

1



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

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

PROVA ESCRITA

CANDIDATO: 894125

Ponto 3 - métodos fenotípicos e moleculares

As bactérias patógenas de importância na medicina humana podem ser identificadas em laboratórios de microbiologia por uma série de métodos fenotípicos e moleculares. A identificação do patógeno causador de uma infecção em nível de gênero e espécie é extremamente importante para orientar a conduta terapêutica adotada pelo médico, confirmar o diagnóstico da doença e informar sobre padrões epidemiológicos locais.

A coleta do espécime clínico é o primeiro passo para identificação. O espécime clínico deve ser representativo do local de infecção e deve ser coletado volume suficiente para permitir a realização dos testes diagnósticos. A coleta deve ser feita sob condições assépticas e o material deve ser transportado o mais rápido possível para

(2)

o laboratório, preferencialmente em meios de transporte, como Amies e Cary-Blair, para manter a viabilidade do patógeno. Ex: amostra de secreção vaginal que se transportada em meio Amies.

No laboratório, amostras clínicas provenientes de sítios estéreis podem se submetidas a um método de coloração e visualizados no microscópio, pois podem fornecer informações para orientar a identificação fenotípica e, em alguns casos, (fornecer) contribuir para o diagnóstico presumido (Ex: cocos em esboços gram negativos em amostra de lícor). A principal técnica de coloração empregada é a coloração de Gram, que permite a classificação das bactérias em Gram-positivos e Gram-negativos, baseada nas características da parede celular. As bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano que retém o cristal violeta mesmo após a decoloração com solução de álcool-acetona e coram-se em roxo. As bactérias Gram-negativas contêm uma fina camada de peptidoglicano, mas retém o cristal violeta após a decoloração com álcool-acetona, são contracoradas com fucsina ou safranina e coram-se em rosa. O próximo passo é o semeadura em meios de cultura, pela técnica de esgotamento, para obtenção de colônias isoladas e sugestivas da bactéria patogênica em questão. Os meios de cultura

podem ser ríscos (nutrientes básicos para crescimento de patógenos, ex: TSA), ricos (permite crescimento de bactérias fastidiosas, ex: ágar sangue), seletivos (favorecem o crescimento de um grupo específico de bactérias em detrimento de outros, ex: meio MacConkey é seletivo para bactérias gram-negativas por conter cristal violeta e sais biliares que inibem as gram-positivas) e indicadores (indicam a presença de um grupo de bactérias, ex: meio MacConkey que contém lactose e um indicador de pH que detecta a presença de bactérias fermentadoras de lactose). Existem os meios ~~seletivos~~ seletivo-indicadores, que combinam ambas as características. Ex: ágar MacConkey, ágar EM10, ágar manitol salgado. As placas devem ser incubadas em estufa a 35-37°C por 18-24h para crescimento e visualização de colônias ureoladas. Após o crescimento, as colônias podem ser utilizadas para preparação de um esfregaço e colocação para visualização microscópica e observação de características morfológicas. Além da coloração de Gram podem ser utilizadas as colorações Fontana-Tribonadeau (Cocci-mebacterium), Allect-Hayden (Espiroquetas) e Hehl-Melsen (bacilos álcool-ácido resistentes, BAAR - diagnóstico da tuberculose e visualização de micobactérias). O principal microscópio utilizado é o de campo claro.

(4)

umas podem ser utilizadas no microscópio de campo escuro e microscópio de fluorescência, além de microscópio eletrônico e confocal, mais restritos a laboratórios de pesquisa.

Após o isolamento em meio de cultura, re-
quem-se os testes bioquímicos de identificação.
Esses testes baseiam-se na capacidade das bactérias em utilizar carboidratos do meio, produzir enzimas, utilizar ou não aminoácidos, e fornecer um perfil fenotípico para cada espécie bacteriana, que leva à sua identificação em nível de gênero e, em alguns casos, um nível de ~~espécie~~ espécie. Seguem alguns exemplos abaixo:

- Produção de enzimas: produção de fator CAMP por *Streptococcus agalactiae* diferencia essa espécie de outros *Streptococcus* detrahemáticos.

- Utilização de carboidratos: teste TSI (Triple sugar iron) avalia fermentação de glicose, lactose, sacarose, além da produção de H_2S e gás e diferencia espécies de enterobactérias.

Contudo, os testes bioquímicos são trabalhosos e por vezes demorados, requerem incubação de pelo menos 24h e grande quantidade de inóculo. Para contornar essa situação, surgiram os testes miniaturizados que combinam pequena quantidade de inóculo e testes realizados em pequeno volume (miniaturizados) e permitem resultado mais rápido. Os sistemas automatiza-

des microrganismos da combinação dos sistemas miniaturizados com avaliações da susceptibilidade antimicrobiana (Ex: Titic, Phoenix). O resultado de curvamento microscópico é verificado por diferentes métodos, como turbidez e reações enzimáticas colorimétricas.

Outra alternativa para os testes microbiológicos são os métodos imunológicos, que podem ser diretos (detecção de Aqs) ou indiretos (detecção de Abs). Exemplos de métodos imunológicos são os testes de aglutinação, neutralização, imunoenzimáticos (ELISA), imuno fluorescência (utilização de Abs marcados por fluorescência), entre outros. São muito utilizados para identificação de patógenos de difícil cultivo (Ex: VDRL, PRR para diagnóstico da sífilis - Treponema pallidum) e também para classificação das espécies bacterianas em sorogrupos, baseado na detecção de Aqs específicos. Ex: sorotipagem de E. coli e S. agalactiae, sorogrupagem de enterococos e beta hemolíticos.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos é complementar ao diagnóstico e muito importante para orientar a terapia e identificar padrões de resistência locais e regionais. Pode ser realizado por disco-difusão ou diluições seriadas (micro ou macrodiluição), ou ainda pelo método espectrométrico (Forte E). As diluições seriadas e E-test

(6)

são quantitativos e permitem a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), enquanto a disco-difusão é qualitativa (sensível ou resistente). São padronizados por comitês internacionais (CLSI, EUCAST) e nacionais (BCCAST).

Os métodos fenotípicos são extremamente úteis e considerados padrão ouro em muitos casos, mas apresentam limitações como a demora para a obtenção do resultado e não são aplicáveis a microrganismos não cultiváveis ou com alguma limitação a patógenos de difícil cultivo em meios de cultura convencionais. Nesse contexto, os métodos moleculares surgiram e vem sendo amplamente utilizados.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica baseada no uso de iniciadores específicos, uma DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) e variações de temperatura (desnaturação, anelamento e extensão) durante um número de ciclos determinado (>30) e permite a identificação de genes específicos. Pode ser utilizado para identificação de espécies bacterianas pela detecção de genes constituídos a partir do espécime clínico (sem cultivo) ou a partir da colônia isolada. Também pode ser usada para detecção de

894125

(7)

genes de resistência e virulência. Variações da técnica incluem método PCR, PCR Touch down, PCR in silico e PCR em tempo real (qPCR). A qPCR permite a quantificação de um determinado taxon / espécie bacteriana em amostra, além da sua identificação e também é usada em estudos de expressão gênica (RT-PCR e qPCR). A PCR pode ser ~~usada~~ utilizada também para tipagem molecular pela detecção de sequências repetitivas do genoma, as quais geram um perfil único ~~para~~ para determinados clones e linhagens, acoplada ou não a enzimas de restrição. Ex. BOX-PCR, ERIC-PCR, AFLP, RFLP, ARDRA-PCR, ERISPR-RFLP. A técnica de PFGE (pulsed field gel electrophoresis) analisa o DNA genômico após tratamento com enzimas de restrição de corte raro em gel de agarose em campo pulsado, muito utilizada na detecção de surtos. A técnica MLST (multi locus sequencing typing) analisa a sequência de 7 genes consecutivos, comparados com banco de dados internacional (PubMLST), e classificação de representantes de espécies bacterianas em sequências tipo (ST). Muito utilizado para rastreamento de linhagens virulentas e resistentes aos antimicrobianos em nível regional e global. As técnicas de hibridização de DNA (DNA-DNA ou DNA-RNA), ~~o~~

(8)

em especial a técnica de microarranjo, foram muito utilizadas para estudos taxonômicos e de expressão gênica, mas caíram em desuso com o advento das técnicas de sequenciamento genético.

O sequenciamento genético tem revolucionado a microbiologia, permitindo a identificação e estudos aprofundados de patógenos bacterianos em relação a aspectos taxonômicos, filogenéticos evolutivos e de virulência e resistência.

O sequenciamento do genoma completo tem revolucionado a área da microbiologia médica. O primeiro método foi o método de Sanger, manual e automatizado, baseado na incorporação de didotil nucleotídeos e sequenciamento por síntese. muito laborioso e demorado, permitia o sequenciamento de pequenos fragmentos (200-900 pb). As sequenciadoras de nova geração surgiram para trazer a possibilidade de produzir maior quantidade de dados por corrida, melhor custo-benefício, sequenciamento de genomas completos e análise de mais de uma amostra por corrida. Baseiam-se na fragmentação do DNA genômico, ~~por~~ amplificação clonal (utilização de clones) e sequenciamento. O método mais utilizado atualmente é o de

sequenciamento por síntese da plataforma Illumina. Amplificação por ponte ou de desincrustações marcadas por fluorescência. Os sequenciadores de 3ª geração permitem o sequenciamento de uma única molécula de DNA, sem necessidade de amplificação clonal. Os mais utilizados são os sistemas PacBio e Nanopore da Oxford. Após o sequenciamento, os dados são analisados por ferramentas de bioinformática (montagem, anotação) para identificação, tipagem molecular, taxonomia, estudos filogenéticos, investigação de viristomas, melanomas e leucemias.

Outra técnica que tem vindo a ser utilizada na microbiologia é a espectrometria de massas, especialmente MALDI-TOF MS. Esta técnica é utilizada com sucesso para identificação bacteriana em laboratórios clínicos, em substituição aos testes fenotípicos convencionais. Apresenta rapidez, robustez, bom custo-benefício por análise. As colónias são analisadas com espectros de um conjunto de biomarcadores espécie-específicos que permitem a identificação por comparação a um banco de dados.

Ex: *Micoflex* (Beuhc). ~~A~~ Também é utilizada para tipagem molecular (ecotipagem de *S. pneumoniae*) e deteção de mecanismos de resistência (E): existem

(10)

via a proximidade em gram-negativos).
Técnicas incluem MALDI-TOF/TOF,
MALDI-imaging. A técnica de espectroscopia
com o aprimoramento por transferência
da de Louie emergiu recentemente
e tem sido utilizada com sucesso para
identificação e tipagem molecular de
bactérias patogênicas. Baseia-se na mi-
lidade diferencial da absorção do infravermelho
por diferentes moléculas, em es-
pecial polissacarídeos.

Dessa forma, métodos fenotípicos e
moleculares diversos podem ser aplicados
sozinhos ou em associação para identi-
ficação de patógenos bacterianos, além
de tipagem molecular, estudos da
sua prevalência e persistência, contribuindo
para melhoria do diagnóstico, tratamento,
controle e prevenção de infecções bacte-
rianas.

Ponto 7 - Bactérias gram-negativas

As bactérias gram-negativas representam um importante grupo que inclui espécies patogênicas para o homem e que podem ser encontradas nos mais diversos ambientes incluindo animais, solo, (rivas) matizes aquáticas e até mesmo o ambiente hospitalar.

As bactérias gram-negativas podem ser identificadas por métodos fenotípicos diversos, os principais são descritos a seguir:

- métodos baseados na fermentação de carboidratos: o teste de oxidação/fermentação (OF) da glicose divide as bactérias gram-negativas em fermentadoras (*Enterobacterias*, realizam metabolismo fermentativo) e não fermentadoras (*Pseudomonas aeruginosa* *Cinetobacter baumannii*, realizam metabolismo oxidativo apenas). O teste TSI (Triple Sugar Iron) avalia a capacidade de fermentar glicose, sacarose, lactose, e produzir H_2S e gás, é importante para diferenciação das espécies de *Enterobacterias*.

- testes de desaminação e descarboxilação de aminoácidos em anaerobiose e aerobiose são também muito utilizados.

- testes de detecção de vias fermentativas como os testes de Voges-Proskauer e urease e urease de melíca.

- teste de utilização do citrato como única fonte de carbono também diferenciadas enterobactérias.

Além dos testes bioquímicos citados, a avaliação da motilidade (microscopia ou meios específicos) também é importante. Métodos imunológicos, como métodos de aglutinação, ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência, são utilizados para identificação rápida independente de cultivo para bactérias gram negativas (GN) fastidiosas ~~ou de difícil~~ (ex: Neisseria spp.) ou de difícil cultivo (ex: Lepidopterygillum). Também são utilizados para categorização das GN em subgrupos, como no caso de Escherichia coli baseado em características antigênicas dos antígenos O (LPS), H (capso) e K (flagelo). Ex: E. coli O157:H7.

Os métodos genotípicos e moleculares descritos no ponto 3 também são muito utilizados para identificação e estudo das GN. A técnica de PCR e suas variações é muito aplicada para identificação e detecção de genes de resistência e virulência em GN. Os métodos de tipagem molecular baseados em PCR, ~~(etc)~~ associados ou não a enzimas de restrição (ERIC, BOX-PCR, RFLP-PCR, CRISPR-RFLP), ~~são~~ além de PFGE são utilizados em investigações

epidemiológicas, elucidação de surtos hospitalares. ~~A~~ A técnica de MST também é muito importante para identificação e rastreamento de linhagens associadas à resistência antimicrobiana e ou virulência. Ex: E. coli ST131, Klebsiella pneumoniae ST258. O sequenciamento do genoma completo ^(WGS) também vem sendo aplicado para elucidar aspectos da virulência e relacionamento filogenético das GN, levando a reclassificações taxonômicas. Além disso, o sequenciamento tem permitido a ~~total~~ elucidação e caracterização do contexto genético dos mecanismos de resistência das GN, permitindo a identificação e caracterização das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases e elementos genéticos móveis (plasmídeos, integrons) associados e detecção de outros mecanismos de resistência como as mutações e genes ~~mes~~ associados a resistência às penicilinas. Nesse contexto, os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos constituem ferramenta importante a adotar à identificação/cultura convencional para triagem e detecção de mecanismos de resistência e orientação da terapia antimicrobiana.

métodos baseados na análise de proteínas, como MALDI-TOF MS também vem sendo

amplamente exporados em laboratórios clínicos e de pesquisa para identificação bacteriana, mas também detecção de mecanismos de resistência (ex. resistência às penicilinas).

As bactérias GN podem causar uma série de doenças, incluindo doenças gastrointestinais, respiratórias, ~~as~~ sistema nervoso central, deato genitourinário e infecções associadas à assistência à saúde (IRAS).

Dentre as espécies associadas às doenças gastrointestinais, destacam-se E. coli, Salmonella spp e Shigella spp. E. coli pode ser encontrada no trato gastrointestinal de animais e homens e pode ser classificada em patótipos: E. coli enteropatógeno (EPEC, lesão AE), E. coli enterohemorrágico (EHEC, toxina Shiga, lesão AIB), E. coli enteroinvazivo (EIEC, toxinas e invasão intracelular), E. coli enterotoxigênico (ETEC, toxinas AB) e E. coli de agregação difusa (DAEC, lesão e agregação difusa). Todos esses patótipos causam um maior ou menor grau, dor, diarreia, dor abdominal, febre e que pode ser acompanhada por vômito e sangue no caso de EHEC. E. coli UPEC é (Salmonella spp. cau)

associada a infecção do trato urinário e E. coli K12 à meningite neonatal.

Salmonella spp causa doença diarreica

PFGE são utilizados

ca (S. Enteritidis) ou extra intestinal (febre tifoide, S. ~~Typhi~~ Typhi). ~~Shigella~~
 Pode ser encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais. Shigella spp. possui como único reservatório o homem e produz a toxina Shiga. Ambas causam a uma internalização inoperante do intestinal (mecanismo vaxpa), seguido de escape do fagossoma multiplicação intracelular, disseminação intercelular e lesão tecidual. Produzem toxinas e interferem com a sinalização intracelular e acúmulo de fluidos no lúmen intestinal, causando diarreia intensa, que dor abdominal e febre. A Shigella sp. causa a disenteria bacilar clássica.

Neisseria meningitidis causa doença meningocócica (meningite e meningococemia), caracteriza por rigidez da nuca, febre, dor de cabeça e erupções petequiais (meningococcemia). Doença grave que pode levar a óbito, homem é único reservatório, transmitida por secreções respiratórias. Neisseria gonorrhoeae causa gonorréia, uma doença sexualmente transmissível, cujo principal sintoma é a uretrite. As Neisseria sp. possuem como principais fatores de virulência as fimbrias tipo IV, proteínas de membrana externa (Opa), variação antigênica e de fase e

o dipolissacarídeo da membrana externa (LOS).

E. coli, *Salmonella* e *Shigella* possuem sistemas de secreção como o tipo III, proteínas de membrana externa e o lipídeo A do dipolissacarídeo como fatores de virulência.

Pseudomonas aeruginosa destaca-se como patógeno oportunista e associada à IDAS. É resistente ao meio externo, possui vários fatores de virulência (fimbria tipo IV, lecitinas, alginato, entre outros) e mecanismos de resistência naturais e adquiridos. *A. baumannii* também é um patógeno oportunista associado à IDAS. Possui diversos fatores de virulência e mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos. *P. aeruginosa* é um importante patógeno em pacientes com fístula cística.

P. aeruginosa, *A. baumannii* e *Enterobacteriales* produtores de ESBL e carbapenemas são considerados ameaças globais à Saúde Pública pela OMS.

O controle das infecções se dá pelo tratamento com antimicrobianos, cefalosporinas 3ª geração, aminoglicosídeos ou carbapenemas. Devido a resistência, polimixinas podem ser usadas, mas já há resistência (mutações e gene *mec*). A meningite meningocócica e

11

(epidemiológicas)

prevenível por vacinação (sorotipos B, C, A+E+W+Y) e a gonocócica é prevenível por uso de preservativo e práticas de sexo seguro. As doenças diarréicas nem sempre precisam de terapia antimicrobiana (actolimitada) e são prevenidas por medidas de saneamento básico e higiene, preparo seguro de alimentos.

Ponto 9 - Evolução

ao longo dos anos, as bactérias têm usado de forma a se adaptar às condições ambientais que são submetidas e apenas vive o seu fitness. A seleção natural atua como uma força que seleciona indivíduos melhor adaptados a uma determinada condição. Por exemplo, bactérias que adquiriram um determinado mecanismo de resistência, p.ex. enzima ESBL, são selecionadas na presença de um beta-lactâmico, como uma cefalosporina. A duplicação gênica é outro mecanismo atuante na evolução pois permite que um gene seja duplicado, um deles mantém a função original, enquanto o outro pode sofrer diversificações em sua sequência e evoluir para

desempenhar uma função diferente.

Outra força muito importante é o mecanismo de redução gênica, especialmente importante para patógenos intracelulares. Nesse caso, o organismo intracelular evolui e se adapta ao seu hospedeiro de forma a perder genes não mais necessários (perda de genes ou perda de genes) para utilizar a maquinaria do hospedeiro e nutrientes para sua sobrevivência.

No entanto, as forças que mais contribuem com a redução e variação da diversidade dos genomas bacterianos são as mutações e os eventos de transferência horizontal de genes. As mutações são eventos que acontecem ao acaso e podem ser benéficas ou neutras (código genético degenerado) ou ainda ~~mutação~~ prejudiciais à bactéria. As mutações neutras e benéficas são mantidas, pois conferem vantagem, e as prejudiciais são eliminadas por seleção natural. As mutações podem conferir alterações de um único nucleotídeo (SNPs) ou eventos de inserção ou deleção de um nucleotídeo ou um pequeno trecho de DNA (INDELS) (~~Os mecanismos de~~) As mutações caracterizam-se como eventos de transmissão vertical da célula mãe para

as células filhas. Os eventos de transferência horizontal de genes permitem a aquisição lateral de DNA exógeno pela bactéria, seguido da sua incorporação. Nesse contexto, o DNA exógeno pode ser incorporado como por recombinação (homóloga ou não-homóloga) mediado pela ação de endonucleases da família Rec (Ex: RecA) ou permanecer no citoplasma (plasmídeos). Geralmente, os eventos de THG permitem que a bactéria adquira funções acessórias não essenciais, mas que podem contribuir para sua adaptação ao hospedeiro ou ambiente, como a aquisição de genes de resistência e virulência. Nesse contexto os conceitos de genoma core, genoma acessório e pan-genoma são importantes. O genoma core constitui o conjunto de genes compartilhados por todos os representantes de uma espécie, ditos "essenciais". As mutações são a principal força de redução do genoma core. O genoma acessório constitui os genes adquiridos pela bactéria ao longo da sua evolução, que não são compartilhados por todos os representantes de uma espécie. A principal força que reduz a redução do genoma acessório é a THG. O pan-genoma é o conjunto do genoma core e genoma acessório.

ATHG caracteriza-se por 3 mecanismos -

mos: transfoemacão, transdução e conjugação. Na transfoemacão, DNA exógeno do meio externo é captado por uma célula receptora que se encontra no seu estado de competência. Modificações na superfície celular ocorrem em resposta a estímulos ambientais (Ex: quorum sensing) que permitem a incorporação do DNA. *Neisseria* sp. tem competência natural e *S. pneumoniae* induzida. Na transdução, um bactéiofago infecta uma célula bacteriana e pode entrar no ciclo lítico: usa a máquina da célula para se multiplicar e produzir mais células. Caso haja um empacotamento do fago, parte do cromossoma bacteriano pode ser empacotado na partícula viral e ser transferido para outra bactéria em uma nova infecção. O bactéiofago pode iniciar também o ciclo lisogênico e se incorporar no cromossoma bacteriano de forma inativa. Em resposta a estímulos ambientais, o fago pode se excisar e entrar no ciclo lítico. Caso parte do cromossoma bacteriano seja excisado com o material genético do fago, pode ser transferido para uma próxima bactéria infectada. A conjugação física é a incorporação de DNA fóssil que codifica funções específicas, como toxina (Ex: *Yersinia enterocolitica* e a toxina

uma colônia). A conjugação é um mecanismo que envolve a transferência de material genético entre duas células e envolve o contato célula-célula. É mediado por plasmídeos conjugativos ou transposons conjugativos. Em bactérias gram-negativas há a formação do pilus sexual pela célula doadora a qual é reconhecido pela receptora. Em gram-positivos, a célula receptora produz piliamentos sexuais que estimulam uma aproximação na superfície celular da célula doadora e o contato sexual. Plasmídeos conjugativos e transposons codificam o aparato de conjugação (genes tra e traI) com produção da ~~relaxase~~ relaxase e dos complexos ~~transferonoma~~ traI e traII proteínas de acoplamento e relaxonoma. Após a transferência, o material genético é incorporado ao cromossomo no caso dos transposons ou permanece no citoplasma no caso dos plasmídeos. Os plasmídeos podem eventualmente integrar-se aos cromossomos (episômo).

Os elementos genéticos móveis (EGM), ex. plasmídeos, transposons, sequências de inserção, ilhas cromossômicas, integrons são essenciais nos mecanismos de DNA e para a evolução das bactérias. Carriam genes que codificam características

acessorias benéficas às células bacterianas como genes de resistência e virulência, que favorecem a maior patogenicidade e/ou adaptação ao hospedeiro. Transposons são muito importantes em bactérias gram-positivas enquanto plasmídeos e integons são mais presentes em bactérias gram-negativas e tem sido associados a emergência de cepas multiresistentes. Plasmasomas geralmente carregam grupos de genes de virulência relacionados (ex: sistemas de secreção ~~Sec~~ e genes de resistência) (see mec de S. aureus).

Dessa forma, diferentes mecanismos e forças atuam para modular a plasticidade dos genomas bacterianos e contribuem para sua evolução.