

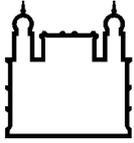
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária
Mestrado

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE
Burkholderia cenocepacia E MACRÓFAGOS ALVEOLARES
IN VITRO E DA INFECÇÃO DE MODELOS MURINOS**

RHAISSA CALIXTO VIEIRA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RHAISSA CALIXTO VIEIRA

Avaliação da interação entre *Burkholderia cenocepacia* e macrófagos alveolares *in vitro* e da infecção de modelos murinos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

Orientadora: Dr^a Joseli Lannes-Vieira

Colaborador: Dr Daniel Gibaldi

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V658 Vieira, Rhaissa Calixto

Avaliação da interação entre *Burkholderia cenocepacia* e macrófagos alveolares *in vitro* e da infecção de modelos murinos / Rhaissa Calixto Vieira. – Rio de Janeiro, 2016.

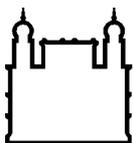
xvi, 77 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 68-77

1. Macrófagos alveolares. 2. *Burkholderia cenocepacia*. 3. Óxido nítrico sintase induzível. 4. Arginase. I. Título.

CDD 571.9685



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RHAISSA CALIXTO VIEIRA

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE
***Burkholderia cenocepacia* E MACRÓFAGOS ALVEOLARES**
***IN VITRO* E DA INFECÇÃO DE MODELOS MURINOS**

ORIENTADORA: Dr^a Joseli Lannes-Vieira

Colaborador: Dr Daniel Gibaldi

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani - Presidente (IOC-Fiocruz/RJ)

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (IOC-Fiocruz/RJ)

Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas (IOC-Fiocruz/RJ)

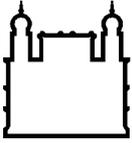
Prof. Dr. Bianca Cruz Neves (UFRJ/RJ)

Prof. Dr. Johnatas Dutra Silva (UFRJ/RJ)

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2016

**“In my view, all that is necessary for faith
is the belief that by doing our best we
shall succeed in our aims: the
improvement of mankind.”**

Rosalind Franklin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Rhaissa Calixto Vieira**, sob orientação da Dr^a. Joseli Lannes Vieira. Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Interação entre *Burkholderia cenocepacia* e macrófagos alveolares *in vitro* e em modelos murinos *in vivo*.**" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Marcelo Pelajo Machado - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Bianca Cruz Nevez - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Paulo Renato Zuquim Antas - IOC/FIOCRUZ e Dr. Johnatas Dutra Silva - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2016.

Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani (Presidente da Banca):

Dr. Marcelo Pelajo Machado (Membro da Banca):

Dr^a. Bianca Cruz Nevez (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

AGRADECIMENTOS

Ao universo, esse grande gerador de probabilidades infinitas.

Aos meus pais, Flávia e Marcelo, que por caminhos distintos e de maneiras diferentes construíram o que sou.

À minha querida avó, Maria Aparecida, pela imensidão em seu coração, me apoiando mesmo não me compreendendo muito bem.

Ao meu primo, João Neto, por me abrigar em seu apartamento durante meus 3 primeiros meses no Rio de Janeiro, pelos conselhos científicos e pessoais.

À Hayohanna, que esteve ao meu lado, me ajudando a sobreviver nesta selva urbana que é o Rio de Janeiro.

À equipe de 2014 do Laboratório de Biologia das Interações, que, cada um à sua maneira, contribuiu para que eu adquirisse maturidade científica e pessoal.

À queridíssima Lucilene, pelos cafés, pães na chapa e pães recheados, fundamentais principalmente em longos dias de bancada.

À Dr^a Joseli Lannes, chefe do Laboratório de Biologia das Interações e orientadora, pela confiança em abrir as portas de seu grupo de pesquisa, paciência e generosidade em promover o amadurecimento de meu pensar científico.

Ao Dr. Daniel Gibaldi, pelo exímio e sempre paciente ensinamento em cultivo celular, discussões científicas que contribuíram para meu amadurecimento, pelas caronas e conversas.

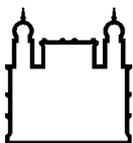
À doutoranda Glaucia Vilar por rever as observações encontradas no exame clínico dos camundongos utilizados neste estudo.

Ao colaborador Marcelo Meuser, do Departamento de Anatomia Patológica do Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ, pelo preparo das lâminas e colorações com cortes histológicos.

À Dr^a Marise Dutra Asensi e Dr^a Ana Paula D'A. C. Assef, do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar e curadoras da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH), pela análise bacteriológica das cepas de *Burkholderia*.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), por proporcionar tamanho crescimento a mim.

Por fim, às agências de fomento à pesquisa, CNPq, FAPERJ, INCT Vacinas e PROEP/IOC/Fiocruz.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

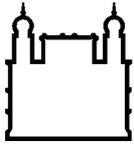
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE *Burkholderia cenocepacia* E MACRÓFAGOS ALVEOLARES *IN VITRO* E DA INFECÇÃO DE MODELOS MURINOS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Rhaissa Calixto Vieira

Burkholderia cenocepacia é uma bactéria gram-negativa associada a infecções pulmonares oportunistas acometendo portadores de fibrose cística, doença granulomatosa crônica ou que apresentem algum tipo de imunodeficiência, podendo resultar em declínio da função pulmonar e no quadro séptico conhecido como síndrome cepacia. Por mecanismos de escape *B. cenocepacia* promove atraso na maturação do fagolisossomo, enquanto fatores envolvidos na resistência a ROS desempenham papel na sobrevivência intracelular. Dados de nosso laboratório mostram que cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos e da linhagem RAW 264.7 estimulados com IFN γ e LPS, quando desafiados com *B. cenocepacia*, apresentam reduzidos níveis de NO $_x$ nos sobrenadantes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta efetora de macrófagos alveolares de camundongo da linhagem AMJ2-C11 na infecção por *B. cenocepacia*. Além disso, avaliamos a infecção de camundongos imunocompetentes C57BL/6 ou geneticamente deficientes para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2). Nossos resultados indicam que *B. cenocepacia* é capaz de desativar mecanismos efetores da resposta clássica de macrófagos, redirecionando para o perfil alternativo de ativação. Observamos em cultivos de macrófagos AMJ2-C11 expostos à *B. cenocepacia* (i) concentrações reduzidas de NO $_x$ e concentrações aumentadas de ureia em sobrenadantes, (ii) aumento da expressão da enzima arginase e baixa expressão de iNOS/NOS2 nestas células, (iii) menor frequência de células expressando MHC-I e moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 e CD40), e por fim (iv) baixas concentrações de TNF nos sobrenadantes. Semelhante ao encontrado nos sobrenadantes dos cultivos na presença de *B. cenocepacia*, os lavados pleurais de animais infectados pela bactéria apresentam aumento na produção de ureia em detrimento da produção de NO $_x$. Em 72 horas de infecção, contagem de CFU encontra-se aumentada nos animais deficientes em iNOS/NOS2, enquanto é controlada em animais C57BL/6 imunocompetentes. Todos os camundongos infectados apresentaram perda de peso nas primeiras 72 horas de infecção. Animais C57BL/6 recuperaram peso corporal, apresentando ao término da análise ganho ponderal semelhante aos não infectados. Por outro lado, animais *inos*^{-/-} infectados acumularam perda ponderal no decorrer do tempo analisado, apresentando em torno de 40% de perda de massa corpórea e apresentaram 100% de mortalidade em 13 dias pós-infecção, ao passo que não houveram mortalidade em animais controles (NI). Os pulmões dos animais *inos*^{-/-} infectados apresentam alterações histológicas agudas, comparados tanto aos controles não infectados, e mais intensas que os animais C57BL/6 infectados. Em conjunto nossos dados sugerem que a infecção por *B. cenocepacia* interfere no balanço das vias óxido nítrico sintase induzível e arginase, favorecendo esta última, o que poderia promover a atenuação da resposta inflamatória e a persistência da infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF INTERACTION BETWEEN *Burkholderia cenocepacia* AND ALVEOLAR MACROPHAGES *IN VITRO* AND OF INFECTION OF MOUSE MODELS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Rhaissa Calixto Vieira

Burkholderia cenocepacia is a gram-negative bacteria associated with opportunistic lung infections affecting patients with cystic fibrosis, chronic granulomatous disease or immunodeficiencies, which can result in decreased pulmonary function and sepsis known as cepacia syndrome. By escape mechanisms *B. cenocepacia* promotes delay in maturation of phagolysosome, since cell factors involved in ROS resistance play a role in intracellular survival. Data from our laboratory show that cultures *in vitro* of mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cell line stimulated with LPS and IFN γ , when challenged with *B. cenocepacia* present reduced NO $_x$ levels in the supernatants. The aim of the present work was to evaluate the effector response of mouse alveolar macrophages of the cell lineage AMJ2-C11 challenged by infection with *B. cenocepacia*. In addition, we evaluated the infection of mice immunocompetent (C57BL/6) or genetically deficient for the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS2). Our results indicate that *B. cenocepacia* can disable effector mechanisms of classical response of macrophages, redirecting to the alternative profile of activation. We observed in AMJ2-C11 macrophage exposed to *B. cenocepacia* (i) reduced concentrations of NO $_x$ and increased concentrations of urea in supernatants, (ii) increased expression of arginase and low expression of iNOS/NOS2 in these cells, (iii) lower frequency of cells expressing MHC-I and costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40), and finally (iv) lower TNF concentrations in the supernatants. Akin the findings in supernatants of AMJ2-C11 macrophage exposed to *B. cenocepacia*, pleural washes recovered from infected mice show increased production of urea, while NO $_x$ was barely detected. At 72 hours of infection, CFU counts were increased in pleural washes of iNOS/NOS2-deficient mice, while bacteria growth was controlled in immunocompetent mice. All infected mice showed initial weight loss. After 72 hours of infection, C57BL/6 mice recovered body weight, showing similar weight gain to uninfected mice. On the other hand, *B. cenocepacia*-infected *inos*^{-/-} mice accumulated body weight loss (~ 40%) during the course of infection, showing 100% of mortality at 13 days post-infection, whereas none of the control mice showed mortality. The lungs of *B. cenocepacia*-infected *inos*^{-/-} mice showed acute histological alterations in comparison with uninfected controls, and more intense abnormalities when compared to infected C57BL/6 mice. Taken together our data suggest that the infection by *B. cenocepacia* interferes with the balance of the inducible nitric oxide synthase and arginase, favoring the latter, which could promote the attenuation of the inflammatory response and the persistence of infection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AHLs	N-acil-homoserina lactonas
APCs	células apresentadoras de antígenos
Arg-I	arginase I
Arg-II	arginase II
CBC	complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CCL17/TARC	ligante 17 de CC quimiocina /quimiocina do timo regulada por ativação
CCL22	ligante 22 de CC quimiocina
CD40L	ligante de CD40
<i>Cftr</i>	<i>regulador de condutância transmembranar de fibrose cística</i>
CFU	unidades formadoras de colônias
CQ13	citoqueratina 13
CXCL1	proteína do tipo reguladora do crescimento celular
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano
DGC	doença granulomatosa crônica
eNOS/NOS3	óxido nítrico sintase endotelial
ET12	<i>eletrophoretic type 12</i>
FC	fibrose cística
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
IFN γ	interferon- γ
IG	ilhas genômicas
IL-10	interleucina 10
IL-10R	receptor de interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina-13
IL-18	interleucina 18
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-23	interleucina 23
IL-6	interleucina 6
iNOS/NOS2	óxido nítrico sintase induzível

IS	sequências de inserção
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MCP	proteína quimiotática de monócitos
MCP-1/CCL2	proteína quimiotática de monócitos 1
MDMs	macrófagos derivados de monócitos
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIP-2	proteína inflamatória de macrófago-2
MOI	multiplicidade de infecção
MyD-88	gene de resposta primária de diferenciação mielóide-88
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ -B	fator nuclear <i>kappa</i> -B
NK	<i>natural killer</i> , células citotóxicas
nNOS/NOS1	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO _x	óxidos de nitrogênio
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
NOR	óxido nítrico redutase
OAT	ornitina aminotransferase
ODC	ornitina decarboxilase
OTC	ornitina transcarbamilase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	célula mononuclear de sangue periférico
PFA	paraformaldeído
PKA	proteína quinase A
PKG	proteína quinase G
PMNs	células polimorfonucleares
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio

SOD	superóxido dismutase
T3SS	sistema de secreção de tipo III
T6SS	sistema de secreção tipo 6
TGF- β	fator transformador de crescimento
TLRs	receptores do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Principais características de virulência e estrutura genômica de <i>B. cenocepacia</i> cepa J2315.....	7
Figura 2.2: Metabolismo da arginina, catalisada por arginase e óxido nítrico sintase (iNOS).12	
Figura 2.3: Ativação e resposta de macrófagos M1..	13
Figura 5.1. <i>Detecção de NO em macrófagos das linhagens RAW 246.7 e AMJ2-C11. Detecção de NO em interação entre macrófago e Burkholderia cenocepacia.....</i>	27
Figura 5.2. <i>Detecção de NO em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença de Burkholderia cenocepacia inativada em diferentes concentrações de paraformaldeído. 29</i>	
Figura 5.3. <i>Detecção de NO em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença de Burkholderia cenocepacia ativa e inativa.....</i>	30
Figura 5.4. <i>Viabilidade das células da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos após 24h de ensaio.</i>	31
Figura 5.5. <i>Cinética de infecção por Burkholderia cenocepacia na linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos..</i>	33
Figura 5.6. <i>Padronização de detecção de expressão de proteína iNOS/NOS2 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS/IFNγ.</i>	35
Figura 5.7. <i>Expressão de proteínas iNOS/NOS2 e ARGII em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 mediante infecção por Burkholderia cenocepacia.</i>	36
Figura 5.8. <i>Detecção de NO e ureia em macrófagos da linhagem AMJ2-C11. Teste de redirecionamento de resposta, segundo a condição experimental A.....</i>	38
Figura 5.9. <i>Detecção de NO e ureia em macrófagos da linhagem AMJ2-C11. Teste de redirecionamento de resposta, segundo as condições experimentais B e C.....</i>	39
Figura 5.10. <i>Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (MHC-I e MHC-II) em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com Burkholderia cenocepacia.</i>	41
Figura 5.11. <i>Expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com Burkholderia cenocepacia.....</i>	433
Figura 5.12. <i>Expressão da molécula coestimuladora CD40 em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com Burkholderia cenocepacia.</i>	44
Figura 5.13. <i>Detecção de TNF em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença da infecção por Burkholderia cenocepacia.</i>	45

Figura 5.14. <i>Infecção experimental por Burkholderia cenocepacia em camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2.</i>	47
Figura 5.15. <i>Detecção de NO e ureia em lavado pleural de camundongos C57BL/6 e inos^{-/-} infectados por Burkholderia cenocepacia.</i>	48
Figura 5.16. <i>Histologias de pulmão de camundongos camundongos C57BL/6 e inos^{-/-} injetados com salina.</i>	51
Figura 5.17. <i>Histologias de pulmão de camundongos camundongos C57BL/6 e inos^{-/-} infectados com Burkholderia cenocepacia.</i>	52
Figura 5.18. <i>Camundongos C57BL/6 e inos^{-/-} infectados com Burkholderia cenocepacia, alterações físicas.</i>	54
Figura 5.19. <i>Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 e inos^{-/-} após infecção experimental por Burkholderia cenocepacia.</i>	55

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
SUMÁRIO.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Burkholderia cenocepacia</i>	3
2.1.1. Impacto na saúde humana	5
2.1.2. Patogênese da infecção.....	6
2.1.3. Modelos de estudo da interação <i>Burkholderia cenocepacia</i> com o hospedeiro.....	8
2.2. Macrófagos e homeostase tecidual	9
2.2.1. Polarização de Macrófagos	11
2.3. Interação de macrófagos com <i>Burkholderia cenocepacia</i>	14
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	18
4.1.1. Linhagens de macrófagos murinos	18
4.1.2. Cepa bacteriana de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	18
4.1.3. Obtenção das linhagens de macrófagos, infecção dos cultivos por <i>Burkholderia cenocepacia</i> e desenho experimental.....	18
4.1.4. Dosagem de óxido nítrico.....	19
4.1.5. Dosagem de ureia.....	19
4.1.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	20
4.1.7. <i>Western blotting</i>	20
4.1.8. Citometria de Fluxo	22
4.2. Ensaios <i>in vivo</i>	23
4.2.1. Animais.....	23
4.2.2. Infecção experimental pela cepa J2315 de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	23
4.2.3. Curva de sobrevivência e registro de peso corporal.....	24
4.2.4. Obtenção e processamento de exsudatos e tecidos	24
4.2.5. Quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU).....	24
4.2.6. Histologia.....	25
4.2.7. Análise estatística.....	25

5. RESULTADOS	26
5.1. Estabelecimento de modelo de infecção por <i>Burkholderia cenocepacia</i> em linhagem de macrófago alveolar de camundongos.....	26
5.2. Efeitos sobre a linhagem de macrófagos alveolares AMJ2-C11 dependem da viabilidade/atividade de <i>Burkholderia cenocepacia</i>	28
5.3. Viabilidade das células da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongo após 24 horas de ensaio	31
5.4. Cinética de detecção de NO _x e ureia em cultivos de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 infectados por <i>Burkholderia cenocepacia</i>	32
5.5. Expressão de proteínas iNOS/NOS2 e argII mediante infecção de células AMJ2-C11 por <i>Burkholderia cenocepacia</i>	34
5.6. Detecção de NO _x e ureia em sobrenadantes da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos em diferentes condições experimentais.....	37
5.7. Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (MHC I e MHC II) em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 após interação com <i>Burkholderia cenocepacia</i>	40
5.8. Expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) e CD40 em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 após interação com <i>Burkholderia cenocepacia</i>	42
5.9. Detecção de citocinas em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença da infecção por <i>Burkholderia cenocepacia</i>	45
5.10. Infecção experimental por <i>Burkholderia cenocepacia</i> em camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2	46
5.11. Detecção de NO _x e ureia em lavado pleural de camundongos competentes e deficientes em iNOS/NOS2 infectados por <i>Burkholderia cenocepacia</i>	48
5.12. Achados histológicos em pulmão de camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2	49
5.13. Avaliação clínica e curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 e <i>inos^{-/-}</i> após a infecção experimental por <i>Burkholderia cenocepacia</i>	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	66
8. PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

Burkholderia cenocepacia é uma, de pelo menos 17 espécies classificadas dentro do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; VANLAERE et al., 2008, 2009) que compreende bactérias fenotipicamente distintas, porém genotipicamente semelhantes. São bactérias gram-negativas, comumente encontradas em diversos nichos ecológicos, e que estabelecem relações ecológicas harmônicas e por vezes patogênicas (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005). Estas bactérias são descritas como estando associadas à infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com fibrose cística (FC) ou doença granulomatosa crônica (DGC) (LOUTET; VALVANO, 2010). Na FC, o imunocomprometimento é decorrente do dano fisiológico permanente devido à mutação no gene que codifica a proteína *cftr* (regulador de condutância transmembranar de fibrose cística), enquanto que na DGC as células fagocíticas são incapazes de promover resposta oxidativa eficaz contra patógenos (DAVIS, 2006; JOHNSTON, 2001).

Diversos estudos apontam que *B. cenocepacia*, é capaz de evadir-se da resposta imune inata. MACDONALD e SPEERT (2008), estudando a resposta de células dendríticas frente à infecção por *B. cenocepacia*, observaram que há redução da expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), interferindo na maturação normal desse tipo celular. Em neutrófilos, foi demonstrado que a infecção por *B. cenocepacia* inibe a quimiotaxia e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ambos componentes essenciais de resposta imune inata mediada por essas células (BYLUND et al., 2006). Em portadores de FC, por exemplo, ao colonizar o trato respiratório, bactérias do complexo CBC podem invadir o epitélio e sobreviver dentro de células epiteliais e de macrófagos (AL-KHODOR et al., 2014), apresentando alto potencial para causar quadros clínicos graves, como a síndrome cepacia, caracterizada por alta bacteremia e septicemia, podendo levar ao óbito (BLACKBURN et al., 2004). De fato, em estudo utilizando macrófagos oriundos de portadores de FC, foi observado aumento de morte celular e sobrevivência de bactérias em comparação a macrófagos *cftr* competentes, sendo *B. cenocepacia* encontrada livre no citosol uma hora após a infecção, indicando o escape da via autofágica (ABDULRAHMAN et al., 2011; AL-KHODOR et al., 2014). LAMOTHE et al (2007) utilizando um modelo de infecção *in vitro* investigaram a sobrevivência de *B. cenocepacia* em macrófagos murinos de linhagem (RAW 264.7), descrevendo um atraso na formação do fagossomo após a infecção, o que poderia contribuir para o escape dos mecanismos microbicidas da célula hospedeira.

A propósito dos diversos fatores de virulência já estudados e bem caracterizados em *B. cenocepacia*, ainda permanece obscura a patogênese das alterações resultantes da infecção. Sendo os macrófagos uma das primeiras linhas de interação com microrganismos, como a *B. cenocepacia*, estes desempenham importante papel no desencadear de resposta inflamatória/microbicida. Contudo, macrófagos também desempenham importante papel regulador e no reestabelecimento da homeostase. Esse aspecto duplo da biologia de macrófagos deve-se ao balanço entre as vias óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2) e arginase que competem pelo mesmo substrato, o aminoácido arginina. Os estímulos que levam o macrófago a metabolizar a arginina via iNOS, formando óxido nítrico (NO) e citrulina, ou via arginase, gerando ornitina e ureia, definem o macrófago como M1 (iNOS⁺) ou M2 (arginase⁺) (RATH et al., 2014). Nesta perspectiva, dados de nosso laboratório utilizando cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) e desafiados com *B. cenocepacia* mostram a capacidade destas bactérias em modular os níveis de NO nestas células. Em conjunto, estes dados nos levaram a propor a hipótese de que a infecção por *B. cenocepacia* modula a atividade efetora/microbicida de macrófagos, promovendo atenuação da resposta inflamatória e contribuindo para a persistência da infecção. Considerando que *B. cenocepacia* está associada a infecções pulmonares, investigamos neste trabalho de dissertação a interação entre esta bactéria e macrófagos alveolares de linhagem murina. Para isto, utilizamos abordagens *in vitro*, avaliando a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, além de caracterizar a expressão de moléculas coestimuladoras após a interação entre a célula hospedeira e a bactéria. Além disto, abordagens *in vivo* também foram foco deste estudo, visando avaliar os danos tissulares, tendo como alvo de estudo o pulmão, após colonização bacteriana em camundongos competentes e geneticamente deficientes para a enzima iNOS/NOS2. Assim, esperamos contribuir para a compreensão de outros fatores para além dos já descritos, que permitem o escape de *B. cenocepacia* de mecanismos inatos efetores, com a geração de conhecimento para a área em estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Burkholderia cenocepacia*

O gênero *Burkholderia* compreende atualmente mais de 60 espécies descritas (SUÁREZ-MORENO et al., 2012). São gram-negativas, comumente encontradas em diversos nichos ecológicos, e que estabelecem relações ecológicas harmônicas e por vezes patogênicas (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005). Originalmente, as primeiras espécies de *Burkholderia* foram classificadas no gênero *Pseudomonas* por Walter Burkholder, que em 1950 descreveu a espécie *Pseudomonas cepacia* como fitopatógeno causador de danos a cultivos de cebola (BURKHOLDER, 1950). Posteriormente, em 1992, foi proposto e criado o gênero *Burkholderia* a fim de acomodar as espécies que compunham o até então grupo II de bactérias pseudomonadas (YABUUCHI et al., 1992)

Dois grupos principais podem ser distinguíveis dentro do gênero *Burkholderia*. No primeiro são agrupadas espécies patogênicas que compreendem o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), o grupo “pseudomallei”, patógenos de plantas bem como espécies endossimbióticas de fungos fitopatogênicos, enquanto o segundo grupo é composto por espécies não patogênicas (SUÁREZ-MORENO et al., 2012). Bactérias desse gênero têm sido isoladas a partir de nichos ecológicos extremamente diversificados, como em solos, rizosfera, água, plantas, fungos, ambientes hospitalares e seres humanos infectados (COENYE; VANDAMME, 2003).

B. cenocepacia é uma, de pelo menos 17 espécies classificadas dentro do CBC, (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; VANLAERE et al., 2008, 2009) que compreende bactérias fenotipicamente distintas, porém genotipicamente semelhantes. As espécies que compõe o CBC são, de modo geral, comuns no ambiente, ocupando diversos nichos, tendo algumas espécies descritas em interações benéficas com plantas hospedeiras, sendo comercialmente utilizadas como biopesticida no combate de doenças fúngicas em plantações, agente promotor do crescimento de plantas ou, até mesmo, como agente biorremediador de poluentes (COENYE; VANDAMME, 2003; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Essas aplicações biotecnológicas interessantes vão de encontro as graves e, por vezes, fatais infecções que bactérias do CBC podem causar. Nos últimos 40 anos, algumas espécies dentro do CBC têm emergido como problema de saúde pública, associado à infecções oportunistas em indivíduos portadores de fibrose cística (FC), doença granulomatosa crônica (DGC) ou com algum tipo de imunodeficiência (Tabela 1). Não há nenhuma distinção clara entre os isolados de origem

ambiental ou clínicos, sendo amplamente aceito, portanto, que o ambiente natural é a fonte de CBC em doenças infecciosas (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). Sabe-se, porém, que podem ocorrer infecções cruzadas entre portadores de FC (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; VANDAMME, 2002), e que há mudança no perfil de expressão gênica do isolado oriundo de infecção pulmonar em relação àquele obtido a partir do solo, por exemplo (DREVINEK et al., 2008). São observados também em bactérias do CBC mecanismos como *quorum sensing*, formação de biofilme e produção de sideróforos (ligantes específicos de Fe³⁺ que atuam como quelantes), que contribuem para a virulência tanto em modelo de infecção em murinos, como em modelos utilizando plantas leguminosas (VIAL et al., 2011).

Tabela 1: Bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* na Fibrose Cística. Adaptado de: MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008 e SPEERT, 2002.

Espécie CBC	Características e prevalência na Fibrose Cística
<i>B. cepacia</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. multivorans</i>	Segunda espécie mais comum em infecções por CBC na FC; relacionada a transmissões entre pacientes FC; várias cepas descritas oriundas de surtos epidêmicos. Presente em infecções na DGC
<i>B. cenocepacia</i>	Primeira espécie mais comum em infecções por CBC na FC (70% dos casos de infecção); linhagens altamente transmissíveis associadas à um mau prognóstico. Presente em infecções na DGC
<i>B. stabilis</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. vietnamiensis</i>	Prevalência limitada como patógeno em FC. Presente em infecções na DGC
<i>B. dolosa</i>	Transmissão entre pacientes FC descrita em surto epidêmico nos Estados Unidos
<i>B. ambifaria</i>	Raramente encontrada como patógeno em FC
<i>B. anthina</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. pyrrocinia</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. ubonensis</i>	Isolado a partir de infecção clínica não associada à FC
<i>B. latens</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. diffusa</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. arboris</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. seminalis</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. metallica</i>	Baixa prevalência em infecções na FC
<i>B. contaminans</i>	Raramente encontrada como patógeno em FC
<i>B. lata</i>	Raramente encontrada como patógeno em FC

2.1.1. Impacto na saúde humana

Como patógenos oportunistas, cepas do CBC normalmente não infectam indivíduos saudáveis, apenas aqueles imunocomprometidos. Sendo essas infecções de origem pulmonar, têm como características o desenvolvimento de pneumonia aguda, acompanhada de declínio da função respiratória, e o quadro de septicemia descrito como síndrome cepacia (ISLES, 1984), status clínico que raramente ocorre durante infecções por outros tipos de patógenos (SPEERT et al., 1999). De modo geral, os indivíduos afetados são primordialmente portadores FC que possuem a fisiologia das vias aéreas alterada devido à mutação na proteína *cfr*, que sob condições normais funciona como um canal responsável pelo transporte do íon cloreto. Esta disfunção resulta em maior fluxo de sódio para o interior das células, o que preservaria o equilíbrio eletroquímico, que nas vias aéreas culmina com espessamento da mucoviscosidade, alteração esta que propicia a colonização do trato respiratório por bactérias oportunistas (DAVIS, 2006). Em menor grau, a infecção oportunista por *B. cenocepacia* afeta também portadores da DGC, uma imunodeficiência rara que resulta em comprometimento do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase de fagócitos tornando-os incapazes de promover uma resposta oxidativa eficaz contra patógenos (JOHNSTON, 2001).

A capacidade de bactérias do CBC em infectar indivíduos com FC não é espécie-dependente, visto que, com a exceção da espécie *Burkholderia ubonensis*, todas espécies dentro do complexo já foram isolados de pacientes FC (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; VANDAMME, 2002). Porém, a maior parte das infecções ocorre por *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). De maneira similar, na DGC, o principal grupo de bactérias que geram um quadro clínico fatal são membros do complexo CBC, sendo particularmente problemáticas as infecções por *B. cenocepacia* (SPEERT, 2002), visto que portadores de DGC são suscetíveis a infecções por *B. cenocepacia*, mas não por *Pseudomonas aeruginosa* (outro patógeno oportunista gram-negativo), por exemplo. De fato, *B. cenocepacia* pode resistir à atividade bactericida não oxidativa de neutrófilos (SPEERT et al., 1994).

Isolados de *B. cenocepacia* podem ser subdivididos em quatro linhagens distintas: IIIA, IIIB, IIIC e IIID (VANDAMME et al., 2003). Sendo que o subgrupo IIIA acomoda clones da cepa epidêmica ET12 (*electrophoretic type 12*), que diferentemente dos outros subgrupos, está associado à quadros de síndrome cepacia e pior prognóstico. Estudos do genoma da cepa *B. cenocepacia* J2315, oriunda da linhagem ET12, demonstrou uma recente

adaptação a infecções humanas (HOLDEN et al., 2009), possuindo, por exemplo, características únicas associadas à virulência, como a ocorrência de adesina de 22 kDa (SAJJAN & FORSTNER, 1993), gene *cblA*, que codifica uma subunidade do “*cable pil*”, estrutura chave que é responsável pela aderência da bactéria na célula epitelial (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; SAJJAN et al., 1995) e também possui o BCESM (marcador de cepa epidêmica de *Burkholderia cenocepacia*), regulador transcricional encontrado apenas em cepas epidêmicas (MAHENTHIRALINGAM; SIMPSON; SPEERT, 1997).

2.1.2. Patogênese da infecção

Na FC, situação em que infecções por *B. cenocepacia* é mais bem descrita na literatura, ocorre imunocomprometimento em decorrência das alterações fisiológicas das vias aéreas (COHEN; PRINCE, 2012). Nesta situação são observados, por exemplo, ativação constitutiva do fator nuclear kappa (NF- κ)-B em células epiteliais, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs) independente da interação de receptores do tipo Toll (TLRs) com a proteína gene de resposta primária à diferenciação mielóide (MyD)-88 (VIJ; MAZUR; ZEITLIN, 2009). O recrutamento de PMNs aumenta a produção de ROS, que por sua vez ativa a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), amplificando a produção de citocinas, contribuindo para o recrutamento de mais PMNs (BHATTACHARYYA et al., 2011). Contudo, apesar do estado pró-inflamatório e recrutamento de PMNs, este cenário não está correlacionado com a erradicação ou eliminação de bactérias inaladas (COHEN; PRINCE, 2012). Assim, é possível pensar que os quadros de infecções crônicas ocorrem não apenas por mecanismos intrínsecos do hospedeiro, mas também por capacidades inerentes aos patógenos oportunistas em se adaptar e persistir nos pulmões. De modo que estes patógenos compartilham uma flexibilidade genética e capacidade de se adaptar às pressões impostas pela imunidade da mucosa (BRAGONZI et al., 2009; O’GRADY, 2011).

Um estudo do transcriptoma de *B. cenocepacia*, oriunda da interação com o muco do hospedeiro, demonstrou que genes específicos são ativados ou suprimidos neste ambiente. Fatores de virulência que foram alterados neste modelo de crescimento durante a infecção respiratória incluem: i) ativação de mecanismos de proteção contra antibióticos e ROS, ii) resposta a alterações na concentração interna de ferro, iii) aumento da expressão de genes que codificam para a produção de metaloproteinasas, e genes associados à formação de flagelos (estrutura associada à mobilidade e adesão bacteriana) (DREVINEK et al., 2008).

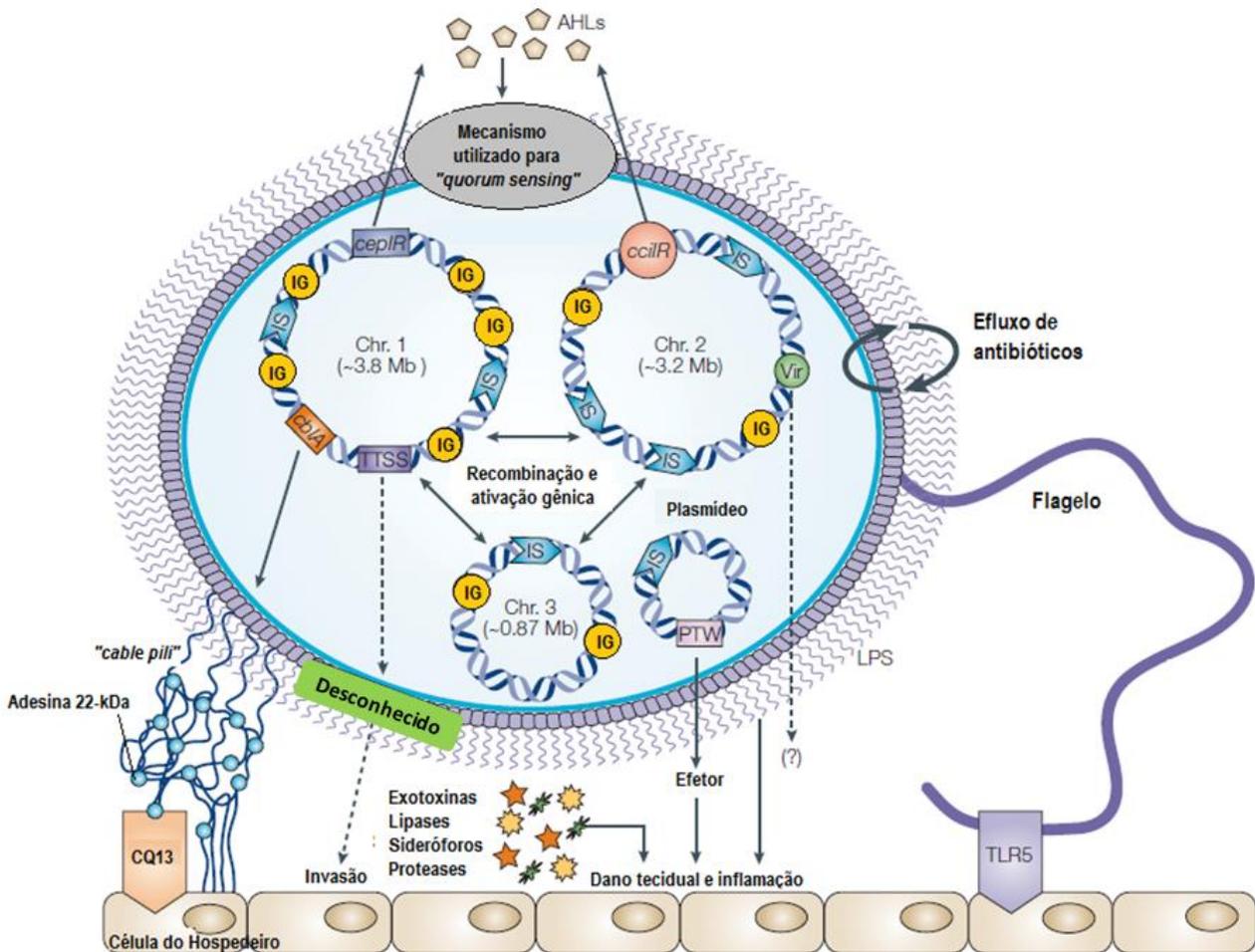


Figura 2.1: Principais características de virulência e estrutura genômica de *B. cenocepacia* cepa J2315. As características do genoma incluem: 3 replicões cromossômicos (Chr. 1, Chr.2 e Chr.3) e o plasmídeo; presença de ilhas genômicas (IG) em cada um dos replicons; e sequências de inserção (IS) que contribuem potencialmente para a plasticidade genômica. Fatores de virulência e seus papéis na interação com células hospedeiras: o “*cable pili*” e adesina de 22 kDa (círculos azuis) que se ligam a filamentos intermediários de citoqueratina 13 (CQ13); os sistemas de “*quorum sensing*” *cepIR* e *cciIR*, sendo que ambos secretam e reconhecem N-acil-homoserina lactonas (AHLs); o sistema de secreção de tipo III (T3SS) e o seu possível papel na invasão e sobrevivência *in vivo*; flagelos que se ligam a TLR5 mediando a resposta inflamatória; múltiplos fatores extracelulares, incluindo LPS, exotoxinas, lipases e proteases, sideróforos; resistência intrínseca a antibióticos e os sistemas Vir- T4SS e PTW- T4SS, com função efetora aparentemente envolvida na mobilização do plasmídeo. Adaptado de MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005.

Sendo a produção de ROS por fagócitos um componente importante no combate de microrganismos fagocitados, é interessante notar como vários estudos utilizando diferentes abordagens e modelos apontam a capacidade de *B. cenocepacia* em regular esta função microbicida (BYLUND et al., 2005, 2006; KEITH et al., 2007; LEFEBRE M; VALVANO M., 2001). Foi observado, por exemplo, que *B. cenocepacia* fagocitada por neutrófilos é capaz

de escapar da geração de ROS no interior do fagossomo, bem como induzir apoptose celular de modo independente da produção deste mediador (BYLUND et al., 2005). Ainda, BYLUND e colaboradores. (2006) mostraram que muitos isolados de bactérias do CBC produzem grandes quantidades de exopolissacarídeo, que interfere na função de neutrófilos humanos. Estas interações levam à inibição da quimiotaxia de neutrófilos e da produção de ROS, que são componentes essenciais no controle de patógenos mediado por neutrófilos. Estes autores também forneceram evidências diretas de que o exopolissacarídeo inibe a geração de ROS (BYLUND et al., 2006).

Outros fatores são demonstrados contribuir para a persistência de *B. cenocepacia*, dentre os quais destacamos: i) efluxo de antibióticos; ii) absorção de Ferro, em condições em que o suprimento deste na forma livre está indisponível, devido a capacidade de produzir sideróforos; iii) motilidade e aderência; sendo demonstrado que *B. cenocepacia* aumenta a expressão de genes envolvidos com a função flagelar, sugerindo que essa motilidade permita um fenótipo mais invasivo, resultando em septicemia, o que não é observado em *Pseudomonas aeruginosa*; iv) sistemas de secreção (**Figura 2.1**) (DREVINEK et al., 2008; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; VANDAMME et al., 2003). A utilização de modelos de estudo com bactérias, células ou camundongos geneticamente deficientes para genes específicos, têm contribuído para o entendimento de fatores tanto do patógeno como do hospedeiro que são determinantes para a patogênese da infecção.

2.1.3. Modelos de estudo da interação *Burkholderia cenocepacia* com o hospedeiro

Modelos de estudo visando esclarecer os mecanismos de interação de *B. cenocepacia* com o hospedeiro são em geral *in vitro*, baseados em células deficientes para o gene *cftr* (ABDULRAHMAN et al., 2011; ASSANI et al., 2014; KOPP et al., 2012; LAMOTHE; VALVANO, 2008), ou na enzima NADPH-oxidase (AL-KHODOR et al., 2014; BYLUND et al., 2005; ZELAZNY et al., 2009), mimetizando as deficiências encontradas em FC e DGC, respectivamente. Ainda dentro da abordagem *in vitro*, são também utilizados fagócitos, humanos ou murinos, competentes em sua resposta oxidativa e efetora, visando entender os mecanismos de virulência intrínsecos à *B. cenocepacia* a despeito de quaisquer comprometimentos oriundos das células (LAMOTHE et al., 2007; MACDONALD; SPEERT, 2008).

A fim de avaliar a fisiopatologia e estudar os mecanismos moleculares envolvidos na virulência do patógeno, bem como fatores imunológicos do hospedeiro na infecção, são utilizados modelos *in vivo* com camundongos geneticamente deficientes para o gene *cftr*

(CHATTORAJ et al., 2010), ou ainda geneticamente deficientes em genes que codificam componentes da enzima NADPH-oxidase (gp91^{phox}/-, p47^{phox}/-, por exemplo) (SEGAL et al., 2000). Também são utilizadas linhagens de camundongos distintas, sem necessariamente ser geneticamente deficientes, combinados com diferentes cargas de infecção bacteriana. Estes parâmetros distintos resultam em modelos de pneumonias agudas e infecções pulmonares crônicas (BRAGONZI, 2010).

Outra abordagem para estudos da interação entre *B. cenocepacia* com o hospedeiro são as que utilizam bactérias geneticamente deficientes, que visam entender fatores e estruturas da bactéria que são determinantes para a infecção e persistência (ROSALES-REYES et al., 2012; TOMICH; MOHR, 2004; URBAN et al., 2005). Sendo identificado, por exemplo, a importância do sistema de secreção tipo 3 (T3SS) na patogênese da infecção, em que camundongos C57BL/6 imunocompetentes infectados por cepas de *B. cepacia* deficientes em T3SS apresentaram inflamação nos pulmões atenuada em relação àqueles infectados com cepas selvagens (TOMICH et al., 2003) .

Estudos em modelos animais não vertebrados, tais como *Caenorhabditis elegans*, têm sido desenvolvidos para estudar mecanismos de virulência de bactérias do CBC (CARDONA et al., 2005; KÖTHE et al., 2003), bem como em larvas de *Galleria mellonella* (traça da cera), já utilizada em modelos de infecções por outros patógenos, também foram utilizadas para estudos de virulência (SEED; DENNIS, 2008). Além disso, recentemente um estudo em modelo vertebrado não mamífero, realizado em embrião de *Danio rerio* (peixe-zebra), permitiu avaliar a replicação de diferentes cepas de *B. cenocepacia* dentro de macrófagos, e em seguida, sua disseminação envolvendo liberação não- lítica das bactérias, resultando em infecção sistêmica e morte dos embriões (VERGUNST et al., 2010).

Estes vários modelos têm contribuído para o entendimento de fatores associados à virulência de *B. cenocepacia*, incluindo hemolisinas, proteases, sideróforos, LPS, flagelos, pilis, sistemas de secreção, catalases, superóxido dismutase e *quorum sensing*. Porém, importantes questões ainda pairam sobre como a bactéria é capaz de evadir da resposta imune do hospedeiro, como persiste e como é capaz de levar a um quadro fatal de septicemia.

2.2. Macrófagos e homeostase tecidual

Décadas de pesquisa nos trouxeram ao atual e crescente entendimento sobre as funções que macrófagos desempenham. Mais do que compor uma das primeiras barreiras do sistema imune contra infecções, atuando como fagócito profissional, em que desempenha papel chave durante a inflamação e na presença de patógenos, macrófagos têm funções

importantes no desenvolvimento tecidual bem como sua homeostase e na resolução da inflamação, mesmo na ausência de patógenos (GINHOUX; JUNG, 2014). Curiosamente, Ilya Metchnikoff, o pai da imunologia celular, propôs em 1891 que macrófagos ao longo do processo evolutivo adaptaram-se inicialmente em regular o desenvolvimento (fagocitando células indesejadas do próprio organismo) e que isso preparou o cenário para sua função como efetores da imunidade inata (STEFATER et al., 2011).

Diferente do que se acreditava como um dos dogmas da imunologia postulado em 1968, em que monócitos seriam constantemente recrutados da circulação para os tecidos, com o advento da análise celular por citometria de fluxo, entre outros métodos mais finos de análise, as células que compõem o sistema fagocítico mononuclear são descritas com mais critério. Evidentemente, monócitos podem, e de fato o fazem, dar origem a macrófagos em certos cenários e durante inflamações (GINHOUX; JUNG, 2014). Porém, os conceitos que se têm atualmente são de que (i) monócitos não contribuem de modo substancial para a população de macrófagos encontradas nos tecidos/órgãos sob situações normais ou em certos tipos de inflamação, (ii) os macrófagos localizados em tecidos de indivíduos adultos são derivados de precursores embrionários que se estabeleceram nos tecidos antes do nascimento e (iii) macrófagos residentes podem manter-se nos tecidos por auto-renovação (GINHOUX; JUNG, 2014; HASHIMOTO et al., 2013).

A função dos macrófagos está adaptada ao microambiente tecidual em que estão inseridos, e pela própria fisiologia do tecido. Células de Kupffer no fígado, osteoclastos nos ossos, micróglia no sistema nervoso central e macrófagos alveolares possuem funções distintas e podem ser fenotipicamente distintos uns dos outros (HUSSELL; BELL, 2014). A superfície das vias aéreas é uma grande interface com o ambiente externo, sendo exposta continuamente a uma vasta gama de antígenos durante a respiração. Esses antígenos são em sua maioria proteínas de origem animal e vegetal altamente imunogênicas, porém inofensivas, de modo que a homeostase imunológica neste tecido envolve a capacidade em discriminar esses antígenos inócuos daqueles associados a agentes patogênicos (HOLT et al., 2008). Em estado homeostático, a principal função dos macrófagos alveolares é fagocitar e sequestrar antígenos protegendo o microambiente do desenvolvimento de resposta imune específica (MACLEAN et al., 1996). Outro fator que permite macrófagos alveolares distinguir situações que exigem uma resposta tolerogênica daquelas que requerem uma resposta inflamatória, é a necessidade de sinalização através de vários receptores, capazes de suplantar os mecanismos inibitórios que regulam essas células (HUSSELL; BELL, 2014). Por exemplo, o estímulo de macrófagos alveolares através de receptores do tipo Toll (TLR)-2, TLR4 ou TLR9 inibe a sinalização através do receptor de interleucina 10 (IL-10R), permitindo que a célula saia de

seu estado de supressão, que é normalmente mediada pela produção de IL-10 por células epiteliais (FERNANDEZ et al., 2004).

Mesmo macrófagos residentes atuam de modo versátil, (i) agindo como efetor apresentando atividades microbicidas, mas por outro lado (ii) atuam na homeostase tecidual, induzindo, suprimindo ou modulando a resposta imune adaptativa.

2.2.1. Polarização de Macrófagos

Tendo o macrófago sido ativado, e neste caso entende-se por “ativação” quaisquer perturbações induzidas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), haverá ativação de vias de sinalização intracelular (MURRAY et al., 2014). De maneira generalista e reducionista, macrófagos podem ser categorizados de acordo com seus principais fenótipos oriundos da sinalização intracelular: M1 para o fenótipo “killing/fighting” (lutador) e M2 para “healing/fixing” (reparador) (RATH et al., 2014). A classificação M1/M2 de macrófagos pode ser condensada em duas vias opostas para o metabolismo do aminoácido arginina¹: a capacidade de macrófagos em metabolizar arginina via iNOS/NOS2 podem os definir como M1 (iNOS/NOS2⁺), ou via enzima arginase, os definindo como M2 (arginase⁺) (MILLS, 2012) (**Figura 2.2**). Essa dicotomia no metabolismo da arginina em macrófagos possui várias implicações na sua função, bem como no resultado da resposta imune em que essas células estarão envolvidas (RATH et al., 2014).

¹ Esclarecemos que tratamos este tópico de forma condensada e reducionista, visto que entendemos que existe um espectro de perfis de macrófagos, e não uma mera dualidade. Em MURRAY et al., 2014, foram propostos orientações para nomenclaturas ao se tratar de ativação e polarização de macrófagos. Adotamos a descrição em M1 e M2, pois ela é útil em descrever a função dos macrófagos em influenciar a resposta inflamatória de maneiras opostas (MILLS, 2012).

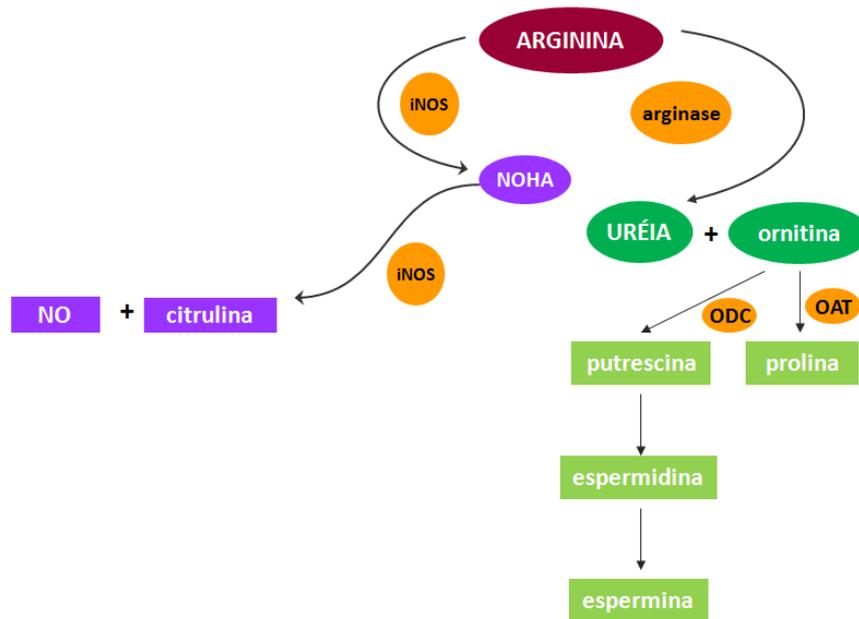


Figura 2.2: Metabolismo da arginina, catalisada por arginase e óxido nítrico síntase (iNOS). *NOHA* N-hidroxi-L-arginina, intermediário da síntese de NO, inibe a atividade de arginase. *OAT* ornitina aminotransferase. *ODC* ornitina decarboxilase. Adaptado de MAARSINGH; PERA; MEURS, 2008.

NO é uma molécula efetora que possui uma variedade de funções pleiotrópicas conhecidas, sendo produzido por três isoformas de NO sintase descritas até o momento: NOS neuronal (nNOS/NOS1), NOS induzível (iNOS/NOS2), e NOS endotelial (eNOS/NOS3). As três isoenzimas diferem em estrutura, distribuição e regulação, porém catalisam a mesma reação. nNOS e eNOS são expressas constitutivamente e são cálcio- dependentes. Por outro lado, iNOS/NOS2 é controlada via transcrição induzida, com a síntese de NO ocorrendo mesmo em baixos níveis intracelulares de cálcio (RATH et al., 2014). NO, produzido via iNOS/NOS2, pode mediar sinalização intracelular, ao agir sobre a adenilato ciclase solúvel, gerando monofosfato de guanosina cíclico (GMPC), e este em contrapartida ativa proteína quinase G (PKG) e proteína quinase A (PKA) (RATH et al., 2014). Em estudo com plasmócitos, foi demonstrado, por exemplo, que a enzima iNOS/NOS2 endógena promove a sobrevivência destas células através do eixo iNOS-NO-guanilato ciclase solúvel-GMPC-PKG, levando à modulação de moléculas componentes da resposta ao estresse do retículo endoplasmático, bem como a inibição da ativação de caspases (SAINI et al., 2014). Em seu papel microbicida, NO varia em sua importância para conferir resistência a patógenos, pois pode tanto restringir o crescimento de patógenos, como levar à exacerbação do dano tecidual (BREITBACH; WONGPROMPITAK; STEINMETZ, 2011). Dentro do fenótipo de ativação M1, além da metabolização da arginina via iNOS/NOS2 gerando NO, são observadas outras

características como resultado da ativação das vias de sinalização NF- κ B e MAPK. Neste contexto, macrófagos produzem uma vasta gama de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-23, IL-6, e quimiocinas pró-inflamatórias, que incluem proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2, proteína quimiotática de monócitos (MCP) e CXCL1 (proteína do tipo reguladora do crescimento celular) (STEFATER et al., 2011). Como parte importante da resposta à ativação clássica de macrófagos (M1), além da produção de mediadores solúveis, ocorre também apresentação de antígenos a células T, via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) dos tipos I e II (**Figura 2.3**).

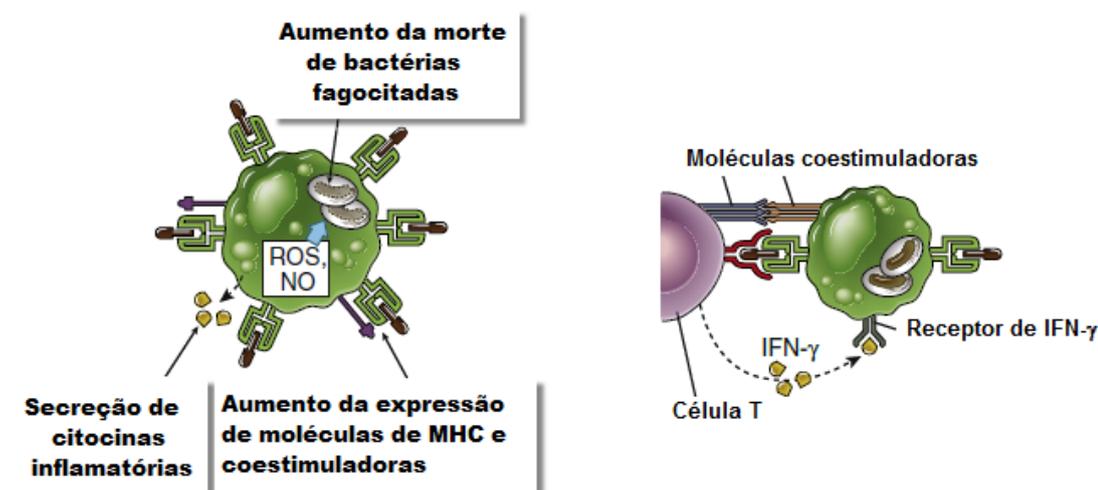


Figura 2.3: Ativação e resposta de macrófagos M1. Ao internalizar bactérias, por exemplo, ocorre produção de ROS e NO, estímulo da resposta inflamatória e aumento da capacidade de apresentação de antígenos a células T. Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011.

Além do reconhecimento de antígenos, outros estímulos ativadores são necessários para induzir ativação e resposta em células T, pois na ausência de coestímulos, as células entram em anergia ou morrem por apoptose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). As moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são as coestimuladoras mais conhecidas, de modo geral estão ausentes ou expressas em baixos níveis e são induzidas por produtos microbianos que se acoplam a TLRs ou por citocinas como IFN- γ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Células T, uma vez ativadas, expressam em sua superfície CD40-ligante (CD40L), que interage com a molécula CD40 expressa por macrófagos, enviando sinais que aumentam a expressão de moléculas coestimuladoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Arginase é a enzima conversora de arginina em ornitina e ureia, além de ser expressa no fígado, onde ocorre o ciclo completo da ureia, é também expressa em células e tecidos nos quais este ciclo não ocorre. Possui duas isoformas conhecidas: arginase I, localizada no

citosol, isoforma predominante no fígado; arginase II, enzima mitocondrial majoritariamente encontrada em tecidos extra-hepáticos (MAARSINGH; PERA; MEURS, 2008). A atividade de arginase pode restringir a produção de NO, uma vez que compete com NOS pelo mesmo substrato, arginina. Além disso, a atividade extra-hepática de arginase pode estar relacionada ao processo de reparo tecidual, uma vez que ornitina é precursora de poliaminas, envolvidas na proliferação celular, e prolina, associada à síntese de colágeno (WU; MORRIS, 1998). De modo que, muito mais do que restringir a atividade de iNOS/NOS2 redirecionando o metabolismo da arginina, a expressão de arginase em macrófagos tem marcantes efeitos funcionais na biologia desta célula. De fato, arginase induz um estado anti-inflamatório em macrófagos. Neste cenário, este perfil de ativação alternativa de macrófagos (M2) possui como características a produção de fator transformador de crescimento (TGF)- β , IL-13, IL-10 e quimiocinas, incluindo CCL17/TARC (ligante 17 de CC quimiocina /quimiocina do timo regulada por ativação) e CCL22 (ligante 22 de CC quimiocina) (STEFATER et al., 2011). Assim como ocorre para a atividade de iNOS/NOS2 na produção de NO, a atividade de arginase pode também possuir papéis antagônicos, podendo favorecer o hospedeiro prevenindo dano tecidual exacerbado, como pode favorecer o patógeno. Para este caso, foi descrito que a evasão da resposta imune em modelo de infecção crônica por *Helicobacter pylori* é mediada pela indução de arginase II em macrófagos encontrados no estômago, ocorrendo ainda inibição de NO e supressão da produção de citocinas pro-inflamatórias (LEWIS et al., 2011). Ainda, em modelo murino de infecção onde foi observada presença de macrófagos M2, ocorreu supressão da ativação, proliferação e diferenciação de células Th2 (PESCE et al., 2009). São descritos para ambas as vias uma regulação cruzada, na qual intermediários ou mesmo o produto final de uma via inibe o andamento da via oposta, e vice-versa (RATH et al., 2014). De modo que esta atuação oposta está em consonância com o conceito de polarização de macrófagos, que são definidos não apenas pelo destino da arginina intracelular, mas também pelos aspectos funcionais que esses macrófagos assumem.

2.3. Interação de macrófagos com *Burkholderia cenocepacia*

Sendo um patógeno oportunista, *B. cenocepacia* encontra nas células do hospedeiro imunocomprometido uma pré-disposição à sua sobrevivência. Essa questão tem sido abordada por grupos que ao utilizarem macrófagos provenientes de portadores de FC demonstraram que ocorre aumento da morte celular e sobrevivência das bactérias em comparação a macrófagos competentes (KOPP et al., 2012). *B. cenocepacia* pode ser encontrada livre no citosol 1 hora após a infecção, indicando o escape da via autofágica, visto que a ausência de *cftr* na

membrana do fagolisossomo impede a acidificação correta da organela que levará à ausência ou baixa ativação das enzimas responsáveis pela degradação de bactérias, o que por sua vez resulta na manutenção e permanência da infecção (ABDULRAHMAN et al., 2011; AL-KHODOR et al., 2014).

Porém, é notável que *B. cenocepacia* mesmo em macrófagos competentes consegue evadir-se e sobreviver nestas células. Dentre os mecanismos de escape, são descritos que *B. cenocepacia* promove atraso na maturação do fagolisossomo em macrófagos murinos, ocorrendo fusão com o lisossomo apenas 6 horas após a internalização. Foi demonstrado que em vacúolos contendo *B. cenocepacia* fagocitadas o pH no espaço luminal é mantido em $6,4 \pm 0,12$. Em contraste, vacúolos contendo *B. cenocepacia* inativada pelo calor o pH apresentado é de $4,8 \pm 0,03$, ocorrendo rápida fusão com o lisossomo (LAMOTHE et al., 2007). Fatores envolvidos na resistência ao dano oxidativo desempenham um papel na sobrevivência intracelular de *B. cenocepacia*. De fato, *B. cenocepacia* mutante, incapaz de produzir um pigmento semelhante à melanina (*melanin-like*), apresenta aumento de suscetibilidade ao estresse oxidativo, sendo essas bactérias rapidamente direcionadas para o tráfego lisossomal, mas este processo pode ser interrompido na presença de inibidores de NADPH oxidase e de NO (KEITH et al., 2007). Essa produção de pigmentos semelhantes à melanina confere proteção contra o dano oxidativo por atuarem como *scavengers* de ROS, de modo que *B. cenocepacia* pode ser capaz de superar os mecanismos microbicidas de defesa da célula hospedeira. Outro mecanismo de escape descrito na interação de *B. cenocepacia* com macrófagos está relacionado aos sistemas de secreção, pois a sua sobrevivência intracelular requer, na maioria dos casos, um ou mais sistemas de secreção responsáveis por injetar moléculas bacterianas no citoplasma, que terão por alvo vias de sinalização da célula hospedeira, permitindo que a bactéria se estabeleça em um nicho intracelular (VALVANO, 2015). O sistema de secreção tipo 6 (T6SS) promove desestruturação da membrana do fagolisossomo, permitindo o escape para o citoplasma do macrófago das proteases ZmpA e ZmpB secretadas por T2SS, capazes de clivar e inativar peptídeos antimicrobianos envolvidos na imunidade inata (ROSALES-REYES et al., 2012). T6SS também foi demonstrado estar envolvido na ativação de inflamassomo resultando no estímulo e secreção de IL-1 β via caspase-1, sendo esta via envolvida na morte celular conhecida por piroptose (ROSALES-REYES et al., 2012).

Os dados acima citados sugerem que *B. cenocepacia* tenha em macrófagos um refúgio dos mecanismos de controle da infecção. Nesta perspectiva, dados de nosso laboratório utilizando cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos e da linhagem RAW 264.7 estimulados com IFN γ e LPS e desafiados com *B. cenocepacia* mostram a capacidade

destas bactérias em não induzir ou modular negativamente os níveis de NO nestas células (GIBALDI, 2009). Em conjunto, estes dados nos levaram a propor a hipótese de que a infecção por *B. cenocepacia* modula a atividade efetora/microbicida de macrófagos, promovendo atenuação da resposta inflamatória e resultando na persistência da infecção. Considerando que *B. cenocepacia* está associada a infecções pulmonares oportunistas (ISLES, 1984), investigamos neste trabalho de dissertação a interação entre a bactéria e macrófagos alveolares de linhagem murina (AMJ-C11). Para isto, utilizamos abordagens *in vitro*, avaliando a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, além de caracterizar a expressão de moléculas coestimuladoras após a interação entre a célula hospedeira e a bactéria. Abordagens *in vivo* também foram foco deste estudo, visando avaliar os danos tissulares, tendo como alvo de estudo o pulmão, após colonização bacteriana em camundongos competentes e geneticamente deficientes para a enzima iNOS/NOS2. Assim, esperamos contribuir para a compreensão de outros fatores para além dos já descritos, que permitem o escape de *B. cenocepacia* de mecanismos inatos efetores, com a geração de conhecimento para a área em estudo.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar a resposta imunológica na infecção de vias aéreas por meio da interação de *B. cenocepacia* e macrófagos alveolares utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Avaliar o perfil de atividade efetora microbicida e inflamatória de macrófagos alveolares murinos à infecção por *Burkholderia cenocepacia*, usando modelos *in vitro*, com dosagem de NO e ureia e estudo da expressão de enzimas (iNOS/NOS2, arginases);
- 2- Avaliar a atividade efetora inflamatória de macrófagos alveolares murinos à infecção por *Burkholderia cenocepacia*, usando modelos *in vitro*, com estudo do estado de ativação dos macrófagos (MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD40) e produção de citocinas (TNF e IL-10);
- 3- Avaliar a infecção de *B. cenocepacia* em camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2, através de observações clínicas, dosagem de NO e ureia, bem como quantificação da carga bacteriana, no sítio de infecção;
- 4- Estudar as alterações histopatológicas das vias aéreas de camundongos infectados por *B. cenocepacia*, quanto à estrutura tecidual e ocorrência de infiltrado inflamatório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Linhagens de macrófagos murinos

Foram utilizadas a linhagem de macrófago alveolar AMJ2-C11 (ATCC® CRL-2456™), oriunda de camundongos C57BL/6, e a de macrófago peritoneal RAW264.7 (ATCC® TIB71™), oriunda de camundongos BALB/c. Estas foram mantidas em garrafa de cultivo de 75 cm², à 37 °C, 5% CO₂ e 60~80% de umidade, em meio DMEM High Glucose (LGC Biotecnologia, cat. BR 30003-05) com soro bovino fetal (SBF) (Gibco®) a 5% e 10% em AMJ2-C11 e RAW264.7, respectivamente.

4.1.2. Cepa bacteriana de *Burkholderia cenocepacia*

A cepa clínica (ATCC: LMG16656 [J2315] – isolado de paciente FC) de *B. cenocepacia* foi cedida pelo Dr Christian D Mohr (Universidade do Texas) à Dr^a Lucia M Previato (IBCCF/ Universidade Federal do Rio de Janeiro), que gentilmente nos doou para este trabalho. É armazenada congelada em 20% glicerol em meio de cultura LB Broth (Caldo Luria Bertani – LGC Biotecnologia, cat. BR 12106-06) e mantida sob refrigeração à -80 °C. Para os testes de infecção, alíquotas foram ressuspensas em meio LB Broth (Caldo Luria Bertani – LGC Biotecnologia, cat. BR 12106-06), sob agitação em estufa à 37 °C por 24 h, sendo a quantificação da população bacteriana realizada através da transposição da densidade óptica (DO)_{650nm} das culturas em uma curva de crescimento já existente. Para ensaios específicos, *B. cenocepacia* foi inativada em solução de paraformaldeído 3,65%, por 24 h à 37 °C em placa agitadora, onde após esse período o material foi centrifugado a 5.600 xg por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi ressuspenso em meio HBSS (*Hank's Balanced Solution Salts* – LGC Biotecnologia, cat. BR 30015-05).

4.1.3. Obtenção das linhagens de macrófagos, infecção dos cultivos por *Burkholderia cenocepacia* e desenho experimental

A retirada dos cultivos das linhagens foi realizada com auxílio de *cell scraper*, e após centrifugação à 2.100 xg 4 °C em tubos de 50 mL estéreis, o centrifugado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo e o número de células foi contado por exclusão em azul de Trypan, utilizando câmara de Neubauer. As linhagens de macrófagos foram então plaqueadas em

concentrações que variaram de 5×10^5 a 3×10^6 células por poço, em placas de 24 ou 6 poços, respectivamente, a depender do ensaio. Após 4 h, as células receberam tratamento ou não com LPS (10 ng/mL – Sigma Aldrich, cat. L2880) e IFN γ (10 ng/mL – eBioscience, cat. 34-8311-82), e foram infectadas ou não com *B.cenocepacia* (MOI [*multiplicity of infection*] 1:1) 24 h ou 48 h (a depender do ensaio). Posteriormente, os sobrenadantes foram recolhidos e separados, parte para dosagem de NO (método de Griess) e ureia (método enzimático/colorimétrico), e outra parte para dosagem de TNF e IL-10 por ELISA). Quando não utilizados imediatamente após o recolhimento da cultura celular, os sobrenadantes foram estocados à -80 °C. As células obtidas nos ensaios foram recolhidas para (i) marcação de moléculas de superfície, para análise através de citometria de fluxo; ou (ii) para obtenção de proteínas para análise por *Western blotting* (iNOS/NOS2 e arginase II).

4.1.4. Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de NO foram estimados indiretamente pela dosagem de nitrito através do método de Green (Green et al., 1982). Após a transferência de 50 μ L de amostra e das diluições da curva padrão (200 μ M a 3,125 μ M) em uma placa de 96 poços e a posterior adição de igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% H₂PO₄ e 0,1% α -naftiletilediamina em água MiliQ). A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em leitor de placa de 96 poços utilizando filtro de 540 nm. A DO específica foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DO específica} = \text{DO da amostra} - \text{DO reagente de trabalho (branco)}$$

4.1.5. Dosagem de ureia

Utilizamos o kit comercial ureia CE (Catálogo 27/ Labtest Diagnóstica). O princípio do ensaio é enzimático/colorimétrico, onde a ureia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de ureia na amostra. Padronizamos a dosagem para sobrenadantes em placas de 96 poços, utilizando 10 μ L da amostra, 100 μ L da urease tamponada (reagente do kit), levamos por 5 min à 37 °C protegido de luz, e em seguida adicionamos 100 μ L do tampão (reagente do kit), com mais 5 min à 37 °C protegido de luz. A curva padrão (70 mg/dL a 1,093 mg/dL) foi preparada em paralelo. A reação colorimétrica obtida pela

revelação da reação foi avaliada em 600 nm em leitor de placa de 96 poços. A densidade ótica (DO) específica foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DO específica} = \text{DO da amostra} - \text{DO reagente de trabalho (branco)}$$

4.1.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As concentrações de TNF e IL-10 nos sobrenadantes de cultivos celulares, no soro e no exsudato obtido dos animais foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a detecção TNF utilizamos o kit Mouse TNF (Cat. 430905 ELISA MAXTM Deluxe), e para IL-10 foi usado o kit Mouse IL-10 (Cat. 431415 ELISA MAXTM Deluxe) e foram usados de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, os poços foram cobertos com 100 µL de anticorpo primário e mantidos à 4 °C por 16 h. Após, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem TBS (PBS contendo 0,05% Tween) e bloqueados com tampão de bloqueio (reagente do kit) por 1 h. Os poços foram novamente lavados, as amostras e a curva-padrão adicionadas em um volume de 100 µL e incubadas por 2 h à 4 °C. Nova lavagem foi realizada e 100 µL do anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase foram adicionados. Após 2 h de incubação à 4 °C, foi adicionado o substrato (peróxido de hidrogênio) na presença do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), seguindo-se incubação por 20 min. A reação colorimétrica obtida pela revelação da reação foi avaliada em leitor de placa de 96 poços, utilizando os filtros 570 nm e 450 nm, sendo o valor obtido em 570 nm subtraído do valor em 450 nm. Curva padrão para TNF (500 pg/mL a 31,3 pg/mL) e para IL-10 (2000 pg/mL a 31,3 pg/mL), foram feitas em paralelo. A DO específica foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DO específica} = \text{DO da amostra} - \text{DO reagente de trabalho (branco)}$$

4.1.7. *Western blotting*

Obtenção do extrato proteico: Cultivos de macrófagos foram plaqueados em placas de 6 poços de modo a obter 6×10^6 células por grupo experimental, os ensaios ocorreram em tempo de 24 h de acordo com os padrões de estímulos e infecções estabelecidos. Ao término do ensaio os sobrenadantes foram recolhidos, processados e estocados e as células foram lavadas gentilmente por 2 vezes com 1 mL meio HBSS (*Hank's Balanced Solution Salts* – LGC Biotecnologia, cat. BR 30015-05) à 37 °C. Imediatamente após as lavagens a placa foi colocada em banho de gelo molhado (sendo que a partir deste momento toda amostra foi

manipulada a baixas temperaturas). Com auxílio de *cell scraper* (raspador de células), as células foram removidas dos poços e transferidas para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, centrifugadas à 7.000 xg 10 min, 4 °C, sobrenadantes foram aspirados e o centrifugado celular ressuspenso em 150 µL de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton x-100; 0,1% SDS; 1% desoxicolato de sódio) 10% inibidores de proteases (Roche cat. 13136600) e incubados por 30 min à 4 °C (do início da incubação ao término, as amostras passaram pelo vórtex ao menos 3 vezes, de modo a garantir a devida homogeneização do tampão de lise). Terminada a incubação, a centrifugação foi realizada, 14.000 xg, 20 min, 4°C, o sobrenadante foi aspirado e estocado em 2 alíquotas, uma de 40 µL, para a quantificação de proteínas totais, e outra de 80 µL, para diluição em solução de aplicação em gel de poliacrilamida.

Quantificação de proteínas totais: As concentrações de proteínas totais presente nas amostras foram determinadas pelo método de Bradford (1976), as amostras foram diluídas em água MiliQ (1:4), e para detecção utilizamos Reagente de Bradford (LGC Biotecnologia – cat. 13-1309-05). A reação colorimétrica obtida pela revelação da reação foi avaliada em leitor de microplaca, utilizando os filtros 595 nm. Curva padrão com concentrações proteicas conhecidas de albumina de soro bovino (BSA 20 µg/mL a 2000 µg/mL) foi preparada em paralelo. A DO específica foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DO específica} = \text{DO da amostra} - \text{DO reagente de trabalho (branco)}$$

Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida: Após quantificação, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (Laemmli, Sigma cat. S-3401), e desnaturadas à 100 °C por 5 min. A concentração proteica utilizada em cada amostra foi de 30 µg. As amostras foram aplicadas em géis de 12% de SDS-poliacrilamida, e submetidos a uma corrente de 100 V (PowerPac HC – Bio-Rad) no sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). Utilizamos peso molecular pré-corado (MW 26,6 – 180kDa - Sigma Aldrich, cat. SDS7B2).

Transferência de proteínas e revelação: As proteínas encontradas nos géis foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco submetidos à 15 V por 20 min. A visualização das proteínas transferidas foi feita por coloração reversível utilizando o kit específico (*Memcode reversible protein stain kit – for nitrocellulose membrane* – cat. 24580, Pierce™). O bloqueio foi realizado durante 1 h em solução TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl) com 0.1% Tween 20 (solução TBST) à 3% de BSA. Os anticorpos primários (Tabela 4.1) diluídos em solução de bloqueio foram incubados *overnight* a 4 °C. Os anticorpos secundários, diluídos em solução de bloqueio (Tabela 4.1) foram incubados por 1 h

em temperatura ambiente e também diluídos em solução de bloqueio. O anticorpo IgG de camundongo anti-GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle de carregamento das amostras. A revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, com o kit ImmunoCruz™ Western Blotting Luminol Reagente (Santa Cruz Biotechnology, cat. Sc2048) e filmes de Raios-X. A densitometria foi analisada no *software* Image Studio™, versão 4.0 (LI-COR biosciences), sendo utilizados os valores de sinal obtidos em RGB (Red, Blue, Green), de modo que para cada análise obtivemos 3 valores quais utilizamos em nossas quantificações.

Tabela 4.1: Lista de anticorpos utilizados para western blot

Anticorpos	Descrição	Diluição
Anticorpo primário anti-iNOS/NOS2 de coelho	Cayman Chemical / cat 160862	1/500
Anticorpo primário anti-Arg II (H-64) de coelho	Santa Cruz Biotechnology / cat sc-20151	1/500
Anticorpo primário IgG anti-GAPDH de camundongo	Fitzgerald / cat 10R-G109A	1/60000
Anticorpo secundário policlonal anti-imunoglobulina de coelho conjugado à HPR	Thermo Scientific/ cat 31460	1/30000
Anticorpo secundário policlonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à HPR	Thermo Scientific/ cat 31430	1/30000

4.1.8. Citometria de Fluxo

As células foram obtidas a partir da placa de 24 poços, que após ter os sobrenadantes recolhidos, foi então manipulada em banho de gelo. Após as células de cada grupo experimental terem sido removidas dos poços, foram centrifugadas à 2.800 xg, 10 min, 4 °C, e o centrifugado de células foi ressuspenso em 100 µL de solução de bloqueio, soro normal de camundongo a 2% em solução de PBS-SBF 2% e NaN3 0,1%, 2% Fc block (BD Pharmigen, purified rat anti-mouse CD16/CD32) durante 30 min a 4 °C. A seguir, as amostras celulares foram distribuídas em placas de poliestireno de 96 poços (Falcon 3911, EUA). Para a marcação de superfície, os anticorpos (Tabela 4.2) foram diluídos em 20 µL de solução de PBS-SFB 2% e NaN3 0,1% e incubados durante 40 min a 4 °C. Seguindo a incubação, foram realizadas lavagens com 150 µL de PBS-SBF 2% e NaN3 0,1% /poço centrifugando durante 5

min a 600 g em 10 °C e posterior fixação em solução de PBS-formaldeído a 1%. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo (CyAN™ DakoCytomation), sendo salvos 10000 eventos por amostra, e análise processada no *software* Summit 4.3.

Tabela 4.2: Lista de anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Anticorpos	Descrição	Diluição
anti-CD80 (B7-1) de camundongo conjugado à PE	Clone: 16-10A1/ eBioscience cat 12-0801-82	1/80
anti-CD86 de camundongo conjugado à FITC	Clone: GL1/ BD Pharmigen cat 553691	1/20
anti-MHC II (I-A/I-E) de camundongo conjugado à FITC	Clone: M5/114.15.2/ eBiosciences cat 11-5321-85	1/8
anti-CD40 de camundongo conjugado à PE	Clone: 1C10/ eBioscience cat 12-0401-82	1/20
anti-MHC I (H-2K ^d /H-2D ^d) de camundongo conjugado à FITC	Clone: 34-1-2S/ eBioscience/ cat 11-5998-81	1/100

4.2. Ensaios *in vivo*

4.2.1. Animais

Para os ensaios foram utilizados camundongos machos ou fêmeas, de 4-8 semanas de idade, das linhagens C57BL/6 e B6.129P2-Nos2. Cerca de 15 camundongos de cada linhagem foram utilizados em cada ponto experimental. Os camundongos foram obtidos junto ao Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL/Fiocruz) através da licença CEUA LW-77/12. Os animais chegaram ao Biotério de Experimentação do Pavilhão Cardoso Fontes/IOC e foram mantidos em adaptação por 10-14 dias sob condições livres de patógenos específicos (SPF). Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas de polipropileno em microisoladores e receberam ração e água *ad libitum* durante todo curso do ensaio.

4.2.2. Infecção experimental pela cepa J2315 de *Burkholderia cenocepacia*

Os camundongos foram infectados pela via intrapleural com um inóculo de 10⁸ bactérias da cepa J2315 de *B. cenocepacia* em 100 µL de veículo (PBS estéril) no interior de cabine de segurança biológica. A suspensão bacteriana foi obtida após crescimento em meio LB Broth (Caldo Luria Bertani – LGC Biotecnologia, cat. BR 12106-06) por 24 h, e após a quantificação, todo material foi centrifugado à 4.754 xg, por 20 min à 4 °C, o sobrenadante foi aspirado com pipeta sorológica e o pellet ressuspense em PBS estéril (LGC biotecnologia -

Tampão PHOSPHATE-BUFFERED SALINE 1X Cat.13-30259-05), em volume apropriado de modo a obter o inóculo de 10^8 / 100 μ L. Animais controles, não infectados de mesma idade e sexo, foram injetados com o veículo e mantidos sob as mesmas condições no biotério de experimentação. Todo material e suspensão bacteriana foram mantidos estéreis, sendo manipulados apenas no interior de cabine de segurança biológica.

4.2.3. Curva de sobrevivência e registro de peso corporal

Camundongos das linhagens C57BL/6 e B6.129P2-Nos2, foram inoculados como descrito no item 4.2.2. Foram realizadas visitas diárias ao Biotério de Experimentação Animal do Pavilhão Cardoso Fontes/ IOC, durante 15 dias, para o registro de peso corporal e mortalidade, limpeza das gaiolas e troca das rações e água.

4.2.4. Obtenção e processamento de exsudatos e tecidos

Os animais foram analisados nos pontos de 8, 24, 48 e 72 h após infecção (hpi). Eles foram eutanasiados em câmara de CO₂, o sangue obtido por punção cardíaca e realizado o lavado pleural com 1 mL de meio HBSS (*Hank's Balanced Solution Salts* – LGC Biotecnologia, cat. BR 30015-05) estéril gelado. Os pulmões foram obtidos, sendo lavados e perfundidos inicialmente com PBS e em seguida preservados em solução formaldeído 10% tamponado (para análises histológicas). Todo material foi coletado em cabine de segurança biológica e armazenados em tubos de 1,5 mL estéreis, e em seguida estocados à 0 °C para em seguida as amostras serem processadas. Com o sangue obtivemos o soro que foi estocados em freezer -80 °C até o momento de análise. A partir do lavado pleural, obtivemos uma alíquota de 20 μ L para quantificação de CFU. O material foi centrifugado, o sobrenadante foi aspirado e estocado em freezer -80 °C até o momento de análise (quantificação de citocinas, NO e ureia).

4.2.5. Quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU)

Para quantificação de colônias, *B. cenocepacia* foi semeada em meio agar *Pseudomonas cepacia* (*Pseudomonas cepacia* agar cat.7458/ Acumedia), meio utilizado para o isolamento seletivo e detecção de *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) a partir de

espécimes clínicos e não clínicos. Após semeadas, as placas foram incubadas à 37 °C 40 h para a posterior quantificação de CFU.

4.2.6. Histologia

Os procedimentos de processamento, corte e coloração do material foram realizados no Departamento de Anatomia Patológica do Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ, como protocolo indicado por nosso colaborador neste trabalho, o tecnologista Marcelo Meuser Batista. Resumidamente, para infiltração em parafina, o órgão foi desidratado em bateria de etanol com concentrações crescentes deste reagente. Em seguida para a completa remoção do álcool dos tecidos foi realizada a etapa de clarificação, feita em banhos de xilol. Posteriormente o órgão foi infiltrado e incluído em parafina, sendo a inclusão feita com o pulmão inteiro na posição para o corte em plano coronal. Foi realizada coloração por hematoxilina-eosina para observação de infiltrado inflamatório.

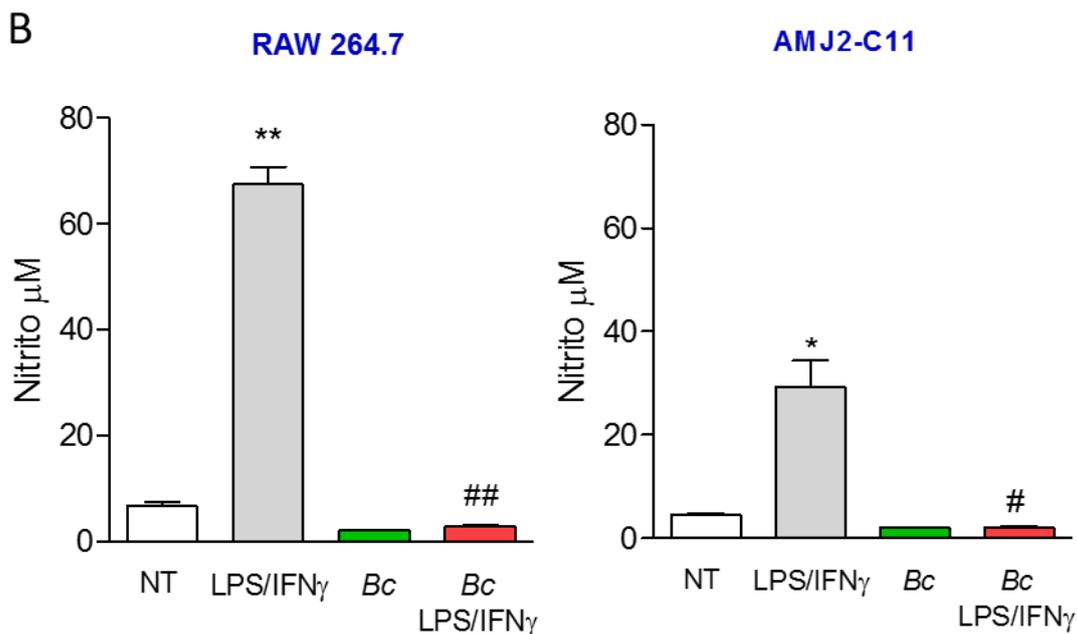
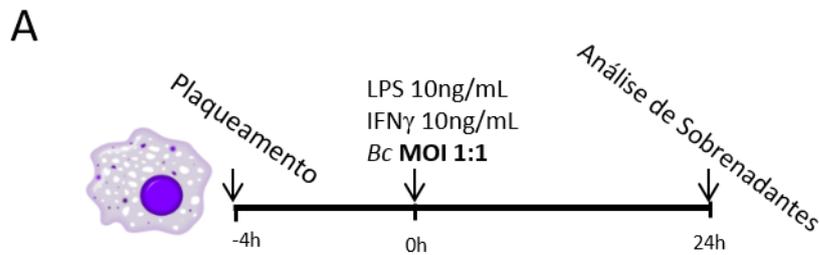
4.2.7. Análise estatística

O teste t-Student foi usado para estabelecimento das diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,05$ (*, #), $p < 0,01$ (**, ##, &&) ou $p < 0,001$ (***, ###, &&&, ψψψ, φφφ), e para o teste estatístico dos ensaios de sobrevivência foi aplicado a Curva de Kaplan-Meier, calculados pelo programa estatístico Graphpad Prism versão 3.0. Média aritmética e desvio padrão foram utilizados para apresentar os resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Estabelecimento de modelo de infecção por *Burkholderia cenocepacia* em linhagem de macrófago alveolar de camundongos

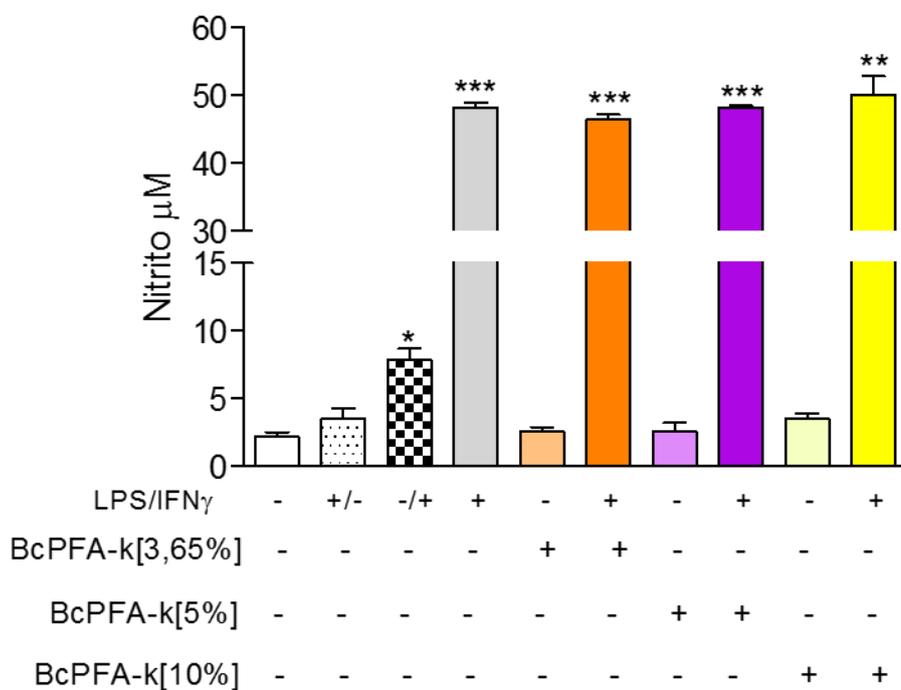
Dados de nosso grupo utilizando cultivos *in vitro* de linhagem celular de macrófagos peritoneais (RAW264.7, ATCC® TIB71™) desafiados com *B. cenocepacia* já mostravam não haver níveis detectáveis de NO, mesmo em cultivos estimulados com LPS/IFN γ , potentes indutores de NO. Visto o patógeno em estudo estar associado a infecções pulmonares, utilizamos para o modelo analisado, linhagem de macrófago alveolar de camundongo C57BL/6 (AMJ2-C11, ATCC® CRL-2456™). Sendo NO um importante mediador da atividade efetora de macrófagos, participando no controle de infecções (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011), utilizamos sua concentração em sobrenadantes de nossos cultivos como parâmetro inicial para estabelecimento de nosso modelo de estudo. Para isso cultivos de macrófagos alveolares foram estimulados ou não com LPS/IFN γ , e infectados ou não por *B. cenocepacia*, multiplicidade de infecção (MOI) de 1 por 24 h (**Figura 5.1A**). Inicialmente realizamos um ensaio comparativo entre as linhagens de macrófagos peritoneais e alveolares, a fim de verificar se *B. cenocepacia* produz efeitos similares ou não entre os cultivos. Observamos que a linhagem de macrófago alveolar apresenta níveis basais de NO quando na ausência de estímulos (NT), ao passo que em cultivos estimulados com LPS/IFN γ ocorre aumento significativo nas concentrações de nitrito. Na presença de *B. cenocepacia* as concentrações de nitrito encontradas são próximas, ou menores ao controle não tratado (NT), mesmo em condições em que houve estímulos com LPS/IFN γ no momento da interação com *B. cenocepacia*. Assim, notamos que o padrão de resposta da linhagem de macrófagos alveolares AMJ2-C11 aos diversos estímulos foi semelhante ao observado na linhagem de macrófagos peritoneais RAW264.7 (**Figura 5.1B,C**).



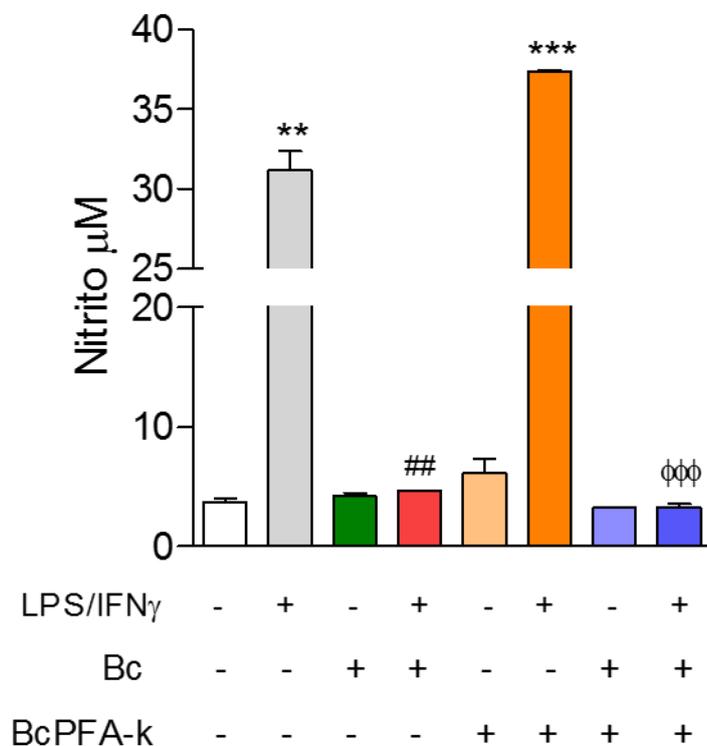
5.1. Detecção de NO em sobrenadantes de macrófagos das linhagens RAW 246.7 e AMJ2-C11 infectados com *B. cenocepacia*. (A) Desenho experimental do modelo em estudo. (B) Linhagem RAW264.7: controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *B. cenocepacia*. (C) Linhagem AMJ2-C11 controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *B. cenocepacia*. *P < 0,05; **P < 0,01 grupos experimentais comparados com controle NT. # P < 0,05 ## P < 0,01 LPS/IFN γ comparado com Bc LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 5 experimentos independentes.

5.2. Efeitos sobre a linhagem de macrófagos alveolares AMJ2-C11 dependem da viabilidade/atividade de *Burkholderia cenocepacia*

Considerando que tanto *B. cenocepacia* ativa, como inativa, podem ser fagocitadas por macrófagos (LAMOTHE et al., 2007), procuramos entender se o efeito de não detecção de nitrito após interação de macrófagos alveolares com *B. cenocepacia*, depende do patógeno estar metabolicamente ativo ou não. Para isso, realizamos a inativação de *B. cenocepacia* em paraformaldeído (PFA) em diferentes concentrações (3,65%, 5% e 10%). Observamos que *B. cenocepacia* inativada, independentemente das concentrações de PFA (BcPFA-k[3,65], BcPFA-k[5] e BcPFA-k[10]), ao interagir com os cultivos de macrófagos alveolares, não foi capaz de alterar os níveis basais de NO_x em relação ao controle NT. Quando as células AMJ2-C11 expostas a bactérias inativadas foram estimuladas com LPS/IFN γ , foram detectados concentrações de nitrito entre 40 μ M e 50 μ M, semelhantes ao controle estimulado apenas com LPS/IFN γ (**Figura 5.2**). Nos ensaios seguintes, optamos por utilizar BcPFA-k[3,65] visto não termos encontrado diferenças entre esta e as outras concentrações de inativação em PFA. Altas concentrações de nitrito são encontradas em cultivos estimulados com LPS/IFN γ na presença de BcPFA-k[3,65], ao passo que a adição de *B. cenocepacia* viva/ativa neste cultivo resulta em não detecção de nitrito (**Figura 5.3**).



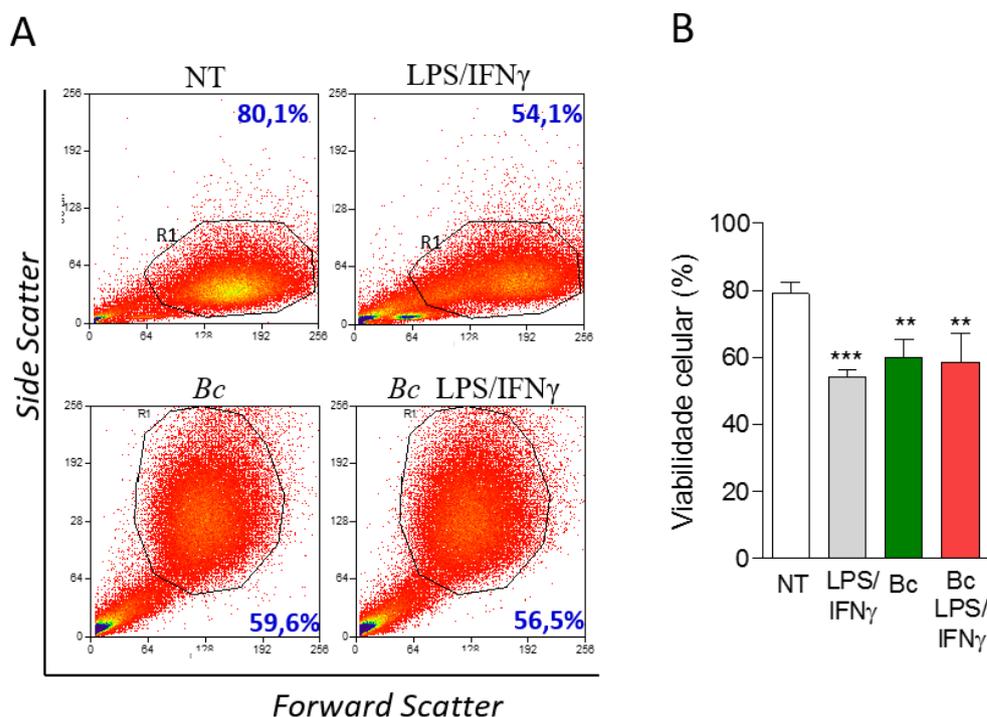
5.2. Detecção de NO em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença de *Burkholderia cenocepacia* inativada em diferentes concentrações de paraformaldeído. controles não tratados (-), estimulados com LPS (+/-) ou IFN γ (-/+) ou ambos (LPS/IFN γ), sendo ou não infectados com *B. cenocepacia*. Bactérias foram inativadas 24h antes com paraformaldeído (BcPFA-k: Bc paraformaldehyde-killed) em diferentes concentrações. *P < 0,05; **P < 0,01;***P < 0,001. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.



5.3. Detecção de NO em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença de *Burkholderia cenocepacia* ativa e inativa. controles não tratados (-), estimulados com LPS/IFN γ , sendo ou não infectados com *B. cenocepacia*. Bactérias foram inativadas 24h antes com paraformaldeído (BcPFA-k: Bc paraformaldehyde-killed) a 3,65%. **P < 0,01; ***P < 0,001 grupos experimentais comparados com controles não tratados e não infectados. ## P < 0,01 LPS/IFN γ comparado com *Bc* LPS/IFN γ . φφφ P < 0,001 BcPFA-k LPS/IFN γ comparado com *Bc* LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

5.3. Viabilidade das células da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongo após 24 horas de ensaio

Considerando que os efeitos de não detecção de nitrito observados na presença de *B. cenocepacia*, poderiam ser resultado de morte das células e, por conseguinte, interrupção da produção de NO, identificamos de maneira indireta a viabilidade dos cultivos. Por citometria de fluxo, avaliamos o padrão de tamanho e granularidade (FSC x SSC), em cada grupo de nosso modelo experimental. Através de *gates* realizados no universo de células viáveis, após exclusão de agregados celulares (*doublets*), estimamos indiretamente o percentual de células vivas. Como mostrado no experimento representativo (**Figura 5.4A**), foram encontrados nos grupos NT percentual de 80,1%, em LPS/IFN γ 54,1%, em Bc 59,6% e em Bc LPS/IFN γ 56,5%. Notamos nos cultivos que interagiram com *B. cenocepacia*, diferenças no padrão FSC e SSC, indicativos que as células apresentaram maior tamanho e granularidade em relação aos grupos com células não infectadas. Este padrão de viabilidade celular foi encontrado em experimentos independentes (**Figura 5.4B**).

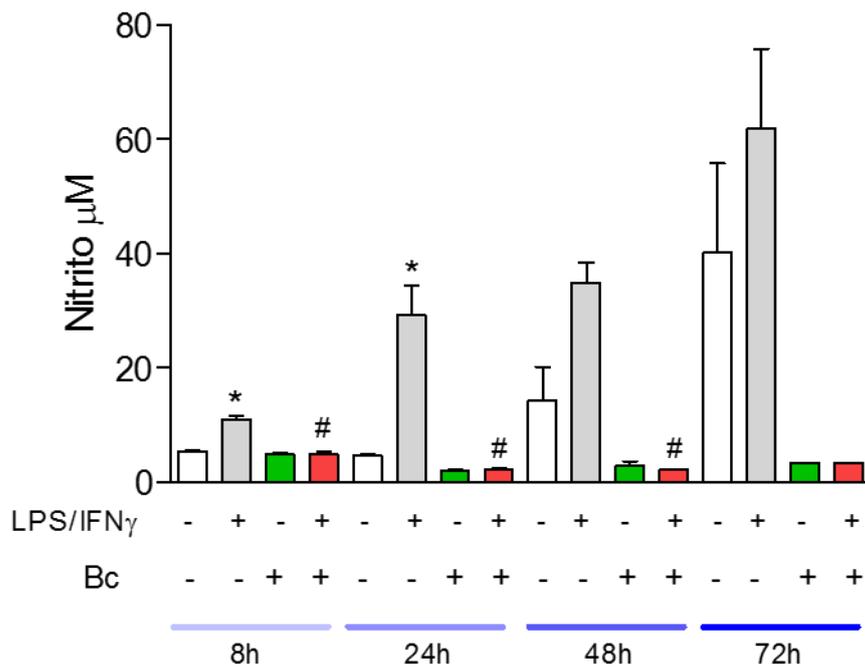


5.4. Viabilidade das células da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos após 24h de ensaio. (A) *Dot plots* representativos Forward Scatter (tamanho celular) e Side Scatter (granulosidade interna das células) demonstrando universo de células viáveis para cada condição experimental. (B) Frequência de viabilidade celular com a síntese de 3 experimentos independentes. **P < 0,01; ***P < 0,001 grupos experimentais comparados com controle NT.

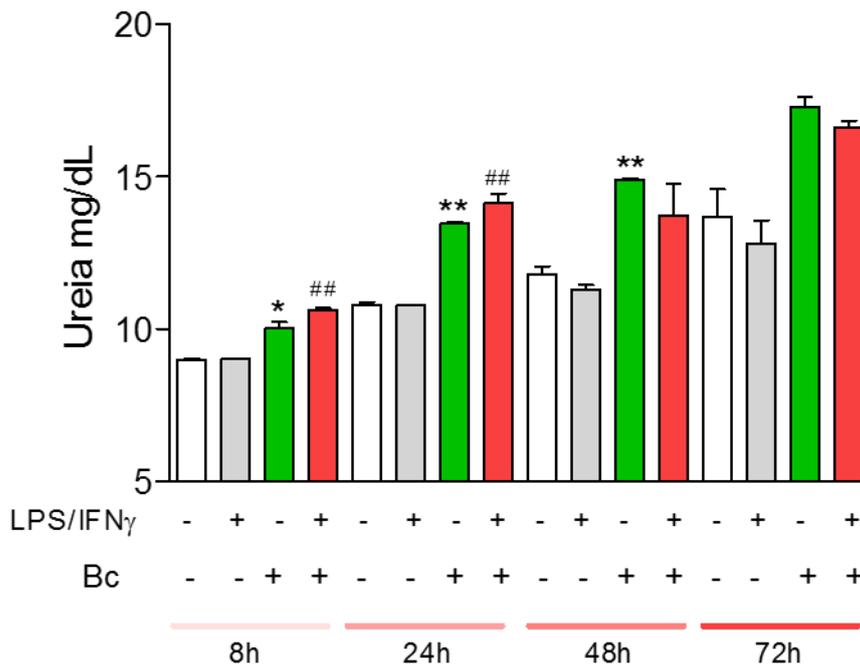
5.4. Cinética de detecção de NO_x e ureia em cultivos de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 infectados por *Burkholderia cenocepacia*

Visando avaliar se a produção de NO em cultivos na presença de *B. cenocepacia* ocorria de modo precoce ou tardio, influenciado pela presença da bactéria, realizamos ensaio de cinética, analisando os pontos de 8, 24, 48 e 72 hpi. Verificamos que a não detecção de NO_x na presença de *B. cenocepacia* ocorre independente do tempo de análise. Confirmamos também, que o tempo ideal para análise é o ponto de 24 h, pois neste é possível obter valores das concentrações de nitrito nos sobrenadantes com a menor variação dentro dos grupos experimentais, garantindo um intervalo de confiança plausível nas análises, pois são observados em momentos mais tardios aumento das concentrações de nitrito nos controles NT (**Figura 5.5A**). Considerando que o aminoácido arginina pode ser metabolizado por vias opostas, pelas enzimas iNOS/NOS2 (gerando como produto final NO + citrulina) ou arginase (gerando como produto final ornitina + ureia), a não detecção de NO_x poderia ser resultado de atividade aumentada da enzima arginase. A fim de verificar indiretamente a possível atividade da enzima arginase, dosamos ureia. Observamos que na ausência ou presença de LPS/IFN γ a concentração de ureia nos sobrenadantes se mantém basal (~10 mg/dL). Por outro lado, em cultivos na presença de *B. cenocepacia*, ocorre aumento da concentração de ureia (~14 mg/dL) (**Figura 5.5B**).

A



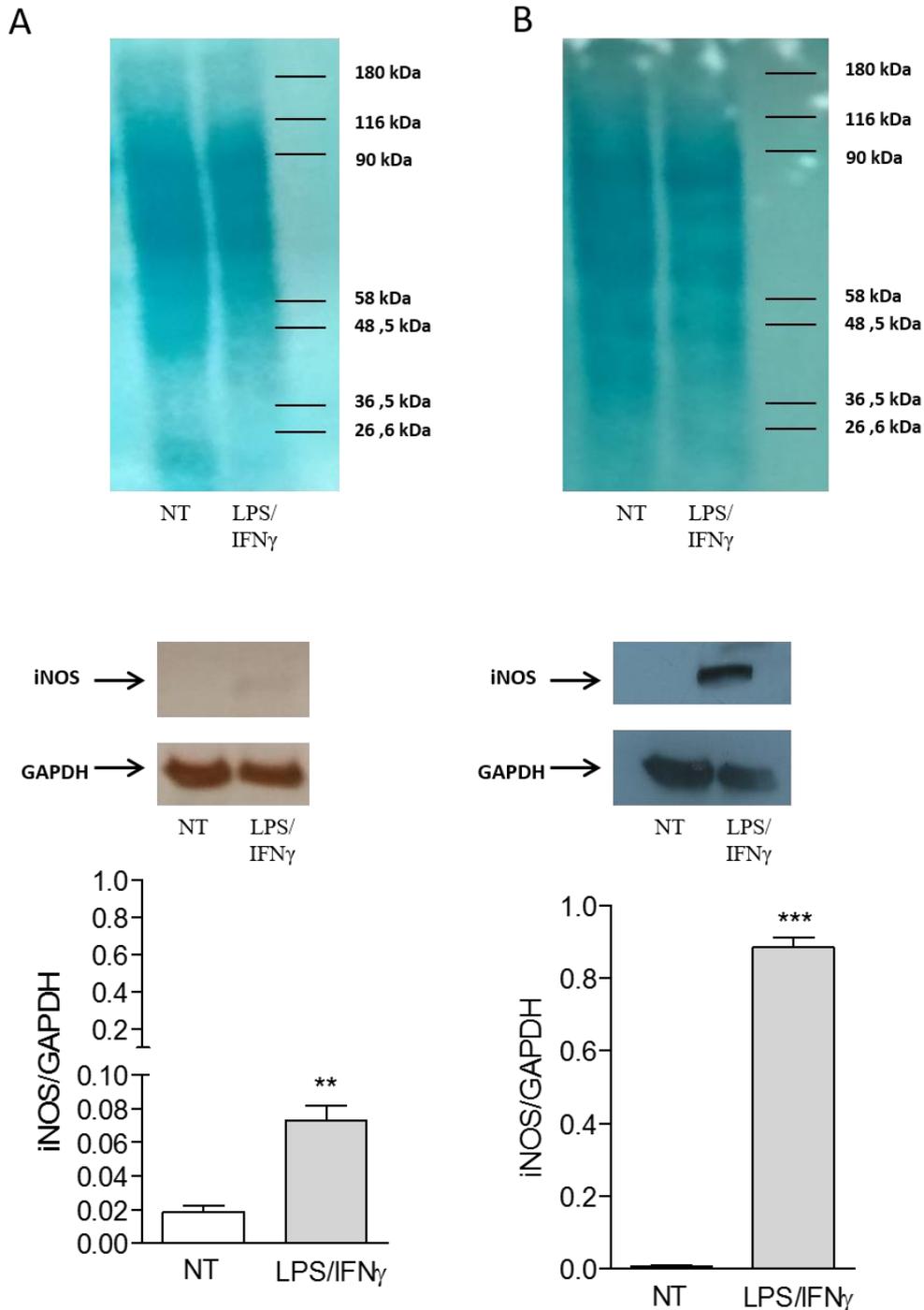
B



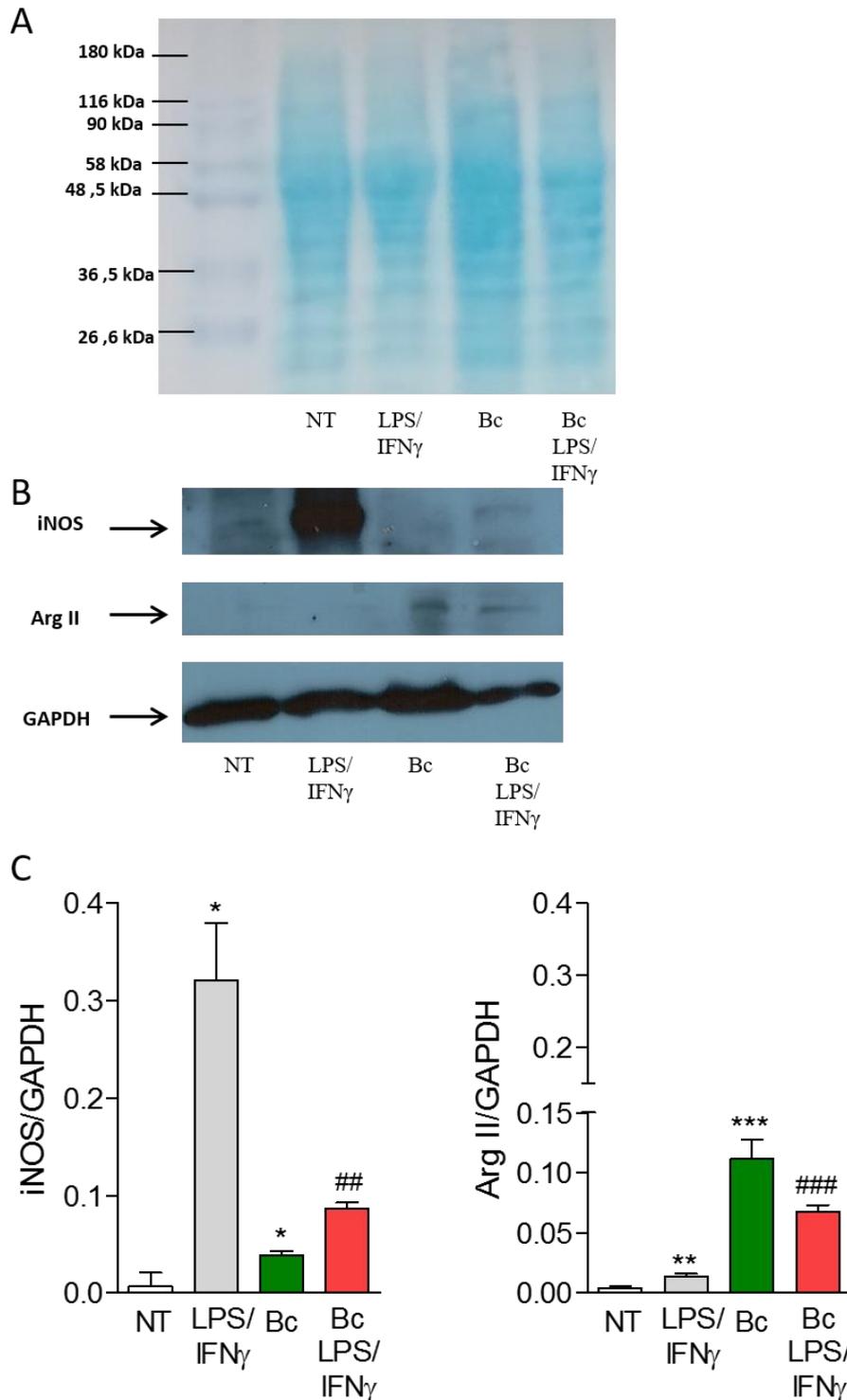
5.5. Cinética de produção de NO e ureia por células da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos infectados por *B. cenocepacia*. (A) Detecção de NO e (B) detecção de ureia: controle não tratado e não infectado e estimulados com LPS/IFN γ e/ou infectados com *B. cenocepacia*, sendo a análise realizada em 8h, 24h, 48h e 72h. *P < 0,05; **P < 0,01 grupos experimentais comparados com controle não tratado e não infectado. # P < 0,05; ## P < 0,01 LPS/IFN γ comparado com *Bc* LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

5.5. Expressão de proteínas iNOS/NOS2 e argII mediante infecção de células AMJ2-C11 por *Burkholderia cenocepacia*

Devido a não detecção de NO_x, e aumento da concentração de ureia em cultivos de macrófagos alveolares de camundongo da linhagem AMJ2-C11 infectados por *B. cenocepacia*, pensamos que (i) a presença da bactéria estaria induzindo aumento da expressão de arginase deslocando a metabolização de arginina para esta via, mesmo havendo expressão de iNOS/NOS2, ou (ii) a presença de *B. cenocepacia* não induziria a expressão de iNOS/NOS2 e aumentaria a expressão de arginase. Para avaliar qual cenário estaria ocorrendo em nosso modelo, analisamos a expressão das proteínas de interesse. Inicialmente, realizamos a padronização das condições de ensaio para detecção da expressão de iNOS/NOS2 na linhagem RAW 264.7 de macrófagos peritoneais estimulados com LPS/IFN γ , já que dados prévios de nosso grupo indicam que este tipo celular apresenta alta expressão desta molécula após o referido estímulo (GIBALDI, 2009). Após avaliarmos a qualidade da transferência das proteínas totais para a membrana de nitrocelulose, utilizando coloração reversível, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-iNOS/NOS2, e posteriormente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Utilizamos detecção colorimétrica (**Figura 5.6A**) e detecção por quimioluminescência (**Figura 5.6B**). Como o esperado, detectamos iNOS/NOS2 no extrato proteico de RAW 264.7 que foi estimulado com LPS/IFN γ nos dois sistemas avaliados, sendo que a revelação por quimioluminescência apresentou maior sensibilidade na análise por densitometria. Seguindo nosso modelo de infecção *in vitro* de 24 h, o extrato proteico de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 foi obtido para análise da expressão das proteínas iNOS/NOS2 e argII após a infecção de *B. cenocepacia*. Avaliamos a qualidade da transferência das proteínas totais (**Figura 5.7A**), e após a incubação com anticorpos primários anti-iNOS/NOS2 e anti-argII, e secundários conjugados à peroxidase, realizamos a detecção por quimioluminescência (**Figura 5.7B**). Na análise semi-quantitativa por densitometria (**Figura 5.7C**) observamos que, de acordo com o esperado, ocorre aumento da expressão de iNOS/NOS2 nos cultivos estimulados com LPS/IFN γ , em relação ao controle não estimulado e não infectado. Em cultivos que foram infectados por *B. cenocepacia* encontramos baixa expressão de iNOS/NOS2, mesmo quando estimulados com LPS/IFN γ . Por outro lado, ao avaliarmos a expressão de argII, observamos um discreto aumento da expressão quando os cultivos são estimulados com LPS/IFN γ , e ainda maior expressão da proteína quando os cultivos haviam sido infectados por *B. cenocepacia*. Em todas as membranas foi utilizado como controle *house keeping* o GAPDH, revelado por anticorpo específico.



5.6. Padronização de detecção de expressão de proteína iNOS/NOS2 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS/IFN γ . Expressão de iNOS/NOS2 em linhagem RAW 264.7 determinada por revelação (A) colorimétrica usando anticorpo secundário conjugado à biotina e revelado por estreptoavidina-peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e DAB (3,3-diaminobenzina), formando cromógeno e (B) quimioluminescente usando o anticorpo secundário conjugado à biotina e revelado por estreptoavidina-peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e de luminol. A figura mostra controle de carregamento (corado por *Memcode reversible protein stain*), a imagem da revelação da presença de iNOS/NOS2 e a análise semi-quantitativa da expressão de iNOS/NOS2 em relação à expressão do *house keeping* GAPDH. Controles não tratados (NT) ou estimulados com LPS/IFN γ . **P < 0,01; ***P < 0,001. Dados representativos de um experimento.



5.7. Expressão de proteínas iNOS/NOS2 e ARGII em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 mediante infecção por *Burkholderia cenocepacia*. (A) SDS-PAGE 12% mostrando controle de carregamento de proteínas corado por *Memcode reversible protein stain*. São indicados os padrões de massa molecular. (B) Imagem da revelação por luminol da expressão de iNOS/NOS2 e Arg II. (C) Análise semi-quantitativa da expressão de iNOS/NOS2 e Arg II em relação à expressão do *house keeping* GAPDH. Os grupos em estudo foram: não tratado e não infectado (NT), estimulado com LPS/IFN γ na presença ou não de *B. cenocepacia*. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 grupos experimentais comparados com controle NT. ##P < 0,01; ###P < 0,001 LPS/IFN γ comparado com Bc LPS/IFN γ . Dados representativos de um experimento.

5.6. Detecção de NO_x e ureia em sobrenadantes da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos em diferentes condições experimentais

Tendo por base nossos resultados de detecção de NO_x e ureia em modelo *in vitro* de interação de 24 h, procuramos avaliar se após o estímulo de cultivos da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos com LPS/IFN γ , e na permanência desse estímulo, a presença da bactéria seria capaz de produzir os efeitos que resultam em não detecção de NO_x e concomitante aumento da concentração de ureia. Para isso, realizamos um ensaio de 48 h onde cultivos de macrófagos alveolares foram submetidos a três condições experimentais distintas, em que avaliamos o potencial reposicionamento das vias iNOS/NOS2 e arginase (condição experimental B) além da possível ocorrência de consumo de NO/nitrito por *B. cenocepacia* (condição experimental C):

- (i) **condição experimental A:** macrófagos alveolares plaqueados e mantidos sem estímulos por 24 h foram lavados e receberam meio de cultivo fresco, com adição ou não de estímulos com LPS/IFN γ e/ou *B. cenocepacia* (MOI 1:1) por 24 h;
- (ii) **condição experimental B:** macrófagos alveolares plaqueados e estimulados com LPS/IFN γ por 24 h foram lavados e receberam meio de cultivo fresco, com nova adição ou não de estímulos com LPS/IFN γ e/ou *B. cenocepacia* (MOI 1:1) por 24 h;
- (iii) **condição experimental C:** macrófagos alveolares plaqueados e estimulados com LPS/IFN γ por 24 h, após esse período, sem reposição de meio de cultivo fresco, com nova adição ou não de estímulos com LPS/IFN γ e/ou *B. cenocepacia* (MOI 1:1) por 24 h.

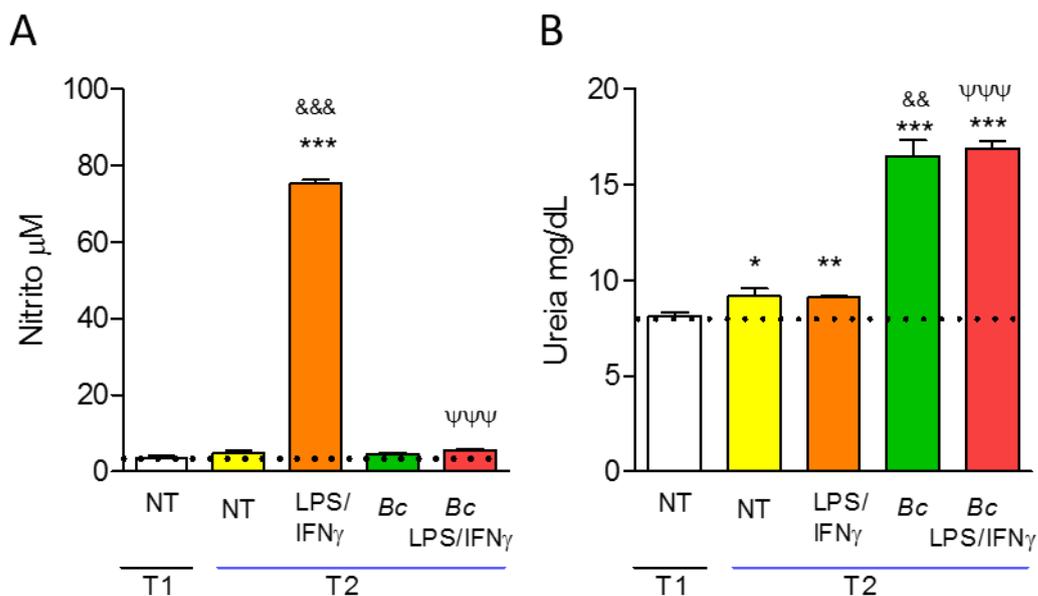
Na condição experimental A, macrófagos não estimulados por 24 h, ao receberem estímulos com LPS/IFN γ produzem NO_x , de modo que são detectadas concentrações maiores que 60 μM , enquanto nas condições NT e com LPS/IFN γ as concentrações de ureia foram basais (~10 mg/dL). Na presença de *B. cenocepacia* as concentrações de nitrito nos sobrenadantes estão reduzidas e próximas aos valores do controle NT, e as concentrações de ureia estão aumentadas (~18 mg/dL) (**Figura 5.8A e B**).

Na condição experimental B, macrófagos estimulados com LPS/IFN γ (por 24 h), após receberem meio de cultivo fresco (sem adição de estímulos), apresentaram em seus sobrenadantes concentrações de nitrito semelhantes às concentrações encontradas nas primeiras 24 h (~ 60 μM), enquanto os níveis de ureia permaneceram basais (~ 10 mg/dL). Em macrófagos que receberam meio de cultivo fresco e reposição de LPS/IFN γ , foram detectadas concentrações mais elevadas ($P < 0,001$) de nitrito nos sobrenadantes (**Figura**

5.9A), sendo os níveis de ureia também basais (~ 10 mg/dL; **Figura 5.9B**). Por outro lado, macrófagos expostos a LPS/IFN γ por 24 h, quando meio de cultivo fresco e *B. cenocepacia* foram adicionados, encontramos baixas concentrações de nitrito (~ 20 μ M; **Figura 5.9A**) e aumento nas concentrações de ureia nos sobrenadantes (15 mg/dL; **Figura 5.9B**). Dados similares foram observados nos cultivos em que houve reposição de LPS/IFN γ e as células foram expostas à infecção pela bactéria.

Na condição experimental C, os cultivos de macrófagos foram estimulados com LPS/IFN γ por 24 h, não houve reposição de meio, mas adicionamos novamente, ou não, LPS/IFN γ e infectamos com *B. cenocepacia*. Nesta condição, ao final de 48 h, macrófagos que receberam LPS/IFN γ apenas uma vez, bem como aqueles que receberam duas vezes, as concentrações de nitrito nos sobrenadantes foram elevadas (~80 μ M; **Figura 5.9C**), enquanto as concentrações de ureia foram próximas às basais (~ 10 mg/dL; **Figura 5.9D**). Contudo, na presença de *B. cenocepacia*, a concentração de nitrito é reduzida (~ 50 μ M, **Figura 5.9C**), enquanto observamos aumento nos níveis de ureia (~15 mg/dL; **Figura 5.9D**).

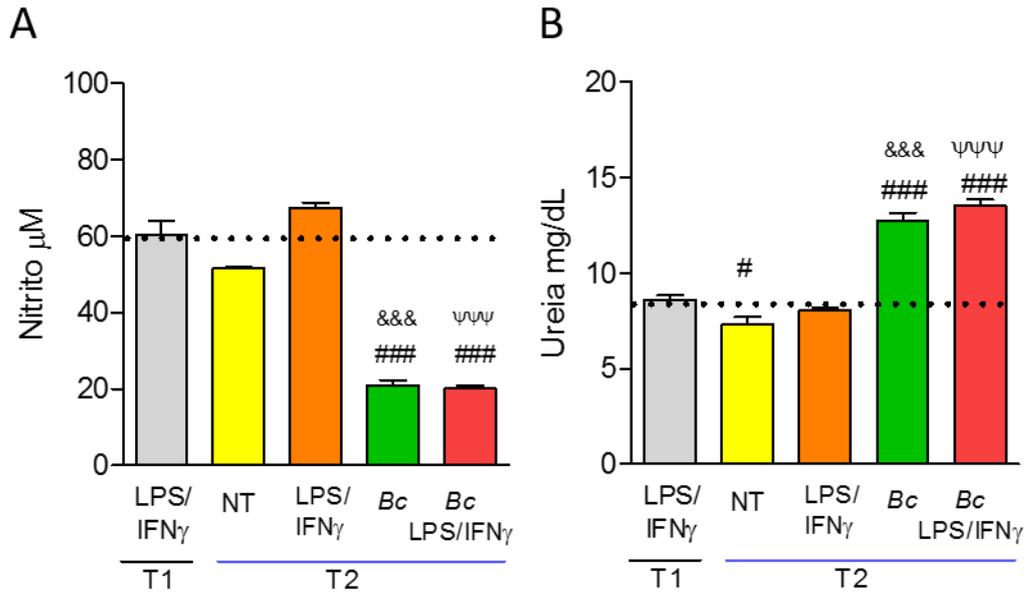
Condição experimental A



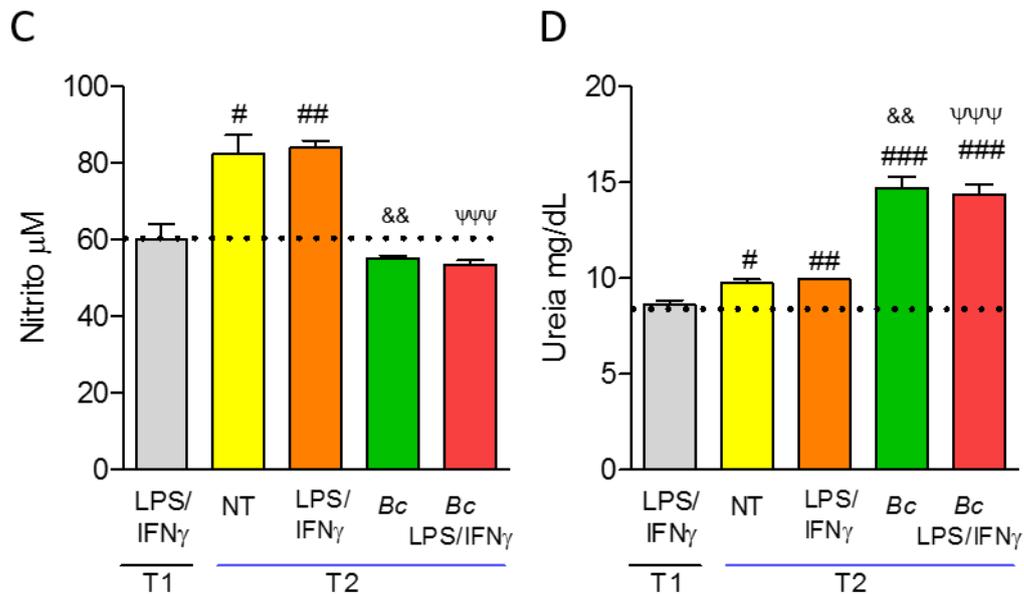
5.8 Detecção de NO e ureia em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11.

Teste de redirecionamento de resposta, segundo a condição experimental A. Detecção de NO (A) e ureia (B) em sobrenadantes de cultivos submetidos à condição experimental A: cultivos não-estimulados cultivados por 24 h (T1), lavados e submetidos aos diferentes tratamentos por 24 h (T2): controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 NT/T1 comparado com grupos em T2. &&P < 0,01; &&&P < 0,001 NT/T2 comparado com outros grupos experimentais. ψP < 0,05; ψψP < 0,01 LPS/IFN γ /T2 comparado com BcLPS/IFN γ /T2. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

Condição experimental B



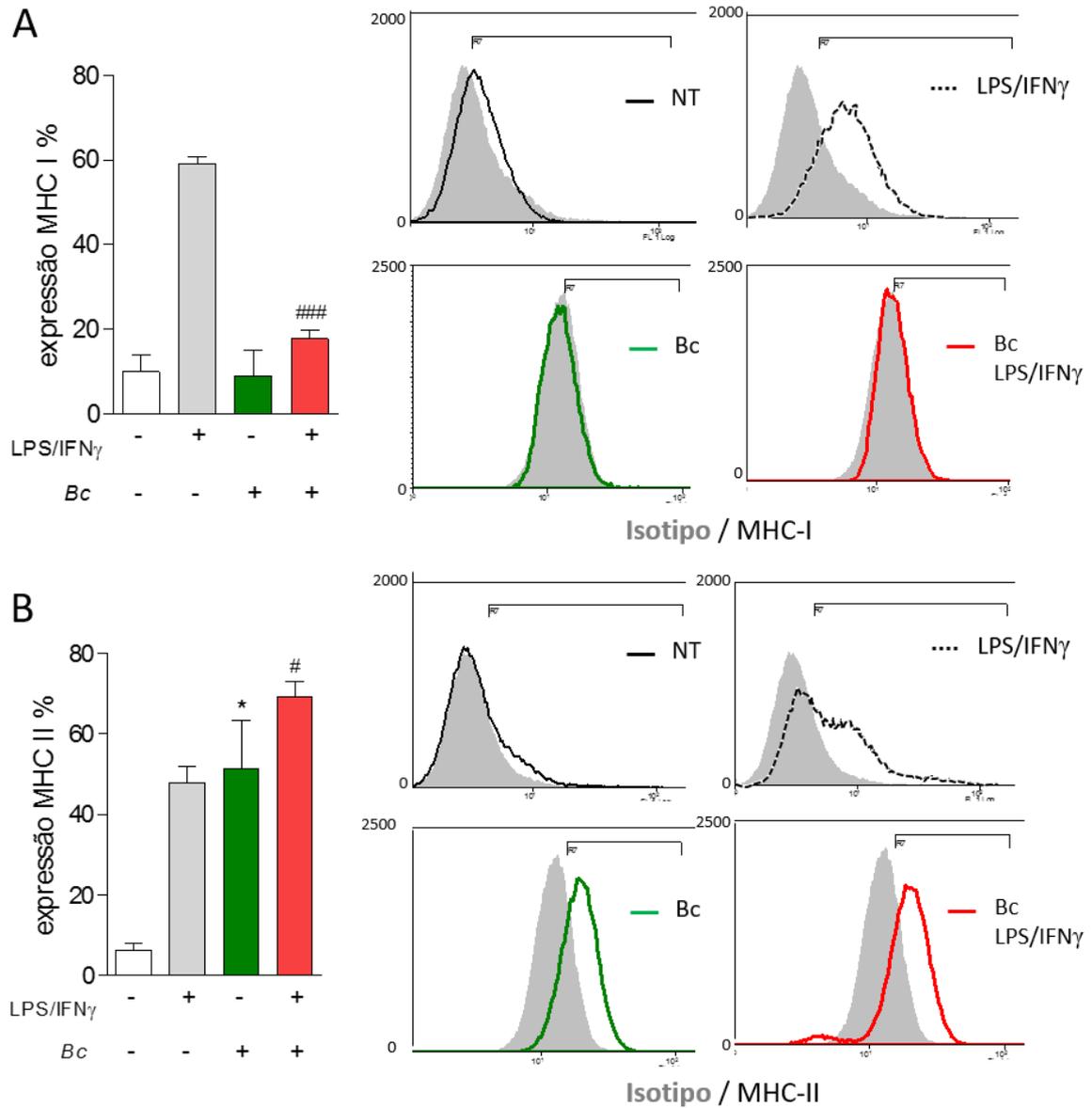
Condição experimental C



5.9. Detecção de NO e ureia em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11. Teste de redirecionamento de resposta, segundo as condições experimentais B e C. Detecção de NO (A e C) e ureia (B e D) em sobrenadantes de cultivos submetidos às condições experimentais. Na condição experimental B: cultivos estimulados com LPS/IFN γ por 24 h (T1), lavados e submetidos aos diferentes tratamentos por 24 h (T2). Na condição experimental C: cultivos estimulados com LPS/IFN γ por 24 h (T1), o estímulo foi repostado e os cultivos submetidos aos diferentes tratamentos por 24 h (T2). Grupos experimentais foram: controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001 LPS/IFN γ /T1 comparado com grupos em T2. &&P < 0,01; &&&P < 0,001 NT/T2 comparado com outros grupos experimentais. $\psi\psi\psi$ P < 0,001 LPS/IFN γ /T2 comparado com BcLPS/IFN γ /T2. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

5.7. Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (MHC I e MHC II) em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 após interação com *Burkholderia cenocepacia*

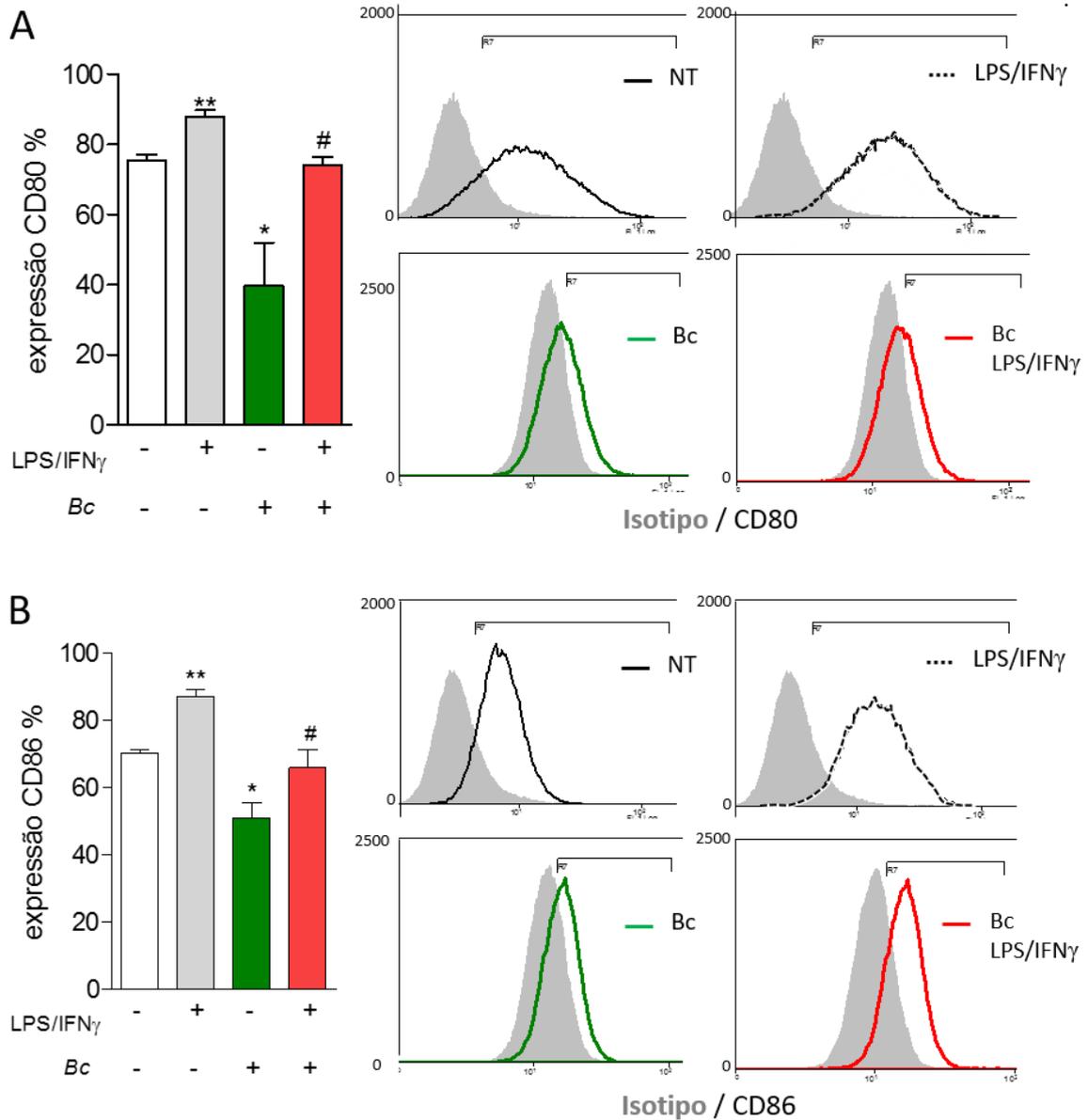
Como importante mecanismo na geração da resposta adaptativa, macrófagos, além de suas funções fagocíticas e de produção de ROS e citocinas, atuam na apresentação de antígenos a células T e o fazem via MHC de classe I e II (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Procuramos então avaliar a capacidade dos macrófagos alveolares em expressar fenótipo associado à apresentação de antígenos a células T após interação com *B. cenocepacia*. Para isso, seguindo nosso modelo de infecção *in vitro* de 24 h, os macrófagos foram obtidos e incubados com anticorpos anti-MHC-I e anti-MHC-II conjugados a fluorocromos (ou isotipo controle), sendo a frequência de células expressando estas moléculas determinada através de citometria de fluxo. Como esperado, ao serem estimulados com LPS/IFN γ houve aumento da frequência de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 expressando MHC-I e MHC-II em relação aos controles NT (**Figura 5.10A e B**). Cultivos celulares que interagiram com *B. cenocepacia* apresentam frequência de células expressando de MHC-I semelhantes ao controle NT (**Figura 5.10A**). Na presença de infecção por *B. cenocepacia* e estímulo com LPS/IFN γ não houve alteração significativa na frequência de células expressando de MHC-I em relação ao controle NT, mas redução da proporção de células MHC-I⁺ em relação ao controle LPS/IFN γ (**Figura 5.10A**). Cultivos que interagiram com *B. cenocepacia*, ao serem analisados para MHC-II, apresentaram aumento significativo da frequência de células expressando esta molécula em relação ao controle NT, que foram semelhantes à frequência de células MHC-II⁺ detectadas nos cultivos estimulados com LPS/IFN γ (**Figura 5.10B**). A infecção pela bactéria na presença de estímulos LPS/IFN γ resultou em aumento da frequência de células MHC-II⁺ em relação aos cultivos somente estimulados com LPS/IFN γ (**Figura 5.10B**).



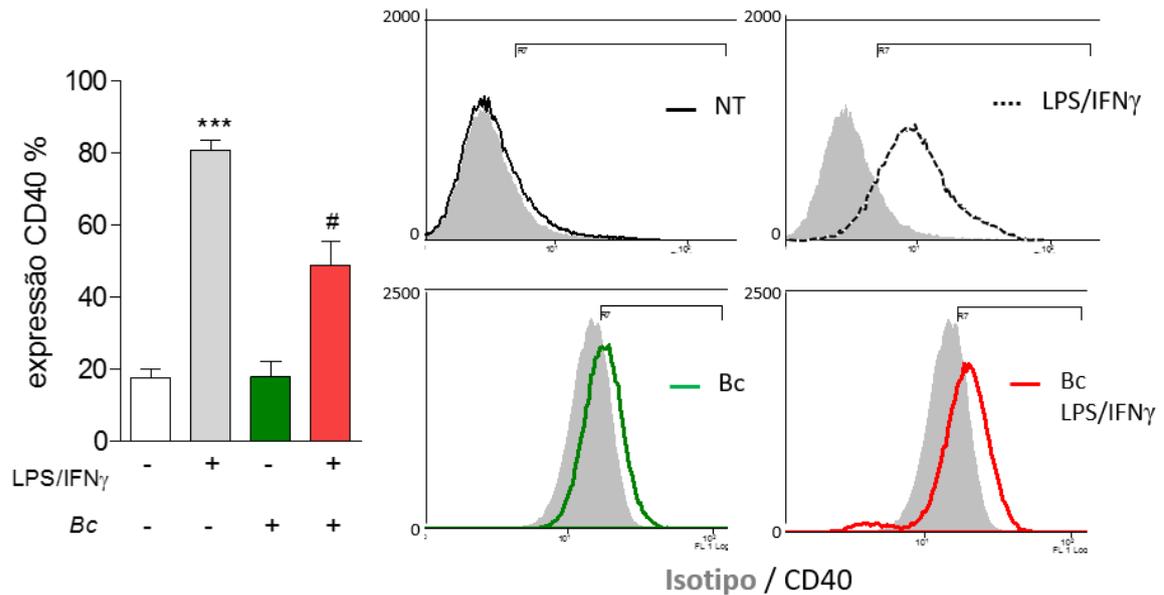
5.10. Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (MHC-I e MHC-II) em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com *Burkholderia cenocepacia*. Gráficos de frequência e histogramas representativos da expressão de MHC-I (A) e MHC-II (B). Grupos experimentais foram: controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. *P < 0,05 grupos experimentais comparados com controle NT. # P < 0,05; ### P < 0,001 LPS/IFN γ comparado com Bc LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

5.8. Expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) e CD40 em macrófagos da linhagem AMJ2-C11 após interação com *Burkholderia cenocepacia*

Procuramos avaliar também, a capacidade dos macrófagos alveolares em expressar fenótipo associado à ativação de linfócitos T após a infecção por *B. cenocepacia*. Para isso, seguindo nosso modelo de infecção *in vitro* de 24 h, os macrófagos foram obtidos e incubados com anticorpos anti-CD80, anti-CD86 e anti-CD40, conjugados a fluorocromos (ou isotipos controles), a frequência de células expressando estas moléculas foi determinada através de citometria de fluxo. Nossos dados mostraram que os estímulos com LPS/IFN γ induzem aumento significativo na frequência de células expressando as moléculas CD80, CD86 e CD40 nos macrófagos da linhagem AMJ2-C11, comparados aos macrófagos controles NT (**Figura 5.11A e B; Figura 5.12**). Após interação com *B. cenocepacia* observamos redução da proporção de células CD80⁺ e CD86⁺ em relação aos controles NT (**Figura 5.11A e B**), enquanto a frequência de células expressando CD40⁺ foi semelhante ao controle NT (**Figura 5.12**). A infecção na presença de estímulos LPS/IFN γ resultou em redução da frequência de células CD80⁺, CD86⁺ e CD40⁺, em relação ao controle LPS/IFN γ (**Figura 5.11A e B; Figura 5.12**).



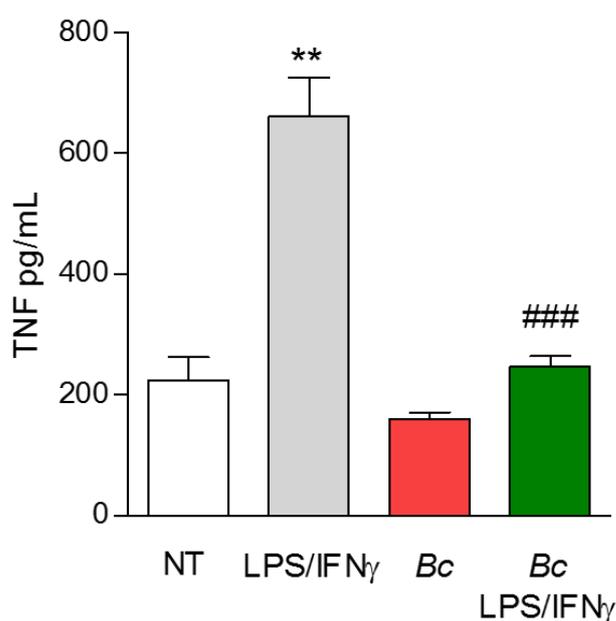
5.11. Expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com *Burkholderia cenocepacia*. Gráficos de frequência e histogramas representativos da expressão de CD80 (A) e CD86 (B). Grupos experimentais foram: controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. *P < 0,05; **P < 0,01 grupos experimentais comparados com controle NT. # P < 0,05 LPS/IFN γ comparado com Bc LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.



5.12. Expressão da molécula coestimuladora CD40 em macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 pós-interação com *Burkholderia cenocepacia*. Gráficos de frequência e histogramas representativos da expressão de CD40. Grupos experimentais foram: controle não tratado (NT), estimulados (LPS/IFN γ) e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. ***P < 0,001 grupos experimentais comparados com controle NT. # P < 0,05 LPS/IFN γ comparado com Bc LPS/IFN γ . Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

5.9. Detecção de citocinas em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença da infecção por *Burkholderia cenocepacia*

Visando avaliar se em cultivos de macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 o perfil de produção de citocinas, TNF, uma das principais citocinas inflamatórias, e IL-10, que atua na regulação da resposta inflamatória, seria influenciado pela presença de *B. cenocepacia*, dosamos estas citocinas nos sobrenadantes obtidos após 24 h de cultivo. De maneira esperada, quando os cultivos foram estimulados com LPS/IFN γ observamos um aumento na concentração de TNF em comparação aos níveis basais dos cultivos NT (**Figura 5.13**). Por outro lado, quando na presença de *B. cenocepacia* as concentrações de TNF nos sobrenadantes se mantêm semelhantes às encontradas nos cultivos NT. A presença de *B. cenocepacia* em cultivos estimulados com LPS/IFN γ resultou em níveis de TNF reduzidos em relação aos cultivos estimulados com LPS/IFN γ e similares às concentrações desta citocina nos cultivos NT (**Figura 5.13**). Em todas as condições estudadas não detectamos a presença de IL-10 nos sobrenadantes, ainda que a curva fosse válida e IL-10 fosse detectada em sobrenadantes de macrófagos da linhagem RAW264.7 tratados com LPS/IFN γ , como controle positivo (dado não mostrado).

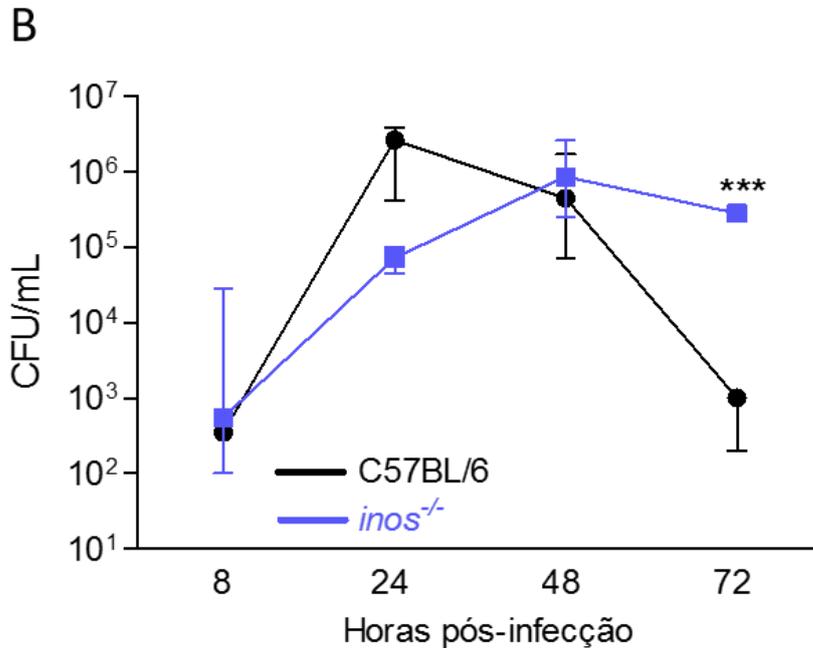
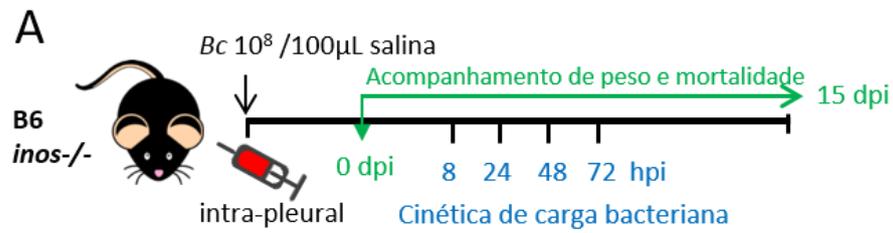


5.13. Detecção de TNF em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11 na presença da infecção por *Burkholderia cenocepacia*. Detecção de TNF em sobrenadantes de cultivos não tratados (NT) ou estimulados com LPS/IFN γ e/ou infectados com *Burkholderia cenocepacia*. **P < 0,01 grupos experimentais comparados com controle NT. ### P < 0,001 LPS/IFN γ comparado com outros grupos experimentais. Gráficos representativos de 4 experimentos independentes.

5.10. Infecção experimental por *Burkholderia cenocepacia* em camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2

Avaliamos a influência de iNOS/NOS2 na colonização e persistência da bactéria, e nas alterações estruturais nas vias aéreas. Para tal, utilizamos camundongos geneticamente deficientes para a enzima iNOS/NOS2, B6.129.P2-NOS2 (*inos*^{-/-}), e seu respectivo *background* genético B6.129 (C57BL/6). Esses camundongos foram infectados com *B. cenocepacia* cepa J2315, pela via intra-pleural, com uma carga bacteriana de 10⁸ células (DO_{600nm} = 0.189), suspensas em 100 µL de solução salina estéril e foram avaliados em diferentes momentos pós-infecção (**Figura 5.14A**).

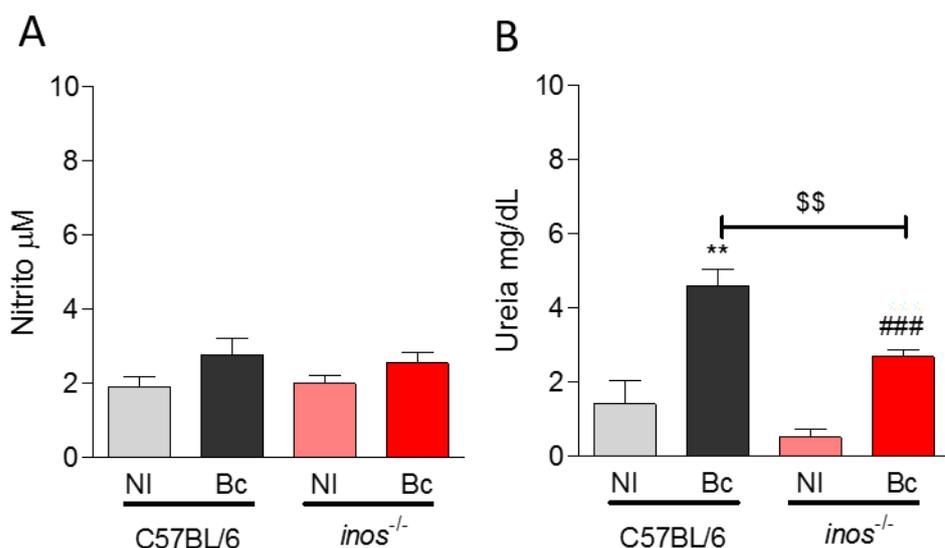
Como um dos parâmetros para avaliar controle ou persistência de *B. cenocepacia*, o número de CFU oriundos do lavado pleural dos animais obtidos em 8, 24, 48 e 72 hpi foi quantificado. Tanto camundongos competentes como deficientes em iNOS/NOS2, apresentam valores de CFU próximos quando analisados em 8 hpi (~10³ CFU/ mL). Em 24 hpi quantificamos um aumento da carga bacteriana (~10⁶ CFU/ mL em camundongos competentes e ~10⁵ CFU/ mL em camundongos deficientes). Em 48 hpi observamos valores próximos de CFU (~10⁶ CFU/ mL) em camundongos competentes e deficientes em iNOS/NOS2, ao passo que em 72 hpi os camundongos competentes C57BL/6 apresentam diminuição da carga bacteriana encontrada no lavado pleural (10³ CFU/mL), enquanto camundongos *inos*^{-/-} mantêm carga bacteriana significativamente mais alta (~ 10⁶ CFU/mL) (**Figura 5.14B**).



5.14. Infecção experimental por *Burkholderia cenocepacia* em camundongos imunocompetentes e deficientes em *iNOS/NOS2*. (A) Desenho experimental do modelo em estudo. (B) Quantificação da carga bacteriana em lavado pleural de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} infectados por *Burkholderia cenocepacia*. Contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) em lavado pleural em 8, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Número de animais por ponto experimental: 8 hpi C57BL/6 n:4 / *inos*^{-/-} n: 4; 24 hpi C57BL/6 n:3 / *inos*^{-/-} n: 4; 48 hpi C57BL/6 n:5 / *inos*^{-/-} n: 5; 72 hpi C57BL/6 n:3 / *inos*^{-/-} n: 3. ***P < 0,001. Dados representativos de um experimento.

5.11. Detecção de NO_x e ureia em lavado pleural de camundongos competentes e deficientes em iNOS/NOS2 infectados por *Burkholderia cenocepacia*

A fim de verificar o efeito da colonização bacteriana nas concentrações de NO_x e ureia no sítio de infecção, quantificamos as concentrações destes produtos no lavado pleural obtido de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} infectados por *B. cenocepacia* ou injetados com salina. O ponto de 48 hpi foi escolhido para quantificação, pois neste momento a carga bacteriana em ambas as linhagens se encontra pareada, permitindo uma análise proporcional. Não foram detectados níveis de NO_x no lavado pleural dos camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-}, estando estes infectados ou não (**Figura 5.15A**). Ao quantificarmos as concentrações de ureia, observamos que em camundongos C57BL/6 não infectados são detectados 2 mg/ dL, ocorrendo aumento significativo (P < 0,01) nos níveis detectados quando os animais estão infectados por *B. cenocepacia* (~5 mg/ mL), este aumento é de cerca de 3,3 vezes em relação ao NI. Em camundongos *inos*^{-/-} não infectados observamos baixos níveis de ureia (~0,5 mg/ dL), ocorrendo também aumento significativo (P < 0,001) nos níveis detectados quando os animais *inos*^{-/-} foram infectados por *B. cenocepacia* (~ 3 mg/ dL), sendo este aumento cerca de 5,2 vezes em relação ao NI (**Figura 5.15B**).



5.15. Detecção de NO e ureia em lavado pleural de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} infectados por *Burkholderia cenocepacia*. Detecção de NO_x (A) e ureia (B) em 48 hpi. **P < 0,01 animais C57BL/6 NI comparados com infectados com *Bc*; ####P < 0,001 animais *inos*^{-/-} NI comparados com infectados com *Bc*; \$\$ P < 0,01 animais C57BL/6 infectados comparados com animais *inos*^{-/-} infectados com *Bc*. Dados representativos de um experimento preliminar.

5.12. Achados histológicos em pulmão de camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2

Avaliamos em diferentes momentos (24, 48 e 72 hpi) os efeitos da infecção por *B. cenocepacia* nos pulmões de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-}. Para isso, secções do órgão fixado e embocado em parafina foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas de modo qualitativo para os seguintes parâmetros: (i) infiltrado peribronquiolar; (ii) infiltrado perivascular; (iii) adesão de leucócitos ao endotélio de vasos sanguíneos; (iv) edema perivascular; e (v) espessamento alveolar (**Tabela 5.12.1**).

Inicialmente, caracterizamos as diferenças já existentes entre o C57BL/6 e *inos*^{-/-} injetados com salina (**Figura 5.16**) sendo observadas alterações anteriores à infecção por *B. cenocepacia* nos animais deficientes em iNOS/NOS2 como: espessamento do interstício alveolar, extravasamento de hemácias para o espaço alveolar, leve infiltrado peribronquiolar e perivascular e presença de hemácias no lúmen de vasos (**Figura 5.16B, D e F**), essas alterações não estão presentes nos camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6 (**Figura 5.16A, C e E**).

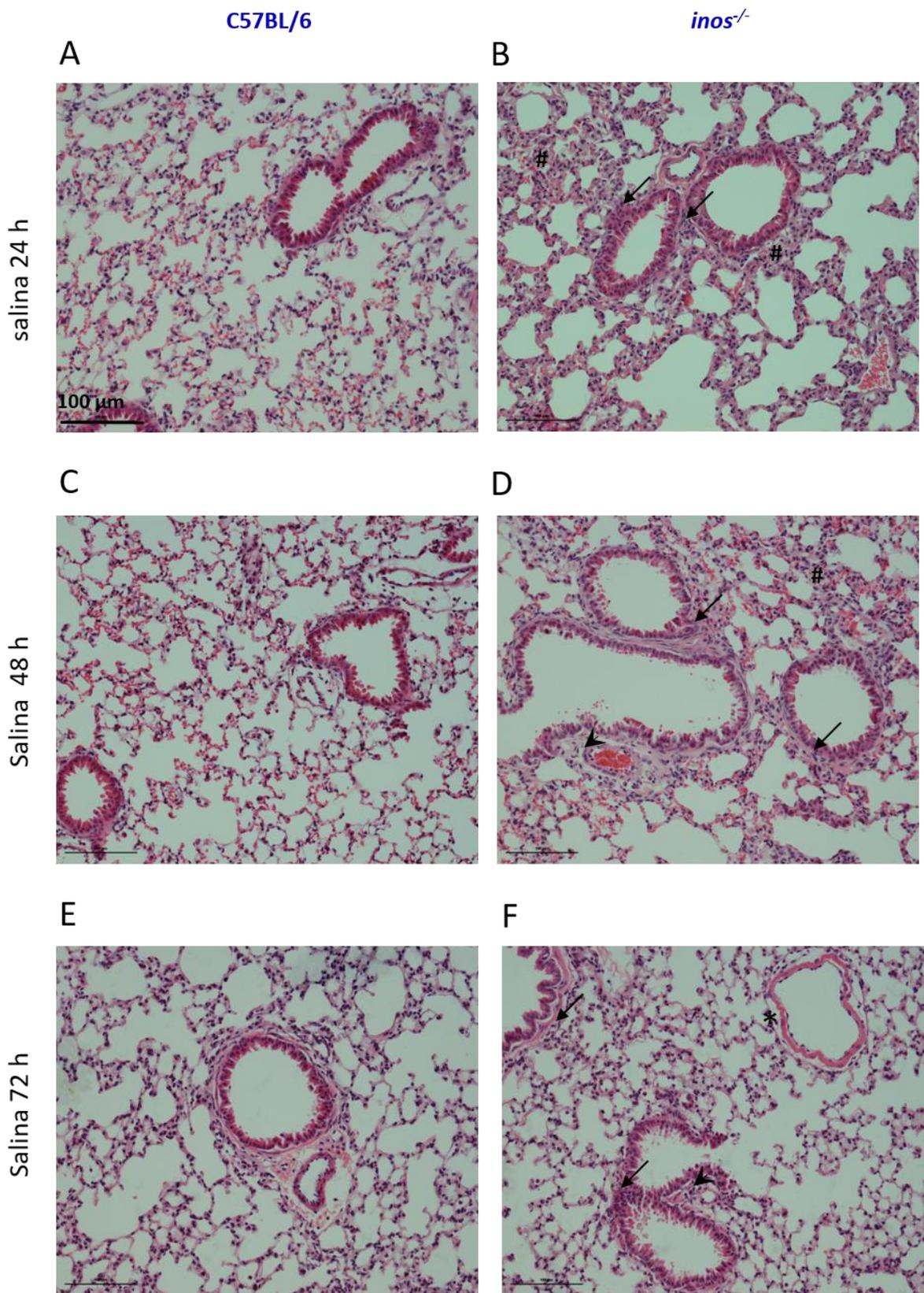
Na análise das alterações que ocorreram após a infecção por *B. cenocepacia* (**Figura 5.17**) observamos em 24 hpi ausência de infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular, e presença desigual de hemácias no lúmen dos vasos sanguíneos de camundongos C57BL/6 (**Figura 5.17A**). Nos camundongos *inos*^{-/-} observamos moderado infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular, desorganização de bronquíolos e redução da área dos alvéolos (**Figura 5.17B**). Em 48 hpi, encontramos nos camundongos C57BL/6 moderado infiltrado inflamatório peribronquiolar, edema no espaço perivascular, adesão de leucócitos ao endotélio de vasos sanguíneos e leve desorganização de bronquíolos (**Figura 5.17C**). Em camundongos *inos*^{-/-} ocorre presença de edema no espaço perivascular e peribronquiolar, adesão de leucócitos ao endotélio de vasos sanguíneos, extravasamento de hemácias e persistente redução da área dos alvéolos, além de moderado infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular (**Figura 5.17D**). Por fim, em 72 hpi ocorre nos pulmões de camundongos C57BL/6 de leve e desigual a ausente infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular (**Figura 5.17E**), enquanto em camundongos *inos*^{-/-} observa-se infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular agudo e por todo o tecido, espessamento dos interstícios alveolares, presença de edema por todo tecido, e acentuada adesão de leucócitos ao endotélio vasos sanguíneos (**Figura 5.17F**).

Tabela 5.12.1: Síntese das alterações histológicas encontradas em histologias de pulmão dos camundongos C57BL/6 e *inos^{-/-}* infectados por *B. cenocepacia*.

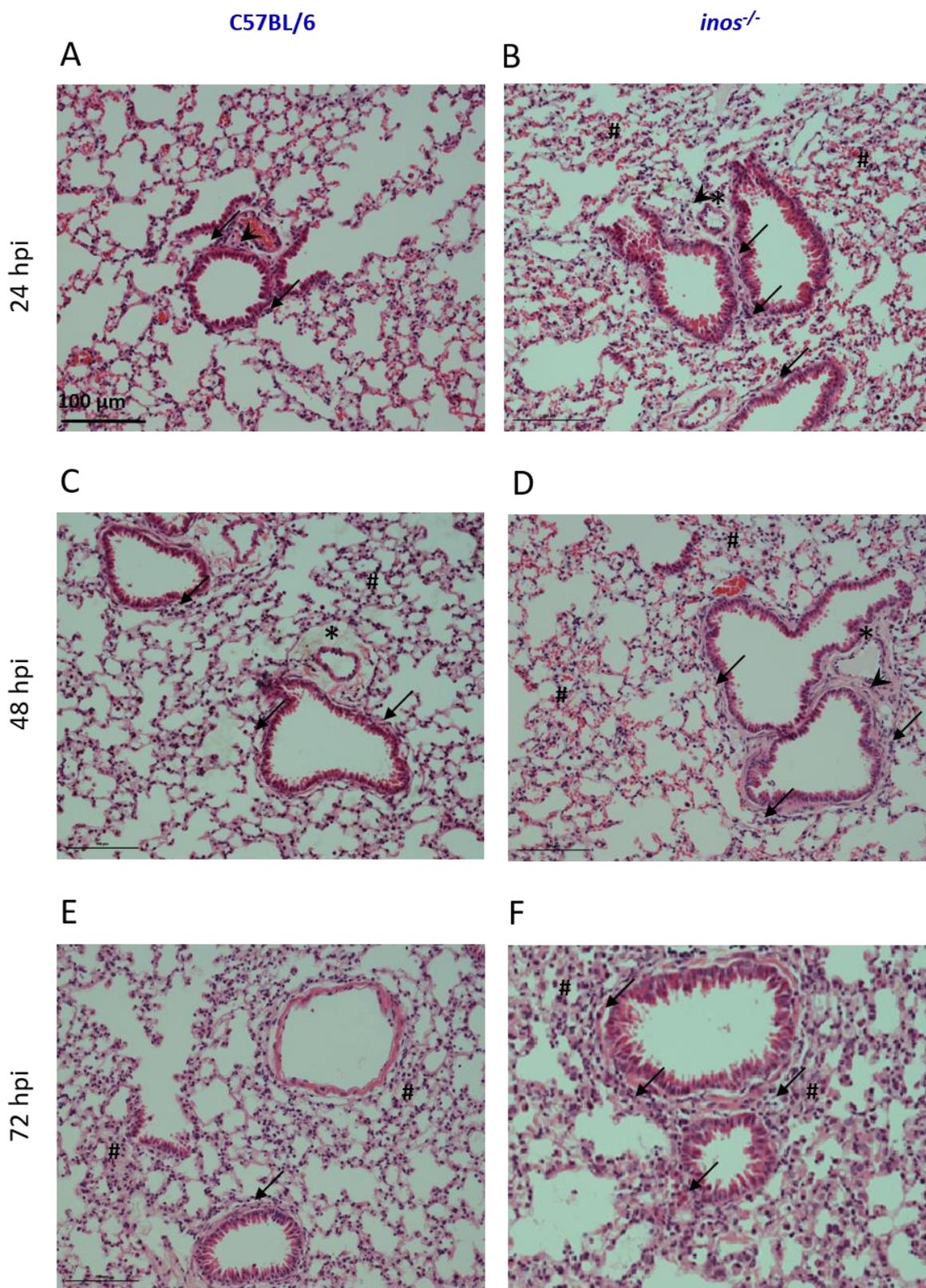
Alterações histológicas	C57BL/6		<i>inos^{-/-}</i>	
	NI	<i>Bc</i> *	NI	<i>Bc</i> *
24 hpi				
Infiltrado peribronquiolar	_#	-	+/-	+
Infiltrado perivascular	-	-	+/-	+
Aderência ao endotélio	+/-	+	-	-
Edema perivascular	-	-	-	-
Espessamento alveolar	-	-	+	++
48 hpi				
Infiltrado peribronquiolar	-	+	+/-	+
Infiltrado perivascular	-	+	+/-	+
Aderência ao endotélio	-	+	+	+
Edema perivascular	-	+	+/-	+/-
Espessamento alveolar	-	-	+	++
72 hpi				
Infiltrado peribronquiolar	-	-	+/-	+
Infiltrado perivascular	-	-	+/-	++
Aderência ao endotélio	-	-	+/-	++
Edema perivascular	+/-	+/-	+	+
Espessamento alveolar	-	-	+/	+

**Bc*: *Burkholderia cenocepacia*

#Gradação de alterações (*score*): (-) ausentes; (+/-) leve; (+) moderado; (++) agudo



5.16. Histologias de pulmão de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} injetados com salina. Seções de parafina, coloração hematoxilina e eosina (HE), de pulmão de camundongos C57BL/6 (A, C e E) e *inos*^{-/-} (B, D e F) injetados via IT com salina, em 24, 48 e 72 hpi. As imagens representam o resultado de 3 animais individuais em cada ponto. Tamanho da escala: 100 µm. Seta completa: infiltrado inflamatório peribronquiloar; Cabeça de seta: infiltrado inflamatório perivascular; asterisco: edema perivascular; cerquilha: espessamento alveolar.

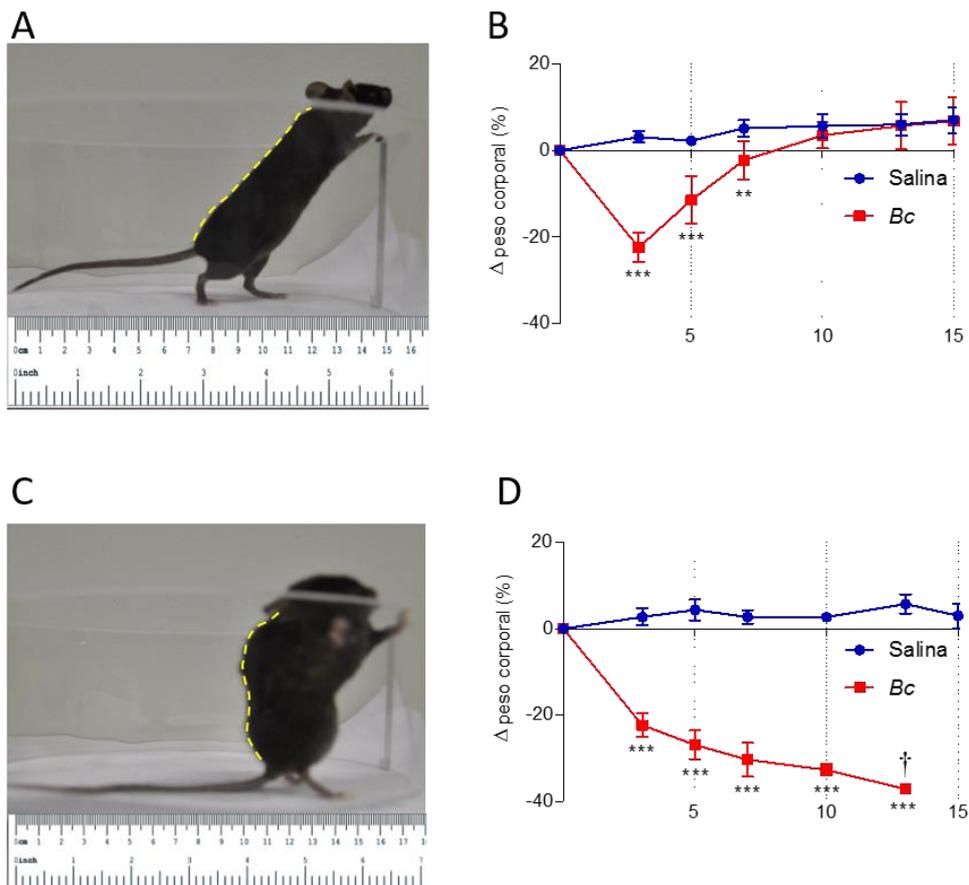


5.17. Histologias de pulmão de camundongos *C57BL/6* e *inos^{-/-}* infectados com *Burkholderia cenocepacia*. Secções de parafina, coloração hematoxilina e eosina (HE), de pulmão de camundongos *C57BL/6* (A, C e E) e *inos^{-/-}* (B, D e F) infectados via IT com *B. cenocepacia*, em 24, 48 e 72 hpi. As imagens representam o resultado de 4 animais individuais em cada ponto. Tamanho da escala: 100 µm. Seta completa: infiltrado inflamatório peribronquiloar; Cabeça de seta: infiltrado inflamatório perivascular; asterisco: edema perivascular; cerquilha: espessamento alveolar.

5.13. Avaliação clínica e curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} após a infecção experimental por *Burkholderia cenocepacia*

Ao exame clínico, a partir de 3 dpi, os camundongos deficientes em iNOS/NOS2 infectados com *B. cenocepacia* encontravam-se sugestivos de hiporexia e diminuição da ingestão de água, ao se observar o volume da ração e de água consumida quando comparados aos camundongos C57BL/6 infectados com *B. cenocepacia* (normorexia e normodipsia). Alterações comportamentais como as descritas acima não foram observadas em camundongos C57BL/6 infectados com *B. cenocepacia* (**Figura 5.18A**). O acompanhamento do peso dos animais imunocompetentes no decorrer de 15 dias mostrou que aqueles injetados com salina apresentaram ganho ponderal ao final da análise, e aqueles inoculados com *B. cenocepacia* exibiram perda em torno de 20% de peso corporal em 3 dpi, recuperando o peso ao término do ensaio apresentando ganho final semelhante aos animais não infectados (**Figura 5.18B**). Por outro lado, observamos em camundongos deficientes em iNOS/NOS2 infectados com *B. cenocepacia* respiração rápida e curta, sugestiva de taquipneia e alterações comportamentais tais como: tensão muscular, encurvatura torácica (**Figura 5.18C**) e alterações na movimentação dos animais, apresentando letargia. A variação de peso corporal dos animais deficientes em iNOS/NOS2 mostrou que aqueles injetados com salina apresentam ganho de peso, ao passo que os inoculados com *B. cenocepacia* exibiram perda ponderal de aproximadamente 20% em 3 dpi, com perda de peso progressiva em torno de 40% ao término da análise, cujo desfecho foi a morte de todos os animais do grupo (**Figura 5.18D**).

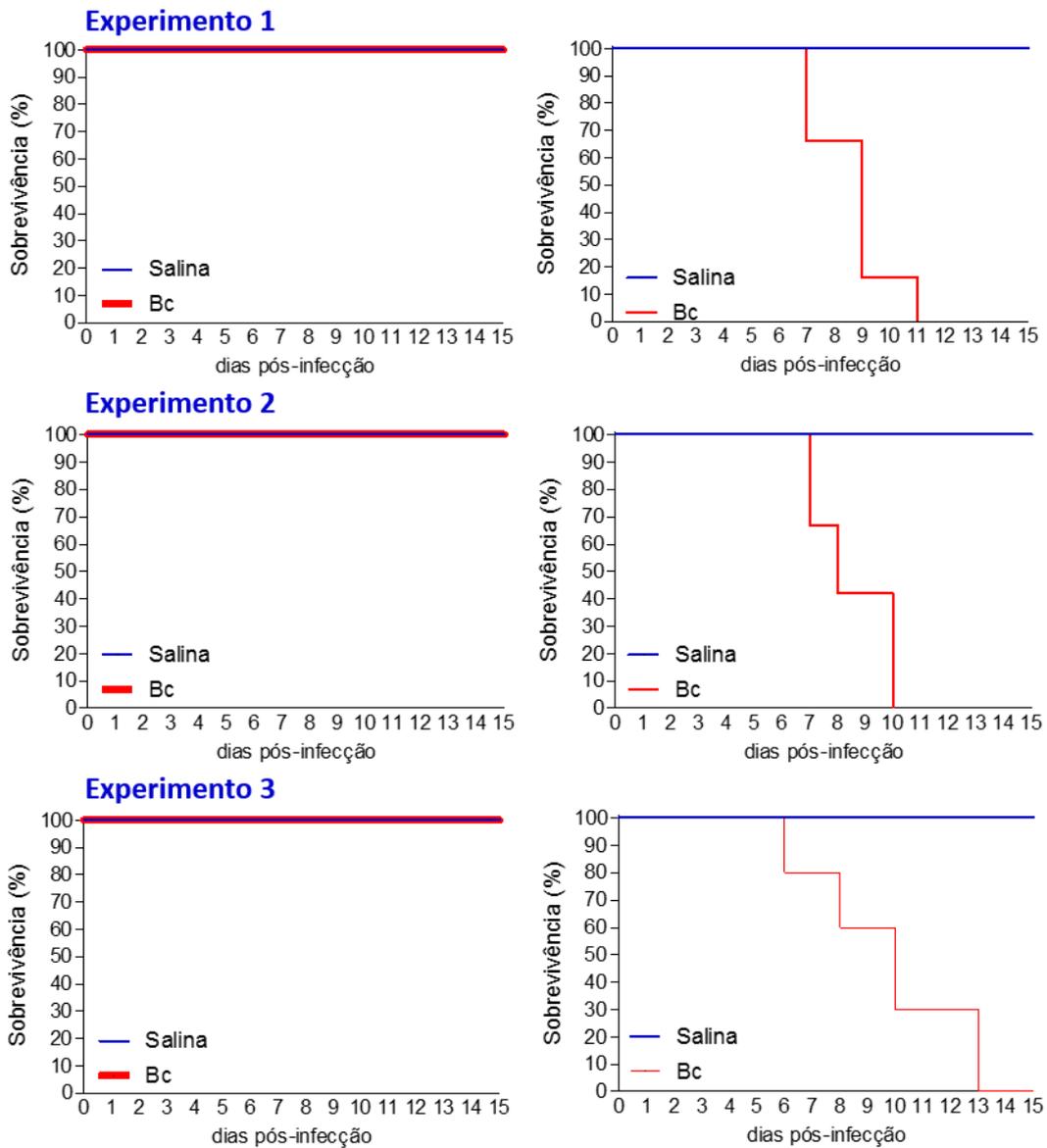
Procuramos, avaliar *in vivo* se a ausência de enzima iNOS/NOS2 é um fator importante à sobrevivência dos animais na presença da *B. cenocepacia*. Para analisarmos a sobrevivência dos animais à infecção, fizemos acompanhamento diário de mortalidade durante 15 dias. Em três experimentos independentes, ao término do acompanhamento, animais C57BL/6 apresentaram 100% de sobrevivência à infecção. Por outro lado, todos os animais *inos*^{-/-} sucumbiram à infecção por *B. cenocepacia*. As primeiras mortes foram registradas entre 6 e 7 dpi, com 100% sucumbindo entre 11 e 13 dpi. Os respectivos controles inoculados com salina estéril e mantidos no mesmo ambiente de experimentação apresentaram sobrevivência de 100% (**Figura 5.19**). A **tabela 5.13.1** demonstra a síntese dos dados de 3 experimentos independentes.



5.18. Camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} infectados com *Burkholderia cenocepacia*, alterações físicas e curva de peso corporal. Camundongos C57BL/6: (A) animal representativo do grupo mostrando ausência de sinais visíveis de alterações físicas em 6 dpi. (B) Curva de variação de peso corporal em camundongos inoculados com *B. cenocepacia* (linha vermelha) ou controles injetados com salina (linha azul). Camundongos deficientes em iNOS/NOS2: (C) animal representativo mostrando encurvatura torácica em 6 dpi. (D) Curva de variação de peso corporal em camundongos inoculados com *B. cenocepacia* (linha vermelha) ou controles injetados com salina (linha azul). ** P<0,01; ***P < 0,001. Dados representativos de um experimento. †, indica morte de todos os animais do grupo.

Tabela 5.13.1: Número de animais utilizados nos ensaios de acompanhamento de mortalidade após infecção por *B. cenocepacia*.

Experimentos					
Animais	#1	#2	#3	Total	Sobrevivência em 14 dpi
C57BL/6					
Salina	4	1	6	11	100 %
<i>B. cenocepacia</i>	6	11	9	26	100 %
<i>inos</i>^{-/-}					
Salina	4	3	6	13	100 %
<i>B. cenocepacia</i>	6	9	10	28	0 %



5.19. Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 e *inos*^{-/-} após infecção experimental por *Burkholderia cenocepacia*. Camundongos da linhagem B6.129 (C57BL/6) B6.129-P2-nos2 (*inos*^{-/-}) inoculados com *B. cenocepacia* ou controles injetados com salina. Dados de 3 experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos da infecção de *B. cenocepacia* sobre a resposta efetora de macrófagos alveolares de linhagem oriunda de camundongos C57BL/6. Nossos principais achados *in vitro* indicam que *B. cenocepacia* é capaz de desativar mecanismos efetores da resposta clássica de macrófagos, aparentemente redirecionando para o perfil alternativo de ativação. Nossos dados *in vivo*, ainda que preliminares, indicam que a deficiência em iNOS/NOS2 contribui para a persistência de *B. cenocepacia* e indução de alterações histológicas no pulmão.

De maneira geral, na ativação clássica, iniciada por componentes bacterianos como LPS e por IFN γ secretado por células T e células *natural killer* (NK), macrófagos respondem com produção de ROS, NO $_x$, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, de forma associada ao aumento de expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Vários estudos indicam a capacidade de *B. cenocepacia* em resistir ao estresse oxidativo, visto sobreviverem dentro de fagócitos (BYLUND et al., 2006; EL-HALFAWY; VALVANO, 2014; KEITH et al., 2007; LEFEBRE M; VALVANO M., 2001; POOCK et al., 2002). Superóxido (O $_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$), são moléculas que compõem o ROS gerado por neutrófilos e macrófagos. Neste sentido, foi encontrado em várias espécies do CBC, incluindo as diferentes cepas de *B. cenocepacia*, positividade para as enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de O $_2^-$ em O $_2$ e H $_2$ O $_2$, e para a enzima catalase, que decompõe o H $_2$ O $_2$ gerando H $_2$ O e O $_2$ (LEFEBRE M; VALVANO M., 2001). NO, por sua vez é uma molécula que compõe as espécies reativas de nitrogênio (RNS), atuando junto com ROS na resposta oxidativa a patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Uma vez gerado pela atividade da enzima iNOS/NOS2, a partir de NO são formadas outras moléculas de RNS, tais como dióxido de nitrogênio (NO $_2^-$) e peroxinitrito (ONOO $^-$) (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

Em nossas observações no modelo *in vitro* em cultivos oriundos da linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, bem como da linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6, verificamos a capacidade de *B. cenocepacia* cepa J2315 em promover a não detecção de NO $_x$ em sobrenadantes destes cultivos, mesmo quando estimulados com LPS/IFN γ . Considerando que ao colonizar o trato respiratório *B. cenocepacia* invade e sobrevive dentro de células epiteliais e macrófagos (AL-KHODOR et al., 2014), neste momento de nosso trabalho focamos os estudos na resultante da interação de *B. cenocepacia* com a linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos.

Em nosso modelo de interação por 24 h de *B. cenocepacia* com a linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6, entendemos que os efeitos da presença da bactéria sobre a não detecção de NO_x não é resultado de morte celular, pois verificamos que estas células apresentam perfil de viabilidade, em frequência similar às que foram expostas apenas ao estímulo com LPS/IFN γ . Evidentemente, ensaios mais precisos para aferir a viabilidade nos diferentes grupos experimentais são necessários para confirmar esta questão. Além disso, constatamos que a bactéria estar metabolicamente ativa é fundamental para que não ocorra detecção de NO_x nos sobrenadantes, visto que são encontradas elevadas concentrações de nitrito em cultivos da linhagem AMJ2-C11 estimulados e na presença de bactérias fixadas BcPFA-k. Por outro lado, a adição de *B. cenocepacia* metabolicamente viável leva à não detecção de NO_x. Confirmamos também, por meio de ensaio de cinética, que não ocorre detecção de NO_x quando os macrófagos alveolares são cultivados na presença da bactéria, nem em período anterior à 24 h, nem em momentos posteriores. De fato, nossos dados indicam que a não detecção de NO_x em sobrenadantes de cultivos de macrófagos, mesmo naqueles estimulados por LPS/IFN γ , possa ser resultado de (i) consumo pela própria bactéria do NO_x gerado pelos macrófagos, já que em nosso modelo de interação por 48 h na condição experimental C, em que não houve lavagem dos cultivos (apenas estímulos com LPS/IFN γ), observamos menor concentração de nitrito quando avaliamos as concentrações desta molécula após *B. cenocepacia* ser adicionada ao sistema, em comparação aos controles NT e LPS/IFN γ . De fato, em modelo de crescimento em muco, *B. cenocepacia* cepa J2315 possui aumentada expressão gênica de BCAM1676, gene que codifica para enzima nitrito/sulfato redutase (DREVINEK et al., 2008). Além disto, o genoma da *B. cenocepacia* apresenta outros genes possivelmente associados à detoxificação do NO (HOLDEN et al., 2009). Apesar dos mecanismos da detoxificação enzimática de RNS não estarem tão bem caracterizados quanto a resposta a ROS, existem evidências que a enzima nitrito redutase possa ter um importante papel na proteção aos efeitos letais de NO (POOCK et al., 2002). Por exemplo, genes codificando oxido nítrico redutase (NOR) podem ser identificados em sequências de genoma de bactérias patogênicas não-denitrificantes, incluindo espécies como *Mycobacterium avium* e *Neisseria meningitidis* (RICHARDSON, 2000). Ou ainda, a não detecção de NO_x pode ser resultado de (ii) transcrição ou tradução comprometida da enzima iNOS/NOS2, pois além da não detecção de nitrito, a análise da expressão proteica demonstrou que na presença de *B. cenocepacia* ocorre baixa expressão de iNOS/NOS2, mesmo quando os macrófagos foram estimulados com LPS/IFN γ , como será discutido adiante.

A enzima arginase compete com a via da enzima iNOS/NOS2, pois estas utilizam o mesmo substrato, a arginina, cuja metabolização por arginase leva à ureia e ornitina. Esta

última é utilizada pelas enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e ornitina transcarbamilase (OTC), formando poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) e prolina, respectivamente (RATH et al., 2014). Estudos sobre o papel de poliaminas na resposta imune demonstraram envolvimento na inibição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Em modelo de indução de sepse letal em camundongos, foi descrito que a administração intraperitoneal de espermina conferiu proteção aos animais, sendo esta associada à redução local (peritoneal) e sistêmica (soro), de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, MCP-1, MIP-2 e TNF (ZHU et al., 2009). Duas isoformas de arginase são descritas em mamíferos: arginase (arg)-I, de localização citosólica, altamente expressa no fígado como componente do ciclo da ureia, com sua expressão limitada a alguns outros tecidos; arginase (arg)-II, enzima mitocondrial, que é expressa nos rins, cérebro, intestino, glândulas mamárias e macrófagos, mas com pequena ou nenhuma expressão no fígado (WU; MORRIS, 1998). Em nossos resultados verificamos indiretamente a atividade da enzima arginase ao dosarmos as concentrações de ureia em sobrenadantes de macrófagos da linhagem AMJ2-C11. Constatamos que a presença de *B. cenocepacia* nos cultivos leva à maiores concentrações de ureia, em relação a concentrações basais encontradas em cultivos na ausência da bactéria, perfil que ocorre já nas primeiras horas após a infecção (como demonstrado no ensaio de cinética) e se mantém por até 72 h, ponto final do ensaio. A análise da expressão de arg-II, isoforma inicialmente escolhida por ser expressa em macrófagos (MAARSINGH; PERA; MEURS, 2008), revelou aumento de sua expressão quando os cultivos foram submetidos à infecção por *B. cenocepacia*, na presença ou ausência de estímulos inflamatórios (LPS/IFN γ). A indução da atividade de arginase por patógenos têm sido relatada por modular a produção de NO por macrófagos, no caso de ambas, arg-I e arg-II, que podem restringir a resposta imune efetora (DULEU et al., 2004; HERBERT et al., 2010; INIESTA et al., 2005; KASMI et al., 2008; LEWIS et al., 2010). Por exemplo, foi demonstrado que a indução de arg-II em macrófagos infectados por *H. pylori* inibe a tradução de iNOS/NOS2, a produção de NO e a morte da bactéria *in vitro*. Também, em camundongos infectados por *H. pylori* por 48 h, o tratamento com um inibidor de arginase resultou em aumento dos níveis proteicos de iNOS/NOS2 e levou à produção de NO em macrófagos gástricos (LEWIS et al., 2010). A presença de ureia nos sobrenadantes pode indicar indiretamente a presença de ornitina, que serve de substrato para a formação de poliaminas, entre essas a espermina, que tem sido demonstrado ter atuação mais potente que espermidina e putrescina, na inibição da produção de NO e citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (PAUL; KANG, 2013; RATH et al., 2014; SZABÓ et al., 1994; ZHANG et al., 1997). Em macrófagos da linhagem J774.2 de

camundongos BALB/c estimulados com LPS, foi demonstrado que espermina inibe a indução, mas não a atividade de iNOS/NOS2 (SZABÓ et al., 1994).

Macrófagos são capazes de responder de maneiras diferentes a estímulos diversos encontrados no microambiente em que estão inseridos, essa resposta diferencial confere a essas células funções heterogêneas (MILLS, 2012). Além de responderem de maneira diferencial, a resposta também pode ser revertida. Por exemplo, macrófagos estimulados com citocinas como IFN γ ou IL-4, podem ter seu padrão de resposta funcional ao LPS alterado, se o estímulo é retirado 24 – 48 horas antes do desafio com LPS; o padrão de resposta é essencialmente idêntico ao de macrófagos que não haviam sido estimulados com citocinas (STOUT; SUTTLES, 2004). Em nosso modelo de 48 h de ensaio, verificamos a ocorrência de redirecionamento do metabolismo da arginina, pois na condição experimental B, em que os cultivos foram estimulados pelas 24 h iniciais com LPS/IFN γ (T1), lavados e submetidos aos diferentes tratamentos por 24 h (T2), ocorre aumento das concentrações de ureia quando *B. cenocepacia* está presente. Nas primeiras 24 h, podemos supor que arginina estava sendo metabolizada por iNOS/NOS2, levando à produção de NO $_x$, e que nas 24 h finais do ensaio, onde há presença de *B. cenocepacia* o metabolismo é redirecionado para arginase, com produção de ureia, sendo este perfil encontrado mesmo na presença constante de LPS/IFN γ , como demonstrado na condição experimental C. Esses dados sugerem haver supressão da resposta canônica de macrófagos ativados por LPS e IFN γ , supressão esta possivelmente mediada por aumento da atividade de arginase, como anteriormente mostrado em PAUL & KANG (2013) e SZABÓ e colaboradores (1994)

Visto que a via da arginase está associada à um perfil regulador em macrófagos (MUNDER, 2009; RATH et al., 2014; WU; MORRIS, 1998), esta pode ser favorável à sobrevivência de *B. cenocepacia*. Em modelo de estresse oxidativo induzido por antibióticos em *B. cenocepacia*, foi observado produção de putrescina pela bactéria, tendo esta um efeito protetor contra o estresse oxidativo. De modo interessante, neste cenário ocorre aumento de expressão do gene bacteriano BCAL2641, que codifica uma isoforma da enzima ODC (que converte ornitina em putrescina, espermina e espermidina em mamíferos) (EL-HALFAWY; VALVANO, 2014). Foi também reportado em modelo de infecção de macrófagos por *H. pylori*, que espermina inibe a tradução do mRNA de iNOS/NOS2, e inibe a produção de NO. Em condição de silenciamento gênico da enzima ODC, a síntese de espermina é interrompida e observa-se aumento da produção de NO (BUSSIÈRE et al., 2005). Contudo, em modelo de infecção por *B. cenocepacia* esse aspecto ainda não foi avaliado, havendo, portanto necessidade de entender o papel da enzima ODC presente na bactéria, se esta contribui para os efeitos globais observados nos macrófagos. NARITA e colaboradores

(2013), demonstraram que IL-6 está relacionada com aumento da expressão de arg-I em células dendríticas, e KASMI e colaboradores (2008) demonstraram indução da expressão de arg-I mediada por ativação intracelular de TLR. Assim, é interessante avaliar se mecanismos semelhantes, gerados em resposta à presença de *B. cenocepacia*, podem estar aumentando a expressão da enzima arginase.

Como parte importante da resposta à ativação clássica de macrófagos (M1), ocorre também apresentação de antígenos a células T, via moléculas de MHC. De forma canônica, as moléculas de classe I do MHC apresentam antígenos citosólicos, que são reconhecidas por T CD8⁺, enquanto antígenos internalizados em vesículas a partir do meio extracelular são apresentados por MHC-II e reconhecidos por T CD4⁺ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Avaliamos a capacidade dos macrófagos da linhagem AMJ2-C11 em expressar fenótipo associado à apresentação de antígenos a células T após interação com *B. cenocepacia*. Esta bactéria além de ser encontrada em vesículas endocíticas são encontradas também livres no citosol de macrófagos (ABDULRAHMAN et al., 2011; AL-KHODOR et al., 2014; LAMOTHE et al., 2007), havendo possibilidade de apresentação de antígenos da bactéria por MHC-I e II. Enquanto observamos que há aumento da frequência de células expressando moléculas de MHC-II após interação com *B. cenocepacia*, notamos o comprometimento da expressão de MHC-I, visto que a frequência de células expressando esta molécula não é induzida, mesmo em situações em que além da bactéria induzimos estímulos por LPS/IFN γ . Supomos, portanto, que ocorra falha na apresentação de antígenos às células T CD8⁺. Assim, sugerimos que estas células, parcialmente comprometidas nas suas propriedades de reconhecimento, não irão exercer efeitos citotóxicos sobre os macrófagos infectados, possibilitando que estes funcionem como refúgios para *B. cenocepacia*.

Nossos resultados também mostram que a presença de *B. cenocepacia* em cultivos dos macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 resultou em redução da frequência de células CD80⁺, CD86⁺ e CD40⁺. De modo que, em teoria a resposta adaptativa à infecção por *B. cenocepacia* possa estar prejudicada, visto que para geração efetiva da resposta adaptativa por células T, além de apresentar antígenos, macrófagos fornecem sinais coestimuladores, por meio de CD80 e CD86, que levam à proliferação e diferenciação de linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Ainda, CD40, ao interagir com CD40L presente em células T, geram sinais que aumentam a expressão de moléculas coestimuladoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). A falha em gerar coestímulo efetivo pode ter profundos efeitos na habilidade de macrófagos dirigir a resposta imune a patógenos (MACDONALD; SPEERT, 2008). Nossos dados corroboram os dados de MACDONALD & SPEERT (2008), que em modelo de infecção de células dendríticas primárias derivadas de monócitos por

B. cenocepacia observaram falha na expressão de CD80 e CD86. Além disso, a redução da frequência de células CD40⁺ em nosso modelo indica que a presença de *B. cenocepacia* promove falha na geração de sinais coestimuladores. A alta frequência de células CD80⁺ e CD86⁺ na ausência de estímulos, encontradas em três experimentos independentes realizados com a linhagem AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongos nos levou a pensar que possivelmente esse fenótipo seja característico da linhagem celular. Em geral, a expressão destas moléculas coestimuladoras é ausente ou baixa em APCs que se encontram em repouso, ocorrendo aumento da expressão quando ativadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Em nossas análises mostramos a frequência de células que expressam as moléculas, e não a densidade de moléculas presentes em cada célula (ou seja, não utilizamos a média de intensidade de fluorescência). Isto porque, ao serem infectados por *B. cenocepacia*, o padrão de tamanho e granularidade dos macrófagos em análise se altera em relação aos macrófagos não infectados, ocorrendo aumento da autofluorescência celular. Este aumento de fluorescência não corresponde necessariamente à intensidade de fluorescência relacionada às moléculas analisadas, sendo um fator limitante à interpretação do resultado. Optamos, portanto, por analisar a frequência de células que expressavam as moléculas alvo do estudo, de modo a reduzir as limitações da análise.

Nosso modelo *in vitro* também evidenciou alteração na produção de TNF após a interação do macrófago da linhagem AMJ2-C11 com *B. cenocepacia*. Concentrações significantes de TNF são encontradas nos sobrenadantes de macrófagos alveolares expostos a LPS/IFN γ . Contudo, essas concentrações são baixas na presença da bactéria. Em modelo de estudo utilizando a cepa J2315, a mesma utilizada em nosso trabalho, para avaliar o padrão da resposta inflamatória em macrófagos derivados de monócitos humanos isolados de sangue periférico (MDMs), foi observado não haver aumento da produção de TNF em resposta à infecção por *B. cenocepacia* (KOPP et al., 2012). A não alteração na produção de TNF pode indicar que a infecção por *B. cenocepacia* ocorre sem que haja ativação de sensores transmembranares e citoplasmáticos (TLR e receptores do tipo NOD, respectivamente), visto que a produção desta citocina por macrófagos é estimulada por PAMPs e DAMPs (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Porém, é necessário um completo estudo para identificação do perfil de outras citocinas (como IL-1 β e IL-6) na resposta inflamatória de macrófagos, visto que a depender do fagócito em estudo a resposta mediada por citocinas após a infecção por *B. cenocepacia* poderá ser diferente (MACDONALD; SPEERT, 2008). Além disso, como a presença de ureia nos sobrenadantes de cultivos de macrófagos alveolares de camundongos infectados por *B. cenocepacia*, pode indicar a presença de ornitina, que como já comentado é precursora de poliaminas, é possível que putrecina, espermina e espermidina estejam

relacionadas à inibição da produção de TNF. De fato, em estudo sobre os efeitos da adição de putrescina, espermina e espermidina exógenos em cultivos de macrófagos peritoneais da linhagem RAW 264.7, foi demonstrado que o pré-tratamento com uma dessas poliaminas, seguidos de estímulo por LPS, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF (PAUL; KANG, 2013). Em cultivos de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de humanos estimulados com LPS e IFN γ , também foram observados inibição da síntese de TNF quando espermina foi adicionada aos cultivos, sendo que esse mecanismo de supressão mediado por espermina foi demonstrado ser pós-transcricional, uma vez que são observados contínuo aumento da produção de mRNA de TNF (ZHANG et al., 1997). Em nossos ensaios, procuramos também identificar a citocina IL-10, tendo em vista que nossos dados anteriores mostraram uma aparente reversão do perfil de ativação clássica de macrófagos para um perfil alternativo de ativação. No tempo analisado de 24 h, não foi possível identificar IL-10 nos sobrenadantes. Esta pode estar sendo produzida anterior ao tempo de análise e sendo consumida pelo próprio sistema, regulando sua ativação na presença da bactéria, efeito este que explicaria também a inibição da expressão de moléculas coestimuladoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Ou então, IL-10 pode estar sendo produzida em momentos tardios, ou ainda ser dependente da carga da infecção, visto que KOPP e colaboradores (2012) ao utilizarem MDMs e infecção em MOI 10:1 detectaram altas concentrações de IL-10, após 24 h. Estas possibilidades precisam ser melhor exploradas.

Nossos conjuntos de dados sugerem que a infecção por *B. cenocepacia* favorece a ocorrência de um perfil regulador, contribuindo para a persistência da bactéria em macrófagos. Contudo, ainda permanece a necessidade de, em estudo futuro, nos debruçarmos sobre a avaliação do crescimento bacteriano em nosso modelo *in vitro*.

Visto que nossa hipótese inicial era a de que *B. cenocepacia* seria capaz de controlar o NO $_x$ produzido, prosperando no sítio de infecção, procuramos entender esta questão em modelo *in vivo*. Cabe ressaltar que este estudo *in vivo* é inicial e seus resultados são preliminares, necessitando de ensaios e parâmetros adicionais a fim de esclarecermos os resultados obtidos.

Adotamos um modelo de pleurisia induzido por injeção intra-torácica (MENEZES-DE-LIMA-JÚNIOR et al., 1997) de *B. cenocepacia* (pareado com salina nos grupos controles). Inicialmente, realizamos a quantificação de CFU, a partir do lavado pleural, mostrando que em camundongos imunocompetentes há controle da infecção em 72 hpi, enquanto em camundongos *inos*^{-/-} observa-se persistência bacteriana, indicando que a presença de iNOS/NOS2 é essencial para o controle da infecção no modelo avaliado. Estudamos também, as concentrações de nitrito e ureia do lavado pleural de 48 hpi.

Observamos não haver níveis de NO detectáveis no lavado pleural, mesmo em camundongos C57BL/6. Além disto, encontramos aumento nos níveis de ureia em ambas as linhagens de camundongos, indicando indiretamente a atividade aumentada de arginase e legitimando nossos achados em modelo *in vitro*. O papel da enzima arginase tem sido descrito em doenças pulmonares (MAARSINGH; PERA; MEURS, 2008), sendo discutido que sua expressão em células epiteliais bronquiolares, células endoteliais, miofibroblastos e macrófagos alveolares esteja associada ao reparo tecidual (SATRIANO, 2004; WU; MORRIS, 1998). A ornitina, gerada a partir da atividade de arginase, ao ser metabolizada via enzima OAT, gera prolina. Esta é essencial para a síntese de colágeno, podendo ser importante para o processo de remodelamento tecidual. Essa hipótese é sustentada por estudos que mostraram aumento de expressão e de atividade da enzima arginase em doenças pulmonares fibróticas e asma alérgica (KITOWSKA et al., 2008; MAARSINGH et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2003). Assim, temos como perspectivas o estudo da expressão de colágeno no cenário da infecção por *B. cenocepacia* em camundongos C57BL/6 e inumodeficientes em iNOS/NOS2.

A análise histológica revelou-se correspondente à carga bacteriana presente no sítio de infecção. Como esperado, camundongos C57BL/6 injetados com salina não apresentam sinais de inflamação (infiltrado peribronquiloar e perivascular, edema perivascular) nos diferentes pontos analisados. Camundongos C57BL/6 infectados por *B. cenocepacia*, aparentam recuperação do processo inflamatório, pois em 72 hpi são observados leve e desigual infiltrado inflamatório, revelando preservação da maior parte do tecido. Quanto aos camundongos *inos^{-/-}*, a despeito das alterações já presentes observadas naqueles injetados apenas com salina (estando essas talvez associadas à deficiência em iNOS/NOS2), em animais infectados pela bactéria, são observadas alterações agudas em 72 hpi, com intenso infiltrado inflamatório, presença de edema perivascular, desorganização do epitélio bronquiloar e espessamento do espaço alveolar. Em modelo de infecção *in vivo* por *B. cenocepacia*, por exemplo, GOLDBERG e colaboradores (2011), utilizando camundongos C57BL/6 observaram infiltrados de neutrófilos nos espaços peribronquiloar e perivascular a partir de 24 hpi, sendo que em 72 hpi descreveram inflamação leve ou ausente. Quando realizaram a infecção de *B. cenocepacia* associada ao exopolissacarídeo alginato (produzido por *P. aeruginosa*), observaram infiltrado inflamatório já nas primeiras 6 hpi, com inflamação aguda e por todo o tecido em 72 hpi. Parâmetros semelhantes são observados em outros modelos que caracterizam a persistência de *B. cenocepacia* em pulmões de camundongos (ABDULRAHMAN et al., 2011). À semelhança com outros modelos de infecção pela *B. cenocepacia*, nosso modelo de pleurisia pode ser útil para avaliarmos alterações presentes

na infecção aguda pela bactéria. São necessárias, porém, outras análises como por exemplo a caracterização dos leucócitos presentes na cavidade pleural em diferentes tempos de infecção, além da avaliação histológica e de carga bacteriana em pontos mais tardios após a infecção.

Ao avaliarmos ainda a mortalidade de camundongos imunocompetentes e deficientes para a enzima iNOS/NOS2 à infecção por *B. cenocepacia*, constatamos que camundongos *inos^{-/-}* sucumbem à infecção aguda por esta bactéria, indicando que a presença da enzima iNOS/NOS2 tem papel crucial na sobrevivência à infecção. Apesar da deficiência em gerar RNS, a enzima NADPH oxidase está presente nesta linhagem de camundongos (B6.129P2-Nos2) e, portanto, a geração de ROS não se encontra comprometida (BREITBACH et al., 2006), o que precisa ser explorado. Nossos achados diferem do observado em modelo de infecção sistêmica por *Burkholderia pseudomallei*, no qual a presença de iNOS/NOS2 em camundongos da linhagem C57BL/6 os torna mais susceptíveis à infecção, tendo NO papel deletério na resistência inata, com aumento da mortalidade em animais competentes para a enzima em relação aos deficientes (*inos^{-/-}*) (BREITBACH; WONGPROMPITAK; STEINMETZ, 2011). Estas diferenças podem ser oriundas do modelo de infecção adotados em cada caso, número de bactérias inoculadas, ou ainda devido às espécies de *Burkholderia* utilizadas nos estudos.

Correlacionando nossos achados *in vivo* com a FC, encontramos na literatura alguns dados que indicam a possibilidade de que um dos mecanismos que leve à persistência de *B. cenocepacia* resida no dualismo entre as enzimas iNOS/NOS2 e arginase. Apesar da natureza inflamatória da FC, são descritos diminuição dos níveis de NO nas vias aéreas de portadores (ELPHICK et al., 2001; GRASEMANN et al., 1997), situação esta que pode levar à infecção e colonização por bactérias, bem como a alterações funcionais. Vários mecanismos podem contribuir para os baixos níveis de NO em portadores de FC, como redução da expressão de iNOS/NOS2 (DOWNEY; ELBORN, 2000), retenção de NOx nas secreções pulmonares (GRASEMANN et al., 1998) e aumento da atividade da enzima arginase nas vias aéreas (GRASEMANN et al., 2005, 2006). Esse cenário, aliado a todas as alterações associadas à presença de *B. cenocepacia* descritas em nosso modelo *in vitro*, bem como em tantos outros discutidos acima, podem atuar como facilitadores da infecção e persistência da bactéria nas infecções pulmonares.

Mostramos neste trabalho, pela primeira vez, que *B. cenocepacia* leva ao aumento da expressão da enzima arginase, evidência sugestiva da geração de ornitina (precursora de poliaminas), devido à presença de ureia. É vastamente demonstrado na literatura que poliaminas estão associadas à supressão da atividade pró-inflamatória de macrófagos. De fato, em nosso modelo demonstramos que a presença de *B. cenocepacia* está diretamente associada

ao aumento da expressão proteica de arg-II e das concentrações de ureia em sobrenadantes, sendo concomitantemente observada redução da expressão de iNOS/NOS2 e de NO, redução da frequência de células expressando MHC-I e moléculas coestimuladoras, além de redução da produção de TNF. Os achados desta pesquisa contribuem para o entendimento de mais um mecanismo de evasão da resposta imune efetora de macrófagos associados à infecção por *B. cenocepacia*, e apresenta dados *in vivo* que podem servir de base para um modelo de estudo dos mecanismos imunopatogênicos da infecção.

7. CONCLUSÃO

Como resultado deste estudo propomos que a presença de *B. cenocepacia* modula a atividade efetora/microbicida de macrófagos alveolares promovendo atenuação da resposta inflamatória, o que permitiria a sobrevivência das bactérias.

A presença de *B. cenocepacia* em cultivos de macrófagos alveolares de camundongos da linhagem AMJ2-C11 resulta em:

- (i) não detecção de NO e aumento das concentrações de ureia nos sobrenadantes;
- (ii) redirecionamento da via iNOS/NOS2 em macrófagos alveolares previamente estimulados com LPS/IFN γ , favorecendo a via arginase;
- (iii) inibição da expressão proteica de iNOS/NOS2, mesmo em cultivos estimulados com LPS/IFN γ , e aumento da expressão de arginase II;
- (iv) inibição da frequência de células expressando MHC-I, mesmo em cultivos estimulados com LPS/IFN γ ;
- (v) redução da frequência de células expressando moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) e CD40, mesmo em cultivos estimulados com LPS/IFN γ ;
- (vi) baixa produção de TNF, mesmo em cultivos estimulados com LPS/IFN γ .

A infecção de *B. cenocepacia* em camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2, utilizando modelo de pleurisia induzida, resulta em:

- (i) persistência de *B. cenocepacia* em camundongos *inos*^{-/-}, indicando que a presença da enzima iNOS/NOS2 é importante para o controle da infecção neste modelo;
- (ii) não detecção de NO, mesmo em camundongos imunocompetentes para a enzima iNOS/NOS2, e aumento das concentrações de ureia no sítio de infecção, tanto em camundongos imunocompetentes como naqueles deficientes para iNOS/NOS2, reproduzindo nossos dados em modelo *in vitro*;
- (iii) alterações histológicas agudas em camundongos *inos*^{-/-}, associadas com a persistência bacteriana nestes animais;
- (iv) morte dos camundongos deficientes em *inos*^{-/-}, indicando que a presença da enzima iNOS/NOS2 é importante para a sobrevivência neste modelo.

8. PERSPECTIVAS

Modelo *in vitro*:

Quantificar a carga bacteriana nos cultivos, visando entender se a supressão da atividade efetora/microbicida de macrófagos alveolares observados na presença de *B. cenocepacia*, contribui para a manutenção/crescimento das bactérias.

Avaliar a expressão da proteína arginase I, para verificar se esta juntamente com arginase-II, contribui para os efeitos de aumento de ureia observados na presença de *B. cenocepacia*.

Avaliar a transcrição de mRNA de iNOS/NOS2 e arginases I e II, buscando entender o nível de regulação de ambas as vias.

Quantificar a produção de ornitina e poliaminas (putrescina, espermina e espermidina), avaliando se estas últimas atuam sobre a enzima iNOS/NOS2 e qual a contribuição individual de cada uma.

Tentar elucidar o mecanismo pelo qual *B. cenocepacia* induz aumento de expressão de arg-II, se por ativação de STAT6, ou mecanismo independente.

Modelo *in vivo*:

Caracterização do infiltrado inflamatório no sítio de infecção, bem como no tecido pulmonar.

Analisar a ocorrência de deposição de colágeno em seções de pulmões de camundongos imunocompetentes e deficientes em iNOS/NOS2 infectados por *B. cenocepacia*.

Identificar a expressão de arginases no tecido pulmonar dos camundongos infectados.

Padronizar modelo de infecção por *B. cenocepacia* em doença pulmonar fibrótica, com indutor de muco e/ou fibrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABDULRAHMAN, B. A et al. Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. **Autophagy**, v. 3, n. November, p. 1359–1370, 2011.

AL-KHODOR, S. et al. *Burkholderia cenocepacia* J2315 escapes to the cytosol and actively subverts autophagy in human macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 378–395, 2014.

ASSANI, K. et al. IFN- γ stimulates autophagy-mediated clearance of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

BHATTACHARYYA, S. et al. MAPK signaling pathways regulate IL-8 mRNA stability and IL-8 protein expression in cystic fibrosis lung epithelial cell lines. **Am J Physiology Lung Cell Mol Physiol**, p. 81–87, 2011.

BLACKBURN, L. et al. “Cepacia syndrome” with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. **Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 3, n. 2, p. 133–4, 2004.

BRAGONZI, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Microevolution during Cystic Fibrosis Lung Infection Establishes Clones with Adapted Virulence. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 180, n. 2, p. 138–145, 2009.

BRAGONZI, A. Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 8, p. 584–593, 2010.

BREITBACH, K. et al. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase and NADPH Oxidase in Early Control of *Burkholderia pseudomallei* Infection in Mice □. v. 74, n. 11, p. 6300–6309, 2006.

BREITBACH, K.; WONGPROMPITAK, P.; STEINMETZ, I. Distinct roles for nitric oxide in resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice to control *Burkholderia pseudomallei* infection. **BMC immunology**, v. 12, n. 1, p. 20, 2011.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115–117, 1950.

BUSSIÈRE, F. I. et al. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2409–2412, 2005.

BYLUND, J. et al. *Burkholderia cenocepacia* induces neutrophil necrosis in chronic granulomatous disease. **Journal of Immunology**, n. 174, p. 3562–3569, 2005.

BYLUND, J. et al. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 5, p. 2526–2532, 2006.

CARDONA, S. T. et al. Diverse pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex strains in the *Caenorhabditis elegans* host model. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 97–104, 2005.

CHATTORAJ, S. S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* alginate promotes *Burkholderia cenocepacia* persistence in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 984–993, 2010.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719–729, 2003.

COHEN, T. S.; PRINCE, A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 509–519, 2012.

DAVIS, P. B. Cystic Fibrosis Since 1938. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 5, p. 475–482, 2006.

DOWNEY, D.; ELBORN, J. S. Nitric oxide, iNOS, and inflammation in cystic fibrosis. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 115–116, 2000.

DREVINEK, P. et al. Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum. **BMC infectious diseases**, v. 8, p. 121, 2008.

DULEU, S. et al. Mouse Strain Susceptibility to Trypanosome Infection: An Arginase-Dependent Effect. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6298–6303, 2004.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Putrescine reduces antibiotic-induced oxidative stress as a mechanism of modulation of antibiotic resistance in *Burkholderia cenocepacia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4162–4171, 2014.

ELPHICK, H. . et al. Exhaled nitric oxide is reduced in infants with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 56, p. 151–152, 2001.

FERNANDEZ, S. et al. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, p. 2613–2620, 2004.

GIBALDI, D. Fatores de virulência envolvidos na interação entre *Burkholderia cenocepacia* e célula hospedeira - papel do sistema secretor tipo 3 e do lipopolissacarídeo. Tese (Doutorado do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Microbiologia Professor Paulo Goés, área de concentração Microbiologia e Imunologia) - **Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ**. 2009, 142p.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014.

GOLDBERG, J. B. et al. Cable pili and the associated 22 kDa adhesin contribute to *Burkholderia cenocepacia* persistence in vivo. **PLoS one**, v. 6, n. 7, p. e22435, 2011.

GRASEMANN, H. et al. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. **Pediatric pulmonology**, v. 24, n. 3, p. 173–7, 1997.

GRASEMANN, H. et al. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. **Archives of disease in childhood**, v. 78, n. 1, p. 49–53, 1998.

GRASEMANN, H. et al. Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 12, p. 1523–1528, 2005.

GRASEMANN, H. et al. Decreased systemic bioavailability of L-arginine in patients with cystic fibrosis. **Respiratory research**, v. 7, p. 87, 2006.

- GREEN, L. C.; et al. Analysis of nitrate and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126: 131-138, 1982.
- HASHIMOTO, D. et al. Adult Life With Minimal Contribution From Circulating Monocytes. v. 38, n. 4, 2013.
- HERBERT, D. R. et al. Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 11, p. 6438–6446, 2010.
- HOLDEN, M. T. G. et al. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 1, p. 261–277, 2009.
- HOLT, P. G. et al. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 2, p. 142–152, 2008.
- HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 81–93, 2014.
- INIESTA, V. et al. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 6085–6090, 2005.
- ISLES, A. et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. **J Pediatr**, v. 104, n. 2, p.206-10, 1984.
- JOHNSTON, R. B. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. **Current opinion in hematology**, v. 8, n. 1, p. 17–22, 2001.
- KASMI, K. C. et al. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. **Nature immunology**, v. 9, n. 12, p. 1399–1406, 2008.
- KEITH, K. E. et al. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9057–9065, 2007.
- KITOWSKA, K. et al. Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary brosis. **Gene**, p. 34–45, 2008.
- KOPP, B. T. et al. Exaggerated inflammatory responses mediated by *Burkholderia*

ceenocepacia in human macrophages derived from Cystic fibrosis patients. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 424, n. 2, p. 221–7, 2012.

KÖTHER, M. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 343–351, 2003.

LAMOTHE, J. et al. Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 40–53, 2007.

LAMOTHE, J.; VALVANO, M. A. *Burkholderia cepacia*-induced delay of acidification and phagolysosomal fusion in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-defective macrophages. **Microbiology**, v. 154, n. 12, p. 3825–3834, 2008.

LEFEBRE M; VALVANO M. In vitro resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive. **Microbiology**, n. 2001, p. 97–109, 2001.

LEWIS, N. D. et al. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 5, p. 2572–82, 2010.

LEWIS, N. D. et al. Immune evasion by *Helicobacter pylori* is mediated by induction of macrophage arginase II. **J Immunol**, v. 186, n. 6, p. 3632–3641, 2011.

LOUTET, S. A.; VALVANO, M. A. A decade of *Burkholderia cepacia* virulence determinant research. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4088–4100, 2010.

MAARSINGH, H. et al. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. **The European respiratory journal**, v. 38, n. 2, p. 318–28, 2011.

MAARSINGH, H.; PERA, T.; MEURS, H. Arginase and pulmonary diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 378, n. 2, p. 171–84, 2008.

MACDONALD, K. L.; SPEERT, D. P. Differential modulation of innate immune cell functions by the *Burkholderia cepacia* complex: *Burkholderia cepacia* but not *Burkholderia multivorans* disrupts maturation and induces necrosis in human dendritic cells. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2138–2149, 2008.

MACLEAN, J. A et al. Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A

mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 2, p. 657–666, 1996.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. Burkholderia cepacia complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1539–1551, 2008.

MAHENTHIRALINGAM, E.; SIMPSON, D. A.; SPEERT, D. P. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic Burkholderia cepacia strains recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 4, p. 808–16, 1997.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 144–156, 2005.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; VANDAMME, P. Burkholderia cepacia complex infection in patients with cystic fibrosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 533–538, 2002.

MENEZES-DE-LIMA-JÚNIOR, O. et al. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy. **J of Leukocyte Biology**, v. 62, p. 778–785, 1997.

MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages : Oracles of Health and Disease. v. 32, n. 06, p. 463–488, 2012.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 638–51, 2009.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

NARITA, Y. et al. The Key Role of IL-6 – Arginase Cascade for Inducing Dendritic Cell – Dependent CD4 + T Cell Dysfunction in Tumor-Bearing Mice. 2013.

O'GRADY, E. Burkholderia cenocepacia differential gene expression during host–pathogen interactions and adaptation to the host environment. **Frontiers in Cellular and Infection**

Microbiology, v. 1, n. December, p. 1–23, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. .; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PALLERONI, A.V. et al. Tumoricidal alveolar macrophage and tumor infiltrating macrophage cell lines. **Int J Cancer**, v. 49, p. 296-302, 1991.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the Burkholderia Cepacia Complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 39, p. 225–58, 2001.

PAUL, S.; KANG, S. C. Natural polyamine inhibits mouse skin inflammation and macrophage activation. **Inflammation research**, v. 62, n. 7, p. 681–8, 2013.

PESCE, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000371, 2009.

POOCK, S. R. et al. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of Escherichia coli. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23664–9, 2002.

RATH, M. et al. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. October, p. 1–10, 2014.

RICHARDSON, D. J. Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. **Microbiology**, v. 146, n. 2000, p. 551–571, 2000.

ROSALES-REYES, R. et al. Burkholderia cenocepacia type VI secretion system mediates escape of type II secreted proteins into the cytoplasm of infected macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–14, 2012.

SAINI, A. S. et al. Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells. **Nature immunology**, v. 15, n. 3, p. 275–82, 2014.

SAJJAN, U. S. et al. Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 4, p.

1030–8, 1995.

SAJJAN, U. S.; FORSTNER, J. F. Role of a 22-kilodalton pilin protein in binding of *Pseudomonas cepacia* to buccal epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 61, n. 8, p. 3157–63, 1993.

SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. **Amino Acids**, v. 26, p. 321–329, 2004.

SPEERT, D.P. et al. Infection With *Pseudomonas Cepacia* In Chronic Granulomatous Disease: Role Of Nonoxidative Killing By Neutrophils In Host Defense. **J Infect Dis**, v. 170, n. 6, p. 1524-1531, 1994

SEED, K. D.; DENNIS, J. J. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1267–1275, 2008.

SEGAL, B. H. et al. Xanthine Oxidase Contributes to Host Defense against *Burkholderia cepacia* in the p47 phox^{-/-} Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease. **Society**, v. 68, n. 4, p. 2374–2378, 2000.

SPEERT, D. P. et al. A murine model for infection with *Burkholderia cepacia* with sustained persistence in the spleen. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 4027–4032, 1999.

SPEERT, D. P. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. **Paediatric respiratory reviews**, p. 230–235, 2002.

STEFATER, J. A. et al. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 12, p. 743–52, 2011.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 3, p. 509–513, 2004.

SUÁREZ-MORENO, Z. R. et al. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 249–266, 2012.

SZABÓ, C. et al. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. **British journal of pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 757–766, 1994.

TOMICH, M. et al. Attenuated Virulence of a Burkholderia cepacia Type III Secretion Mutant in a Murine Model of Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1405–1415, 2003.

TOMICH, M.; MOHR, C. D. Genetic characterization of a multicomponent signal transduction system controlling the expression of cable pili in Burkholderia cenocepacia. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 12, p. 3826–36, 2004.

URBAN, T. A. et al. Cable pili and the 22-kilodalton adhesin are required for Burkholderia cenocepacia binding to and transmigration across the squamous epithelium. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 5426–5437, 2005.

VALVANO, M. A. Intracellular survival of Burkholderia cepacia complex in phagocytic cells. **Can. J. Microbiol.**, v. 61, p. 607–614, 2015.

VANDAMME, P. et al. Burkholderia cenocepacia sp. nov. - A new twist to an old story. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 91–96, 2003.

VANLAERE, E. et al. Burkholderia latens sp. nov., Burkholderia diffusa sp. nov., Burkholderia arboris sp. nov., Burkholderia seminalis sp. nov. and Burkholderia metallica sp. nov., novel species within the Burkholderia cepacia complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1580–1590, 2008.

VANLAERE, E. et al. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 102–111, 2009.

VERGUNST, A. C. et al. Burkholderia cenocepacia creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1495–508, 2010.

VIAL, L. et al. The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: A tribute to adaptation. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. July 2015, p. 1–12, 2011.

VIJ, N.; MAZUR, S.; ZEITLIN, P. L. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. **PloS one**, v. 4, n. 2, p. e4664, 2009.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical**

Journal, v. 336, p. 1–17, 1998.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group-II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol Immunol** 36: 1251–1275, 1992

ZELAZNY, A. M. et al. Virulence and cellular interactions of *Burkholderia multivorans* in chronic granulomatous disease. **Infection and immunity**, v. 77, n. 10, p. 4337–44, 2009.

ZHANG, M. et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 10, p. 1759–1768, 1997.

ZHU, S. et al. Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 7-8, p. 275–282, 2009.

ZIMMERMANN, N. et al. with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. v. 111, n. 12, p. 1863–1874, 2003.