de antígeno

Nanopartículas calcificantes (NPC) foram cultivadas em E-MEM contendo SFB, conforme descrito anteriormente (item 3.1). Centrifugou-se porções de 1 mL de cada cultivo a 10000 g por 10 min, o pellet lavado 5 vezes com PBS, sendo cada lavagem intercalada por centrifugação a 10000 g por 10 min. Após ressuspensão final em 1mL de PBS o material foi armazenado a -20 °C até o momento do uso. Para a utilização nos experimentos, a concentração do antígeno foi determinada através de espectrofotometria (LKB Biochrom Ultrospec II) em comprimento de onda de 650 nm, sendo expressa em absorbância (A_{650}).

3.4. Produção de anticorpos policlonais

A produção de anticorpos policlonais contra NPC foi efetuada com antígeno preparado como descrito no item 3.7. Foram utilizados quatro camundongos BALB/c provenientes do biotério do IPVDF, Eldorado do Sul, que foram inoculados intraperitonealmente com uma mistura contendo o antígeno e adjuvante incompleto de Freund (1:1). Foram realizadas 3 imunizações, com intervalo de 14 dias entre cada uma. Quatro camundongos BALB/c inoculados com PBS foram usados como controles negativos.

Além disso, 2 coelhos foram imunizados intramuscularmente com 3 doses da suspensão do antígeno (A_{650} : 0.4), em intervalos de 14 dias, após emulsificação em adjuvante incompleto de Freund (1:1). Um coelho foi inoculado com PBS, sendo usado como controle negativo.

3.5. Padronização do método de imunofluorescência indireta (IFI)

Células MDBK, MDCK e Vero foram cultivadas em placas de Petry por 24h, utilizando o meio MEM com 10% SFB. No dia seguinte, eram adicionados 100 μ L de SFB contendo o antígeno e as placas incubadas por 24h. O meio foi removido e as células fixadas com fixador de Carnoy (3 partes de metanol + 1 parte de ácido acético) em duas etapas: 5 min. + 10 min. As células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS pH 8,5 (5 min cada) e permeabilizadas com Triton X-100 a 1% em PBS, por 5 min. As placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 8,5 (5 min cada) e tratadas com albumina bovina 2% por 20 min. Os soros dos camundongos foram diluídos em PBS,

adicionados às células e incubados por 1h e 30 min à temperatura ambiente. Foram testadas diluições a partir de 1:10 até 1:160. As placas foram lavadas quatro vezes em PBS pH 8,5 (5 min cada) e incubadas por 45 min com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Dako Cytomation), diluído 1:320 em PBS pH 8,5 (o conjugado foi previamente testado nas diluições 1:80 a 1:640). As placas foram lavadas quatro vezes em PBS pH 8,5 (5 min cada) e uma vez em água destilada (1min). Adicionou-se glicerina tamponada e uma lamínula foi colocada sobre as células. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400), em aumento de 400x.

3.6. Padronização do método de ELISA

3.6.1.Procedimento geral

As placas foram sensibilizadas com diferentes diluições do antígeno (item 3.1) + tampão carbonato-bicarbonato e incubadas em câmara úmida a 4 °C overnight. No dia seguinte, foram adicionados 100 µL/poço de PBS Tween-20 para o bloqueio. As placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com 100µL/ poço de PBS Tween-20. Acrescentou-se 100 µL de soro/poço, testando-se diluições apropriadas para cada tipo de soro. As placas foram incubadas por 1h a 37 °C em câmara úmida. Lavou-se as placas 3 vezes com 100µL/ poço de PBS Tween-20. Adicionou-se 100 µL de conjugado anti-IgG, diluído apropriadamente em PBS Tween-20, conforme padronizado para cada tipo de soro. As placas foram incubadas por 1h a 37 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas 3 vezes

com 100 μL / poço de PBS Tween-20. Adicionou-se 50 μL de uma mistura de ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio/poço (5 mL de OPD + 60 μL de peróxido de hidrogênio/placa). Incubou-se por 5 a 10 min, até o surgimento de coloração. Adicionou-se 50 μL /poço de H_2SO_4 2M para parar a reação. A leitura da placa foi efetuada em leitor de ELISA (Titertek Multiscan) a 450 nm, sendo expressa em absorbância (A).

Como controle negativo foi utilizada uma mistura de soros dos animais inoculados apenas com PBS. Não foram utilizados controles positivos do antígeno e do anticorpo pela impossibilidade de se conseguir NB e anticorpo monoclonal anti-NB, embora se tenha exaustivamente tentado obtê-los do fornecedor (Nanobac Life Sciences, Inc., Kuopio, Finland).

3.6.2. Teste com soros de camundongos

Para o antígeno foram utilizadas diluições de 1:160 até 1:280 em PBS, cujos valores de A_{650} variaram de 0,0062 a 0,00078. Para os soros de camundongo foram feitas diluições de 1:80 a 1:2560 com PBS. O conjugado anti-IgG de camundongo (Dako Cytomation Ref. P0161) foi diluído a 1:2000, que foi a diluição padronizada previamente para o teste.

3.6.3. Teste com soros de coelhos

Para o antígeno foram utilizadas diluições de 1:320 a 1:2560 em PBS, cujos valores de A_{650} variaram de 0,0031 a 0,0004. Para os soros de coelho foram feitas diluições de 1:80 a 1:2560. O conjugado anti-IgG de coelho

(Zymed) foi diluído a 1:4000 com PBS, que foi a diluição previamente padronizada para o teste.

3.6.4. Teste com soros de humanos

Foram testados soros de pacientes submetidos a sessões semanais de hemodiálise e soros de pacientes aparentemente sem disfunções renais, que realizaram exames laboratoriais de rotina no laboratório Adolpho Lutz (Santa Rosa, RS). Os soros foram diluídos de 1:10 até 1:160 e testados contra diluições do antígeno (absorbância aproximadamente 0,02; 0,01; 0,005). A concentração do antígeno escolhida para uso no teste foi de aproximadamente 0,02 (A_{650}). O conjugado anti-IgG humano (Amershan, England) foi diluído a 1:2000, que foi a diluição previamente padronizada para o teste.

3.6.5. Teste com soros de bovinos

Os soros foram diluídos a partir de 1:5 até 1:640. O antígeno foi diluído a uma concentração cuja A_{650} foi aproximadamente 0,02. O conjugado anti-IgG de bovino (Serotec, Batch 25100) foi diluído a 1:4000.

3.6.6. Teste de especificidade do ELISA

Um teste de ELISA com antígenos diferentes de NPC foi realizado, utilizando-se soros de coelhos imunizados contendo alta concentração de anticorpos anti-NPC. Foram usados antígeno de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Brucella abortus*, todos em

concentrações cujas A_{650} variaram de 0,2 a 0,02. A diluição do soro de coelho foi de 1:40, e a diluição do conjugado anti-IgG de coelho foi de 1:8000.

3.7. Teste da hidroxiapatita

A técnica de separação de DNA utilizando-se hidroxiapatita foi adaptada para este estudo (Sambrook & Russell, 2001). Utilizou-se uma amostra de cálculo renal e uma amostra de NPC retirada de cultivo de SFB. Para controle positivo, utilizou-se 5 μ g de DNA do genoma de *Escherichia coli* em TE. Cerca de 200 μ l de hidroxiapatita ou das amostras que pudessem ter DNA de nanobactérias foram equilibradas com DNA de *E. coli* em fosfato de sódio 0,1 M. As amostras foram eluídas em concentrações crescentes de tampão fosfato de sódio (0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,4M e 0,4M). Em seguida, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1% com as amostras de cada etapa.

3.8. Extração de DNA

As amostras de NPC retiradas do SFB (conforme descrito no item 3.3) foram pré-tratadas com HCl 1M ou EDTA 10 mM. Após, seguiu-se alguns protocolos de extração de bactérias. Como controle do processo de extração, utilizou-se amostras de *Escherichia coli*. Após a extração, foi realizada a eletroforese em gel de agarose para a visualização dos resultados.

4.RESULTADOS

4.1. Cultivo de NPC

Em 7 dos 8 lotes de soros e no lote de suplemento nutricional analisados, observou-se o aparecimento de turvação após 10 a 12 semanas de incubação a 37 °C com a presença de sedimento no fundo do frasco (Figura 4-A; 4-B). Apenas 1 lote de soro não mostrou turvação. A garrafa com E-MEM livre de soro, incubado nas mesmas condições e usado como controle, não mostrou turvação.

Todas as dezenove linhagens celulares (Tabela 3) cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm², conforme descrito no item 3.4, mostraram turvação após algumas semanas de incubação a 37 °C.

A



B



FIGURA 4 – Aspecto do soro fetal bovino (SFB) antes e após incubação a 37 °C por 8 semanas. A) Soro fetal bovino antes e após 8 semanas de incubação a 37 °C; B) Sedimento após 8 semanas de incubação a 37 °C.

4.2. Microscopia óptica

As amostras de SFB e de cultivos celulares foram examinadas em microscópio óptico comum e microscópio óptico invertido e revelaram a presença de pequenas partículas semelhantes a cocos, agrupadas e que, quando em suspensão, apresentavam movimento browniano (Figura 5).

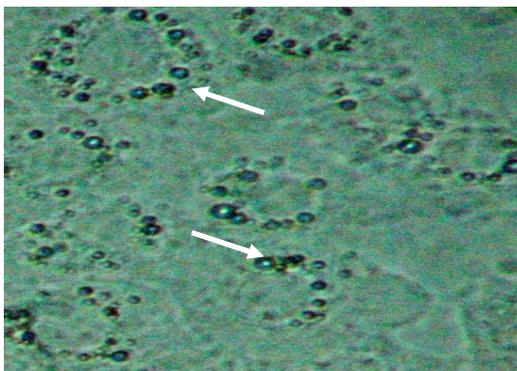


FIGURA 5 – Cultivo de células MDBK após uma semana de incubação a 37 °C. As setas mostram estruturas aglomeradas sugestivas de NPC. Aumento 400X.

4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dos 8 lotes de SFB analisados por MEV, 7 apresentaram pequenas partículas cocóides, semelhantes às relatadas na literatura e morfológicamente sugestivas de NB às quais denominamos de Nano-Partículas Calcificantes ou NPC (Figura 6). Tais estruturas também foram visualizadas em todas as 19 linhagens de células analisadas por esta técnica (Figura 7).

Dos 30 cálculos renais analisados diretamente pela MEV, 25 apresentaram pequenas estruturas, também morfológicamente semelhantes a

NB descritas na literatura e que igualmente foram denominadas de NPC (Figura 8). A Figura 9 mostra NPC encontradas em um cálculo renal, após tratamento com HCl 1M.

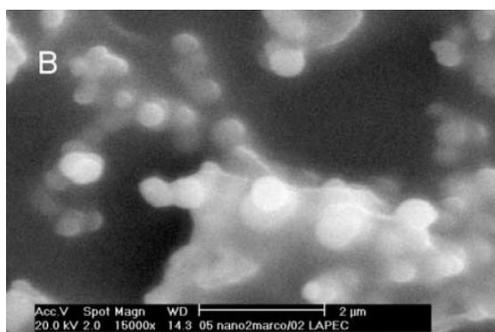


FIGURA 6 – Imagem, ao MEV, do SFB após 8 semanas de cultivo (Barra: 2 μm, 8000X),

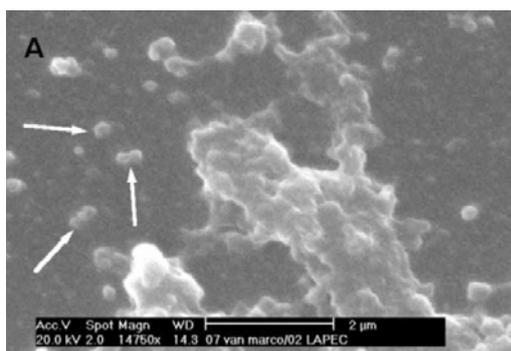


FIGURA 7 – Imagem, ao MEV, de cultivo de células MDBK. Setas indicam NPC (Barra: 2 μm, 8000X).

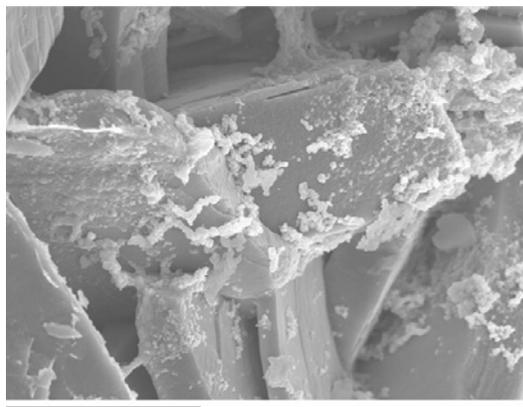


FIGURA 8 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal analisado sem tratamento prévio por HCl, mostrando estruturas aglomeradas sobre a superfície de cristais de oxalato de cálcio. (Barra: 20 μm, 1250X).

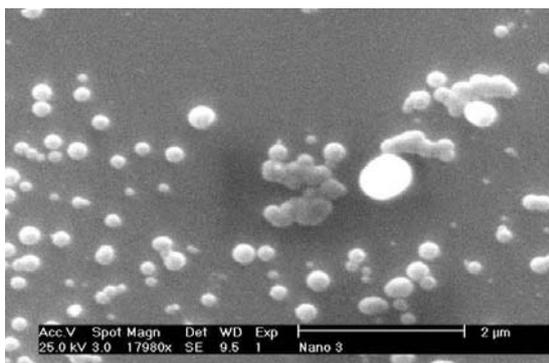


FIGURA 9 – Imagem, ao MEV, de cálculo renal após tratamento com HCl. Pode-se observar estruturas isoladas e agrupadas com tamanho inferior a 500 nm (Barra: 2 µm, 10500X).

4.4. Padronização do método de imunofluorescência indireta

(IFI)

As células MDBK, MDCK e Vero cultivadas em placas de Petri e contaminadas com NPC presentes em SFB apresentaram coloração verde fluorescente quando observadas ao microscópio de fluorescência (Figura 10). O controle negativo não pode ser realizado devido à falta de células livres de NPC em nosso laboratório.

Durante a padronização da técnica, a melhor diluição do anticorpo primário (soro de camundongo) foi 1:20 e para o conjugado anti-IgG de camundongo foi a diluição de 1:320.

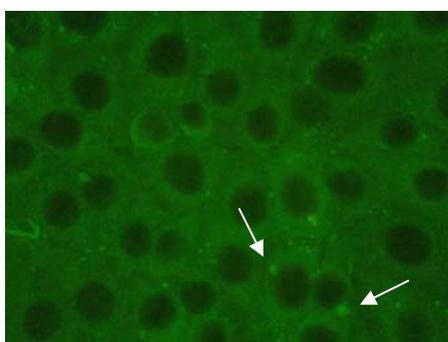


FIGURA 10 – Imagem de células MDBK ao microscópio de fluorescência (400X). As setas mostram aglomerados de NPC.

4.5. Padronização do método de ELISA

4.5.1. Para soros de camundongos

Os soros de camundongos usados como controles negativos apresentaram absorvâncias com valores baixos (0,132 em média), em comparação aos valores observados quando foram testados soros de animais imunizados (0,616 em média).

4.5.2. Teste com soros de coelhos

A Figura 11 mostra uma placa de ELISA, onde se pode observar a intensidade de cor nas diluições do soro de coelho imunizado com NPC (A=0,516 em média) com as do soro de coelho inoculado apenas com PBS (A=0,044 em média).

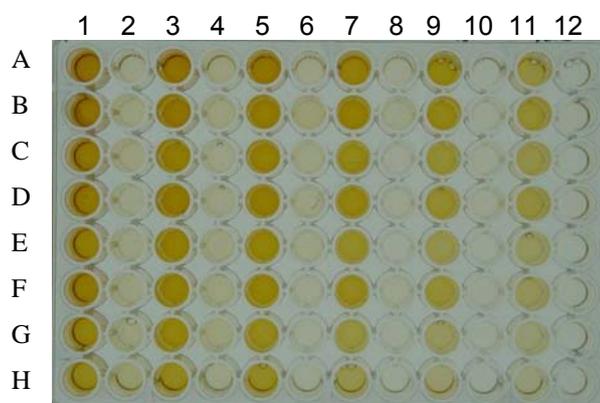


FIGURA 11 – Placa de ELISA mostrando a diferença entre soros de coelhos imunizados e controles negativos. As linhas (A a H) mostram as diluições do antígeno de NPC (1:320 a 1:2560); as colunas (1 a 12) mostram as diluições do soro de coelho (1:80 a 1:2560) contendo anticorpos anti-NPC; as colunas ímpares contêm soro de coelho imunizado com NPC e as colunas pares contêm soro de coelho não imunizado (controle negativo).

4.5.3. Teste com soros de humanos

Os soros de pacientes submetidos a sessões de hemodiálise, bem como os soros de pacientes aparentemente sem disfunções renais, revelaram resultados semelhantes. Ambos apresentaram valores de absorbância semelhantes, que variaram de 0,130 a 0,595 para pacientes hemodialisados e de 0,107 a 0,680 para os pacientes aparentemente saudáveis.

4.5.4. Teste com soros de bovinos

As 64 amostras de soros de bovinos analisadas pelo teste de ELISA não revelaram quantidades significativas de anticorpos anti-NPC. A absorbância média foi de 0,053.

4.5.5. Especificidade do teste de ELISA

O teste de ELISA com antígenos diferentes de NPC apresentou valores baixos de absorbância. Para a *Escherichia coli* os valores foram de 0,064 a 0,095; para o *Bacillus subtilis* de 0,048 a 0,077; para o *Staphylococcus epidermidis* de 0,053 a 0,086; para a *Brucella abortus* de 0,044 a 0,078. Já os valores de absorbância para o antígeno de NPC se situaram entre 0,157 e 0,525.

4.6. Teste da hidroxiapatita

A amostra de hidroxiapatita ligou-se ao DNA de *E. coli* durante a lavagem com tampão fosfato de sódio 0,01 M e liberou o DNA com concentrações entre 0,2M e 0,4M (Figura 12). A amostra de cálculo renal com

5 μg de DNA de *Escherichia coli* também ligou DNA de *E. coli*, mas liberou-o de maneira mais fácil do que a hidroxiapatita (0,2M). No teste em que não foi adicionado DNA de *E.coli* à amostra de cálculo renal, não houve liberação de DNA detectável. O marcador de peso molecular usado foi o pBR327, clivado com Ddel, com NEBcutter 2.0, produzindo uma banda superior de 1,7 kb, conforme ilustrado.

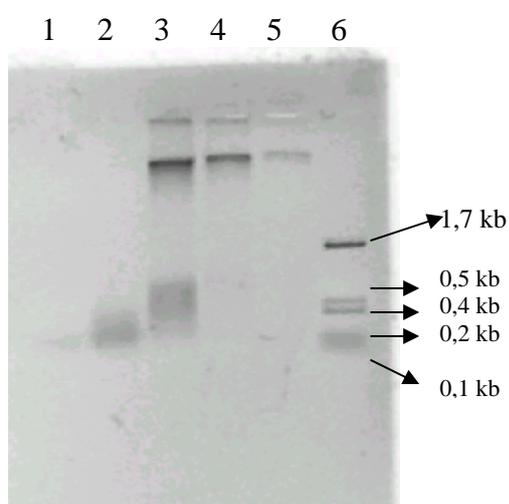


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose mostrando as fases da eluição com tampão fosfato das amostras de hidroxiapatita ligada ao DNA de *E.coli*. Coluna 1: 0,01M; Coluna 2: 0,1M; Coluna 3: 0,2M; Coluna 4: 0,4M; Coluna 5: 0,4M; Coluna 6: marcador de peso molecular.

4.7. Extração de DNA

Não foi detectada a presença de DNA nas amostras de NPC analisadas, após eletroforese em gel de agarose. As amostras de *Escherichia coli* usadas como controle, revelaram a presença de DNA na eletroforese.

5.DISSCUSSÃO

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

Ao revisar a literatura para analisar as possíveis causas de contaminação de cultivos celulares, verificou-se que dificuldades semelhantes já haviam sido descritas por um grupo de pesquisadores finlandeses (Akerman *et al.*, 1993), quando trabalhavam com cultivos celulares de longo tempo e

detectaram a presença de partículas semelhantes a bactérias. Um achado que deu a pista inicial para identificar a causa do problema foi que, cultivando as mesmas células em dois meios diferindo somente na procedência do soro usado como suplemento, as células morreram na presença do soro que continha tais partículas. Após extensivos estudos para a identificação destas partículas através de microscopia eletrônica, testes bioquímicos e moleculares, estes pesquisadores concluíram se tratavam de bactérias às quais denominaram de nanobactérias (NB), pertencentes ao subgrupo alfa-2 de *Proteobacteria* (Kajander *et al.*, 1994; Kajander *et al.*, 1997). Estudos posteriores realizados por este mesmo grupo investigaram a interação de NB com células de mamíferos, observando uma internalização desses organismos e um efeito citotóxico sobre fibroblastos mantidos em cultura (Çiftiçioğlu & Kajander, 1998; Kajander & Çiftiçioğlu, 1998). Tais resultados foram obtidos por microscopia eletrônica e por imunofluorescência indireta, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos.

A partir destes dados da literatura, começamos a analisar amostras dos cultivos celulares suspeitos ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde observamos estruturas arredondadas de tamanho inferior a 500 nm em todos os cultivos analisados. Como se pode observar na Figura 7, estas estruturas se mostravam morfológicamente muito semelhantes com as encontradas pelo grupo finlandês e, por isso, passamos a utilizar o termo Nano-Partículas Calcificantes (NPC) para designá-las.

A seguir, os lotes de SFB de diferentes procedências foram cultivados e incubados por 8 a 12 semanas. Após este tempo de incubação, 7

dos 8 (87,5%) tubos contendo SFB mostravam um aspecto opalescente a olho nu e quando analisados ao microscópio óptico apresentavam NPC. Nos estudos de Kajander *et al.* (1996, 1997), foi detectada a presença de NB em mais de 80% dos lotes comerciais de soro fetal bovino analisados. Nestes estudos foi também mencionado que o problema principal com NB em cultivos celulares ocorreu em experimentos de longos períodos e quando elas estavam presentes em altas concentrações em relação às células. Problemas similares também foram encontrados em nosso laboratório (Simonetti *et al.*, 2005) e temos notícia de que em outros laboratórios do Brasil pesquisadores também enfrentam dificuldades na manutenção de cultivos celulares por longo tempo (comunicação pessoal). Em nosso estudo, observamos a ocorrência de turvação do material incubado após 4 semanas, aproximadamente, como mostra a Figura 4-A, de SFB.

Já havia sido relatada na literatura a produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra NB (Khullar *et al.*, 2004), com a finalidade de utilizá-los em testes para sua detecção em diferentes materiais biológicos. Resolvemos, então, realizar imunizações em camundongos e coelhos utilizando, como antígeno, preparações de NPC para a obtenção de anticorpos policlonais. Os resultados mostraram uma grande produção de anticorpos nos animais imunizados quando testados por ELISA, como pode ser observado na Figura 11, que mostra um teste realizado com soro de coelhos. Nos testes realizados com soros de camundongos imunizados, os soros diluídos a 1:2560 ainda apresentaram uma forte reação frente ao antígeno (absorbância: 0,377 em filtro de 450 nm; absorbância do antígeno: 0,01). Os coelhos inoculados

com NPC também produziram grande quantidade de anticorpos anti-NPC, o que foi demonstrado no teste de ELISA, onde se obteve uma absorbância de 0,438 com soro diluído a 1:2560 e antígeno numa concentração cuja absorbância foi de 0,01. Foram testados tanto soros de camundongos como soros de coelhos inoculados apenas com PBS. Estes demonstraram ausência de anticorpos contra NPC, com valores de absorbância muito baixos (média = 0,040 para coelhos; média = 0,048 para camundongos).

Já os testes de ELISA realizados com soros de humanos, revelaram absorbância entre 0,130 e 0,595 para pacientes hemodialisados e de 0,107 a 0,680 para os pacientes aparentemente saudáveis. Com estes resultados, não se pode afirmar que os valores de absorbância mais elevados correspondem a soros com anticorpos anti-NPC, uma vez que não dispomos de controle positivo, nem tampouco de controle negativo. Estes valores podem ser devido a uma reação cruzada com outros anticorpos presentes no soro humano, pois o antígeno (NPC) não é purificado (epítomos diferentes). Há estudos na literatura onde foram realizadas pesquisas de anticorpos anti-NB em soros de humanos. Wen yu *et al.* (2005) encontraram anticorpos contra NB em soros de 27 (8%) entre 338 pessoas saudáveis, enquanto 24 (31,6%) dos 76 pacientes com colecistolitíase apresentaram esses anticorpos. Kajander & Çifçiolgu (1998a) demonstraram que as NB existem no soro de 5% dos finlandeses saudáveis.

Os testes com soros de bovinos, inclusive controles negativos, apresentaram valores muito baixos, com valores de absorbância entre 0,044 e 0,079, o que sugere a ausência de anticorpos anti-NPC em todas as amostras.

Os estudos até agora publicados, tratam apenas da pesquisa de antígenos de NB em soro bovino (Breitschwerdt *et al.*, 2001; Carson, 1998).

Nos testes de especificidade da técnica de ELISA pôde-se perceber que os anticorpos anti-NPC desenvolvidos pelos coelhos parecem ser bastante específicos para NPC, uma vez que os valores de absorvância referentes ao antígeno de NPC foram de 0,157 a 0,525, enquanto os relativos aos demais antígenos utilizados nos testes foram inferiores a 0,096. O teste de ELISA tem sido muito utilizado na detecção de antígenos de NB, com o uso de anticorpos monoclonais específicos (Kajander *et al.*, 1997; Sedivy & Battistutti, 2003; Wang *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2005). As NB possuem antígenos de superfície semelhantes aos da *Bartonella spp*, podendo apresentar reatividade sorológica cruzada (Kajander & Çiftçioglu, 1998a). Breitschwerdt *et al.*, (2001), no entanto, pesquisaram a existência de antígenos de NB em amostras de sangue de um rebanho bovino com um *kit* de ELISA contendo anticorpos específicos anti-NB; pelos resultados encontrados não foi comprovada a existência de uma correlação entre a detecção de antígenos de NB e a infecção por *Bartonella weissii*. Os autores concluíram apenas que havia uma infecção por outro microorganismo, similar ou intimamente relacionado à *B. weissii*.

Além do teste de ELISA, a imunofluorescência indireta é outro método utilizado na detecção de NB através do uso de anticorpos mono ou policlonais específicos. O grupo finlandês (Kajander *et al.*, 1997; Çiftçioglu *et al.*, 1997b) obteve resultados com elevada especificidade utilizando anticorpos mono ou policlonais específicos anti-NB em cultivos celulares. Em nosso estudo, utilizando anticorpos policlonais contra NPC, detectou-se a presença

de partículas semelhantes em cultivos celulares. Já com o soro de camundongos não imunizados, não foi possível observar a existência de tais partículas. No entanto, as amostras positivas não mostraram um padrão de fluorescência muito definido, o que dificultou o uso da técnica como teste definitivo para diagnóstico. Sendo assim, a técnica precisa ser aprimorada para poder ser incluída nos testes de rotina de laboratório, facilitando a detecção de NPC em cultivos celulares.

Um fato interessante é a capacidade que as NB têm de biomineralização que, em cultivos celulares, resultou na formação de biofilmes e agregados minerais (Kajander *et al.*,1997). Neste estudo, também observamos a presença de uma espécie de biofilme nas paredes dos frascos e tubos de cultura após incubação (Figura 4-B). Este material analisado por MEV mostrou pequenas estruturas arredondadas isoladas ou agrupadas (Figura 6), muito semelhantes morfológicamente às relatadas por Kajander e seu grupo (Figura 1). Através da análise química e da micro-análise de Raio-X por energia dispersiva (EDX) foi verificado que todas as fases de crescimento das NB produziam apatita biogênica no seu envelope celular, material que é encontrado na maioria dos tecidos onde há calcificação (Kajander e Çiftçioğlu,1998). O mesmo estudo demonstrou, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a presença de uma espessa camada que revelou um alto conteúdo de carbonato apatita quando analisada pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformador de Fourier (FTIR). Infelizmente, não foi possível realizar, até o momento, estes tipos de análises

em nosso material, devido à não disponibilidade desses equipamentos em nosso meio.

Devido a esta propriedade de calcificação das NB, surgiu o interesse em se pesquisar a presença destas estruturas em diferentes materiais de origem humana e avaliar a sua possível relação com condições patológicas onde ocorrem calcificações (Carson, 1998). Muitos trabalhos foram realizados para detectar a presença de NB em cálculos renais (Kajander & Çiftçioglu, 1998; Çiftçioglu *et al.*, 1999; Drancourt *et al.*, 2003). No presente estudo foram analisados, além dos soros de animais e de humanos, 30 cálculos renais humanos. Foram utilizadas técnicas de cultivo e de MEV. Dos 4 cálculos renais cultivados em nosso estudo, houve crescimento de NPC em apenas um deles. Através da análise direta dos cálculos por MEV, observou-se a presença de pequenas estruturas cocóides morfológicamente e de tamanho semelhante às NB (Figura 8) em 25 dos 30 cálculos (83%). É interessante observar a disposição dessas estruturas, na maior parte das vezes aglomeradas, sobre o material do cálculo, que é de oxalato de cálcio. Já em cálculos renais tratados com HCl 1M, pode-se visualizar estruturas semelhantes, geralmente isoladas (Figura 9).

Devido às suas propriedades extremófilas, as NB são resistentes a altas temperaturas, à irradiação gama e a repetidos congelamentos. Tratamento com HCl ou EDTA retiram a camada de cálcio que existe ao seu redor, tornando as NB viáveis e virulentas. Dessa forma, elas ficam vulneráveis, duplicando sua taxa de crescimento e iniciando uma nova formação de biofilme para sua proteção (Kajander & Çiftçioglu, 2000). Neste estudo testou-se várias

concentrações de HCl e EDTA em amostras de NPC para posterior análise ao MEV. Pôde-se observar que, após tratamento com HCl 1M, as NPC apresentavam-se mais isoladas. Puskás *et al.* (2005) verificaram que a ligação dos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-NB às placas ateroscleróticas calcificadas em humanos foi bastante aumentada após o pré-tratamento com EDTA.

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

Antibióticos comumente usados não têm efeito sobre as NB. Doses tóxicas de aminoglicosídeos diminuem sua taxa de crescimento, mas apenas por um tempo. Os melhores resultados encontrados por Çiftçioglu *et al.* (2002) contra as NB foram obtidos com a tetraciclina-HCl. A tetraciclina, por ser quelante de cálcio, é capaz de matar especificamente as NB. Calcificações patológicas como placas ateroscleróticas, cálculos renais, placas dentárias, entre outras, têm sido atribuídas à ação de NB. Recentes relatos informam os benefícios de terapias de longo prazo com tetraciclina em pacientes com esclerodermia, ou com aterosclerose. Mulhall (2005) relatou a sua experiência com pacientes portadores de doença coronariana grave, aos quais aplicou o protocolo descrito para NB, que utiliza quelantes de cálcio. O uso de EDTA combinado com tetraciclina regrediu significativamente os níveis de cálcio desses pacientes no coração, acabando com sua angina, resultado que não havia sido conseguido com outros tratamentos testados anteriormente. Estes

relatos sugerem a existência de uma relação entre as calcificações extra-esqueléticas e as NB, uma vez que os antimicrobianos revelados como eficazes contra as NB em experimentos realizados, são os mesmos que mostram bons resultados no tratamento destes tipos de calcificações. Alguns testes realizados em nosso laboratório revelaram dificuldades na escolha de um antibiótico ideal para eliminar as NB de cultivos celulares. Amostras de cultivos de células PK₁₅ foram testadas com antibióticos (Neomicina 50mg/L, Tetraciclina 10mg/L e Enrofloxaxina 10mg/L) puros e associados a EDTA. Nenhum dos antibióticos conseguiu eliminar as NB após 5 dias de incubação. A associação com EDTA não permitiu a fixação das células às placas, além de não demonstrar a inibição de NB. Os controles tiveram seu desenvolvimento normal.

Apesar da possibilidade de que NB sejam agentes etiológicos de calcificação extra-esquelética, existem controvérsias em relação à existência de tais bactérias e seu papel na biomineralização. Um dos pontos mais polêmicos para muitos na comunidade científica é o pequeno tamanho das NB, cerca de 10 a 100 vezes menor do que o da maioria das bactérias conhecidas até hoje. Segundo alguns autores, seria impossível para uma célula deste tamanho conter os componentes macromoleculares necessários para uma célula viva, que exigiriam um diâmetro mínimo de 140 nm (Maniloff, 1997; Neilson, 1997; Psenner, 1997). Outros autores questionam o papel das NB na biomineralização, afirmando que este processo pode ser iniciado por macromoléculas não-vivas e auto-replicáveis (Cisar *et al.*, 2000). Os mesmos autores, utilizando a técnica de PCR, contestam a presença de ácidos

nucléicos nas “nanobactérias”. Alguns estudos revelaram a presença de ácidos nucléicos nas NB pelo uso de corantes específicos, como o corante de Hoechst 33258 e o iodeto de propídio (Kajander *et al.*, 1997; Kajander & Çiftçioğlu, 1998; Çiftçioğlu & Kajander, 1998; Khullar *et al.*, 2004). Outros demonstraram que as NB possuem material genético através da técnica de PCR (Hudelist *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, tentou-se efetuar a extração de DNA de NPC. As amostras foram pré-tratadas com HCl 1M ou EDTA 10 mM. Após, seguiu-se alguns protocolos de extração de bactérias. Como controle do processo de extração, utilizou-se amostras de *Escherichia coli*. No entanto, nenhum DNA foi detectado na eletroforese em gel de agarose a 1% após as tentativas de extração de DNA em amostras de NPC. Somente extraiu-se DNA das amostras de *E. coli*. Çiftçioğlu e sua equipe de pesquisa continuam trabalhando no isolamento e na caracterização de ácidos nucléicos das NB, mas acreditam não se tratarem de ácidos nucléicos tradicionais e sim uma forma primitiva (comunicação via eletrônica).

Neste estudo adaptou-se a técnica de separação de DNA utilizando hidroxiapatita, na tentativa de detectar algum material genético nas amostras de NPC e cálculos renais. O teste com o controle positivo revelou a ligação do DNA de *E.coli* à hidroxiapatita, como pode ser observado na Figura 12. O DNA somente foi liberado nas concentrações de fosfato de sódio a 0,2M e 0,4M. A amostra de cálculo renal demonstrou ter propriedades semelhantes às da hidroxiapatita, pois ligou-se ao DNA da *E. coli* e liberou-o a uma concentração de 0,2M de fosfato de sódio. No entanto, não foi detectado DNA nessas

amostras. Já a amostra de NPC não demonstrou as mesmas propriedades, ou seja, não ligou-se ao DNA.

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

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

De acordo com Tony Taylor (Uwins *et al.*, 1998), os “nanobes” e possivelmente as NB são uma forma de “silicone auto-produtivo” (semelhantemente à hipótese da associação das ribozimas que iniciaram o mundo do RNA). Para ele, se as NB fossem formas de vida de DNA-RNA-proteína normais, pelo grande número de grupos de pesquisa que vêm trabalhando nisso já teria sido relatada a presença destas moléculas há muitos anos (comunicação via eletrônica).

Não é uma afirmativa categórica que as NB são realmente bactérias, o fato é que elas estão presentes como contaminantes em cultivos celulares, SFB e soro de diferentes animais e, após incubação, podem replicar-se. Apesar de não podermos afirmar que as estruturas encontradas neste estudo são realmente NB, elas são muito semelhantes às descritas na literatura no que diz respeito ao seu tamanho e morfologia.

6. CONCLUSÕES

Em 7 dos 8 lotes de soro fetal bovino cultivados observou-se turvação após algumas semanas de incubação a 37°C com a presença de sedimento no fundo dos frascos.

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

A análise dos cálculos renais por MEV também mostrou estruturas semelhantes a nanobactérias.

O método de ELISA revelou boa especificidade e sensibilidade nos testes realizados até o momento.

A partir dos dados apresentados neste trabalho, não se pode afirmar que as partículas estudadas sejam matéria biológica convencional, no entanto, pode-se concluir que as NPC de fato são partículas que se multiplicam e encontram-se presentes em alguns materiais biológicos.

Serão necessários estudos complementares para que se possa esclarecer se essas estruturas por nós observadas possuem ácidos nucleicos, e se estão distribuídas em outros materiais biológicos de animais e humanos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns experimentos estão em andamento em nosso laboratório para que possamos avaliar a hipótese de as estruturas encontradas neste estudo serem de fato nanobactérias. Através da produção de anticorpos monoclonais específicos contra NPC, pretende-se aprimorar as técnicas de ELISA e de imunofluorescência iniciadas neste estudo, a fim de se detectar antígenos de NPC em materiais suspeitos de contaminação, como cultivos celulares, soros de animais e de humanos, entre outros. Além disso, está se encaminhando um estudo com material utilizado para hemodiálise e com soros de pacientes hemodialisados, onde se pretende analisar a presença de NPC. Pretende-se, ainda, realizar avaliações químicas mais sofisticadas a fim de se descobrir se existe alguma ligação específica do DNA, através de TOF-SIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry). Dessa forma, se procurará obter mais informações sobre o provável papel das NPC (ou NB) em patologias humanas e padronizar metodologia para se evitar ou erradicar a contaminação de cultivos celulares por essas estruturas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKERMAN, K.K. *et al.* Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit. **SPIE-The International Society for Optical Engineering**, Bellingham, v.3111, 1997.

ÁVILA, J. M. *et al.* Investigation of “nanobacteria” in banded iron formations by Scanning Eletron Microscopy: an example from Urucum and Carajás, Brazil. **Acta Microscopica**, São Paulo, Supplement A, nov. 2001.

BARR, S.C. *et al.* Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.64, n.2, p.176-182, 2003.

BENZERARA, K. *et al.* Nanobacteria-like calcite single crystals at the surface of the Tataouine meteorite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v.100, n.13, p.7438-7442, 2003.

BJÖRKLUND, M. *et al.* Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3441, p.123-129, 1998.

BONE, H.G. *et al.* Treatment of calcium urolithiasis with diphosphonate: efficacy and hazards. **Journal of Urology**, New York, v.121, p.568-571, 1979.

BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Infection with Bartonella weissii and detection of nanobacteria antigens in a North Carolina beef Herd. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.879-882, 2001.

CARSON, D.A. An infectious origin of extraskeletal calcification. **Commentary, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v.45, n.14, p.7846-7847, 1998.

CHAN D. *et al.* Nanobacteria: role in human renal calculi disease. **Journal of Endourology**, BRS2-11, A7,1999. Trabalho apresentado no 17th. World Congress on Endourology and SWL, Rhodes, 1999.

CICERELLO, E. *et al.* Effect of alkaline citrate therapy on clearance of residual renal stone fragments after extracorporeal shock wave lithotripsy in sterile calcium and infection nephrolithiasis. **Journal of Urology**, New York, v.151, p.5-9, 1994.

CISAR, J. O. *et al.* An alternative interpretation of nanobacteria induced biomineralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 97, n.21, p.11511-11515, 2000.

COHEN, H. *et al.* Bisphosphonates and tetracycline: experimental models for their evaluation in calcium-related disorders. **Pharmaceutical Research**, Netherlands, v.15, p.606-613, 1998.

CONTE, V. A. *et al.* Microinfections and kidney lithiasis. **Archivos Españoles de Urología**, Madrid, v.54, n.9, p.855-60, 2001.

CORIELL, L.L. Methods of prevention of bacterial, fungal, and other contaminations. In: FOGH, J. (Ed.). **Contamination of Tissue Culture**. New York : Academic Press, 1973. p. 29-47.

CRANTON, E.M. **Alleged nanobacteria do not cause calcification of arterial plaque**. Disponível em : <http://drcranton.com/nanobacteria.htm>, 2005. Acesso em: fevereiro, 2006.

ÇİFTÇIOĞLU, N. Another debate in viral vaccines: nanobacterial contamination. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 101., Orlando, 2001. **Papers...** Orlando, 2001. Session 078/Y Paper Y-3, 2001.

ÇİFTÇIOĞLU, N. *et al.* A new potencial threat in antigen and antibody products: Nanobacteria. In: VACCINES 97. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1997a. p.99-103

ÇİFTÇIOĞLU, N. *et al.* Extraordinary growth phases of Nanobacteria isolated from mammalian blood. **Proceedings of SPIE**, San Diego, California, v.3111, p.429-435, 1997b.

ÇİFTÇIOĞLU, N. *et al.* Stone formation and calcification by nanobacteria in human body, **Proceedings of SPIE**, San Diego, California, v. 3441, p.105-111, 1998a.

ÇİFTÇIOĞLU, N. *et al.* Sedimentary rocks in our mouth: Dental pulp stones made by Nanobacteria. **Proceedings of SPIE**, San Diego, California, v.3441, 1998b.

ÇİFTÇIOĞLU, N. *et al.* Nanobacterium sanguineum (NS) antibiotic susceptibility tests and evidence of cytotoxicity of NB isolates from patients with polycystic kidney disease. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR

MICROBIOLOGY, 1999, Chicago. **Proceedings...** Chicago, 1999. Abstract A-114, p.24.

ÇIFTÇIOĞLU, N. *et al.* Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n.7, p.2077-2086, 2002.

ÇIFTÇIOĞLU, N. *et al.* Association between Nanobacteria and periodontal disease. **Circulation**, Dallas, v.108, n.8, p.58, 2003.

ÇIFTÇIOĞLU, N. *et al.* A potential cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity. **Kidney International**, New York, v.67, p.483-491, 2005.

ÇIFTÇIOĞLU, N.; KAJANDER, E.O. Interaction of Nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Kuopio, v.4, p. 259-270, 1998.

DORRELL, S. Nanobacteria linked to kidney disease. **Molecular Medicine Today**, Oxford, v.5, 1999.

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

DRANCOURT, M. *et al.* Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.368-372, 2003.

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

FOLK, R. L. Dolomite and dwarf bacteria (nannobacteria) (abstract). In: GEOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, Boston, 1993. **Program Abstracts**. Boston, 1993a. A-397

Folk, R. L. SEM imaging of bacteria and nannobacteria in carbonate sediments and rocks. **Journal of Sedimentary Petrology**, Boulder, Colorado, v. 63, p. 990-999, 1993b.

FOLK, R. L. Precipitation of opal-CT lepispheres, chalcedony and chert nodules by nannobacteria (dwarf bacteria) (abstract). In: GEOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA ANNUAL MEETING, Lincoln, 1995. **Program Abstracts**. Lincoln, Nebraska, 1995. A-305.

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

FOLK, R.L. 50-100 nm carbon balls in Allende meteorite morphologically identical to nanobacterial colonies on Earth. In: LUNAR AND PLANETARY SCIENCE CONFERENCE, 29., Houston, 1998. **Proceedings...** Houston, 1998. Abstract 1110,

FOLK, R.L.; LYNCH, F.L. Nannobacteria are alive on Earth as well as Mars. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3111, p.406-419, 1997.

FOLK, R. L. ; LYNCH, F. L. Morphology of nannobacterial cells in the Allende carbonaceous chondrite, *in* Hoover, R. B., ed., Instruments, methods, and missions for astrobiology. **Proceedings of SPIE**, San Diego, California, v. 3441, p. 112-122, 1998.

GARCIA CUERPO E. *et al.* Nanobacteria. An experimental neo-lithogenesis model. **Archivos Españoles de Urología**, Madrid, v.53, n.4, p.291-303, 2000.

GIMENEZ, D.F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, Baltimore, v.39, p.135-140, 1964.

GUNDESLIOGLU, O. *et al.* Nanobacteria and breast implant contracture and calcification: a hypothesis. **Aesthetic Plastic Surgery**, New York, v.29, p.582, 2005.

HARVEY, R.P. Nannobacteria: what is the evidence? **Natural Science**, Cleveland, v.1, p.7, 1997.

HIROTA, S. *et al.* Expression of bone-related protein messenger RNA in human meningiomas: possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Baltimore, v.54, p.698-703, 1995.

HJELLE, J. T.; MILLER *et al.* Endotoxin and Nanobacteria in polycystic kidney disease. **Kidney International**, New York, v.57, p.2360-2374, 2000.

HUDELIST, G. *et al.* Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenic role in intratumoral biomineralization. **Histopathology**, Oxford, v.45, p.633-637, 2004.

KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, n.14, p.8274-8279, 1998a.

KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOĞLU, N. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Kuopio, v. 4, p.259-270, 1998b.

KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria as extremophiles. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3755, p.106-112, 2000.

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

KAJANDER, E.O. *et al.* Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth, **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3111, p.420-428, 1997.

KAJANDER, E.O. *et al.* Mineralization by nanobacteria. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3441 p.86-94, 1998a.

KAJANDER, E.O. *et al.* Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. **Proceedings of SPIE**, San Diego, v.3441, p.123-129, 1998b.

KAJANDER, E.O. *et al.* **Suggestions from observations on nanobacteria isolated from blood**. Washington : National Academy of Sciences, 2001a. panel 2.

KAJANDER, E.O. *et al.* Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, Philadelphia, v.10, p.445-452, 2001b.

KHULLAR, M. *et al.* Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population. **Urological Research**, Berlin, v.32, p. 190-195, 2004.

KRAMER, G. *et al.* Role of bacteria in the development of kidney stones. **Current Opinion in Urology**, London, v.10, n.1, p.35-38, 2000.

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

Li, Y. *et al.* Culture and identification of nanobacteria in bile. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, Beijing, v.82, n.22, p.1557-60, 2002.

LOW, M. *et al.* Nanobacteria detection in the serum and urine of urinary stone patients versus normal controls. **Journal of Endourology**, v.13, supplement 1,; A7, 1999, Rhodes, 1999.

MANILOFF, J. Nannobacteria: Size limits and evidence. **Science**, Washington, v.276, p.1776, 1997.

MANISCALCO, B.S.; TAYLOR, K.A. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. **Pathophysiology**, New York, v.11, p.95-101, 2004.

McKAY, D.S. *et al.* Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. **Science**, Washington, v.273, p.924, 1996.

MEZO, G. S. **Nanobacterial therapeutics & objective assessment of decreases in coronary artery calcification**: The NanobacTX pilot Study. In: INTERNATIONAL NANOBACTERIA MINISYMPOSIUM, 2001, Kuopio, Finland. Disponível em: <www.nanobaclabs.com/Research/Abstracts>. Acesso em: 14 mar. 2004.

MILLER, V.M. *et al.* Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. **American Journal of Heart and Circulatory Physiology**, v.287, p.H1115-H1124, 2004.

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

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

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

MULHALL, D. The Nanobacteria Link to Heart Disease and Cancer. **Nexus Magazine**, v.12, n.5, 2005. Disponível em: www.nexusmagazine.com Acesso em: 20 mar.2006.

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

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

PEDONE, B. A.; FOLK, R. L. Formation of aragonite cement by nannobacteria in the Great Salt Lake, Utah. **Geology**, New York, v. 24, p. 763-765, 1996.

PRIECE, P.A. *et al.* Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v.21, p.817-824, 2001.

PSENNER, R.; LOFERER, M. Nannobacteria: Size limits and evidence. **Science**, Washington, v.27, p.1776-1777, 1997.

PUSKÁS, L. G. *et al.* Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 56, n. 3-4, p.233 – 245, 2005.

RASMUSSEN T.E. *et al.* Electron microscope and immunological evidence of nanobacterial-like structures in calcified carotid arteries, aortic aneurysms and cardiac valves. **Journal-American College of Cardiology**, New York, 206A, 2002.

ROBERTS, J.C. **Nanobacterium Literature Review**. Disponível em: <http://www.heartfixer.com/Nanobacterium/NB%20%20Literature%20review.htm>. Acesso em: 16 abr, 2006.

ROZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology**, Washington, v. 51, p.365-379, 1987.

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

SEDIVI, R.; BATTISTUTTI, W.B. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. **Apmis**, Copenhagen, v.111, n.10, p.951, 2003.

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

SHIEKH, F.A. *et al.* Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. **Urological Research**, Berlin, v.34, n.1, p.53-57, 2006.

SHOSKES, D.A. *et al.* Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.173, p.474-477, 2005.

SILAY, Y.S. *et al.* Biphosphonates may inhibit development of atherosclerosis formation through its bactericidal effect on nanobacteria. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v.64, n.6, p.1239-1240, 2005.

SILLITOE, R. H. *et al.* Bacteria as mediators of copper sulfide enrichment during weathering. **Science**, Washington, v. 272, pp. 1153-1155, 1996.

SIMONETTI, A.B. *et al.* Nanobacteria-like particles: a threat to cell cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**. Submetido (pré-aceito) para publicação.

SOMMER, A.P.; PAVLATH, A.E. Nanobioaerosols-reconsidering agricultural irrigation in a warming world. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.8, n.3, p.341-346, 2006.

SUZUKI, T. *et al.* Study of the Structure of Struvite Stones with Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis. **International Journal of Urology**, Basel, v.58, p.88-92, 1997.

THOMAS-KEPRTA, D. S. *et al.* "Bacterial Mineralization Patterns in Basaltic Aquifers. Implications for Possible Life in Martian Meteorite ALH84001," **Geology**, Boulder, v.26, p.1031-1034, 1998.

TOWBIN H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v.76, p.4350, 1979.

TRAVIS, J. The Bacteria in the Stone. **Science News**, Farmington Hills, Michigan, v.154, n.5, p. 75, 1998.

TSUCHIYAMA A. Meteoritics and mineralogy on possible ancient Martian life. **Biological Sciences in Space**, Sagamihara, v.10, n.4, p.262-270, 1996.

TUNIO, G.M. *et al.* Possible relation of osteopontin to development of psammoma bodies in human papillary thyroid cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v.122, p.1087-1090, 1998.

UWINS, P.J.R. *et al.* Novel nano-organisms from Australian sandstones. **American Mineralogist**, Chantilly, v.83, p.1541-1550, 1998.

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

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

WANG, X.J. *et al.* The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, Beijing, v.25, n.6, p.492-494, 2004.

WEN, Y. *et al.* Nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of cholecystolithiasis patients. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, Beijing, v.41, n.4, p.267-70, 2003.

WEN, Y. *et al.* Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v.118, n.5, p.421-424, 2005.

WOOD, H.M.; SHOSKES, D.A. The role of nanobacteria in urologic disease. **World Journal of Urology**, Berlin, v.24, n.1, p.53-57, 2006.

ZREIK, T.G.; RUTHERFORD, T.J. Psammoma bodies in cervicovaginal smears. **Obstetrics and Gynaecology**, New Haven, v. 97 (5 Part 1), p.693-695, 2001.

APÊNDICE

8.1. Soluções para ELISA

8.1.1 PBS 10 X (pH 7,2)

NaCl	85,0 g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	19,43 g
NaHPO ₄ . H ₂ O	3,11 g
H ₂ O qsp	1000 mL

8.1.2 PBS-T20

PBS 1X	999,5 mL
Tween 20	0,5 mL

8.1.3 OGP 0,2 %

n-octil-glicopiranosídeo	0,2 mL
PBS 1X	99,8 mL

8.1.4 Tampão Carbonato/Bicarbonato (pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,39 g
H ₂ O qsp	completar para 1000 mL

8.1.5 Tampão Citrato Fosfato (pH 5.0)

Ácido cítrico	10,2 g
Na ₂ HPO ₄	14,6 g
H ₂ O qsp	completar para 1000 mL

8.1.6 Substrato OPD

Orto-fenilenodiamina (OPD)	0,034 g
----------------------------	---------

8.1.7 2M H₂SO₄

H ₂ SO ₄	104,43 mL
H ₂ O	895,57 mL

8.2 Soluções para teste da hidroxiapatita

8.2.1 Tampão TEM 1X

Tris.Cl (pH 8.0)	10mM
EDTA (pH8.0)	1mM
NaCl	100mM

8.2.2 Tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 6.8)

Na ₂ HPO ₄	46,3 mL
NaH ₂ PO ₄	53,7 mL

VITA

9.1. Dados pessoais

Nome: Cíntia de David

Nascimento: 12/12/1978, Santa Rosa, Rio Grande do Sul, Brasil

CPF: 949918120-20

Filiação: Hélio José de David e Tânia Terezinha Pawlak de David

Endereço residencial: Rua Gonçalves Dias, 1137, ap.309, Menino Deus, Porto Alegre, RS.

Telefone: 3232.4518

E-mail: cintiadedavid@gmail.com

9.2. Formação acadêmica / Titulação

2004 – 2005: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2003: Curso de Especialização Em Análises Clínicas

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

1999 – 2002: Graduação em Farmácia e Bioquímica.

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

9.3. Produção científica

9.3.1. Resumos em anais de eventos

DAVID, Cíntia de; OLIVEIRA, Anna Paula; ENGLERT, Gelsa; ESTEVES, Paulo Augusto; SILVA, Alessandra D'ávila da; ROEHE, Paulo Michel; SIMONETTI, Amauri Braga. Detection of nanobacteria-like particles in cellular cultures. In: XVI Encontro Nacional de Virologia, 2005, Salvador, BA. **Virus Reviews and Research**, 2005. v. 10. p. 117.

OLIVEIRA, Anna Paula de; ROEHE, Paulo Michel; SIMONETTI, Amauri B; **DAVID, Cíntia de**; DONINI, Marco Aurelio; ESTEVES, Paulo Augusto; SILVA, Alessandra D'ávila da; DEZEN, Diogenes. Elisa in serum and blood collected in filter paper for the serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infections. In: XVI Encontro Nacional de Virologia, 2005, Salvador - BA. **Virus Reviews and Research**, 2005. v. 10. p. 121.

DEZEN, Diogenes; ROEHE, Paulo Michel; RIJSEWIJK, Franciscus Maria; ZANELLA, Janice dos Reis Ciacci; OLIVEIRA, Anna Paula de; **DAVID, Cintia de**; COSTA, Helena Beatriz de Carvalho Ruthner da; DONINI, Marco Aurelio; TEIXEIRA, Thaís Fumaco. PCR assessed distribution of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: XVI Encontro Nacional de Virologia, 2005, Salvador - BA. **Virus Reviews & Research**, 2005. v. 10. p. 100.