

**FATORES DE VIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA  
INTERAÇÃO ENTRE *Burkholderia cenocepacia* E  
CÉLULA HOSPEDEIRA – PAPEL DO SISTEMA  
SECRETOR TIPO III E DO LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Daniel Gibaldi**

**IMPPG - Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Dezembro 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FATORES DE VIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA  
INTERAÇÃO ENTRE *Burkholderia cenocepacia* E  
CÉLULA HOSPEDEIRA – PAPEL DO SISTEMA  
SECRETOR TIPO III E DO LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Aluno: Daniel Gibaldi**

**Orientador: José Osvaldo Previato**

**Tese de doutoramento apresentada à pós-graduação do  
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes  
objetivando o grau de Doutor em Ciências nas áreas de  
Microbiologia e Imunologia.**

**IMPPG - Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Dezembro 2009**

**Dedico, com carinho,  
à minha família**

**O homem ama a liberdade como a mariposa ama a luz. E assim como a mariposa, em sua inconsciência, voa para a vela, onde morre queimada por amor à luz, assim também o homem, quando inconsciente, marcha para a escravidão por amor à liberdade.**

**Vasconcelos Noronha**

## **Agradecimentos**

À Força Maior.

À minha família.

Ao meu orientador Dr. José Osvaldo Previato e à Dra. Lucia Mendonça Previato, pelo exemplo de dedicação à ciência.

À Dra. Bianca Cruz Neves pela orientação.

Aos colegas do Laboratório de Glicobiologia, pela agradável convivência.

À Dra. Joseli Lannes Vieira, pelo apoio e aconselhamento científico.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações do IOC/FIOCRUZ, pelo ótimo convívio.

Ao Dr. Célio Geraldo Freire de Lima, pelo suporte.

Ao Dr. Christian Mohr do Departamento de Microbiologia da Universidade de Minnesota, pela doação das cepas de *Burkholderia cenocepacia* utilizadas neste trabalho.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes-UFRJ

Ao IOC e às agências de fomento CNPQ, FAPERJ, INCT-Vacinas/MCT/CNPQ.

## Índice

<b>Resumo:</b> .....	x
<b>Abstract:</b> .....	xi
<b>Lista de abreviaturas:</b> .....	xii
<b>Lista de tabelas:</b> .....	xiii
<b>Lista de figuras:</b> .....	xiii
<b>Lista de artigos no período:</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i></b> .....	2
<b>1.2 Fibrose cística</b> .....	4
<b>1.3. <i>Burkholderia cenocepacia</i></b> .....	7
<b>1.4. Sistemas de secreção tipo III</b> .....	9
<b>1.5. Lipopolissacarídeo</b> .....	12
<b>1.6 Domínio polissacarídeo O-específico</b> .....	15
<b>1.7. Core oligossacarídico</b> .....	16
<b>1.8. Lipídio A</b> .....	17
<b>1.9. Resposta imune inata e mecanismos de evasão do sistema imunológico por bactérias do Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i></b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25

4.1. Manutenção das culturas de bactérias.....	25
4.2. Extração do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	25
4.3. Gel de poliacrilamida do LPS.....	26
4.4. Identificação dos monossacarídeos e ácidos graxos do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	27
4.5. Separação da porção sacarídica do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	28
4.6. Manutenção e infecção das culturas de células de mamíferos.....	28
4.7. Dosagem de citocinas.....	29
4.8. Dosagem de óxido nítrico.....	29
4.9. Avaliação da expressão de moléculas de ativação celular em macrófagos infectados por <i>B. cenocepacia</i> ou tratados com seu LPS.....	30
4.10. Análises estatísticas.....	30
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1. Curva de crescimento de <i>B. cenocepacia</i> .....	31
5.2. Comparação entre a produção de NO por culturas de macrófagos murinos <i>ex vivo</i> ou de linhagem.....	32
5.3. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	34
5.4. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	36

5.5. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	38
5.6. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> inativadas pelo calor.....	39
5.7. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> inativadas pelo calor.....	41
5.8. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> inativadas pelo calor.....	42
5.9. Avaliação da expressão de moléculas de ativação celular em macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	43
5.10. Gel de poliacrilamida de LPS.....	46
5.11. Identificação dos ácidos graxos.....	47
5.12. Identificação dos compostos monossacarídicos.....	51
5.13. Avaliação da atividade citotóxica através da clivagem de MTT por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de <i>B. cenocepacia</i> .....	59
5.14. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de <i>B. cenocepacia</i> .....	61
5.15. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de <i>B. cenocepacia</i> .....	64

5.16. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de <i>B. cenocepacia</i> .....	66
5.17. Avaliação da expressão de moléculas de ativação celular em macrófagos tratados com LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	82
8. PERSPECTIVAS.....	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
10. ANEXO 1.....	105
11. ANEXO 2.....	114

## RESUMO

*Burkholderia cenocepacia* é uma bactéria aeróbica Gram-negativa, com importância médica em infecções de pacientes com resposta imune comprometida, como doença granulomatosa crônica e fibrose cística, apresentando multiresistência à antibioticoterapia. Infecção por esse microrganismo frequentemente leva à síndrome cepacia, quadro clínico caracterizado por bacteremia e septicemia, podendo levar ao óbito. Muitos mecanismos de virulência estão presentes em *B. cenocepacia*, sendo o sistema secretor do tipo III (SSTT) e o Lipopolissacarídeo (LPS) fatores chave na interação com células do hospedeiro. Com o objetivo de avaliar o papel destas estruturas no processo de infecção, estudamos a resposta funcional e a expressão de moléculas de ativação, em macrófagos infectados pela cepa J2315 de *B. cenocepacia* selvagem ou mutante para o SSTT. Nossos resultados mostram que a bactéria é capaz de regular a produção de NO em culturas infectadas, independente da presença de um SSTT funcional. Demonstramos ainda que nem o sistema secretor mutagenizado ou qualquer proteína entregue exclusivamente através dessa estrutura possuem papel central na indução da resposta funcional de macrófagos. Contudo, nossos resultados de avaliação da expressão de moléculas coestimulatórias sugerem que o SSTT pode estar relacionado à ativação destas células. A cepa J2315 de *B. cenocepacia* apresenta LPS sem antígeno O e nossos resultados de caracterização química dessa estrutura apresentam ramnose, glucose, heptose e KDO, além de ácidos mirístico, 3-hidroximirístico e 3-hidroxipalmítico, característicos do gênero *Burkholderia*. Este LPS leva a uma resposta funcional dependente de dose por macrófagos, caracterizada pela liberação de NO, TNF- $\alpha$  e IL-10, além da expressão de moléculas de ativação na superfície dessas células em menores proporções se comparado ao LPS de *Escherichia coli*. Em conjunto, nossos resultados demonstram que os mecanismos de virulência estudados não apresentam papel central na inflamação causada pela infecção por *B. cenocepacia* em células normais. Entretanto, esta bactéria mostra-se adaptada à infecção de pacientes com fibrose cística, sugerindo então a importância da baixa atividade inflamatória na infecção destes indivíduos.

## ABSTRACT

*Burkholderia cenocepacia* is a Gram-negative aerobic bacterium, with medical importance on chronic granulomatous disease and cystic fibrosis, showing multidrug resistance to antibiotic therapy. Infection by this microorganism often leads to cepacia syndrome, clinical presentation characterized by bacteremia and septicemia, which can conduct to death. Many virulence mechanisms are present in *B. cenocepacia*, type III secretory system (TTSS) and Lipopolysaccharide (LPS) are key factors in the interaction with host cells. In order to evaluate the role of these structures in the infection process, we studied the functional response and the expression of activation molecules on macrophages infected with strain J2315 of *B. cenocepacia* wild type or SSTT mutant. Our results show that the bacteria are able to regulate NO production in infected cultures, despite the presence of a functional SSTT. Moreover, we demonstrate that neither the mutagenized-secretory system nor any protein delivered exclusively through this structure have a central role in the induction of the functional response for macrophages. However, our results of evaluating the expression of costimulatory molecules suggest that SSTT may be related to activation of these cells. *B. cenocepacia* J2315 express a LPS without O antigen and characterization of this structure revealed presence of rhamnose, glucose, heptose and KDO as glycosidic components, myristic acid, 3-hydroxy-myristic acid and 3-hydroxy-palmitic acid, which are characteristic of the genus *Burkholderia*. LPS induces a functional dose-dependent response by macrophages, characterized by the release of NO, TNF- $\alpha$ , IL-10 and expression of activation molecules on the surface of these cells in small rates than the ones produced by *Escherichia coli* LPS. Taken together, our results demonstrate that the mechanisms of virulence studied here do not present central role in the inflammation caused by infection with *B. cenocepacia* in normal cells. However, this bacterium was shown to be adapted to infection of patients with cystic fibrosis, suggesting the importance of low inflammatory activity in the infection of these individuals.

## **Lista de abreviaturas**

BC: *Burkholderia cepacia*

BSTFA: bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CBC: Complexo *Burkholderia cepacia*

CD: Grupo de diferenciação

DMEM: Meio de cultura Dulbecco Eagle Modificado

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO: Densidade óptica

EC: Bactéria *Escherichia coli*.

GC-MS: cromatografia gás líquida acoplada à espectrometria de massas

HCl: Ácido clorídrico

IFN: Interferon

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

LB: Meio Luria Bertani

LPS: Lipopolissacarídeo

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

NO: Óxido nítrico

PBS: Tampão fosfato salina

RPMI: Meio de cultura RPMI-1640

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

SSTT: Sistema de secreção tipo três

SSTTmut: Mutante para o sistema de secreção tipo três

TBS: Tampão fosfato salina tween

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

UFC: Unidade formadora de colônia

## Lista de tabelas

Tabela 1: Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i> .....	4
--	---

## Lista de figuras

Figura 1: Sistema de secreção tipo III.....	11
Figura 2: Esquema estrutural do LPS da cepa 0111:B4 de <i>Escherichia coli</i> .....	14
Figura 3: Curva de crescimento de <i>B. cenocepacia</i> .....	32
Figura 4: Comparação entre a produção de NO por culturas de macrófagos <i>ex vivo</i> ou de linhagem.....	33
Figura 5: Produção de NO por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante.....	35
Figura 6: Produção de NO por culturas de macrófagos previamente ativados.....	36
Figura 7: Produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante.....	37
Figura 8: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante.....	39
Figura 9: Produção de NO por culturas de macrófagos tratados com bactérias inativadas pelo calor.....	40
Figura 10: Produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com bactérias inativadas por calor.....	41
Figura 11: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com bactérias inativadas por calor.....	42

Figura 12: Expressão de (a) MHC-II, (b) CD40 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	44
Figura 13: Expressão de (a) CD80, (b) CD86 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	45
Figura 14: Composição sacarídica. Revelação para carboidrato...46	
Figura 15: Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos obtidos após metanólise do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	48
Figura 16: Espectros de massas referentes aos picos 1 e 2 do cromatograma de ácidos graxos do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	49
Figura 17: Espectro de massas referente ao pico 3 do cromatograma de ácidos graxos do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	50
Figura 18: Perfil cromatográfico dos metil-glicosídeos trimetilsililados obtidos após metanólise e trimetilsililação do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	52
Figura 19: Esquema de fragmentação de metil-6-deoxi-hexopiranosídeos trimetilsililados.....	53
Figura 20: Esquema de fragmentação de metil-hexopiranosídeos trimetilsililados.....	54
Figura 21: Esquema de fragmentação de metil-heptogalactofuranosídeos trimetilsililados.....	55
Figura 22: Espectros de massas referentes aos picos 1, 1' e 2 do cromatograma do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	56
Figura 23: Espectro de massas referentes aos picos 2', 2'', 3 e 3' do cromatograma do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	57

Figura 24: Espectro de massas referentes aos picos 4 e 4' do cromatograma do LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	58
Figura 25: Ensaio de MTT em culturas de macrófagos cultivados com LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	60
Figura 26: Produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	62
Figura 27: Produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com diferentes doses de LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	63
Figura 28: Produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com LPS de <i>B. cenocepacia</i> .....	65
Figura 29: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com LPS oriundo da cepa selvagem de <i>B. cenocepacia</i> .....	67
Figura 30: Expressão de (a) MHC-II, (b) CD40 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	69
Figura 31: Expressão de (a) CD80, (b) CD86 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de <i>B. cenocepacia</i> .....	70

## **Lista de artigos no período**

**Gibaldi, D.;** Todeschini, A.R; Mendonça-Previato, L. & Previato, J.O. 2009. Molecular structure of lipopolysaccharide purified from *Burkholderia cenocepacia*: wild type for type III secretion system strain. **Manuscrito a ser submetido, 2010.**

Paiva, C.N.; Figueiredo, R.T.; Kroll-Palhares, K.; Silva, A.A.; Silvério, J.C.; **Gibaldi, D.;** Pyrrho, A.S.; Benjamim, C.F.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M.T. 2009. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Leukoc. Biol. 86:** 1239-1246.

Paiva, C.N.; Arras, R.H.; Lessa, L.P.; **Gibaldi, D.;** Alves, L.; Metz, C.N.; Gazzinelli, R.; Pyrrho, A.S.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M.T. 2007. Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. **Eur. J. Immunol. 37:** 1355-1364.

Valente, L.M.; Scheinvar, L.A.; Silva, G.C.; Antunes, A.P.; Santos, F.A. L.; Tappin, M.R.R.; Siani, A.C.; Bozza, M.T.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Carvalhaes, S.F.; Soares, R.O.A.; Fernandez-Ferreira, E.; Stutz, C.M. & **Gibaldi, D.** 2007. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. **Pharmacog. Mag 3:** 167-172.

Carvalho, A.S.; **Gibaldi, D.;** Pinto, A.C.; Bozza, M. & Boechat, N. 2006. Trypanocidal evaluation of new 5-[N-(3-(5-substituted)-1,3,4-thiadiazolyl)]amino-1-methyl-4-nitroimidazoles. **Lett. Drug. Des. Discov. 3:** 98-101.

## 1. INTRODUÇÃO

*Burkholderia cepacia* é uma bactéria aeróbica Gram-negativa, com morfologia de bastão, descrita por Walter Burkholder (1950). Esse microrganismo foi isolado de cebola em estado de putrefação e inicialmente foi classificado como uma espécie de *Pseudomonas*, *P. cepacia* (Burkholder, 1950). Por muito tempo, diversos trabalhos foram realizados propondo novas espécies relacionadas à *P. cepacia*, como *P. kingii* e *P. multivorans* (Morris & Roberts, 1959; Stanier e col. 1966; Jonsson, 1970), mas estudos posteriores mostraram claramente que todas se tratavam de *P. cepacia* (Snell e col. 1972; Sinsabaugh & Howard, 1975). Embora a nomenclatura "*Pseudomonas cepacia*" não tenha sido incluída na "Lista de Nomes de Bactérias" publicada em 1980 (Skerman e col. 1980), essa denominação continuou a ser utilizada na literatura (Palleroni & Holmes, 1981). Posteriormente, o gênero *Burkholderia* foi proposto para acomodar o grupo relacionado de espécies de *Pseudomonas* do tipo II (Yabuuchi e col. 1992), compreendendo 30 espécies identificadas até 2003 (revisto em Coenye & Vandamme, 2003). Atualmente mais de 50 espécies são descritas. Muitos trabalhos foram publicados antes do reconhecimento das complicadas relações taxonômicas entre os diferentes membros do gênero e, por muitas vezes, cepas classificadas como *B. cepacia* pertenciam na verdade a outras espécies do gênero *Burkholderia*, ou ainda a outros gêneros que possuem similaridades fenotípicas ou genotípicas, como *Ralstonia* sp. (revisto em Coenye e col. 2001).

Atualmente, bactérias identificadas como *B. cepacia* pertencem a um grupo de espécies relacionadas, chamado Complexo *Burkholderia*

*cepacia* (CBC), composto por diferentes linhagens separadas em genomovares (revisto em Coenye e Vandamme, 2003).

### **1.1. Complexo *Burkholderia Cepacia***

O complexo *B. cepacia* (tabela 1) é constituído por bactérias fenotipicamente similares, mas geneticamente distintas, tendo sido inicialmente divididas em nove espécies genômicas ou genomovares (Lipuma e col. 1999; revisto em Coenye e col. 2001; Chiarini e col. 2006): (i) *B. cepacia*, genomovar 1 (Vandamme e col. 1997), (ii) *B. multivorans*, genomovar 2 (Vandamme e col. 1997), (iii) *B. cenocepacia*, genomovar 3 (Vandamme e col. 1997, 2003), (iv) *B. stabilis*, genomovar 4 (Vandamme e col. 1997, 2000), (v) *B. vietnamiensis*, genomovar 5 (Gillis e col. 1995), (vi) *B. dolosa*, genomovar 6 (Vermis e col. 2004), (vii) *B. ambifaria*, genomovar 7 (Coenye e col. 2001), (viii) *B. anthina*, genomovar 8 (Vandamme e col. 2002) e (ix) *B. pyrrocinia*, genomovar 9 (Vandamme e col. 2002). Recentemente, com a utilização de metodologias modernas houve a adição de cinco novas espécies: *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis* e *B. metálica* (Vanlaere e col. 2008).

Microrganismos pertencentes ao CBC vêm sendo isolados dos mais variados habitats, como solo, rizosfera e ambientes aquáticos (Fiore e col. 2001; Miller e col. 2002; Vermis e col. 2003) e são considerados, em sua maioria, bactérias de solo ou patógenos de plantas. O maior conhecimento da diversidade desse gênero possibilita observar que os nichos ocupados pelas diferentes espécies e cepas apresentam interações complexas entre esses microrganismos e seus hospedeiros.

Muitas espécies parecem ser restritas a um ou poucos hospedeiros enquanto outras apresentam interações que variam do parasitismo à simbiose, ou ambos (revisto em Coenye & Vandamme, 2003). De fato, muitas espécies pertencentes ao CBC apresentam características benéficas, como o biocontrole de culturas vegetais, protegendo-as contra fitopatógenos e promovendo seu desenvolvimento (Bevivino e col. 2005; Poonguzhali e col. 2007). Além disso, esses microrganismos podem ainda promover biorremediação, devido à capacidade de utilizar como nutrientes uma variedade de compostos orgânicos, degradando contaminantes ambientais, como algas tóxicas (Lemes e col. 2007), agentes químicos aromáticos (Shields & Reagin, 1992), óleo e derivados de petróleo (Okoh e col. 2001; Chaillan e col. 2004; Castorena e col. 2006) e organoclorados (Zhang e col. 2000).

Por outro lado, estudos sobre a infecção oportunista de espécies de *Burkholderia* em pacientes humanos vêm sendo realizados desde a década de 1970. Foi observado que determinadas espécies de *Burkholderia* eram capazes de infectar pacientes, principalmente portadores de fibrose cística (Gilardi, 1971; Isles e col. 1984; Gilligan e col. 1985), ou ocasionalmente pacientes com algum tipo de imunossupressão (Bottone e col. 1975). De fato, embora muitos autores venham demonstrando a infecção de pacientes portadores das mais variadas imunodeficiências, como doenças granulomatosas crônicas (Renella e col. 2006; Hisano e col. 2007) e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (Chierakul e col. 2005; Pumpradit e col. 2006), o maior envolvimento das bactérias do CBC nas infecções humanas encontra-se nas colonizações das vias aéreas de portadores de fibrose cística (revisto em Coenye e Vandamme, 2003).

Tabela 1: Complexo *Burkholderia Cepacia*

ESPÉCIE	DESCRIÇÃO	GENOMOVAR	INSERÇÃO CBC	REFERÊNCIA
<i>B. cepacia</i>	1992	I	1997	Vandamme e col. 1997
<i>B. multivorans</i>	1997	II	1997	Vandamme e col. 1997
<i>B. cenocepacia</i>	1997	III	1997	Vandamme e col. 1997
<i>B. stabilis</i>	2000	IV	2000	Vandamme e col. 1997, 2000
<i>B. vietnamensis</i>	1995	V	1995	Gillis e col. 1995
<i>B. dolosa</i>	2001	VI	2004	Vermis e col. 2004
<i>B. ambifaria</i>	2001	VII	2001	Coenye e col. 2001
<i>B. anthina</i>	2002	VIII	2002	Vandamme e col. 2002
<i>B. pyrrocinia</i>	1997	IX	2002	Vandamme e col. 1997
<i>B. latens</i>	2008		2008	Vanlaere e col. 2008
<i>B. difusa</i>	2008		2008	Vanlaere e col. 2008
<i>B. arboris</i>	2008		2008	Vanlaere e col. 2008
<i>B. seminalis</i>	2008		2008	Vanlaere e col. 2008
<i>B. metalica</i>	2008		2008	Vanlaere e col. 2008

## 1.2. Fibrose cística

A fibrose cística é uma doença hereditária autossômica recessiva, comum em populações caucasianas, sendo potencialmente letal e apresentando incidência de 1/3300 nascimentos na Europa (Welsh e col. 2001). A doença apresenta um padrão de herança mendeliana simples, onde pais portadores de alterações em uma cópia do gene possuem 25% de probabilidade de descendência sintomática. No Brasil, a incidência na região sul ocorre como nas populações caucasianas européias, enquanto em outras regiões diminui para 1/10000 nascimentos (Raskin e col.

1993). No Rio de Janeiro, a incidência estimada foi de 1/6902 em 1999 (Cabello e col. 1999). Há aproximadamente uma década, estimava-se que apenas 10% do total de casos eram diagnosticados no país (Raskin e col. 1997). O perfil do diagnóstico da fibrose cística vem mudando ao longo do tempo, sendo a doença diagnosticada atualmente na infância. Em 1990, 90% dos casos da doença foram diagnosticados até 12 anos de idade. Dessa maneira, a proporção de adultos aumentou de cerca de 8% em 1969 para 33% em 1990, assim como a média de sobrevida que subiu de 14 para 28 anos. Curiosamente, a média de sobrevida em pacientes do sexo feminino (25 anos) apresentava-se menor que em indivíduos do sexo masculino (30 anos) (Fitz Simmons, 1993). A doença é causada por um defeito no gene regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator), localizado na porção longa do cromossomo 7, o qual origina um mRNA que transcreve a proteína CFTR, de aproximadamente 1480 aminoácidos (Rommens e col. 1989). A proteína determina a formação de canais de cloreto em células epiteliais de glândulas exócrinas, sendo essencial para o transporte iônico através da membrana celular (Boucher, 1998; Vankeerberghen e col. 2002). Como as secreções isotônicas viajam das glândulas sudoríparas em direção à pele, as células epiteliais dos dutos reabsorvem NaCl, resultando em liberação de suor hipotônico. Como os dutos sudoríparos de pacientes com a doença apresentam-se impermeáveis aos cloretos, o NaCl permanece nas secreções, originando suor altamente salgado. Essa mutação causa o fenômeno responsável pela principal característica relacionada à doença: baixa produção de suor, apresentando altos níveis de eletrólitos (revisto em Akabas, 2000).

Embora existam muitos sintomas relacionados à doença, a principal causa de morbidade e mortalidade de pacientes com fibrose cística está relacionada à doença pulmonar crônica (Courtney e col. 2004). Mutações no gene CFTR desregulam a sinalização intracelular pela via do NF- $\kappa$ B, levando ao aumento excessivo de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8; por outro lado, há redução na produção de óxido nítrico (NO) e na sensibilidade ao interferon (IFN)- $\gamma$  e fator transformante de crescimento beta (TGF)- $\beta$  (Kent e col. 1997; revisto em Machen, 2008 e em Döring & Gulbins, 2009), resultando em um processo de inflamação crônica. Além disso, com a alteração da fisiologia das células epiteliais pulmonares, as secreções produzidas tornam-se extremamente viscosas, dificultando o transporte muco-ciliar das vias aéreas e possibilitando a infecção, principalmente por espécies como *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia* (revisto em Millar e col. 2009). Muitas dessas bactérias são capazes de formar biofilmes com acentuado desenvolvimento, tanto horizontal como vertical (Landry e col. 2006), possibilitando o escape do sistema imune e apresentando maior resistência a antibióticos (Schierholtz e col. 1999; Xu e col. 2000).

Muitos fatores de virulência podem ser encontrados em bactérias pertencentes ao CBC, como pili (Sajjan e col. 1995), flagelo (Tomich e col. 2002), exopolissacarídeo (Chung e col. 2003), produção de melanina (Zughaier e col. 1999), catalase (Lefebvre & valvano, 2001), proteases e outras enzimas (Hutchinson e col. 1998; Corbett e col. 2003), formação de biofilme (Huber e col. 2002), sistemas de "quorum sensing" (Lewenza

e col. 1999; Huber e col. 2001) e sistema de secreção do tipo III (SSTT) (Tomich e col. 2003), sendo este último considerado o principal deles. As infecções causadas por microrganismos do CBC são caracterizadas por febre, perda de peso, tosse, mudanças no volume, cor e aparência das secreções, queda na taxa respiratória, dispnéia e ocorrência de infiltrados pulmonares (revisto em McClean & Callaghan, 2009) e podem ser transmitidas entre pacientes através de contato intra ou extra-hospitalares (LiPuma e col. 1990; Govan e col. 1993; Pegues e col. 1994). Das diferentes linhagens que compõem o CBC, *B. cenocepacia* (genomovar III) e *B. mutivorans* (genomovar II) apresentam maior relevância na infecção de pacientes com fibrose cística (McClean & Callaghan, 2009).

### **1.3. *Burkholderia cenocepacia***

Infecção das vias aéreas por *B. cenocepacia* pode causar “síndrome cepacia”, quadro caracterizado por um rápido declínio da função pulmonar e às vezes bacteremia e septicemia, resultando em óbito fulminante na maioria dos casos (Isles e col. 1984; Govan e col. 1996; Blackburn e col. 2004). Essa bactéria pode formar biofilme em conjunto com outras espécies. Contudo, a colonização de *B. cenocepacia* parece ser facilitada pela primo-infecção com *P. aeruginosa* (Saiman e col. 1990).

De uma maneira geral, em bactérias do CBC, os fatores de virulência considerados, até o momento, mais importantes, localizam-se na superfície, ou são liberados (“shedding” ou excretados) (Chiarini e col. 2004; Urban e col. 2004). Em *B. cepacia* a expressão de vários

fatores de virulência é regulada por mecanismos de “quorum-sensing”, dado observado utilizando-se inibidores desse sistema, que é usado pelo microrganismo como forma de monitoramento de sua densidade populacional (Brackman e col. 2009).

Muitas bactérias patogênicas Gram-negativas apresentam sistemas de secreção de proteínas como principal mecanismo de virulência. Esse sistema mostra-se estruturalmente conservado entre as mais diversas espécies bacterianas, mas é capaz de secretar proteínas efetoras altamente variáveis em estrutura e função, causando na célula hospedeira um número diversificado de efeitos (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Existem em *B. cenocepacia*, além de um sistema do tipo III, outros sistemas secretores envolvidos nas mais diversas interações, como dois sistemas tipo IV, associados ao fitoparasitismo (Engledow e col. 2004), quatro sistemas tipo V e um sistema do tipo VI (Holden, e col. 2009), este último sabidamente importante para o parasitismo em *P. aeruginosa* (Potvin e col. 2003). O genoma da cepa J2315 de *B. cenocepacia* possui 8.06-Mb, compreendendo três cromossomos circulares e um plasmídeo, que codificam grande variedade de sistemas típicos de função metabólica, bem como de virulência e resistência a drogas (Holden e col., 2009). Diferente de outras espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, *B. cenocepacia* não apresenta grande número de repetições em tipo de sistemas secretores (Holden e col., 2004; Lim e col., 2009; Nierman e col., 2004; Schell e col., 2007). A análise comparativa do genoma da cepa J2315 de *B. cenocepacia* (cepa obtida de caso humano de infecção pulmonar) com a de outras cepas dessa espécie, evidencia a ocorrência de pseudogenes em diferentes determinantes de virulência, sugerindo que esta cepa

possa ter sofrido pressão seletiva, resultando na melhor adaptação e persistência em hospedeiros portadores de fibrose cística (Holden e col. 2009).

#### **1.4. Sistemas de secreção tipo III**

A interação de bactérias patogênicas com células hospedeiras é dependente de componentes bacterianos presentes na superfície, ou secretados pelo microrganismo. Sistemas de secreção de bactérias são mecanismos capazes de exportar produtos bacterianos e em bactérias Gram-negativas, quatro mecanismos de secreção protéica (Fath & Kolter, 1993; Salmond & Reeves, 1993; Van Gijsegen e col. 1993; Finlay & Falkow, 1997) e um de ácidos nucléicos ou proteínas (Winans e col. 1996) já foram descritos (revisto em Hueck, 1998; Thanassi & Hultgren, 2000). Os SSTT são altamente especializados, permitindo a secreção e translocação de proteínas efetoras através de membranas, diretamente para o citoplasma da célula hospedeira (Revisto em Hueck, 1998) sendo, por isto, denominados sistemas secretores contato dependentes (Cornelis & Van Gijsegen, 2000). As proteínas subvertem as funções celulares do hospedeiro podendo determinar diversas relações ecológicas, como patogênese, para benefício próprio, ou de simbiose (Mota e col. 2005).

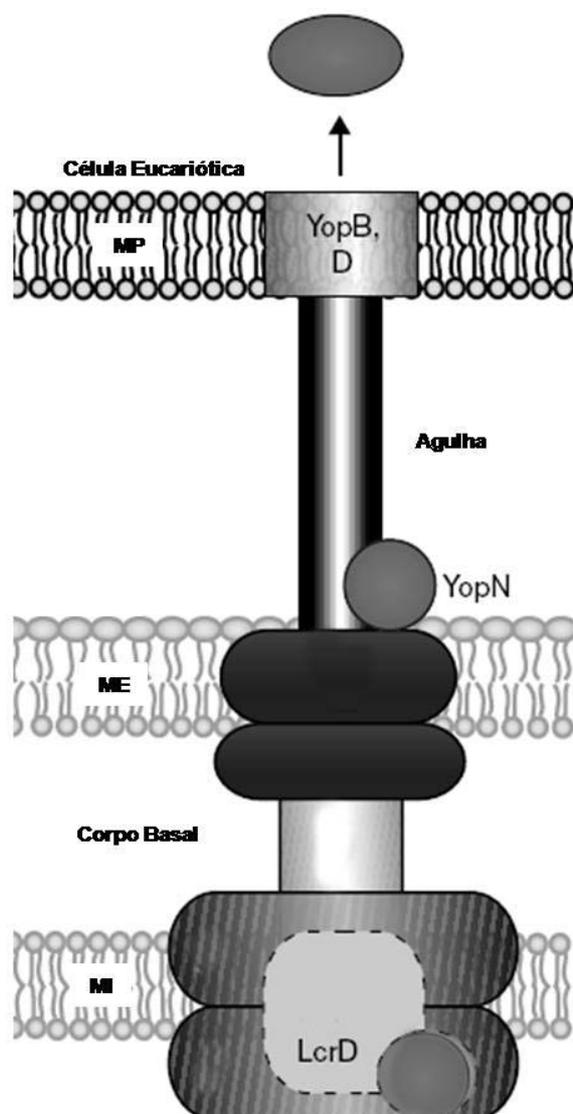
Os SSTT são ativados em resposta a sinais moleculares emitidos pelo hospedeiro e apresentam-se extremamente conservados, tendo sido demonstrado que um SSTT oriundo de uma determinada espécie pode exportar proteínas secretadas por outro SSTT (Rosqvist e col. 1995).

A importância de SSTT na infecção de hospedeiros mamíferos foi demonstrada quando bactérias deficientes do gene *bscN* (Proteína N de secreção), que codifica a proteína geradora de energia, essencial para o funcionamento do SSTT, foram inoculadas em modelo murino, resultando na atenuação da virulência (Tomich e col. 2003). Além disso, esse sistema de secreção mostrou-se igualmente importante em modelo de infecção de *Caenorhabditis elegans* (Markey e col. 2006), onde a ausência desse sistema também reduziu a infecção no hospedeiro.

Em *B. cenocepacia* cepa J2315 ocorre a presença de outros sistemas de secreção, como sistemas tipo IV (Holden e col. 2009), já descrito como importante para o fitoparasitismo (Engledow e col. 2004) e sistema tipo VI (Holden e col. 2009), essencial para a infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* em ratos (Potvin e col. 2003). Ambos também podem estar envolvidos na infecção em fibrose cística.

De maneira objetiva, o funcionamento dos sistemas de secreção do tipo III se dá quando a bactéria, em reconhecimento a sinais do hospedeiro, por exemplo, a temperatura do mesmo, inicia a produção de estruturas do complexo injetor e de proteínas efetoras em seu citoplasma. O microrganismo une-se a receptores existentes na membrana da célula alvo (integrinas, por exemplo), secreta proteínas porinas (formadoras de poros) que, ao se ligarem à célula hospedeira, possibilitarão a conexão do poro com o complexo injetor e posterior translocação da proteína efetora diretamente para o citoplasma da célula alvo (Thanassi & Hultgren, 2000). Dada a relevância do papel dessa estrutura como mecanismo de virulência desse microrganismo, bem como o escasso conhecimento sobre a sua ação no hospedeiro, esta foi um dos alvos de nosso estudo.

Figura 1: Sistema de secreção do tipo III – Protótipo *Yersinia* sp. Adaptado de Thanassi & Hultgren, 2000.



MI: membrana interna; ME: membrana externa; MP: membrana plasmática; LcrD: proteína formadora do poro na membrana interna; Yop: proteína externa de *Yersinia* (B e D: porinas - formadoras de poros na membrana alvo; N: energizadora do canal).  
Notar que a proteína análoga à YopN (BscN) foi o alvo mutagenizado por Tomich e col. 2003.

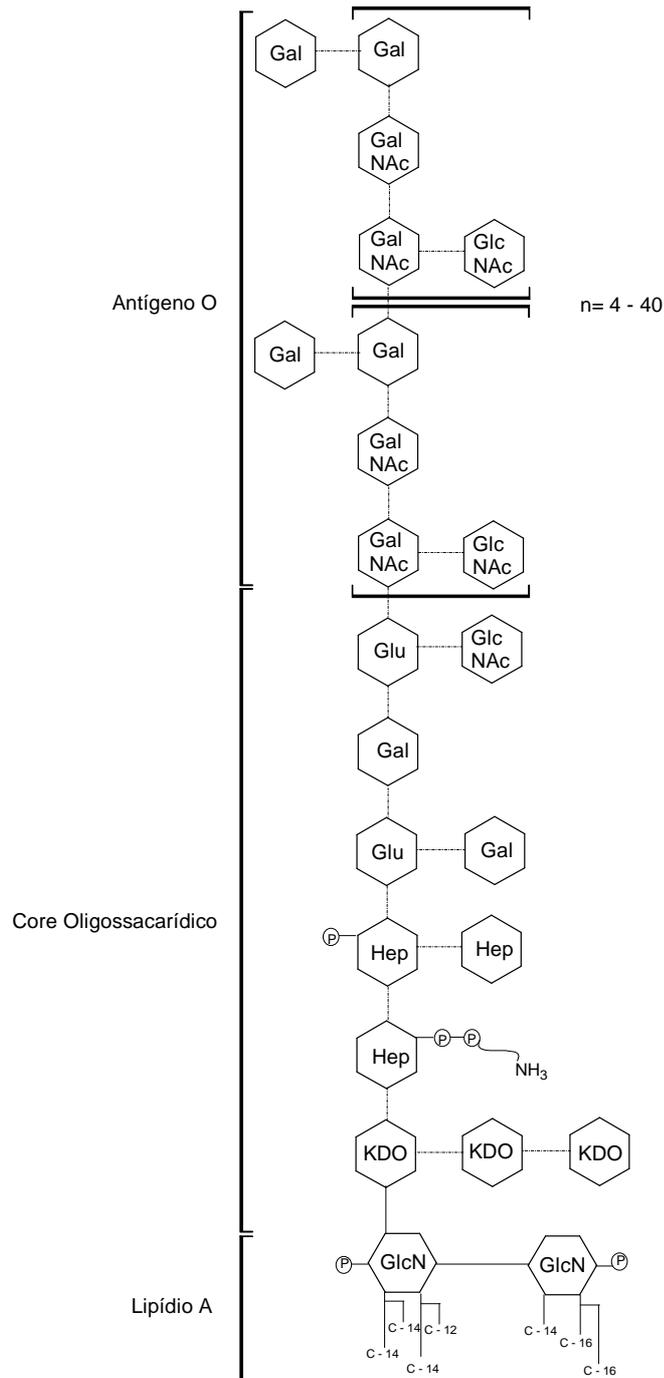
## **Lipopolissacarídeo**

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula anfipática composta por elementos lipídicos e sacarídicos covalentemente ligados, presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. A descoberta do LPS se confunde, remotamente, com a história da medicina. A questão fundamental a ser respondida pela ciência era "qual agente seria o principal desencadeador de morte" e, uma vez que muitos sintomas comuns, como febre, vômito e diarreia eram observados em processos de intoxicação, as escolas de Hipócrates (460 a 370 a.C.) e posteriormente Galeno (129 a 199 d.C), chamavam de "venenos" os causadores desse fenômeno. O quadro "febre" era considerado como o principal sintoma físico de doenças (e algumas vezes como a própria enfermidade). Na Grécia antiga, acreditava-se que era causada por uma entidade física denominada "pirógeno" ("pyrogen". pyros = fogo). Após Louis Pasteur ter comprovado que microrganismos eram responsáveis pela putrefação e decomposição de matéria orgânica, além de serem capazes de causar doenças infecciosas, o princípio do "envenenamento" se confirmou, através da demonstração de Ludwig Brieger de que esses agentes patogênicos produziam e secretavam "venenos" chamados toxinas (revisto em Westphal e col. 1977 e Hitchcock e col. 1986). Richard Pfeiffer, investigando a natureza da toxina envolvida na patogênese da cólera, denominou endotoxina a substância tóxica, termo-estável, associada à porção insolúvel da parede celular de bactérias Gram-negativas. Posteriormente, Eugenio Centamini, patologista italiano, descobriu a relação entre o efeito tóxico e pirogênico da substância denominada "veneno" em microrganismos, concluindo serem

quimicamente inseparáveis e chamando de pirotóxina (Centanini, 1894). O termo LPS foi utilizado pela primeira vez, para descrever endotoxina quando o método de extração fenólica foi utilizado para purificar essa molécula biologicamente ativa de diversas cepas de bactéria Gram-negativas (Westphal & Jann, 1965).

O LPS contém três domínios: (i) polissacarídeo O-específico (antígeno-O ou antígeno somático). É uma cadeia polissacarídica formada de unidades repetitivas, contendo monossacarídeos altamente variáveis; (ii) core oligossacarídico, composto de aproximadamente 10 monossacarídeos, incluindo o ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico (KDO), heptose, glucose, galactose e N-acetilglucosamina, sendo conservado entre cepas relacionadas; e (iii) lipídio A, glicolipídio consistindo de di-glucosamina em ligação  $\beta$ 1-6, acopladas a ésteres, amidos ou ácidos graxos, sendo responsável pela atividade endotóxica (revisto em Caroff & Karibian, 2003). O LPS é a estrutura mais externa em bactérias Gram-negativas e dada sua função biológica considera-se que a determinação de sua estrutura é essencial para o entendimento das relações bactéria-hospedeiro (figura 2).

Figura 2: Esquema estrutural do LPS da cepa 0111:B4 de *Escherichia coli*. Gal (galactose); GalNAc (N-actilgalactosamina) Glc (glucose); GlcN (glucosamina); Hep (heptose); GalNAc (N-acetilgalactosamina); GlcNAc (N-acetilglucosamina); KDO (ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico); P (fosfato). Adaptado de Ohno e Morrison (1989).



## **1.6. Domínio polissacarídeo O-específico**

Cadeias O-específicas estão presentes apenas em colônias de fenótipo liso de bactérias Gram-negativas. A presença ou ausência do antígeno-O na molécula de LPS modifica a característica morfológica da colônia. Colônia tipo lisa, de bactéria que expressa LPS apresentando antígeno O, e colônia tipo rugosa, de bactéria não formadora de LPS com antígeno O. (Schmidt e col. 1968).

Sendo o antígeno-O o domínio mais externo da bactéria Gram-negativa, diversas atividades biológicas são atribuídas a esta porção do LPS, como receptor de bacteriófagos e barreira física contra agressões à superfície da bactéria (revisto em Peschel, 2002); contra a ação de antibióticos (Nikaido, 1976); e modulando a ativação da via alternativa do complemento (Joiner e col. 1984). De fato, em microrganismos patogênicos, o antígeno-O pode diretamente interagir com ligantes/receptores de células do sistema imune (Villeneuve e col. 1994; revisto em Peschel, 2002).

O LPS produzido pela cepa J2315 de *B. cenocepacia* apresenta ausência do antígeno O (Evans e col. 1999) e a análise genômica da bactéria mostrou que essa característica se deve à inserção de um transposon (IS 402) no cluster de biossíntese das unidades repetitivas, uma vez que a inserção do gene (que codifica uma glicosiltransferase), ininterrupto, conferiu a capacidade de expressão do fenótipo perdido, ou seja, a produção de antígeno-O (Ortega e col. 2005).

## 1.7. Core Oligossacarídico

Como já mencionado, o core oligossacarídeo é composto de aproximadamente 10 monossacarídeos, incluindo heptose, glucose, galactose, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico (KDO) (revisto em Caroff & Karibian, 2003), este último podendo ser encontrado em todos os cores conhecidos e fazendo a ligação entre o core e o lipídio A (Unger, 1983). Em *B. cepacia*, o derivado D-glicero-D-talo-octulosônico (DO) também pode ocorrer (Isshiki e col. 1998). Em bactérias que apresentam fenótipo liso, esse domínio é didaticamente subdividido em core interno, mais próximo do lipídio A, e core externo, o qual se liga ao antígeno-O (revisto em Caroff & Karibian, 2003). O core oligossacarídico é conservado entre espécies do mesmo gênero ou família, ainda que apresentem características estruturais parecidas entre bactérias relacionadas, refletindo a importância desse domínio na manutenção da integridade da membrana externa (revisto em Peschel, 2002). Em bactéria do gênero *Burkholderia*, o core pode apresentar o dissacarídeo  $\alpha$ -KO-(2→4)- $\alpha$ -KDO (Isshiki e col. 1998; Molinaro e col. 2002). Em *B. cenocepacia*, o core externo pode não apresentar componentes com carga negativa dominante (reduzindo a atração de peptídeos microbicidas à molécula de LPS) e apresenta ácido urônico, em lugar dos grupos fosfatos normalmente encontrados (Silipo e col. 2007).

## 1.8. Lipídio A

O Lipídio A corresponde, no LPS, ao componente responsável pela atividade endotóxica (Galanos e col. 1985). É constituído do dissacarídeo  $\beta$ -D-GlcN-(1-6)- $\alpha$ -D-GlcN, apresentando dois grupos fosforil nas posições 1 e 4 que podem ser substituídos por etanolamina, fosfo etanolamina, difosfoetanolamina, GlcN, 4-amino-4-deoxy-L-arabinopiranosose e D-arabino-furanose (revisto em Caroff & Karibian, 2003). O principal fator relacionado à atividade endotóxica corresponde ao número e comprimento da(s) cadeias acilas presentes e ao estado de fosforilação da estrutura dissacarídica (Rietschel e col. 1987). Estruturas com um número menor de substituintes fosforilados possuem menor atividade endotóxica. No entanto, alguns trabalhos demonstraram que a presença desse substituinte não seja o único responsável pela atividade biológica. A substituição desse radical por outro com carga negativa pode restaurar a atividade (Ulmer e col. 1992). Além disso, o dissacarídeo também se mostrou importante, visto que preparações monossacarídicas, fosforiladas e aciladas em diferentes posições, perderam atividade (Aschauer e col. 1990).

Em *B. cenocepacia* o lipídio A é caracterizado por uma seqüência P $\rightarrow$ 4- $\beta$ -D-GlcpN-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpN-(1 $\rightarrow$ P)-Ara4N, onde um KO possuindo um resíduo Ara4N substitui uma unidade de KDO. Além disto, foi demonstrado que em *B. cepacia* o KDO pode ser substituído também pelo pentassacarídeo  $\alpha$ -Hep-(1 $\rightarrow$ 7)-[ $\alpha$ -Rha-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$  Hep-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ -Glc-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -hep-(1 $\rightarrow$  em O-5 (Silipo e col. 2006). Pelo exposto neste tópico, fica evidente a importância da caracterização molecular do LPS,

uma vez que sua estrutura química está diretamente relacionada à sua atividade biológica.

### **1.9. Resposta imune inata e mecanismos de evasão do sistema imunológico por bactérias do CBC**

Infecção por bactérias Gram-negativas pode levar à sepse, resposta sistêmica, regulada principalmente pelos mecanismos de virulência do patógeno e pela resposta imune do hospedeiro (Revisto em Rudiger e col. 2008). A sepse ocorre devido à infecção *per se* e pelo dano tecidual, causado tanto pelo microrganismo quanto pela resposta inflamatória. Se não controlada, pode levar ao quadro clínico denominado choque séptico, caracterizado por coagulação intravascular e falência múltipla de órgãos (Revisto em Annane e col. 2005). Como observado anteriormente, o LPS possui papel central na infecção e patogenia do quadro clínico causada por bactérias Gram-negativas. Um inóculo único em alta dose de LPS por via endovenosa pode, parcialmente (já que nesse caso não ocorre persistência da ativação), induzir a resposta inflamatória descrita no fenômeno de choque séptico (Revisto em Glauser e col. 1991). Além disso, o LPS em baixas doses também pode causar essa desordem sistêmica, bastando que o hospedeiro tenha sido desafiado com doses não letais do mesmo até 24h antes (evitando o fenômeno de tolerância à endotoxina), caracterizando a reação de Shwartzman (Revisto em Cotran & Pober, 1990). Importante que se ressalte que a sensibilização ao choque por LPS ocorre não somente com a infecção por bactérias Gram-negativas, mas também pela sinergia com

infecções por outros microrganismos (Fejer e col. 2005; Nansen & Thomsen, 2001; Nguyen & Biron, 1999; Smith e col. 1993) e moléculas pró-inflamatórias (Heremans e col. 1990), como vem sendo demonstrado por muitos autores, incluindo o nosso trabalho em colaboração no modelo de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Paiva e col. 2007 - Anexo 1).

O sistema imune inato reconhece uma grande variedade de patógenos através de componentes presentes na superfície celular chamados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs - pattern recognition receptors), responsáveis pelo reconhecimento de componentes microbianos, extremamente conservados, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns) (Revisto em Janeway & Medzhitov, 2002). Receptores do tipo Toll (TLRs - Toll like receptors) são os principais membros da família dos PRRs, podendo ser encontrados desde plantas até mamíferos, tendo sido inicialmente descritos em *Drosophila melanogaster* (Anderson e col. 1985). O TLR 4, encontrado em mamíferos, liga-se a diversos componentes, sendo a molécula de LPS o ligante mais conhecido deste receptor (Poltorak e col. 1998; Hoshino e col. 1999). Além dos PRRs, moléculas do sistema complemento, um importante componente do sistema imune inato, podem reconhecer e opsonizar microrganismos, possibilitando a fagocitose por fagócitos profissionais ou induzindo à morte através de perturbações na membrana do microrganismo (revisto em Walport, 2001a e 2001b). Células do sistema imune inato, como macrófagos, ingerem e destroem microrganismos invasores através da fagocitose. No modelo clássico de fagocitose, a membrana plasmática engloba a partícula ou

microrganismo a ser ingerido formando a membrana fagocítica (Griffin e col. 1975, 1976). Muitas bactérias patogênicas são capazes de infectar células epiteliais, endoteliais, fibroblastos ou fagócitos por via endocítica ou fagocítica e, caso não possuam capacidade especial para escapar do fagossomo ou modificar os vacúolos líticos, sofrem degradação nos compartimentos lisossomais (Sinai & Joiner, 1997). Entretanto, alguns patógenos intracelulares podem bloquear a maturação do fagossomo ou alterar sua função, podendo se multiplicar na célula infectada (revisado em Sinai & Joiner, 1997 e Dorn e col. 2002). Outros são capazes de escapar do vacúolo e replicar no citoplasma (revisado em Gouin e col. 2005). A infecção, bem como a presença de componentes bacterianos como o LPS, é capaz de ativar monócitos e macrófagos a produzir quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -8 e -12, e também induzir a produção de uma grande variedade de mediadores inflamatórios, incluindo fator de ativação de plaquetas (PAF), prostaglandinas, enzimas e radicais livres como o NO (revisado em Cohen, 2002). A produção desses mediadores contribui para o controle do patógeno e restabelecimento da homeostase. Entretanto, caso não exista a produção de mediadores anti-inflamatórios, principalmente IL-10, a produção excessiva ou descontrolada dessas substâncias pode levar a complicações sistêmicas graves, como disfunção microcirculatória, lesões teciduais e choque séptico (revisado em Morrison & Ryan, 1987; Tracey e col. 1987; revisado em Ulevitch & Tobias, 1985). Uma vez dentro da célula apresentadora de antígenos, o microrganismo pode sofrer degradação proteolítica e os peptídeos gerados são apresentados: (i) por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - major histocompatibility complex) de classe

I para o reconhecimento por linfócitos T CD8, principalmente quando sofrem processamento no citoplasma; ou (ii) por moléculas de MHC de classe II para o reconhecimento por células T CD4, quando são processados principalmente no fagolisossomo (revisto em Harding e col. 1995), aumentando a expressão das moléculas de MHC na superfície celular. Além disso, no transcorrer da resposta imune adaptativa ocorre aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD40, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) na superfície celular, que auxiliam na ativação celular e na instalação da resposta imune adaptativa (revisto em Janeway & Medzhitov, 2002). Entretanto, como já observado, os microrganismos são capazes de inibir a resposta imune, seja regulando a apresentação de antígenos, através da modulação da expressão de moléculas de superfície, seja regulando a produção de citocinas, quimiocinas e agentes microbicidas como o NO. Nesse sentido, a fusão entre fagossomo ou endossomos com lisossomos pode ser inibida por *Chlamydia sp.*, *Legionella sp.*, *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae* (Hart e col. 1987; revisto por Britton e col. 1994; Heinzen e col. 1996), os dois últimos podendo prevenir também a acidificação dos vacúolos (Garcia-DelPortillo & Finlay, 1995). *B. cenocepacia* J2315 sobrevive dentro de macrófagos, possivelmente através de um mecanismo de modulação da acidificação do fagossomo (Lamothe e col. 2006). Importante que se ressalte, que bactérias do CBC resistem em microambientes onde a resposta microbicida encontra-se comprometida (Lefebvre & Valvano, 2001; Bylund e col. 2005), como pulmões de portadores de doença granulomatosa crônica e de fibrose cística. Como mecanismo de escape, *Salmonella sp.* e *Yersinia sp.*, agem modificando a apresentação de antígenos via moléculas de MHC-I através da inibição

da montagem dessa estrutura em sua conformação funcional ou através de sua degradação (Huang e col. 1997; Hughes e col. 1997; Wen e col. 1994). *M. tuberculosis* pode evitar também a resposta microbicida e apresentação de antígenos através de MHC-II em macrófagos, inibindo a sinalização via IFN- $\gamma$  (Fortune e col. 2004; Pai e col. 2003). Antígeno V (LcrV) de *Yersinia sp.* pode estimular a produção de IL-10, inibindo a produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e NO (Sing e col. 2002). Produtos bacterianos liberados pelo microrganismo, como a toxina colérica, também podem reduzir a síntese de moléculas de MHC-II, aparentemente através do aumento intracelular de AMP cíclico (Matousek e col. 1998).

Pelo exposto acima, fica evidente a importância do estudo da influência dos principais fatores de virulência em *B. cenocepacia*, LPS e SSTT, sobre a função de componentes da resposta imune. Nesse sentido, no presente trabalho utilizamos a cepa J2315 de *B. cenocepacia* e a cepa deficiente do SSTT estabelecida por Tomich e colaboradores, gentilmente cedida pelo Dr. Christian Mohr (Departamento de Microbiologia da Universidade de Minnesota), para desenvolver estudos *in vitro* focando os efeitos específicos desse sistema na resposta funcional de macrófagos. Além disso, estudos sobre a caracterização química e a atividade inflamatória do LPS desta bactéria foram realizados, objetivando um melhor entendimento sobre a interação entre *B. cenocepacia* e um dos principais componentes da resposta imune, os macrófagos, estudando a resposta funcional via produção de citocinas e NO, assim como a expressão de moléculas coestimulatórias do processo de ativação por estas células.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a resposta de células do sistema fagocítico à infecção por *B. cenocepacia*.

Determinar a importância do Sistema de Secreção do Tipo III na interação da bactéria com a célula hospedeira.

Purificar e caracterizar o LPS de *B. cenocepacia*.

Estudar a resposta celular causada pelo tratamento com o LPS purificado.

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Quantificar a produção de NO, TNF- $\alpha$ , e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais ou de linhagem RAW264.7 murinos infectados pela cepa selvagem ou mutante (deficiente do SSTT) (SSTTmut) de *B. cenocepacia*.

Avaliar a expressão de moléculas de MHC, CD-40, CD-80 (B7.1) e CD-86 (B7.2) por células infectadas pela linhagem selvagem ou pela SSTTmut de *B. cenocepacia*.

Extrair e caracterizar quimicamente o LPS da cepa selvagem de *B. cenocepacia*.

Quantificar a produção de NO, TNF- $\alpha$ , e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de linhagem RAW264.7 de macrófagos tratados pelo LPS de *B. cenocepacia*.

Avaliar a expressão de moléculas de MHC-II, CD-40, CD-80 (B7.1) e CD-86 (B7.2) por células tratadas com LPS de *B. cenocepacia*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Manutenção das culturas de bactérias**

A cepa selvagem (ATCC: LMG16656 [J2315]) e a SSTTmut (Tomich e col. 2003) de *B. cenocepacia* foram mantidas em meio de cultura Luria Bertani (LB), sob agitação em estufa a 37°C por 24h, sendo então congeladas em 20% glicerol em meio LB e mantidas à -80°C. Para os testes de infecção, a quantificação da população bacteriana foi realizada através da transposição da densidade óptica (DO)<sub>650nm</sub> das culturas em uma curva de crescimento. Para montagem da curva, alíquotas das culturas foram retiradas com 4h, e a cada 2h até 28h de cultivo, sendo então semeadas em meio LB sólido. Concomitantemente, a DO<sub>650nm</sub> foi medida. O número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi ajustado utilizando-se como base a curva de crescimento. Desta maneira, antes da realização das infecções as culturas foram descongeladas e crescidas por aproximadamente 16h. A inativação das culturas foi realizada por aquecimento a 100°C por 30 min.

### **4.2. Extração do LPS de *B. cenocepacia***

Para extração do LPS de *B. cenocepacia* foi utilizado o método de fenol/aquoso (Westphal & Jann, 1965). As culturas foram centrifugadas, lavadas três vezes com PBS e o pellet ressuspensado em água a 65°C, sendo acrescido lentamente de igual volume de 80% fenol à mesma temperatura. Esta suspensão foi mantida sob constante agitação em placa agitadora por 15 min, sendo posteriormente centrifugada a 3.000 x g por 30 min. Posteriormente, a fase aquosa foi separada e a fenólica foi

ressubmetida à extração, como descrito acima. As fases aquosas das duas extrações fenólicas foram dialisadas com água corrente por 48h e liofilizadas. O material foi então solubilizado em água e ultracentrifugado a 105.000 x *g* por 18h para isolamento do LPS purificado, que foi recuperado do precipitado e liofilizado.

### **4.3. Gel de poliacrilamida do LPS**

Para verificar a homogeneidade da preparação, o LPS foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS. A corrida foi desenvolvida utilizando uma corrente inicial de 5mA para o gel de entrada e 12mA para o gel de separação. A visualização total da molécula foi feita por coloração por prata (Hitchcock & Brown, 1983). Resumidamente, o gel foi fixado em uma solução metanol 5% ácido acético por 10 min, sob agitação; o fixador foi retirado e então adicionado 50mL de 4g/L de nitrato de prata, ficando sob agitação por 10 min; após a retirada da solução de prata, o gel foi lavado duas vezes com água mili-Q e foi adicionado 50mL de uma solução de 1,5g de NaOH e 150 $\mu$ L de formaldeído. Após o aparecimento das bandas, retirou-se a solução reveladora e lavou-se o gel por duas vezes, antes de fixá-lo novamente por 2 min e lavá-lo para a retirada do fixador.

Para identificação da porção sacarídica, o LPS foi separado em gel de poliacrilamida (20%), e corado através do método de Schiff (PAS) descrito em Fairbanks e colaboradores (1971), modificado em nosso laboratório para este trabalho, onde as incubações foram realizadas em ciclos de 30 segundos de aquecimento em microondas e agitação por 5 min. O gel foi fixado em solução 80% etanol e 20% ácido acético. Posteriormente a solução foi descartada, e o gel foi lavado com 30%

etanol através do ciclo descrito. Após o descarte desta solução, foi adicionado 0,7% ácido periódico em 5% ácido acético, sofrendo mais um ciclo de aquecimento e agitação. O gel foi então lavado por mais um ciclo com 0,2% metabissulfito de sódio em 5% ácido acético e posteriormente foi adicionado o reagente de Schiff, aquecido e agitado até atingir a coloração esperada.

#### **4.4. Identificação dos monossacarídeos e ácidos graxos do LPS de *B. cenocepacia***

A caracterização da composição monossacarídica do LPS foi determinada após metanólise de aproximadamente 100µg de LPS de *B. cenocepacia* com 0,5mL de HCl 0,5M em metanol, por 18h a 100°C. Após a amostra retornar à temperatura ambiente, três extrações foram realizadas com 1 volume de heptano. As fases heptânica e metanólica foram evaporadas sob corrente de N<sub>2</sub>, sendo os metil-glicosídeos trimetilsililados com BSTFA/piridina (1:1 v/v) por 1h à temperatura ambiente (Sweeley e col. 1963). As análises por GC-MS foram realizadas em espectrômetro de massas quadrupolo Shimadzu GC-MS-QP5050, acoplado ao cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A, equipado com uma coluna capilar DB-1, com energia de ionização de 70eV e corrente de ionização de 0,2mA. A programação de temperatura utilizada foi de 120°C a 240°C (2°C/min) para os metilglicosídeos e de 180°C a 280°C (3°C/min) para os ésteres metílicos dos ácidos graxos. Os resultados das análises foram comparados aos obtidos com LPS de *E.coli* (Sigma-EUA 055: B5).

#### **4.5. Separação da porção sacarídica do LPS de *B. cenocepacia***

O LPS purificado foi submetido à hidrólise ácida através da solubilização em 1% ácido acético aquoso a 100°C por 1h e 30 min. O lipídio A foi isolado após centrifugação a 3.000 x g por 30 min e o sobrenadante contendo o material sacarídico foi fracionado por cromatografia de filtração em gel utilizando coluna Bio Gel P-6 (400 mesh – extra fina) de 1 x 120 cm. As frações foram eluídas com água destilada, sendo monitoradas para carboidrato através pelo método fenol-ácido sulfúrico. As frações positivas foram coletadas (2,0 mL/tubo), liofilizadas e analisadas por CGL e CGL-EM.

#### **4.6. Manutenção e infecção das culturas de células de mamíferos**

As culturas foram mantidas em meio de cultura DMEM, 10% de SFB a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Macrófagos peritoneais obtidos por lavagem de camundongos BALB/c ou células Raw 264.7 (ATCC: TIB-71) foram semeados em placas de 24 poços em concentrações que variavam, de acordo com o experimento a ser realizado, entre 1x10<sup>5</sup> e 5x10<sup>5</sup> células por poço, cultivados em ausência ou presença de bactérias na proporção célula:bactéria de 1:1, 10:1 e 1:10. Alguns poços foram estimulados com IFN- $\gamma$  duas horas antes das infecções. Como controles foram utilizados meio de cultura, IFN- $\gamma$  (40UI) e/ou LPS (10ng) por poço de 1,0mL. Após o período de incubação os sobrenadantes foram retirados para quantificação de NO e citocinas. Em ensaios para avaliação da

modulação da produção de NO, as culturas foram estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$  por 18h, os poços foram lavados com meio de cultura e posteriormente infectados como descrito. Nos experimentos de tratamento com LPS derivado de *B. cenocepacia*, as concentrações utilizadas variaram de 1ng/mL até 100 $\mu$ g/mL.

#### **4.7. Dosagem de citocinas**

As dosagens de TNF- $\alpha$  e IL-10 foram realizadas utilizando kit comercial (R&D, Minneapolis, MN) através do método de Elisa. Os poços foram cobertos com 100 $\mu$ L de anticorpo primário e mantidos à temperatura ambiente. Após 16h de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem TBS (PBS contendo 0,05% Tween) e bloqueados com tampão de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA) por 1h. Os poços foram novamente lavados, as amostras e a curva-padrão adicionadas em um volume de 100 $\mu$ L e incubadas por 2h à temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada e 100 $\mu$ L do anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase foram adicionados. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado o substrato (peróxido de hidrogênio) na presença do cromógeno (tetrametilbenzidina), seguindo-se incubação por 20 min. A coloração foi medida em leitor de microplaca utilizando filtro de 540nm.

#### **4.8. Dosagem de óxido nítrico**

Os níveis de NO foram quantificados indiretamente pela dosagem de nitrito através do método de Green (Green e col. 1982). Após a transferência de 100 $\mu$ L de amostra em uma placa de 96 poços e a

posterior adição de igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% α-naftiletilenodiamina em água), foi realizada a leitura da densidade ótica em um leitor de microplaca utilizando filtro de 540nm.

#### **4.9. Avaliação da expressão de moléculas de superfície em macrófagos infectados por *B. cenocepacia* ou tratados com seu LPS**

Macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante para o SSTT, vivas ou inativadas, bem como tratados com o LPS purificado da cepa selvagem, foram fixados e incubados (como descrito pelo fabricante) com os anticorpos específicos para MHC-II (FITC – BD Biosciences cód. 11-5321), CD40 (PE – BD Biosciences cód. 12-0401), B7.1 (FITC – BD Biosciences cód. 11-0801) e B7.2 (PE – BD Biosciences cód. 12-0862), para posterior avaliação por citometria de fluxo. Para controle da marcação inespecífica pelos anticorpos foi feita a comparação com culturas controles não tratadas.

#### **4.10. Análises estatísticas**

Para avaliar se as diferenças entre os resultados obtidos foram relevantes do ponto de vista estatístico, foi utilizado o método teste t de Student. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão da média. Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) versão 3.0 ou superior.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Curva de crescimento de *B. cenocepacia***

Para avaliação da curva de crescimento, alíquotas das culturas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, seguindo-se a avaliação da DO e semeadas em meio sólido. O número de células foi quantificado pela CFU proveniente de cada alíquota, após a diluição adequada. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para confirmar a relação entre as duas curvas, cujo resultado foi  $r=0,9389$ , indicando a similaridade entre elas. Portanto, para a realização dos experimentos de infecção, o número de bactérias foi ajustado através da associação entre as medidas da DO e da CFU obtidas na curva de crescimento. Nossos resultados mostraram que o melhor tempo de crescimento foi entre 15 e 18h de incubação (figura 3), quando as culturas encontravam-se no fim de sua fase exponencial de crescimento.

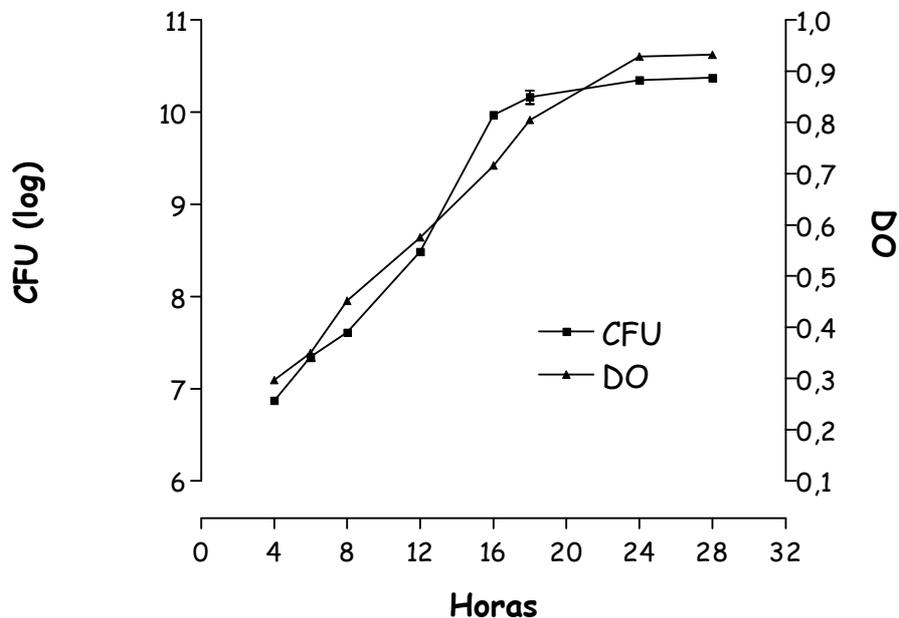


Figura 3: Curva de crescimento de *B. cenocepacia* medida através de contagem de CFU e DO. Resultado representativo de três experimentos independentes. Coeficiente de correlação de Persons:  $r=0,9389$ .

## 5.2. Comparação entre a produção de NO por culturas de macrófagos murinos *ex vivo* ou de linhagem.

Com o intuito de avaliar a possibilidade de utilização de células de linhagem em lugar de células de lavado peritoneal, comparamos a capacidade de produção de NO por macrófagos peritoneais *ex vivo* obtidos de camundongos BALB/c ou células da linhagem Raw 264.7 (também oriundas de camundongos BALB/c), após tratamentos com os controles a serem utilizados nos experimentos de infecção. Foram utilizados poços não tratados, tratados com 40UI de IFN- $\gamma$ , 10ng de LPS comercial de *E. coli* ou uma associação destes. Observamos que, quando

tratados com LPS/IFN- $\gamma$ , macrófagos peritoneais apresentaram maior produção de NO se comparados às células de linhagem, média de 73,5 $\mu$ M de NaNO<sub>2</sub> e de 66,5  $\mu$ M, respectivamente (figura 4). Entretanto, como não houve distinção significativa no perfil de liberação de NO entre as células estudadas, que justificasse a utilização de animais a cada experimento *in vitro*, embora houvesse pequena diferença na real quantidade de NO encontrada nas culturas, a partir daquele momento utilizamos apenas as células de linhagem para a realização dos experimentos de interação.

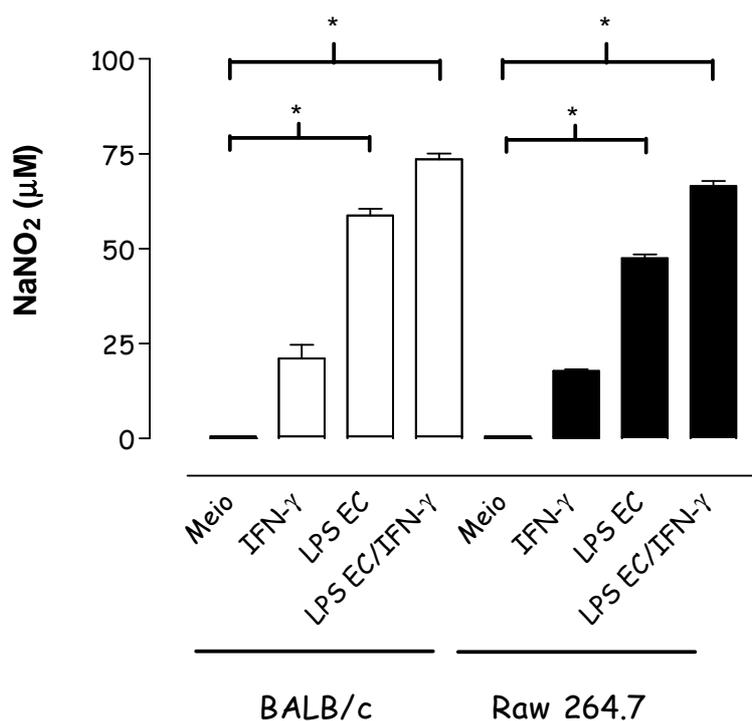


Figura 4: Comparação entre a produção de NO por culturas de macrófagos *ex-vivo* ou de linhagem, tratados com 40UI de IFN- $\gamma$  e/ou 10ng de LPS de *E. coli* (EC). Resultado representativo de dois diferentes experimentos. \* indica P<0,001 em comparação ao controle não tratado.

### **5.3. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*.**

Para avaliar a possível diferença entre as cepas selvagem e mutante da bactéria no tocante à indução de resposta microbicida, quantificamos a liberação de NO nos sobrenadantes das culturas da linhagem de macrófagos, após interação com o microrganismo. As células foram infectadas nas proporções célula:bactéria de 1:1, 10:1 e 1:10, sendo então realizada a avaliação indireta de NO através da dosagem de  $\text{NaNO}_2$  no sobrenadante das culturas após 24h de incubação. A infecção pelas cepas selvagem ou mutante não induziu a liberação de  $\text{NaNO}_2$ , independente das proporções utilizadas. A infecção também inibiu a produção basal deste metabólito após o tratamento com IFN- $\gamma$ . (figura 5 – relação célula:bactéria de 1:1 como representativa dos experimentos). Além disto, em culturas previamente ativadas com LPS/IFN- $\gamma$  por 18h a 37°C, a infecção na relação de 1:1 ainda foi capaz de reduzir a liberação de NO após 24h de incubação (figura 6).

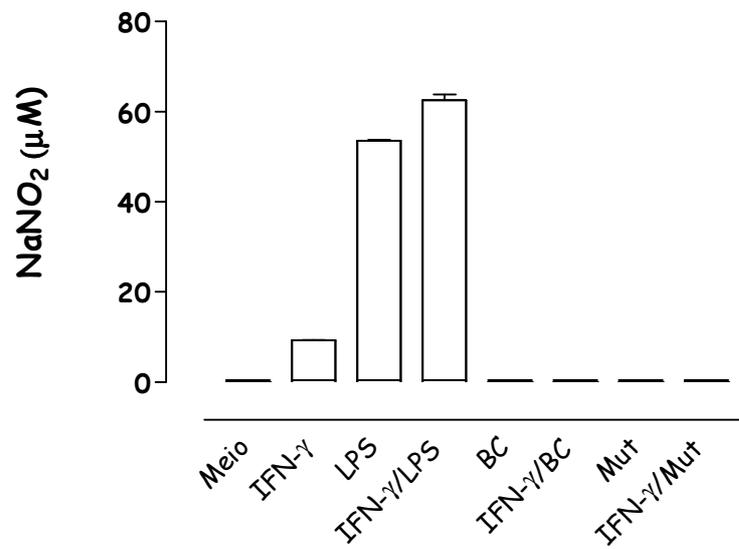


Figura 5: Produção de NO por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante na proporção célula:bactéria de 1:1. Controles não tratados ou tratados com 40UI de IFN- $\gamma$  e/ou 10ng de LPS de *E. coli* (EC). BC: *B. cenocepacia*; Mut: mutante do SSTT. Resultado representativo de cinco diferentes experimentos.

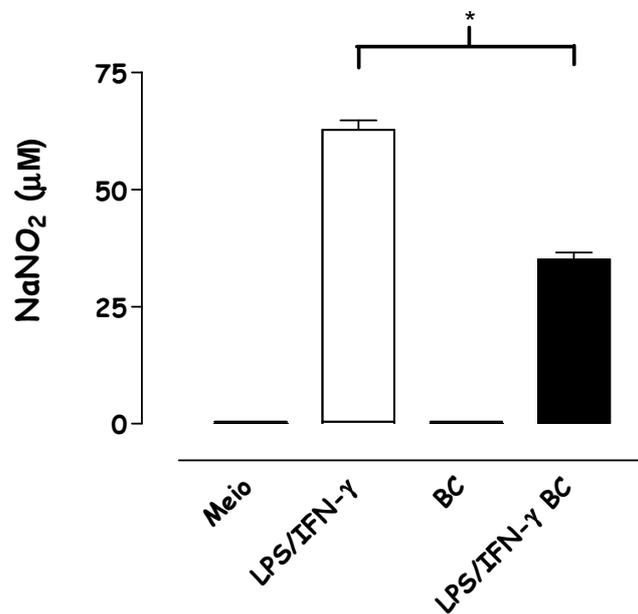


Figura 6: Produção de NO por culturas de macrófagos previamente ativados com 40UI de IFN- $\gamma$  e 10ng de LPS de *E. coli* e infectados pela cepa selvagem na proporção de 1:1. Controles não tratados, tratados com 40UI de IFN- $\gamma$  e 10ng de LPS de *E. coli* e infectados pela bactéria. BC: *B. cenocepacia*. Resultado representativo de três diferentes experimentos. \* indica  $P < 0,001$ .

#### **5.4. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*.**

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com a cepa selvagem ou com a cepa mutante foram quantificados quanto à presença de TNF- $\alpha$  após 24h de incubação, tendo como controles meio de cultura, 40UI de IFN- $\gamma$ , 10ng de LPS e IFN- $\gamma$ /LPS. As diferentes cepas de *B. cenocepacia* induziram a produção e

liberação de grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , semelhantes às induzidas pelos controles positivos IFN- $\gamma$ /LPS (aproximadamente 4.000pg/mL). A presença do IFN- $\gamma$  não potencializou o efeito da infecção por nenhuma das duas cepas no que se refere à produção de TNF- $\alpha$ , já que não houve diferenças significativas entre a produção induzida por elas (figura 7).

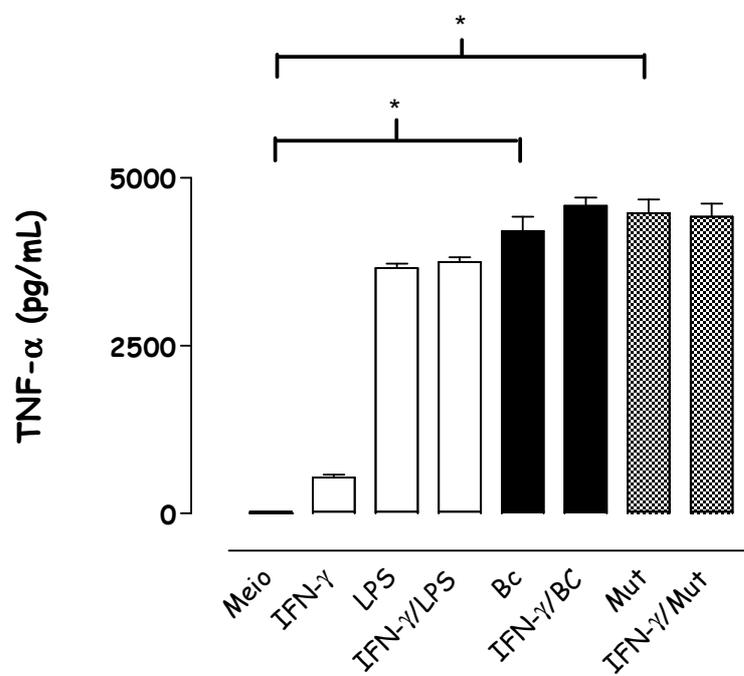


Figura 7: Produção de TNF- $\alpha$  por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; Mut: mutante do SSTT. \* indica  $P < 0,001$  em comparação ao controle não tratado.

### **5.5. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*.**

Para avaliar a ocorrência de perfil antiinflamatório de resposta, quantificamos também a presença de IL-10, após 24h de infecção. Encontramos grandes quantidades desta citocina nos sobrenadantes recolhidos das culturas infectadas pela cepa selvagem e pela mutante de *B. cenocepacia*, em todas as relações de infecção. Importante ressaltar que esta indução de atividade através da produção de IL-10 também ocorreu independente da presença do SSTT funcional, quando a interação com o microrganismo apresentou valores que se encontravam próximos de 6.000 pg/mL desta citocina (figura 8).

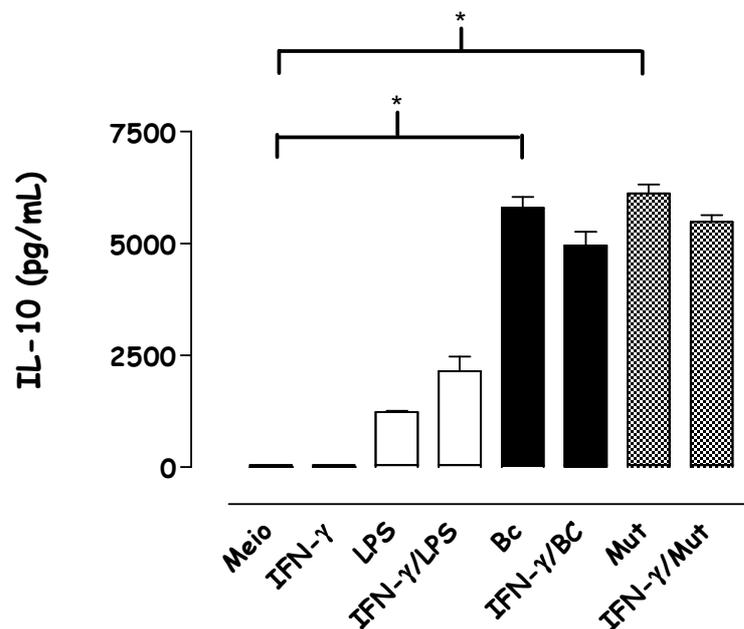


Figura 8: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela cepa SSTT mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; Mut: mutante do SSTT. \* indica  $P < 0,001$  em comparação ao controle não tratado.

### 5.6. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia* inativadas pelo calor.

Para avaliar se a presença de bactérias metabolicamente ativas era essencial à inibição da produção de NO, quantificamos a presença de  $\text{NaNO}_2$  após o tratamento com as diferentes cepas de microrganismos inativadas pelo calor, na proporção de 1:1. Desta vez, macrófagos cultivados com a cepa selvagem e com a cepa mutante inativadas produziram altas quantidades de NO (aproximadamente 100 e 90  $\mu\text{M}$ ,

respectivamente), em torno de duas vezes maiores que as obtidas nas culturas tratadas com o controle LPS (figura 9).

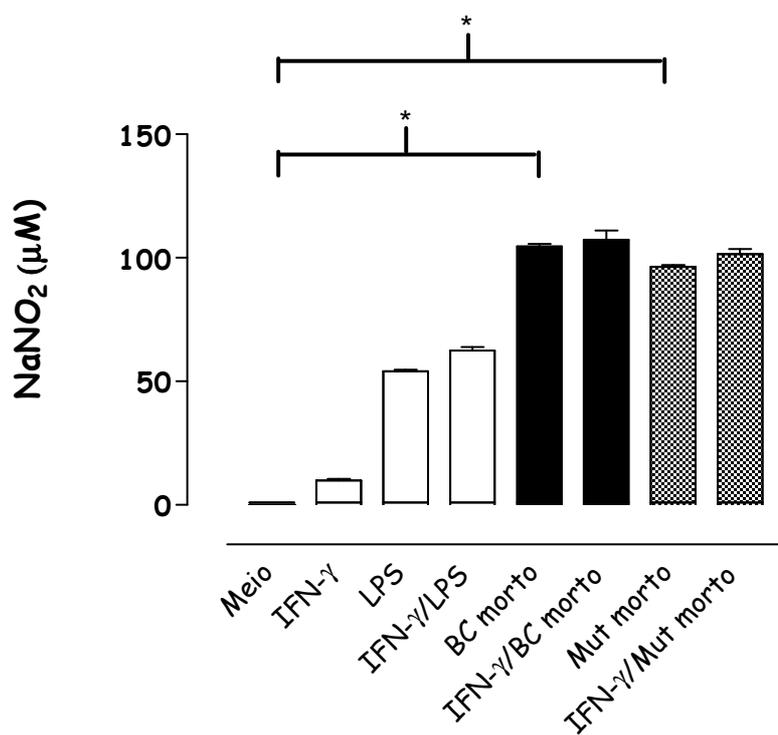


Figura 9: Produção de NO por culturas de macrófagos tratados com bactérias inativadas pelo calor. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; Mut: mutante do SSTT. \* indica  $P < 0,001$  em comparação ao controle não tratado.

### 5.7. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia* inativadas pelo calor

Avaliamos também a capacidade do microrganismo inativado em induzir processo inflamatório através da indução da liberação de TNF- $\alpha$ . Macrófagos cultivados com as cepas de bactérias inativadas pelo calor na proporção de 1:1 foram capazes de liberar níveis semelhantes ao obtido pelas culturas tratadas com IFN- $\gamma$ /LPS, valores aproximados entre 3.000 e 3.500pg/mL (figura 10).

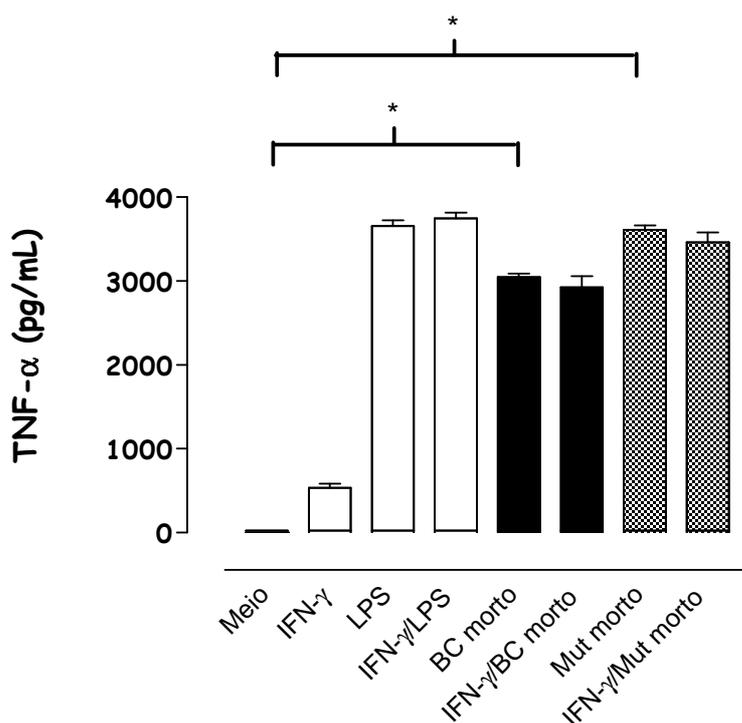


Figura 10: Produção de TNF- $\alpha$  por culturas de macrófagos cultivados com bactérias inativadas por calor. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; Mut: mutante do SSTT. \* indica P<0,001 em comparação ao controle não tratado.

### 5.8. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com a cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia* inativadas pelo calor

Avaliando a liberação de citocina de perfil antiinflamatório, demonstramos que macrófagos cultivados na proporção de 1:1, com as diferentes cepas de bactérias inativadas pelo calor, são capazes de induzir a produção de altas quantidades de IL-10, que dependendo da ocorrência ou não do prévio tratamento com IFN- $\gamma$ , variaram entre 4.000 e 4.500pg/mL (figura 11).

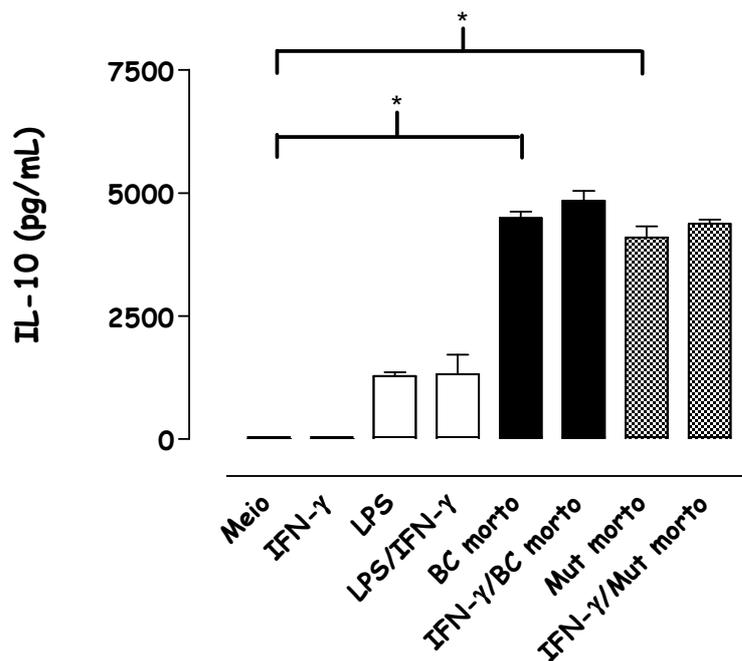


Figura 11: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com bactérias inativadas por calor. Resultado representativo de três diferentes experimentos. \* indica  $P < 0,001$  em comparação ao controle.

### **5.9. Avaliação da expressão de moléculas de ativação celular em macrófagos infectados pela cepa selvagem ou pela mutante de *B. cenocepacia***

Para verificar o efeito na expressão das moléculas de ativação os macrófagos infectados pela cepa selvagem de *B. cenocepacia*. E avaliar a possível modulação do efeito inflamatório pela infecção com a cepa mutante, após a interação com o microrganismo as células foram incubadas com anticorpos específicos anti MHC-II, CD40, CD80 e CD86 conjugados a fluorocromos, tendo sua intensidade de fluorescência determinada através de citometria de fluxo. Como esperado, a infecção pelas diferentes cepas leva a um expressivo aumento da expressão de MHC-II (figura 12 - a), CD40 (figura 12 - b), CD80 (figura 13 - a) e CD86 (figura 13 - b) se comparados ao controle não tratado. Quando comparamos o efeito entre as infecções pelo microrganismo selvagem e pelo mutante, observamos que a cepa deficiente em SSTT é leva à relevante diminuição na expressão de todas as moléculas estudadas.

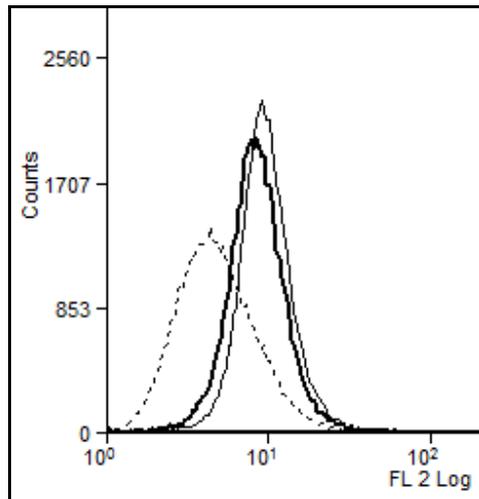


Figura 12 (a): Expressão de MHC-II em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*. -----: controles não tratados;—: cepa selvagem;—: cepa mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

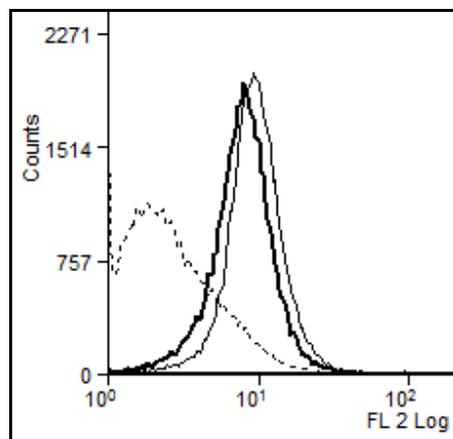


Figura 12 (b): Expressão de CD40 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*. -----: controles não tratados;—: cepa selvagem;—: cepa mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

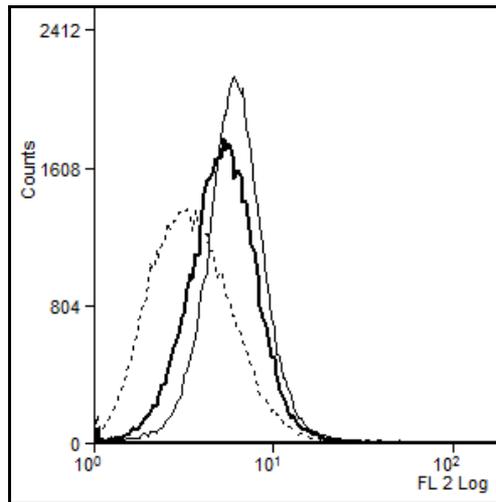


Figura 13 (a): Expressão de CD80 em culturas de macrófagos infectados pela cepa selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*. -----: controles não tratados; —: cepa selvagem; —: cepa mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

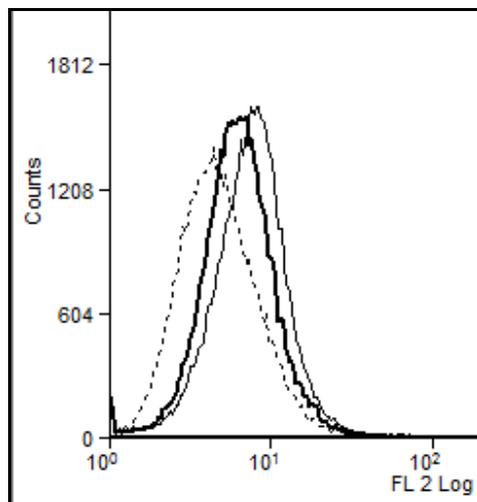


Figura 13 (c): Expressão de CD86 em culturas de macrófagos infectados pelas cepas selvagem ou mutante de *B. cenocepacia*. -----: controles não tratados; —: cepa selvagem; —: cepa mutante. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

### 5.10. Gel de poliacrilamida do LPS

O LPS foi identificado através de coloração pelo método de Schiff (PAS), modificado para este trabalho, após corrida em 20% gel de poliacrilamida. O LPS da cepa selvagem de *B. cenocepacia* apresentou-se purificado, apresentando banda única e massa molecular aparente baixa (figura 14).

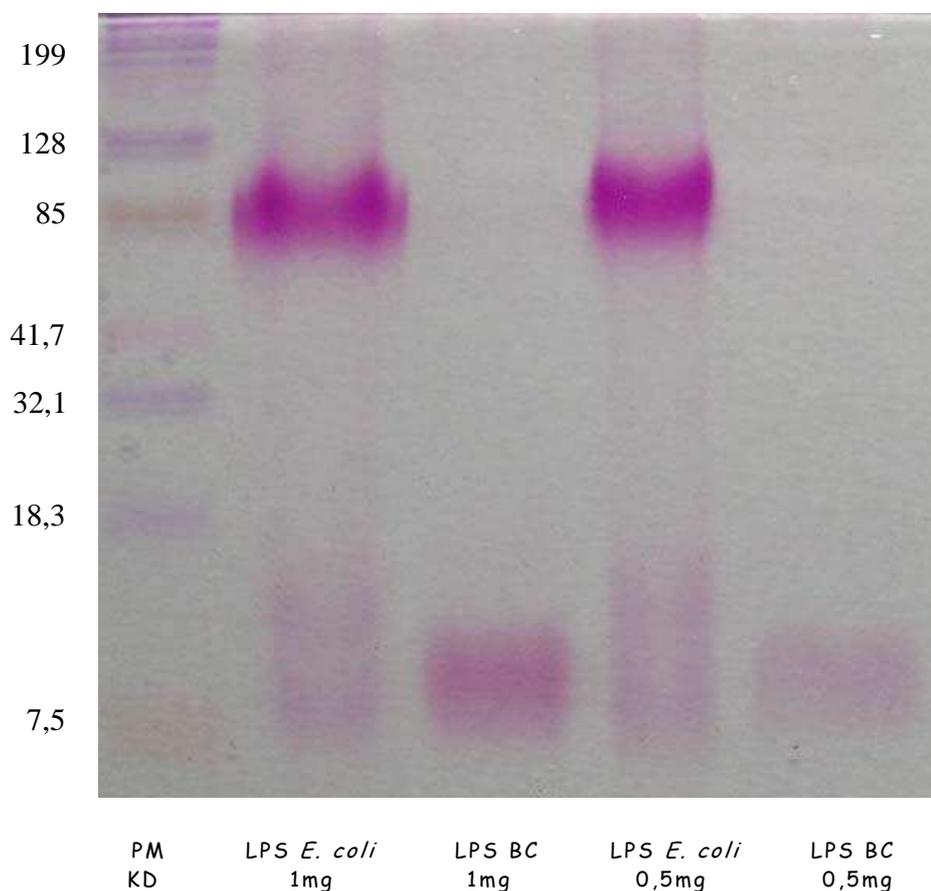


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida do LPS de *B. cenocepacia*. Revelação para carboidrato através da coloração de Schiff (PAS) identificando o perfil de migração do LPS de BC e do LPS de *E. coli* em 20% gel de poliacrilamida. PM: peso molecular.

### **5.11. Identificação dos ácidos graxos do LPS de *B. cenocepacia*.**

Os ácidos graxos, obtidos como ésteres metílicos diretamente do LPS por metanólise após extração com heptano, foram determinados qualitativamente por CGL, através da análise comparativa dos tempos de retenção com ácidos graxos de referência e confirmados por CGL-EM.

Os ácidos graxos encontrados no LPS da cepa J2315 de *B. cenocepacia* são: ácido mirístico (figuras 15 e 16), ácido 3-hidroxi-mirístico (figuras 15 e 16) e ácido 3-hidroxi-palmítico (figuras 15 e 17).

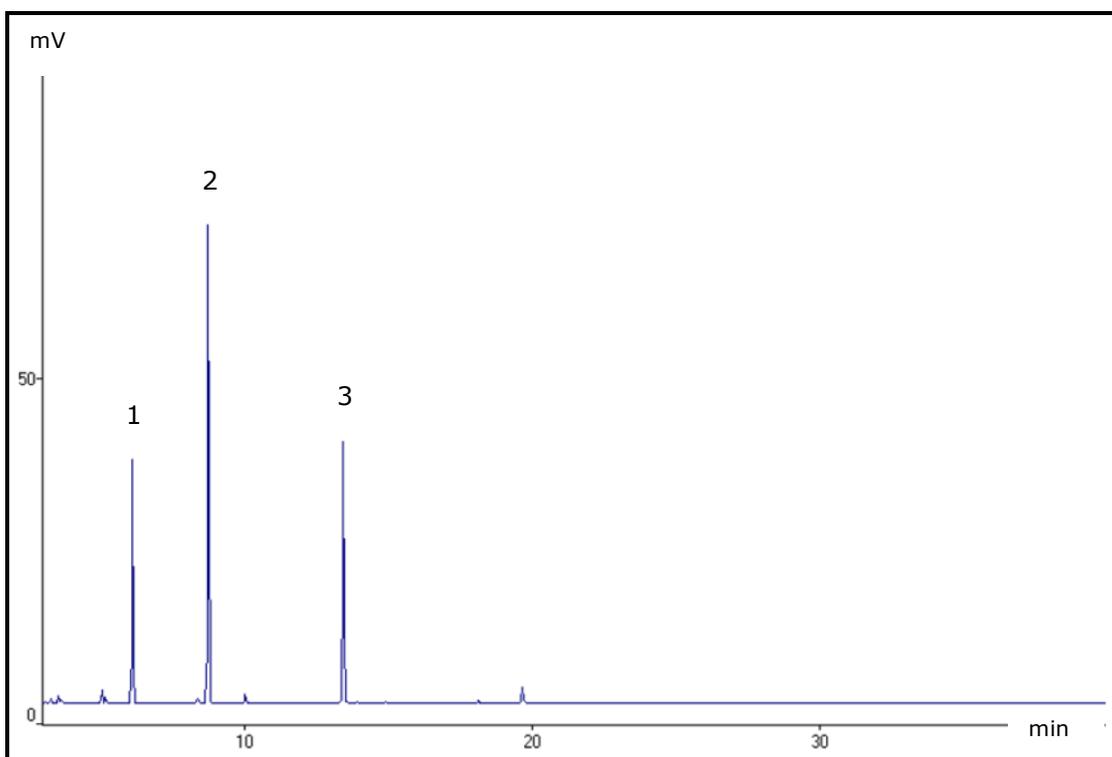


Figura 15: Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos obtidos após metanólise do LPS de *B. cenocepacia*. Os picos assinalados correspondem: (1) éster metílico do ácido mirístico, (2) éster metílico do ácido 3-hidroxi-mirístico e (3) éster metílico do ácido 3-hidroxi-palmítico.



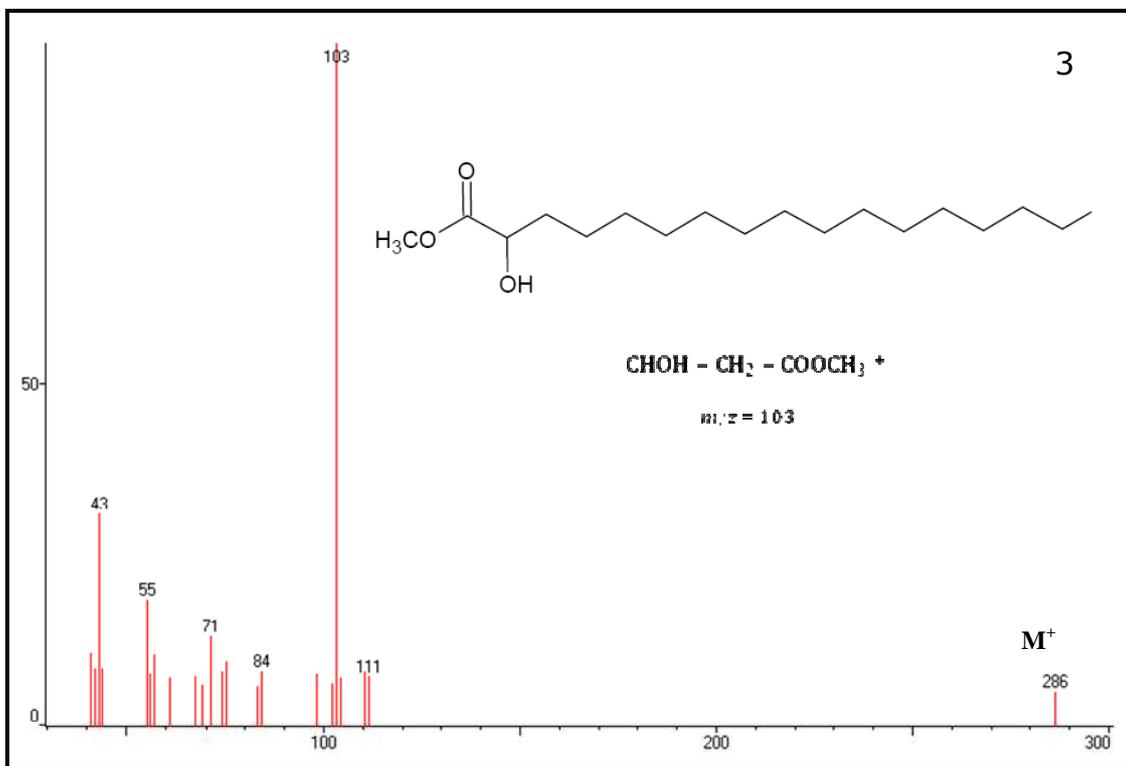


Figura 17: Espectro de massas referente ao pico 3 do cromatograma de ácidos graxos do LPS de *B. cenocepacia*. A fragmentação utilizada para a identificação do ácido graxo está representada no espectro.

### **5.12. Identificação dos compostos monossacarídicos do LPS de *B. cenocepacia***

A fração monossacarídica foi obtida após metanólise do LPS purificado. A fase metanólica foi evaporada sob corrente de N<sub>2</sub>, sendo os metil-glicosídeos trimetilsililados com BSTFA/piridina e analisados por CGL e CGL-EM. De acordo com os resultados, a fração glicídica do LPS de *B. cenocepacia* é composta predominantemente de unidades de ramnose (1), galactose (2), glucose (3) e heptose (4). Os sinais característicos dos carboidratos identificados estão apresentados nas figuras 18 a 24.

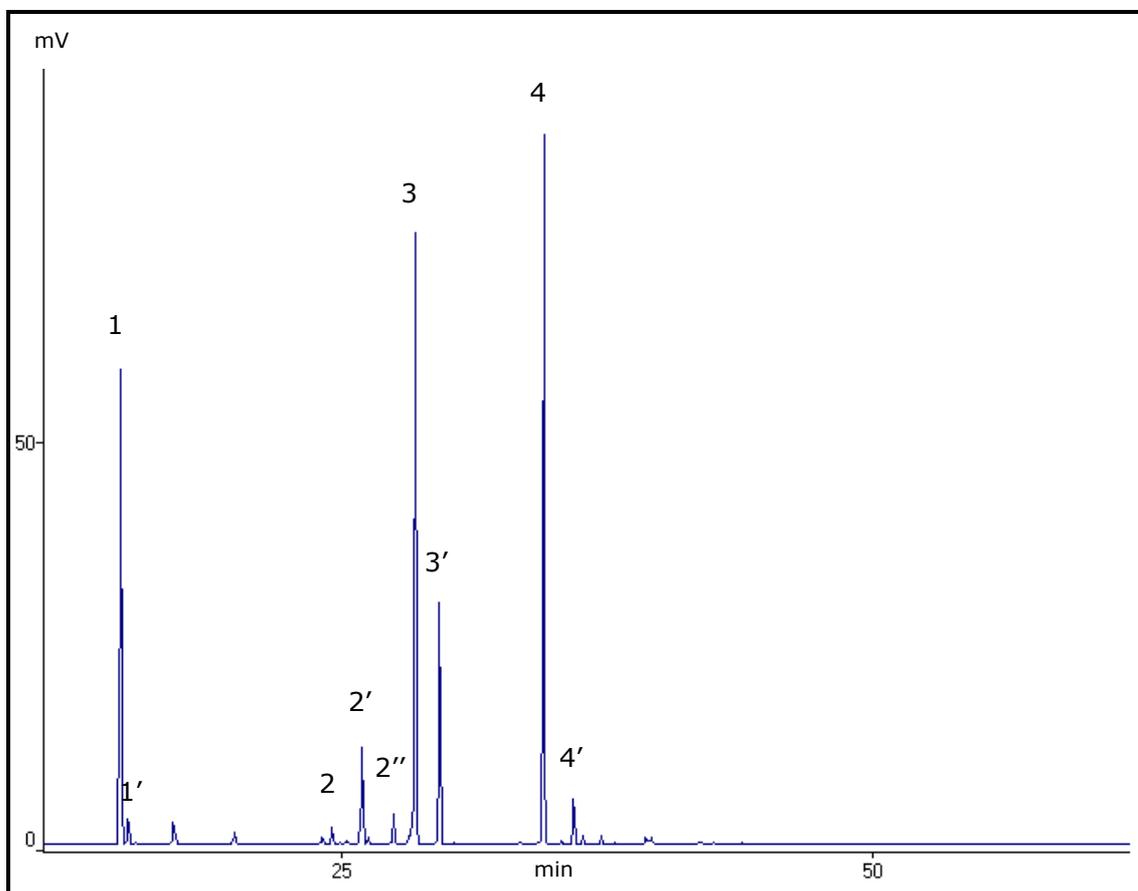


Figura 18: Perfil cromatográfico dos metil-glicosídeos trimetilsililados obtidos após metanólise e trimetilsililação do LPS de *B. cenocercaria*. Os picos assinalados correspondem a: (1) e (1') ramnose; (2), (2') e (2'') galactose; (3) e (3') glucose; (4) e (4') heptose.

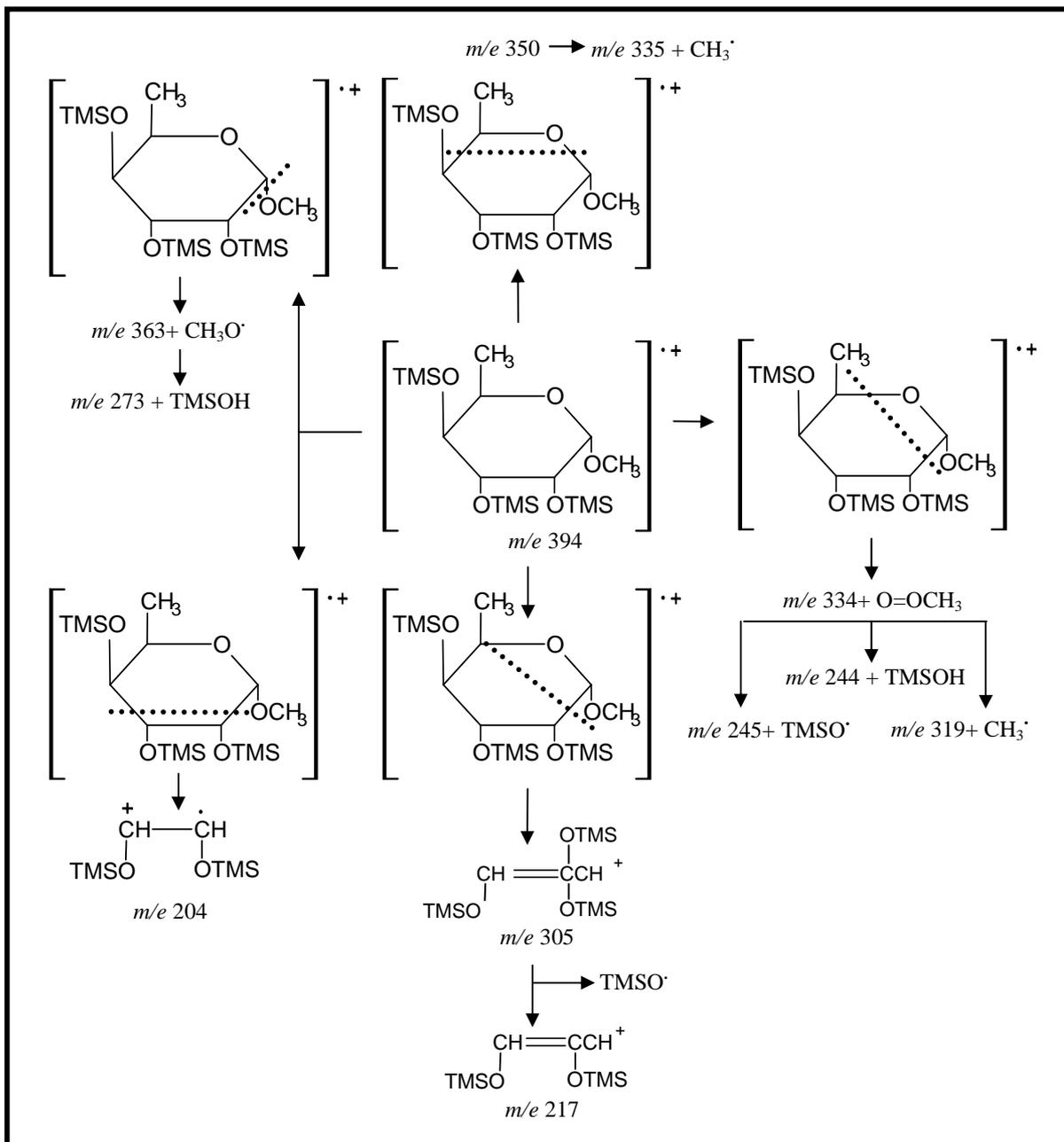


Figura 19: Esquema de fragmentação de metil-6-deoxi-hexopiranosídeos trimetilsililados

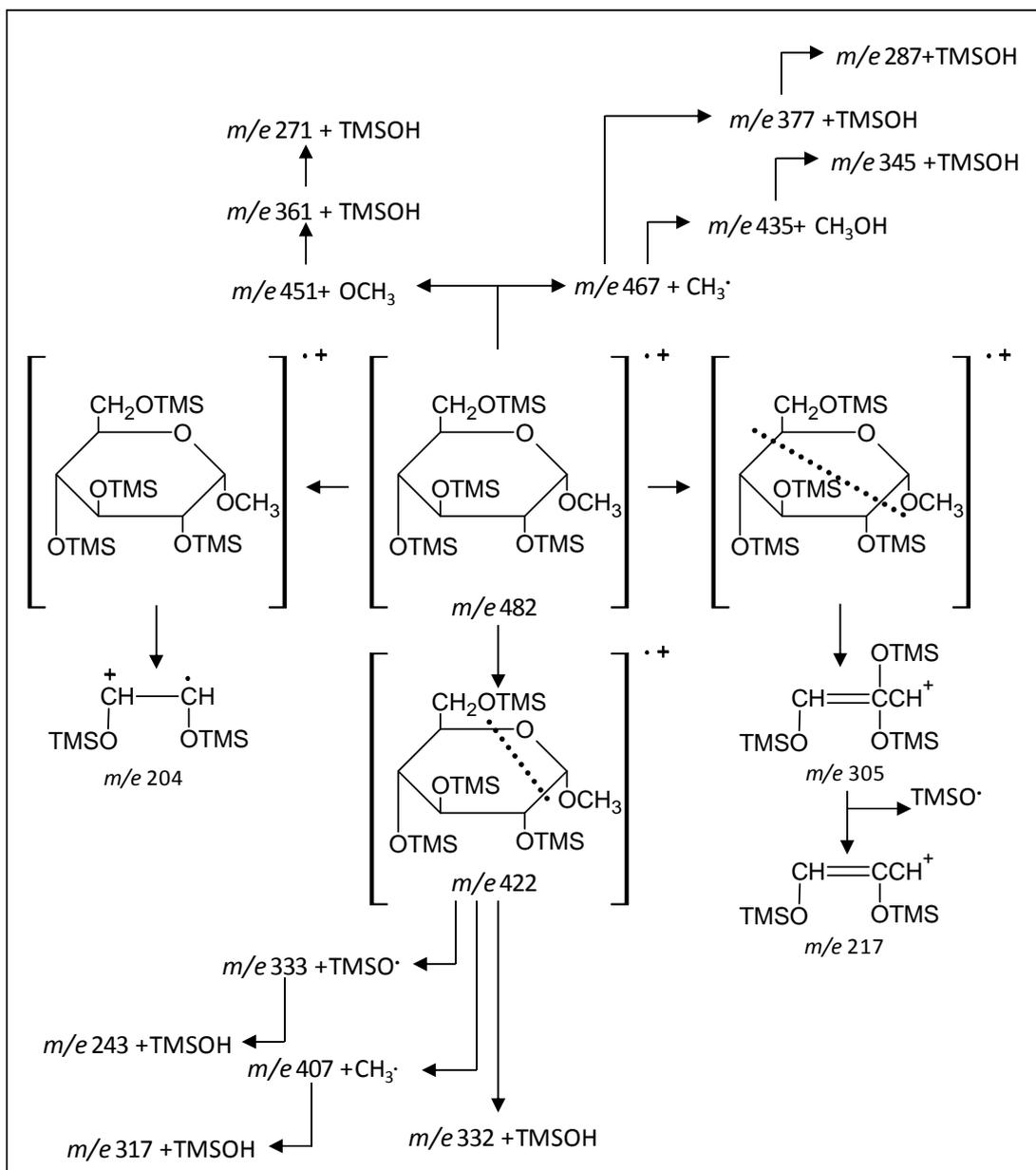


Figura 20: Esquema de fragmentação de metil-hexopiranosídeos trimetilsililados.

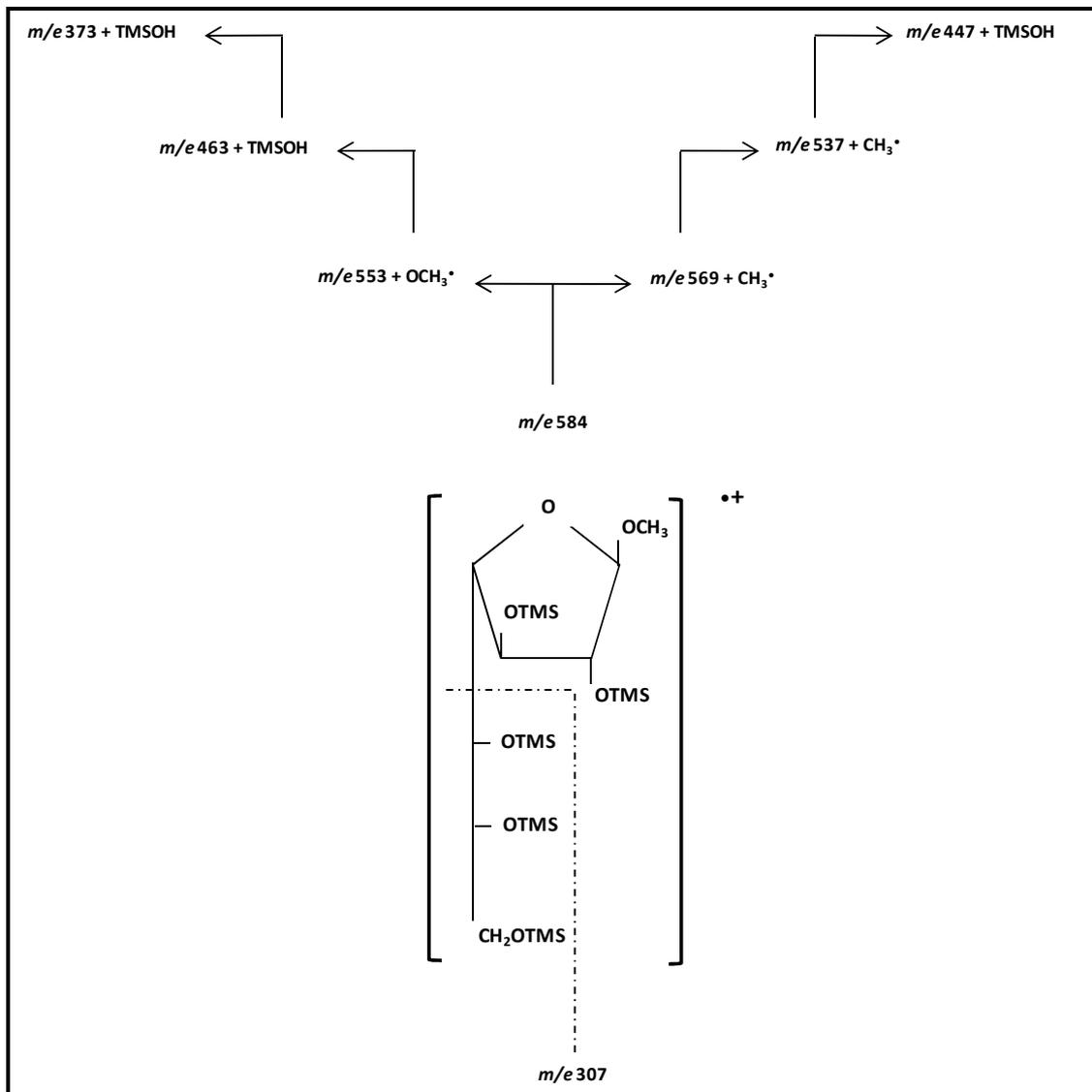


Figura 21: Esquema de fragmentação de metil-heptogalactofuranosídeos trimetilsililados.

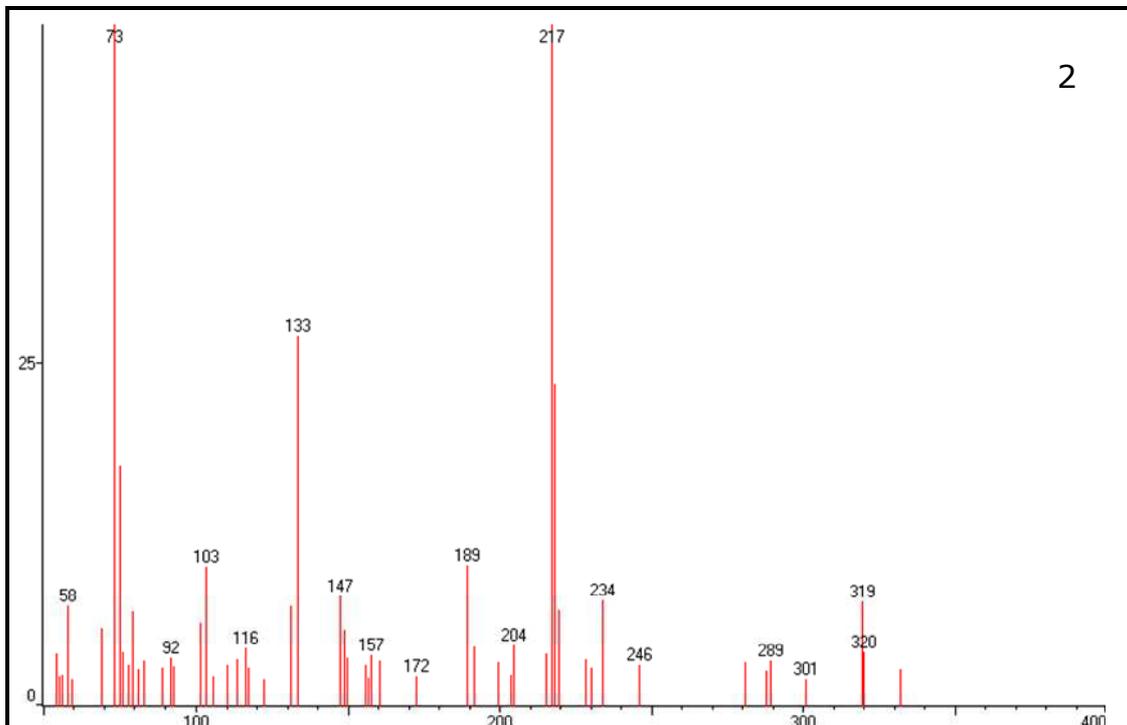
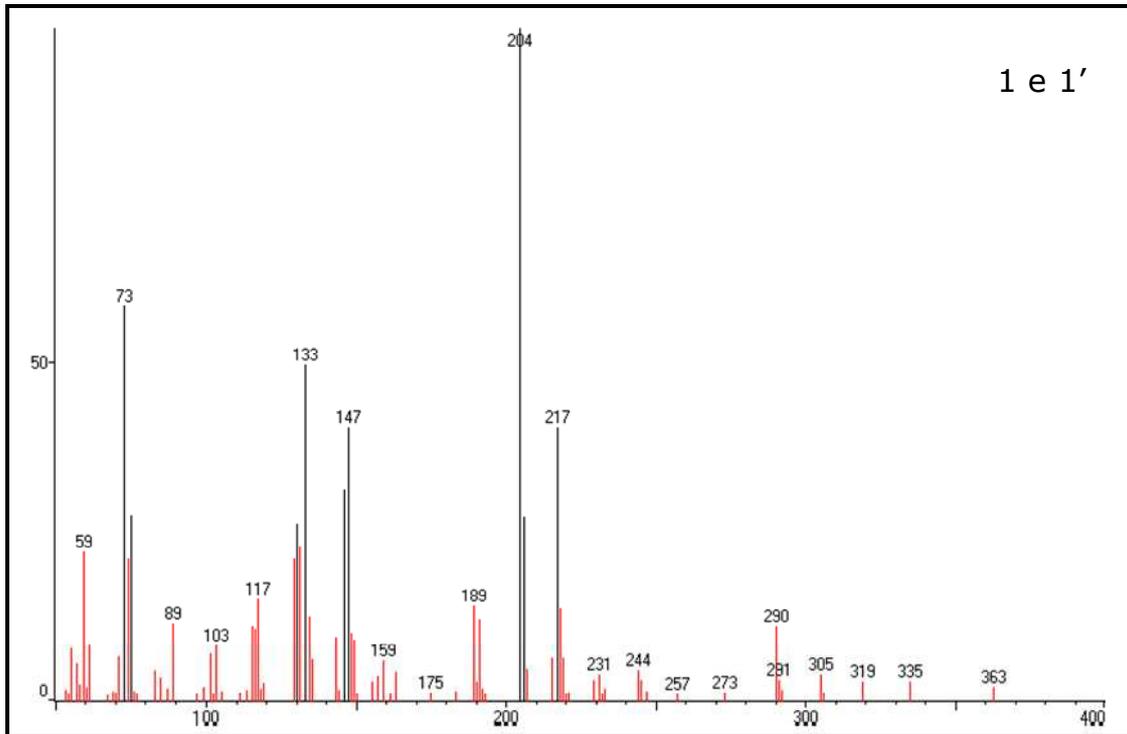


Figura 22: Espectros de massas referentes aos picos 1, 1' e 2 do cromatograma do LPS de *B. cenocepacia*.

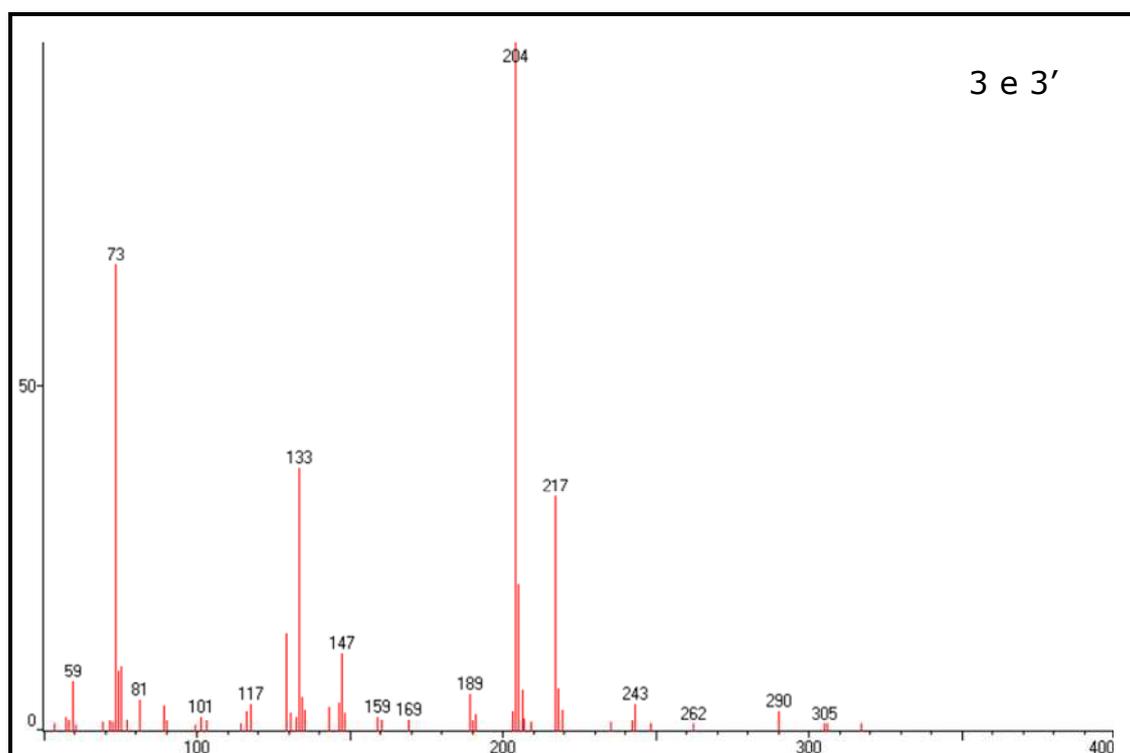
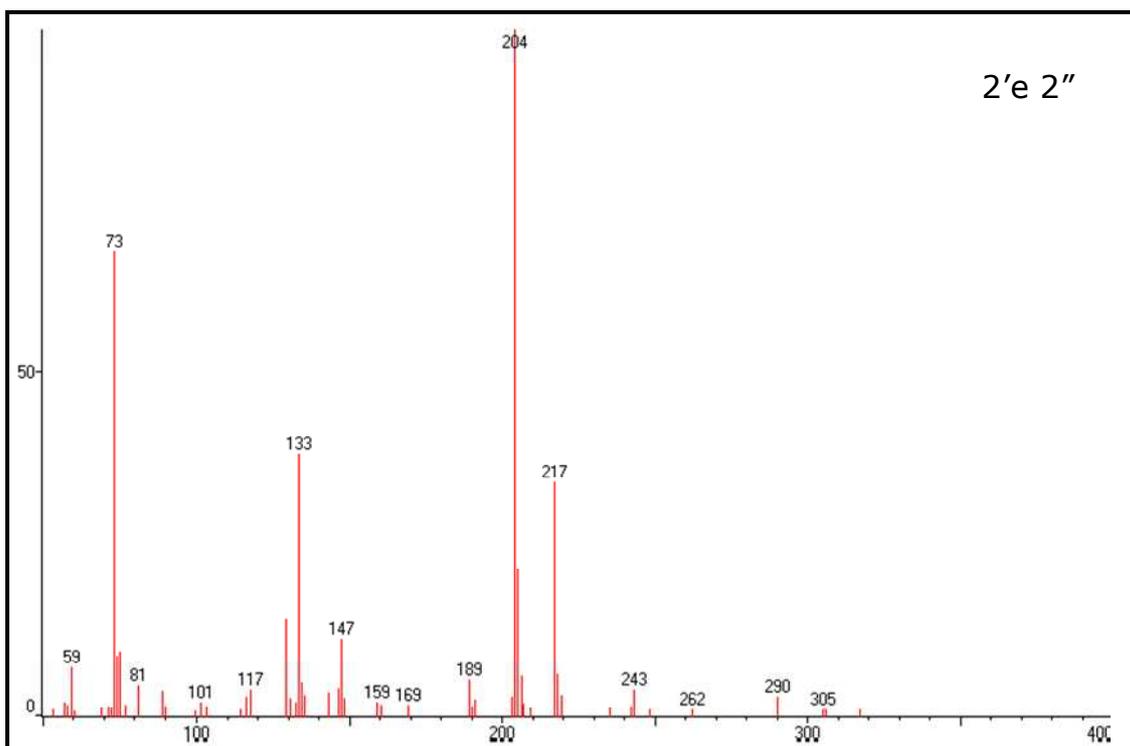


Figura 23: Espectro de massas referentes aos picos 2', 2'', 3 e 3' do cromatograma do LPS de *B. cenocepacia*.

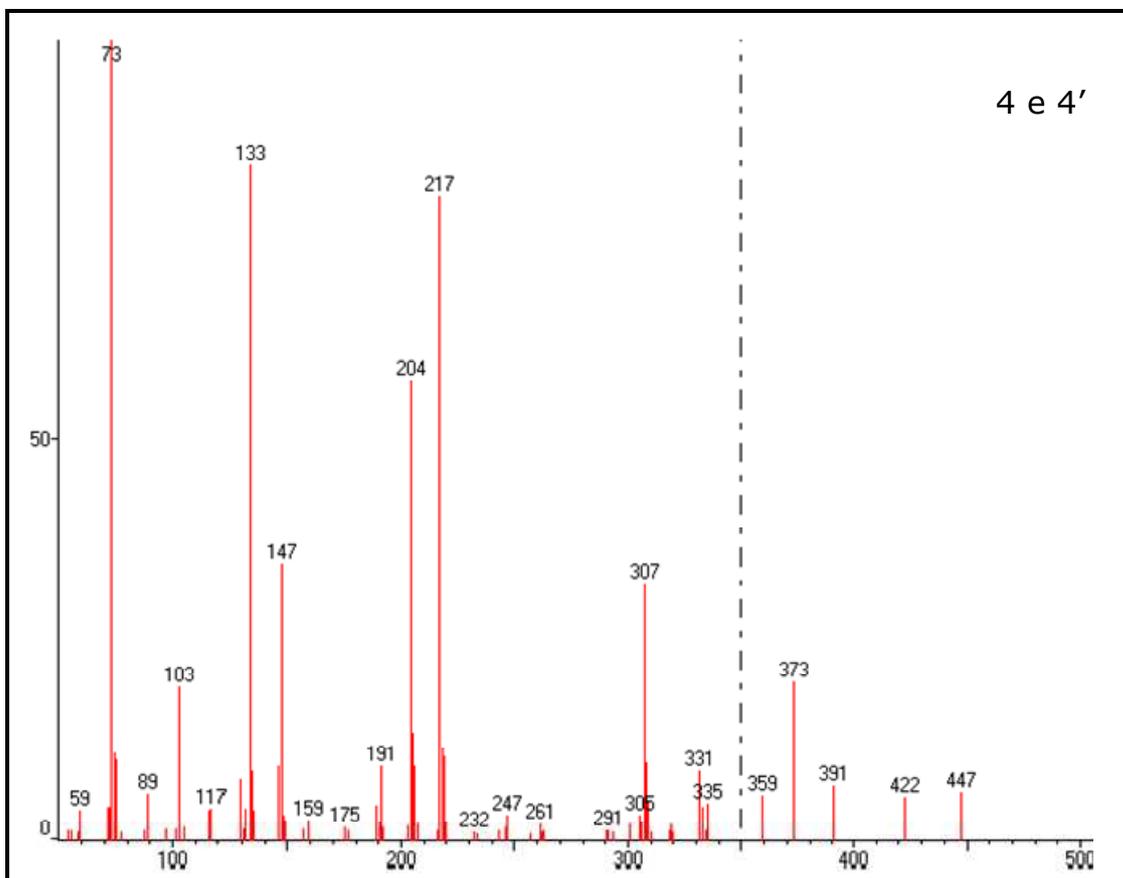


Figura 24: Espectro de massas referentes aos picos 4 e 4' do cromatograma do LPS de *B. cenocepacia*.

### **5.13. Avaliação da atividade citotóxica através da clivagem de MTT por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de *B. cenocepacia***

Para avaliar a ação tóxica do LPS ao metabolismo celular, realizamos experimentos de avaliação de clivagem do MTT (Mosmann, 1983). As culturas foram incubadas com diferentes concentrações de LPS e posteriormente foi adicionada a solução de MTT para avaliação espectrofotométrica da citotoxicidade. Como resultado de três diferentes experimentos, apenas a concentração de 100µg de LPS de *B. cenocepacia* mostrou-se tóxica, com taxas de 20% de toxidez, ou seja, causando uma queda de aproximadamente 20% na clivagem do sal de MTT (figura 25).

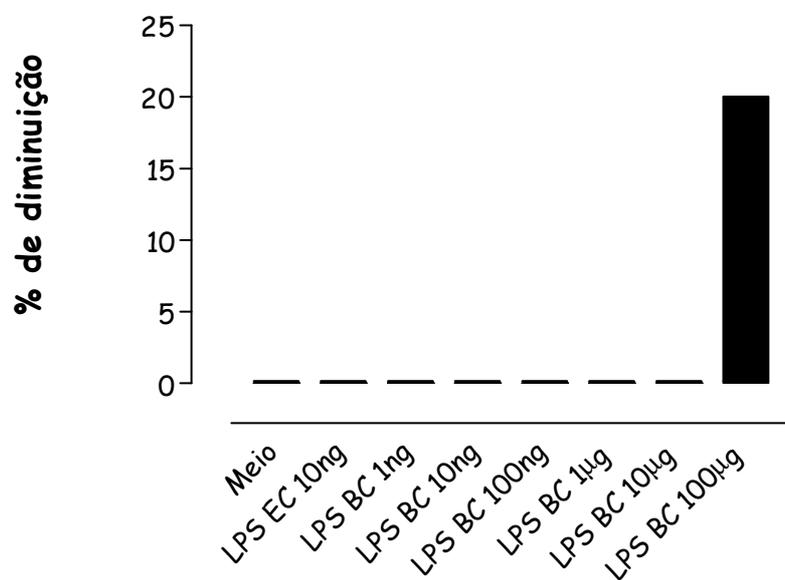


Figura 25: Diminuição da clivagem do sal de MTT por culturas de macrófagos cultivados com LPS oriundo da cepa selvagem de *B. cenocepacia* após 24h incubação. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; EC: *E. coli*.

#### **5.14. Avaliação da produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de *B. cenocepacia*.**

Realizamos experimentos comparativos e de associação entre o tratamento das células com LPS de *E. coli* e LPS de *B. cenocepacia*. Macrófagos cultivados com 10ng de LPS derivado da cepa selvagem, produzem quantidades de NO aproximadamente 7,6 vezes menor (5 $\mu$ M) se comparados aos tratados com mesma concentração de LPS de *E. coli* (38  $\mu$ M). Nas culturas pré-tratadas com IFN- $\gamma$  e cultivadas com o LPS de *B. cenocepacia*, os valores encontrados não são significativamente diferentes dos obtidos no controle de IFN- $\gamma$ . Além disto, a produção de NO induzida pela associação entre os dois LPS não se mostrou diferente daquela onde houve apenas o tratamento com o LPS controle (figura 26).

Posteriormente, realizamos experimentos de tratamento com diferentes doses do LPS de *B. cenocepacia*, em variação logarítmica, ou seja, variando de 100 $\mu$ g a 1ng. Os resultados apresentaram-se em perfil dependente de dose. As células tratadas com 10  $\mu$ g induziram maior liberação de NO com média de 120mM (aproximadamente 1,6 vezes maior que o controle LPS de *E. coli*). Mesmo o tratamento com 100 $\mu$ g, onde existe ação citotóxica do LPS, este induziu um relevante aumento na produção em comparação ao controle com 10ng de LPS de *E. coli* (aproximadamente 1,3 vezes maior). O tratamento com 1  $\mu$ g apresentou concentrações de NO equivalentes ao tratamento com 100 vezes menos LPS controle. As concentrações de 100ng e 10ng induziram liberação de NO em quantidades significativamente menores se comparado ao LPS

controle, sendo 1ng incapaz de induzir liberação em quantidades mensuráveis (figura 27)

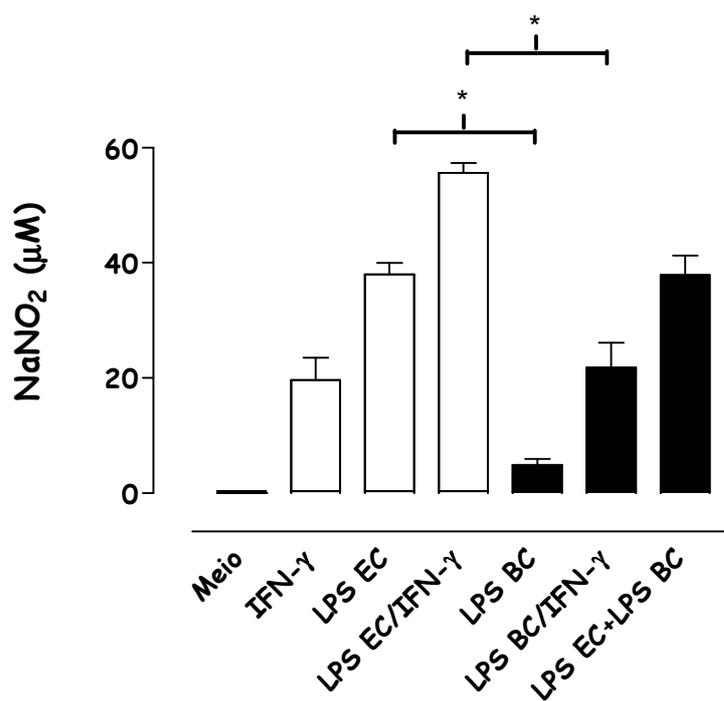


Figura 26: Produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com 10ng/mL de LPS oriundo da cepa selvagem de *B. cenocepacia*. Controles não tratados ou tratados com 40UI IFN- $\gamma$  e 10ng LPS *E. coli* por mL. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; EC: *E. coli*. \* indica  $P < 0,001$ .

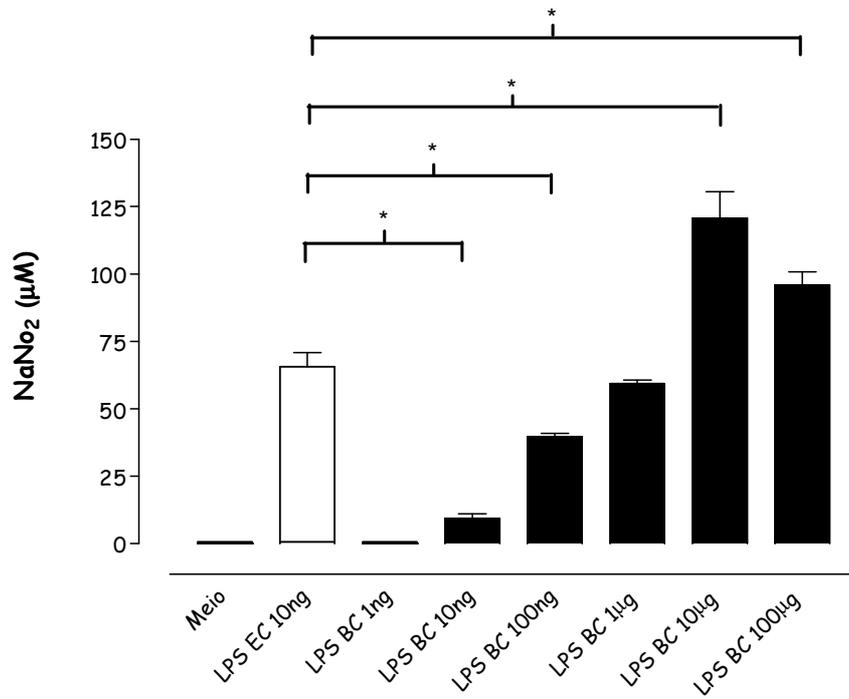


Figura 27: Produção de NO por culturas de macrófagos cultivados com diferentes doses de LPS oriundo da cepa selvagem de *B. cenocepacia*. Controles não tratados, 40UI IFN- $\gamma$  e 10ng LPS *E. coli*. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; EC: *E. coli*. \* indica  $P < 0,001$ .

### **5.15. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de *B. cenocepacia***

Quando avaliamos a liberação de TNF- $\alpha$  nas culturas de macrófagos, cultivadas com diferentes concentrações de LPS de *B. cenocepacia*, encontramos resultados com perfil dependente de dose, similares aos obtidos nos experimentos de liberação de NO. Células tratadas com 10 $\mu$ g apresentaram maior liberação desta citocina, um aumento significativo se comparado ao controle LPS de *E. coli* (1,3 vezes maior). Concentrações equivalentes, 10ng, do LPS dos dois microrganismos, *E. coli* e *B. cenocepacia*, apresentaram diferentes perfis de liberação, onde o tratamento com o LPS do grupo experimental produziu níveis significativamente menores de TNF- $\alpha$  (próximo à metade – em torno de 1.500pg/mL). Mais uma vez, os resultados obtidos com a concentração de 100 $\mu$ g de LPS de *B. cenocepacia* refletiram sua citotoxicidade a esta linhagem celular, apresentando-se menor do que os encontrados com 10 $\mu$ g (figura 28).

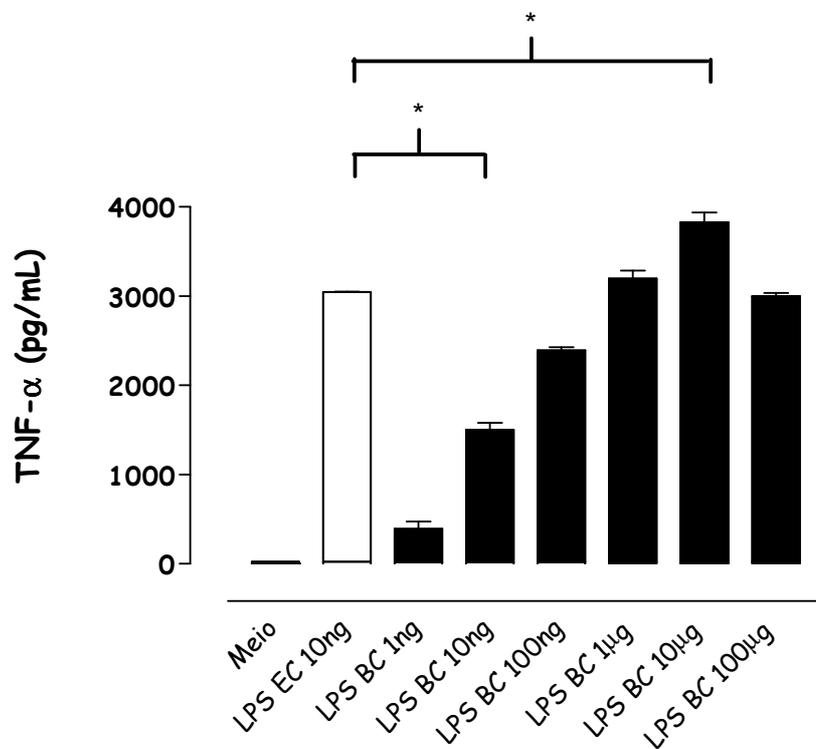


Figura 28: Produção de TNF- $\alpha$  por culturas de macrófagos cultivados com LPS oriundo da cepa selvagem de *B. cenocepacia*. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; EC: *E. coli*. \* indica  $P < 0,001$ .

### **5.16. Avaliação da produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com LPS derivado da cepa selvagem de *B. cenocepacia***

As culturas de macrófagos cultivados com LPS de *B. cenocepacia* foram também quantificadas quanto à liberação de IL-10. Após 24h de incubação, o tratamento com LPS do grupo experimental apresentou perfil de produção de maneira dependente de dose. Grupos tratados com 10 $\mu$ g apresentaram maior liberação desta citocina (aproximadamente 1.800pg), uma quantidade 2,25 vezes maior que o controle com 10ng (1000 vezes menos) de LPS de *E. coli*. O tratamento com 1 $\mu$ g mostrou-se aproximadamente 1,6 vezes maior que o controle LPS, enquanto o tratamento com 10ng induziu liberação em proporção 2,4 vezes menor se comparado ao tratamento com mesma quantidade do LPS controle. A ação citotóxica do tratamento com 100 $\mu$ g do LPS de *B. cenocepacia* ficou evidente também nesta avaliação, apresentando quantidades menores ou iguais que o tratamento com 10 $\mu$ g (figura 29).

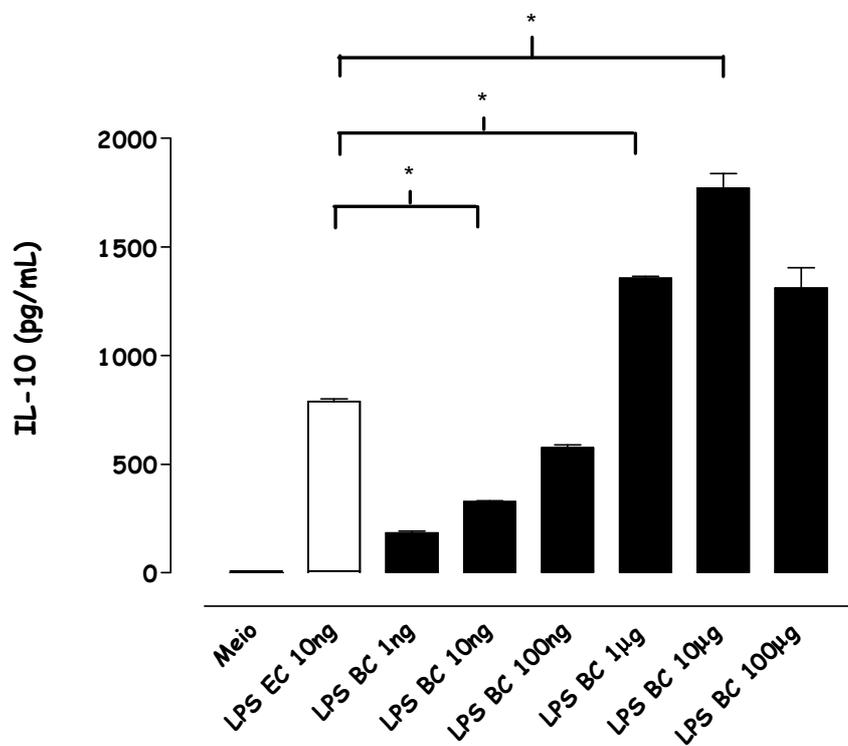


Figura 29: Produção de IL-10 por culturas de macrófagos cultivados com LPS oriundo da cepa selvagem de *B. cenocepacia*. Resultado representativo de três diferentes experimentos. BC: *B. cenocepacia*; EC: *E. coli*. \* indica  $P < 0,001$ .

### **5.17. Avaliação da expressão de moléculas de ativação celular superfície em macrófagos tratados com LPS de *B. cenocepacia*.**

Para analisar o efeito do LPS da bactéria sobre a expressão de moléculas de ativação na superfície das células, após a interação estas foram incubadas com anticorpos específicos anti MHC-II, CD40, CD80 e CD86 marcados com fluorocromo, tendo sua intensidade de fluorescência determinada através de citometria de fluxo. O tratamento com LPS oriundo de *B. cenocepacia* leva ao aumento da expressão de MHC-II (figura 30 - a), CD40 (figura 30 - b), CD80 (figura 31 - a) e CD86 (figura 31 - b), se comparado com células não tratadas. Entretanto, para todas as moléculas estudadas, este efeito mostrou-se significativamente menor quando comparado ao observado no tratamento com as mesmas concentrações do LPS de *E. coli*.

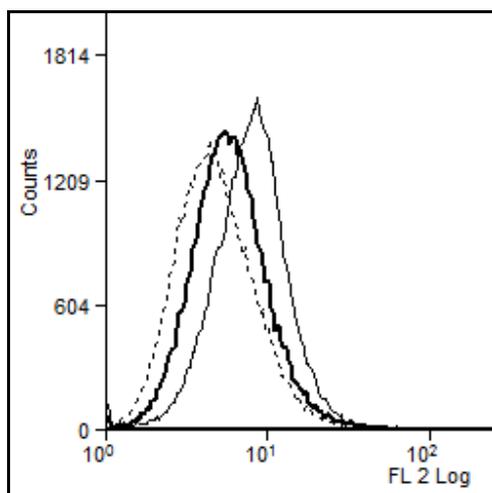


Figura 30(a): Expressão de MHC-II em culturas de macrófagos tratados com LPS derivado de *B. cenocepacia*. ----- : controles não tratados; —: LPS de *E. coli*; — : LPS de BC. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

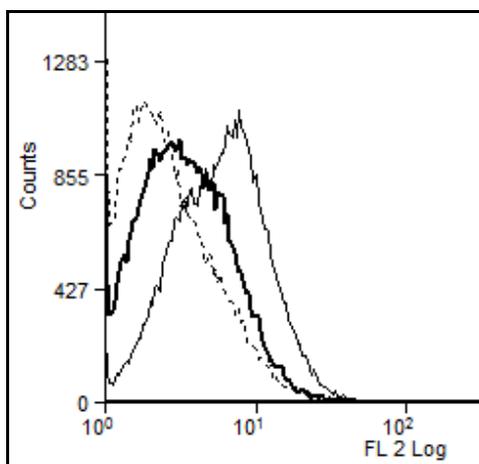


Figura 30(b): Expressão de CD40 em culturas de macrófagos tratados com LPS derivado de *B. cenocepacia*. ----- : controles não tratados; —: LPS de *E. coli*; — : LPS de BC. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

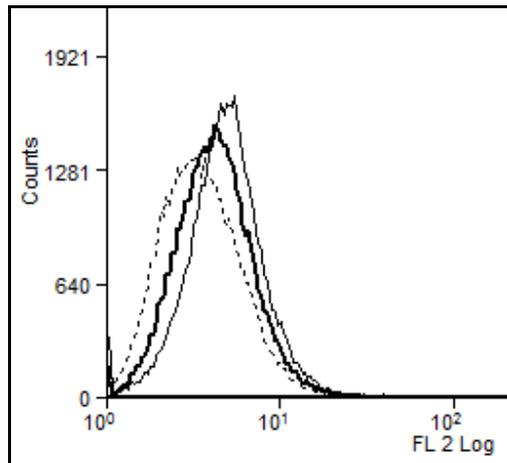


Figura 31(a): Expressão de CD80 em culturas de macrófagos tratados com LPS derivado de *B. cenocepacia*. ----- : controles não tratados; — : LPS de *E. coli*; — : LPS de BC. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

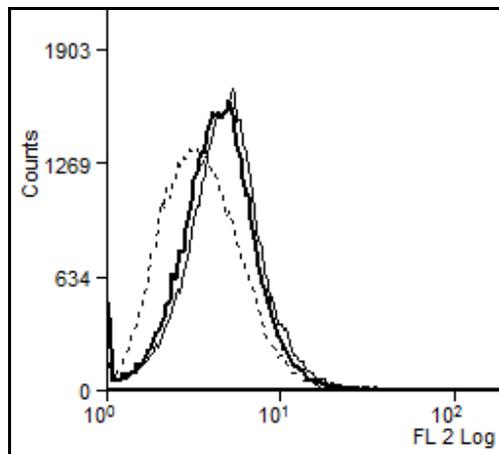


Figura 31(b): Expressão de CD86 em culturas de macrófagos tratados com LPS derivado de *B. cenocepacia*. -----: controles não tratados; — : LPS de *E. coli*; — : LPS de BC. Resultado representativo de três diferentes experimentos.

## **6. DISCUSSÃO**

Bactérias pertencentes ao CBC, descritas em sua essência como fitopatógenos (Burkholder, 1950), demonstraram-se adaptadas ao hospedeiro humano em trabalhos que datam dos anos 70 e 80 do século passado (Gilardi, 1971; Isles e col. 1984). Pouco tempo depois, consideradas como alguns dos principais microrganismos causadores de infecção em fibrose cística (Cunha e col. 2007; Kidd e col. 2003; Reik e col. 2005; Speert e col. 2002), ainda pouco se sabe sobre seus mecanismos de interação com o sistema imune do hospedeiro. A diferença entre os prognósticos dos portadores de fibrose cística, infectados por cepas pertencentes ao CBC, permanece pouco compreendida e pode refletir, em partes, as características dos isolados de bactéria e da interação entre o microrganismo e o hospedeiro. Muitos autores, incluindo trabalhos de colaboração de nosso grupo (Paiva e col. 2009 - Anexo 2), vêm estudando o papel de macrófagos no processo inflamatório. A importância de fagócitos profissionais na interação do sistema imune com bactérias Gram-negativas encontra-se já bem estabelecido, tendo papel central na progressão dos processos de infecção e de resposta imune (revisito em Janeway & Medzhitov, 2002 e em Benoit e col. 2008). Por outro lado, os microrganismos possuem diversas estratégias de regulação da resposta. De fato, a pressão seletiva do hospedeiro possibilitou que o SSTT de bactérias tenha se adaptado, ao longo do tempo, à interação com o sistema imune do hospedeiro, podendo levar nesta situação, à indução da resposta pró-inflamatória, ou a evasão da mesma (ou ambas as alternativas) (Revisito

em Coburn e col. 2007). Em *Burkholderia sp.* diversos fatores de virulência já foram descritos, sendo o SSTT e o LPS considerados como essenciais para sua interação com o hospedeiro. Por este motivo, neste trabalho avaliamos o papel destes dois fatores de virulência encontrados em *B. cenocepacia*, sobre os principais mecanismos de resposta funcional de macrófagos, bem como sobre a expressão de moléculas coestimulatórias do processo de ativação celular na superfície destas células.

Na padronização de nosso modelo de estudo, comparamos a resposta microbicida, através da liberação de NO, de macrófagos obtidos por lavagem peritoneal de camundongos BALB/c, com a resposta encontrada em culturas de macrófagos da linhagem Raw 264.7, derivada da mesma cepa de camundongos. Nossos resultados demonstraram que a linhagem celular foi capaz de produzir grandes quantidades de NO após o desafio com LPS, embora em menor quantidade se comparado às células *ex vivo*. Muitos autores vêm utilizando esta linhagem para o estudo da interação de células do sistema imune inato com diferentes microrganismos, avaliando a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como outros mediadores de inflamação, além da expressão de moléculas de superfície celular (Shi e col. 2009; Wu e col. 2009). De fato, Berghaus e colaboradores (2009) demonstraram que esta linhagem celular é uma ferramenta robusta para avaliação de resposta imune inata, após compará-la com outros tipos celulares, derivados de monócitos, comumente usados.

A resposta imune habitualmente encontrada após infecção por bactérias Gram-negativas caracteriza-se, principalmente, pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12, de

quimiocinas como CCL2, CCL5, CXCL8 e expressão aumentada de receptores de quimiocinas, como CCR7 (revisto em Cohen, 2002 e em Benoit e col. 2008). Sobretudo, sua maior resposta microbicida consiste na liberação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (revisto em Cohen, 2002). Em vias normais, a atividade inflamatória é modulada pela liberação de mediadores como IL-10, evitando complicações sistêmicas graves.

Considerando o caráter microbicida, microrganismos que sobrevivem à resposta de fagócitos necessitam de mecanismos que percebam e inativem o NO (Revisto em Fang, 2004). De fato, muitos microrganismos podem subverter ou resistir à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de mecanismos de evasão, supressão, inativação enzimática ou mecanismos de reparo celular. Os microrganismos são capazes de modular a resposta de macrófagos, seja reprimindo o processamento e a apresentação de antígenos (Revisto em Maksymowych & Kane, 2000), seja inibindo a secreção de substâncias pró-inflamatórias (Revisto em Rahman & McFadden, 2006) ou ainda dirigindo a apoptose de macrófagos ou neutrófilos (Zychlinsky e col. 1992; Revisto por De Leo, 2004), estratégias que podem resultar em menor produção/liberação de NO. Como exemplo, *Yersinia sp.* estimula a produção de IL-10, podendo inibir a produção desta substância microbicida (Sing e col. 2002). Além disto, muitas bactérias possuem mecanismos de detoxificação destas substâncias como catalases, superóxido dismutases, peroxidases, NO redutases, S-nitrosoglutathion redutases e peroxinitrito redutases (revisto em Fang, 2004).

Nossos resultados de infecção de macrófagos por *B. cenocepacia* corroboram o exposto pela literatura quanto à produção aumentada de

TNF- $\alpha$  e IL-10 após infecção por bactérias Gram-negativas. O trabalho de De Soyza e colaboradores (2004) demonstra que, embora não exista uma correlação estabelecida entre a origem da cepa de *Burkholderia* (humana, animal, solo, água, planta) e sua potencial indução de resposta inflamatória, apenas microrganismos oriundos de casos clínicos de infecção em fibrose cística foram capazes de levar a um significativo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, refletindo a pressão seletiva sofrida pelo microrganismo no processo de infecção do hospedeiro. Entretanto, nossos achados mostram que nas culturas infectadas a bactéria é capaz de regular ativamente a produção de NO, uma vez que o cultivo de macrófagos com bactérias inativadas pelo calor induziu a produção de altos níveis desta substância. Saini e colaboradores (1999) também encontraram maior produção de TNF- $\alpha$  e redução na liberação de NO em cultura de macrófagos infectados por *B. cepacia* genomovar VI (*B. dolosa*) e genomovar V (*B. vietnamiensis*). Contudo, nossos resultados utilizando bactérias inativadas pelo calor contrastam com os dados de Saini e colaboradores (1999). Nesse trabalho, o tratamento com bactérias inativadas faz com que a liberação de TNF- $\alpha$  e NO retorne aos níveis basais, sugerindo a necessidade de bactérias viáveis não só para que ocorra a modulação, mas para que também ocorra a ativação da liberação de substâncias pró-inflamatórias. No entanto, o potencial inflamatório de suspensões de bactérias Gram-negativas (Tansini & Medeiros, 2008; Wang e col. 2008; revisto em Plüddemann e col. 2006), inclusive espécies do CBC (West e col. 2008; revisto em De Soyza e col. 2008) inativadas por calor encontra-se bem estabelecido, principalmente na indução de TNF- $\alpha$  e NO fundamentando nossos resultados. Posteriormente, MacDonald & Speert (2008)

utilizando a cepa C6433 de *B. cenocepacia* obtiveram resultados semelhantes aos nossos, com significativa produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 por fagócitos infectados pela bactéria. Entretanto, assim como no trabalho de Saini e colaboradores (1999), quando os autores trataram as células com bactérias inativadas pelo calor não houve produção aumentada destas citocinas. Isto talvez se deva pelo fato de que os autores utilizaram microorganismos inativados por 10min à 56°C, enquanto nós usamos em nossos experimentos bactérias inativadas à 100°C por 30min (onde garante-se a inativação da célula mas pode existir maior liberação de componentes do microorganismo). No tocante à modulação da produção de NO, sabe-se que *Salmonella enterica* utiliza a flavohemoglobina HmpA para detoxificação desta substância microbicida (Stevanin e col. 2002) e *B. cenocepacia* J2315 possui em seu genoma uma região homóloga *hmpA* (Holden e col. 2008). Contudo, estudos que foquem em quais momentos da sinalização/produção de NO o microrganismo possui papel modulador ainda se fazem necessários.

Nossos resultados de avaliação da expressão de moléculas coestimulatórias da ativação celular após a infecção por *B. cenocepacia* são corroborados pelo trabalho de MacDonald e Speert (2008), onde os autores também demonstram que a bactéria é capaz de induzir a super-expressão destas moléculas, como CD80 e CD86.

Considerando o potencial papel regulador do SSTT, nossos resultados demonstram que nem este sistema de secreção encontrado em *B. cenocepacia* e, conseqüentemente, nenhuma das proteínas efetoras entregues exclusivamente através deste mecanismo, parecem possuir papel central na modulação da resposta microbicida induzida pela infecção, uma vez que a cepa SSTT mutante induziu resposta

funcional semelhante à encontrada pela infecção pela cepa selvagem. Entretanto, moléculas de superfície como MHC-II, CD40, CD80 e CD86 encontraram-se significativamente diminuídas nas células infectadas pela cepa SSTT mutante, indicando uma possível ação deste sistema sobre a ativação/super-expressão destas moléculas. Uma possibilidade é que o SSTT de *B. cenocepacia* entregue também proteínas com caráter inflamatório, uma vez que, como em outras infecções por microrganismos patogênicos capazes de manipular vias de sinalização do hospedeiro, a bactéria poderia utilizar-se da disseminação da inflamação para colonizar diferentes tecidos do hospedeiro. Esta teoria pode explicar a maior eficiência no "clearance" da cepa mutante, descrito por Tomich e colaboradores (2003) utilizando modelo murino de infecção, uma vez que esta proteína secretada auxiliaria também à atividade inflamatória e, conseqüentemente, a manutenção da infecção pelo microrganismo. Importante que se ressalte que fatores dependentes do hospedeiro também influenciam a instalação da infecção por *B. cenocepacia*, uma vez que em macrófagos infectados, deficientes de CFTR, a acidificação do vacúolo e a formação do fagolisossomo ocorrem em menor magnitude se comparados aos macrófagos controles (Lamothe & Valvano 2008). Nesse sentido, como o modelo empregado por Tomich e colaboradores (2003) não reproduzia as alterações imunológicas encontradas em portadores de mutação no CFTR (revisto em Machen, 2006 e em Nichols e col. 2008), a resposta ao microrganismo foi mais acentuada do que a naturalmente apresentada em casos de fibrose cística.

Contudo, como já comentado, outros sistemas secretores ou estruturas bacterianas podem estar envolvidos na infecção por este

microrganismo. De fato, a cepa J2315 de *B. cenocepacia* induz a produção de CXCL8/IL-8 por culturas de células epiteliais pulmonares e monócitos através da liberação de exoprodutos (Palfreyman e col. 1997), e induz apoptose de fagócitos pela produção de toxina hemolítica (Hutchinson e col. 1998). Além disto, *Y. enterocolitica*, bactéria com mecanismos reguladores parecidos aos encontrados em *Burkholderia sp.*, é capaz de regular a expressão de moléculas coestimulatórias de ativação celular, como MHC-II, CD45, CD80 e CD86, além de reduzir a produção de CXCL1/KC, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12, através de uma proteína efetora translocada por um SSTT, a YopP (Erfurth e col. 2004). Em *Yersinia sp.*, as proteínas Yop (Yersinia outer proteins) translocadas pelo SSTT são capazes de modular a resposta do hospedeiro, por mecanismos que inibem a fagocitose (Aepfelbacher e col. 1999), ou o burst respiratório em fagócitos profissionais (Andersson e col. 1996). *P. aeruginosa*, bactéria oportunista com alta relevância médica pela infecção em hospedeiros imunocomprometidos, incluindo portadores de fibrose cística, utiliza proteínas efetoras injetadas por SSTT, de forma bastante parecida àquela encontrada em *Yersinia sp.* (Frank, 1997 e Frithz-Lindsten e col. 1997) Nessas bactérias relacionadas à *Burkholderia sp.*, como *P. aeruginosa* e *Y. enterocolitica*, existe homologia entre as proteínas envolvidas no processo de translocação, como as "outer proteins" B, D e N (Yahr e col. 1997), além do fato de que proteína exportada ExoS de *P. aeruginosa*, associada ao dano epitelial e disseminação da infecção (Kang e col. 1997), possui também similaridades estruturais e funcionais com a YopE de *Yersinia sp.* (Kullich e col. 1994).

Neste trabalho, demonstramos que bactérias vivas, bem como inativadas à 100°C, foram melhores estimuladores de produção de citocinas do que o LPS. Esses resultados embora sejam corroborados pelo posterior trabalho de MacDonald & Speert (2008), contrastam com os obtidos por Zughair e colaboradores em 1999, utilizando ensaios com macrófagos estimulados por LPS de *B. cenocepacia*. Uma possibilidade é a de a molécula utilizada pelo autor em 1999 ter sinalizado por outras vias além de CD14/TLR4, uma vez que a mesma não se encontrava em sua forma purificada, diferentemente da utilizada em nosso trabalho.

Em *B. cepacia* a molécula de LPS pode apresentar duas glicosaminas bifosforiladas, ligadas a ácidos 3-hidroxi-hexadecanóicos e com a seqüência 4-amino-4-deoxiarabinose (Ara4N) em ambos os fosfatos, além de um core oligossacarídico Ara4N, ácido d-glicero-d-talo-oct-2-ulosônico (Ko) e ácido 3-deoxi-d-mano-oct-2-ulosônico (Kdo) (Gronow e col. 2003). De fato, a seqüência trissacarídica Ara4N-KO-KDO tem sido demonstrada em moléculas de LPS de diferentes espécies de *Burkholderia* e parece ser um fator exclusivo deste gênero (Isshiki e col. 1998, Gronow e col. 2003; Silipo e col. 2006; revisto em De Soyza e col. 2008).

Nossas análises foram realizadas através da determinação dos ácidos graxos do lipídio A e dos açúcares presentes na molécula de LPS da cepa J2315 de *B. cenocepacia*. Tendo em vista o resultado sobre o perfil de migração das moléculas do LPS em gel de poliacrilamida na presença de SDS, podemos afirmar que neste isolado da cepa J2315 de *B. cenocepacia* as cadeias polissacarídicas do LPS são pouco extensas. Nossos resultados do perfil de ácidos graxos do LPS de *B. cenocepacia*

indicam a presença de ácido mirístico, 3-hidroxi-mirístico e 3-hidroxi-palmítico, característicos do perfil de ácidos graxos para o gênero *Burkholderia* (Galbraith e col. 1999), corroborando os resultados de De Soyza e colaboradores (2004) e de Silipo e colaboradores (2007) utilizando também a cepa J2315. Como comentado em tópico apropriado, o lipídio A é o principal componente do LPS com atividade imunoestimulatória. Porém, diferenças em sua composição podem refletir sua atividade biológica. De fato, o lipídio A da cepa J2315 possui grande heterogeneidade na composição de ácidos graxos, em geral tetra-acilados, apresentando normalmente apenas um resíduo Ara4N (Silipo e col. 2007). Por outro lado, cepa LMG12614 de *B. cenocepacia* possui estrutura do lipídio A mais homogênea, com espécies penta-aciladas e podendo apresentar um ou dois resíduos Ara4N (revisto em De Soyza, 2008). Contudo, outras porções da molécula parecem ser importantes na interação com o hospedeiro. Loutet e colaboradores (2006) demonstrou que, em *B. cenocepacia*, a resistência a peptídeos microbicidas e a sobrevivência no hospedeiro estavam associados à produção de um LPS apresentando lipídio A e core oligossacarídico (independente da presença do antígeno O).

A caracterização glicídica do LPS da cepa J2315 apresentada neste trabalho apresenta unidades de ramnose, galactose, glucose e heptose, corroborando os achados de Isshiki e colaboradores (2003), com LPS obtido de *B. cepacia* cepa GIFU 645<sup>T</sup> e de Ortega e colaboradores (2005), Silipo e colaboradores (2007) e Masoud e colaboradores (2009), utilizando a mesma cepa de *B. cenocepacia* foco de nossos estudos. Nossos resultados demonstram que o LPS caracterizado neste trabalho induz pouca atividade inflamatória em comparação ao LPS de *E. coli*, em

uma razão aproximada de 1:100 em massa, ou seja, para obtenção de um efeito semelhante ao LPS controle, foi necessário a utilização de LPS de *B. cenocepacia* 100 vezes mais concentrado. De fato, embora os diferentes trabalhos que corroboram nossos resultados de atividade inflamatória (De Soyza e col. 2004; Silipo e col. 2007) não tenham avaliado o efeito dose-resposta, como fizemos, a atividade proinflamatória do LPS parece ocorrer da mesma maneira.

Os diferentes resultados encontrados na literatura, tanto de caracterização química do LPS e sua atividade biológica, quanto de indução de resposta pela infecção por diferentes cepas oriundas do clone ET-12 de *B. cenocepacia*, refletem a variabilidade deste microrganismo ao microambiente, tanto no hospedeiro com fibrose cística como em cultura nos repositórios de referência. De fato, Smith e colaboradores (2006) demonstraram que *P. aeruginosa* adaptou-se à interação com o hospedeiro fibrose-cístico e o genoma da cepa J2315 (oriunda de caso clínico de fibrose cística) de *B. cenocepacia* apresenta pseudogenes em determinantes de virulência, evidenciando sua adaptação a estes hospedeiros humanos (Holden e col. 2009).

Os diversos mecanismos de interação presentes em *B. cenocepacia* fazem com que, embora a persistência de infecções por bactérias do genômovar III seja menor se comparada a infecções por outras cepas do CBC, (Chu e col. 2002), *B. cenocepacia* seja um dos principais causadores de morbi-mortalidade associados à fibrose cística. Nesse sentido propomos, de maneira resumida, que o modelo de infecção por *B. cenocepacia* em pacientes que sofrem de fibrose cística ocorra da seguinte forma: Transmissão da bactéria através de contatos intra ou extra-hospitalares (sociais) que, facilitada pela deficiência fisiológica do

paciente, irá colonizar suas vias aéreas. Como o muco espesso dificulta não só a antibiótico-terapia, bem como a resposta imune, já comprometida neste tipo de paciente, o microrganismo, auxiliado em algumas cepas pela baixa atividade inflamatória de suas estruturas e pela característica de crescimento vertical de seu biofilme, sofre pouca pressão seletiva do meio. Provavelmente, o sistema de *quorum sensing* servirá para indicar o momento onde a fase exponencial de replicação do microrganismo terá chegado ao seu pico e desencadeará um processo de infecção celular exacerbado, onde os sistemas secretores liberarão diferentes proteínas efetoras, causando os mais diversos efeitos, como inflamatórios (para recrutamento de células onde a bactéria irá replicar-se) e antiinflamatórios, evitando assim a montagem da resposta imune adequada. Além disto, o microrganismo pode causar o relaxamento das "tight junctions" das células epiteliais pulmonares e atravessá-las, ganhando a corrente sanguínea, podendo assim colonizar outros órgãos, difundindo a contaminação, causar bacteremia e levando ao quadro patológico descrito para esta infecção.

## 7. CONCLUSÃO

Infecção por *B. cenocepacia*, assim como o cultivo com bactérias inativadas por calor, induz a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-10.

*B. cenocepacia* é capaz de modular ativamente a liberação de NO de macrófagos.

A cepa de *B. cenocepacia* mutante para o SSTT também é capaz de modular esta resposta microbicida, demonstrando que o SSTT encontrado nesta bactéria não possui papel central nesta modulação.

A cepa de *B. cenocepacia* selvagem induz maior expressão de moléculas coestimulatórias se comparada à cepa mutante para SSTT, sugerindo que proteínas secretadas por esta estrutura levem à sinalização em macrófagos.

LPS produzido pela cepa J2315 de *B. cenocepacia* apresenta ramnose, glucose, heptose, KDO e os seguintes ácidos graxos: ácido mirístico, 3-hidroximirístico e 3-hidroxipalmítico.

LPS oriundo de *B. cenocepacia* leva a uma resposta funcional dependente de dose por macrófagos, caracterizada pela liberação de NO, TNF- $\alpha$  e IL-10, em menores quantidades se comparado ao LPS de *E. coli*.

LPS de *B. cenocepacia* induz menor expressão de moléculas de ativação em comparação ao LPS de *E. coli*.

## **8. PERSPECTIVAS**

Desenvolver estudos que objetivem avaliar qual via de sinalização da produção de NO está sendo modulada pelo microrganismo. Além disto, encontramos-nos aguardando a avaliação do "Comitê de Ética no Uso de Animais" (CEUA) da FIOCRUZ para realização de experimentos em animais modelo de fibrose cística e seus controles, visando avaliar a infecção pelas cepas de bactérias utilizadas neste estudo e o tratamento com o LPS, visando um melhor entendimento da relação microrganismo/fibrose cística.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aepfelbacher, M.; Zumbihl, R.; Ruckdeschel, K. Jacobi, C. A.; Barz, C. & Heesemann, J. The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. **Biol. Chem.** **380**: 795-802.

Akabas, M. H. 2000. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of na epithelial chloride channel. **J. Biol. Chem.** **6**: 3729-3732.

Anderson, K. V.; Jürgens, G. & Nüsslein-Volhard, C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. **Cell** **42**: 779-789.

Andersson, K.; Carballeira, N.; Magnusson, K. E.; Persson, C.; Stendahl, O.; Wolf-Watz, H. & Fällman, M. 1996. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signaling associated with phagocytosis. **Mol. Microbiol.** **20**: 1057-1069.

Annane, D.; Bellissant, E. & Cavillon, J. M. 2005. Septic shock. **Lancet** **365**: 63-78.

Aschauer, I.; Grob, A.; Hildebrandt, J.; Schutze, E. & Stutz, P. 1990. Highly purified lipid X is devoid of immunostimulatory activity. Isolation and characterization of immunostimulating contaminants in a batch of synthetic lipid X. **J. Biol. Chem.** **265**: 9159-9164.

Benoit, M.; Desnues, B. & Mege, J. L. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. **J. Immunol.** **181**: 3733-3739.

Bergaus, L. J.; moore, J. N.; Hurley, D. J.; Vandenplas, M. L.; Fortes, B. P; Wolfert, M. A. & Boons, G. L. 2009. Innate immune response of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3 and 4. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. (artigo on line – em impressão).**

Bevivino, A.; Peggion, V.; Chiarini, L.; Tabacchioni, S.; Cantale, C. & Dalmastrri, C. 2005. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. **Res. Microbiol.** **156**: 974-983.

Blackburn, L.; Brownlee, K.; Conway, S. & Denton, M. 2004. Cepacia syndrome with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. **J. Cyst. Fibros.** **3**: 133-134.

Bottone, E. J., Douglas, S. D.; Rausen, A. R. & Keusch, G. T. 1975. Association of *Pseudomonas cepacia* with Chronic Granulomatous Disease. **J. Clin. Microbiol.** **1**: 425-428.

Boucher, R. C. 1998. ASL in normal and CF subjects is isotonic: Evidence for the isotonic volume absorption/mucus clearance hypothesis for the pathogenesis of early CF lung disease. **Pediatr. Pulmonol. Suppl** **17**: 132.

Brackman, G.; Hillaert, U.; Van Calenbergh, S.; Nelis, H. J. & Coenye, T. 2009. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. **Research in Microbiol** **160**: 144-151.

Britton, W. J.; Roche, P. W. & Winter, N. 1994. Mechanism of persistence of mycobacteria. **Trends Microbiol.** **2**: 284-288.

Burkholder, W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathol.** **40**: 115-118.

Bylund, J.; Burgess, L. A.; Cescutti, P.; Ernst, R. K. & Speert, D. P. 2005. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.** **281**: 2526-2532.

Cabello, G. M. K.; Moreira, A. F.; Horovitz, D.; Correia, P.; Santa Rosa, A.; Llerena-Jr. J.; Greg, J.; Grody, W. W.; Degraeve, W. M.; Fernandes, O. & Cabello, P. H. 1999. Cystic fibrosis: Low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. **Hum. Biol.** **71**: 189-196.

Caroff, M. & Karibian, D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research** **338**: 2431-2447.

Castorena, G.; Mugica, V.; Le Borgne, S.; Acuña, M. E.; Bustos-Jaimes, I. & Aburto, J. 2006. Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia sp.* Strain IMP5GC. **J. Appl. Microbiol.** **100**: 739-745.

Centanini, E. 1894. Untersuchungen über das Infektionsfieber—das Fiebergift der Bakterien. **Dtsch. Med. Wochenschr.** **20**, 148-153.

Chailan, F.; Le Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong, Y. H.; Grimont, P.; Saliot, A. & Oudot, J. 2004. Identification and biodegradation potential

of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Res. Microbiol.** **155**: 587-595.

Chiarini, L.; Cescutti, P.; Drigo, L.; Impallomeni, G.; Herasimenka, Y.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S.; Manno, G.; Zanetti, F & Izzo, R. 2004. Exopolysaccharides produced by *Burkholderia cenocepacia* recA lineages IIIA and IIIB. **J. Cyst. Fibros.** **3**: 165-172.

Chiarini, L.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S. & Visca, P. 2006. Burkholderia Cepacia Complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends Microbiol.** **14**: 277-286.

Chierakul, W.; Wuthiekanum, V.; Chaowagul, W. Amornchai, P.; Cheng, A. C.; White, N. J.; Day, N. P. & Peacock, S. J. 2005. Short Report: disease severity and outcome of melioidosis in HIV coinfecting individuals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **73**: 1164-1166.

Che, K. K.; Davidson, D. J.; Halsey, T. K.; Chung, J. W. & Speert, D. P. 2002. Differential persistence among genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in a murine model of pulmonary infection. **Infect. Immun.** **70**: 2715-2720.

Chung, J. W.; Altman, E.; Beveridge, T. J. & Speert, D. P. 2003. Colonial morphology of Burkholderia Cepacia Complex genomovar III: Implications in exopolysaccharide production, pilus expression, and persistence in the mouse. **Infect. Immun.** **71**: 904-909.

Coburn, B.; Sekirov, I & Finlay, B. 2007. Type III secretion systems and disease. **Clin. Microbiol. Rev.** **20**: 535-549

Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** **420**: 885-891.

Coenye, T.; Mahenthiralingam, E.; Henry, D.; LiPuma, J. J.; Laevens, S.; Gillis, M.; Speert, D. P. & Vandamme, P. 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the Burkholderia Cepacia Complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **Int. J. Evol. Microbiol.** **51**: 1481-1490.

Coenye, T.; Vandamme, P.; Govan, J. R. W. and LiPuma, J. J. 2001. Taxonomy and identification of the Burkholderia Cepacia Complex. **J. Clin. Microbiol.** **39**: 3427-36.

Coenye, T. & Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environ. Microbiol** **5**: 719-729.

- Corbett, C. R.; Burtnick, M. N.; Kooi, C.; Woods, D. E. & Sokol, P. A. 2003. An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology** **149**: 2263-2271.
- Cornelis, G. R. & Van Gijsegem, V. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.** **54**: 735-775.
- Cotran, R. S. & Pober, J. S. 1990. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.** **1**: 225-235.
- Courtney, J. M.; Dunbar, K. E. A.; McDowell, A.; Moore, J. E.; Warke, T. J.; Stevenson, M. & Elborn, J. S. 2004. Clinical outcome of Burkholderia Cepacia Complex infection in CF adults. **J. Cystic Fibrosis** **3**: 93-98.
- Cunha, M. V.; Pinto-de-Oliveira, A. Meirinhos-Soares, L.; Salgado, M. J.; Melo-Cristino, J.; Correia, S.; Barreto, C. & As-Correia, I. 2007. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. **J. Clin. Microbiol.** **45**: 1628-1663.
- DeLeo, F. R. 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis** **9**: 399-413.
- De Soyza, A.; Ellis, C. D.; Khan, C. M.; Corris, P. A. & Demarco de Hormaeche, R. 2004. *Burkholderia cenocepacia* lipopolysaccharide, lipid A, and proinflammatory activity. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **170**: 70-77.
- De Soyza, A.; Silipo, A.; Lanzetta, R.; Govan, J. R. & Molinaro A. 2008. Chemical and biological features of *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharides. **Innate Immun.** **14**:127-144.
- Döring, G. & Gulbins, E. 2009. Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. **Cell. Microbiol.** **11**: 208-216.
- Dorn, B. R.; Dunn, W. A. & Progulske-Fox, A. 2002. Bacterial interactions with the autophagic pathway. **Cell. Microbiol.** **4**: 1-10.
- Erfurth, S. E.; Gröbner, S.; Kramer, U.; Gunst, D. S.; Soldanova, I.; Schaller, M.; Autenrieth, I. B. & Borgmann, S. 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. **Infect. Immun.** **72**: 7045-7054.

- Engledow, A. S.; Medrano, E. G., Mahenthalingam, E.; LiPuma, J. J. & Gonzalez, C. F. 2004, Involvement of a plasmid-encoded type IV secretion system in the plant tissue watersoaking phenotype of *Burkholderia cenocepacia*. **J. Bacteriol.** **186**: 6015-6024.
- Evans, E.; Poxton, I. R. & Govan, J. R. 1999. Lipopolysaccharide chemotypes of *Burkholderia cepacia*. **J. Med. Microbiol.** **48**: 1-8.
- Fairbanks, G. ; Steck, T. L. & Wallach, D. F. 1971. Eletroforetic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochem. J.** **10**: 2606-2616.
- Fang, F. C. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat. Rev. Microbiol.** **2**: 820-832.
- Fath, M. J. & Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. **Microbiol. Rev.** **57**: 995-1017.
- Fejer, G.; Szalay, K.; Gyory, I.; Fejes, M.; Kusz, E.; Nedieanu, S.; Páli, T.; Schmidt, T.; Siklódi, B.; Lázár, G. Jr.; Lázár, G. Sr. & Duda, E. 2005. Adenovirus infection dramatically augments lipopolysaccharide-induced TNF production and sensitizes to lethal shock. **J. Immunol.** **175**: 1498-1506.
- Finlay, B. B. & Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **61**: 136-169.
- Fiore, A.; Laevens, S.; Bevivino, A.; Dalmastrri, C.; Tabacchioni, S. Vandamme, P. & Chiarini, L. 2001. Burkholderia Cepacia Complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environ. Microbiol.** **3**: 137-143.
- FitzSimmons, S. C. 1993. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **J. Pediatr.** **123**: 172.
- Fortune, S. M.; Solache, A.; Jaeger, A.; Hill, P. J.; Belisle, J. T.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. & Ernst, J. D. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage response to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and independent mechanisms. **J. Immunol.** **172**: 6272-6280.
- Frank, D. W. 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **26**: 621-629.

Frithz-Lindsten, E. Du, Y.; Rosqvist, R. & Forsberg, A. 1997. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. **Mol. Microbiol.** **25**: 1125-1139.

Galanos, C.; Luderitz, O.; Rietschel, E. T.; Westphal, O.; Brade, H.; Brade, L.; Freudenberg, M.; Schade, U.; Imoto, M. & Yoshimura, H. 1985. Synthetic and natural *E. coli* free lipid A express identical endotoxic activities. **Eur. J. Biochem.** **148**: 1-5.

Galbraith, L.; Jonsson, M. H.; Rudhe, L. C. & Wilkinson, S. G. 1999. Lipids and fatty acids of *Burkholderia* and *Ralstonia* species. **FEMS Microb. Lett.** **173**: 359-364.

Garcia-DelPortillo, F. & Finlay, B. B. 1995. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. **Trends Microbiol.** **3**: 373-380.

Gilardi, G. L. 1971. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens. **Appl. Microbiol.** **21**: 414-419.

Gilligan, P. H.; Gage, P. A.; Bradshaw, L. M.; Schidlow, D. V. & DeCicco, B. T. 1985. Isolation medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. **J. Clin Microbiol.** **22**: 5-8.

Gillis, M.; Van Van, T.; Bardin, R.; Goor, M.; Hebbar, P.; Willems, A.; Segers, P.; Kersters, K.; Heulin, T. & Fernandez, M. P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **45**: 274-289.

Glauser, M. P.; Zanetti, G., Baumgartner, J. D. & Cohen, J. 1991. Septic shock: pathogenesis. **Lancet** **338**: 732-736.

Gouin, E.; Welch, M. D. & Cossart, P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. **Curr. Opin. Microbiol.** **8**: 35-45.

Govan, J. R. W.; Brown, P. H.; Maddison, J.; Doherty, C.; Nelson, C. J.; Dodd, M.; Greening, A. P. & Webb, A. K. 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis patients. **Lancet** **342**: 15-19.

Govan, J. R.; Hughes, J. E. & Vandamme, P. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. **J. Med. Microbiol.** **45**: 395-407.

Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P.; Wishnok, J. S. & Tannembaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** **126**: 131-138.

Griffin Jr., F. M.; Griffin, J. A.; Leider, J. E. & Silverstein, S. C. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. **J. Exp. Med.** **142**: 1263-1282.

Griffin Jr., F. M.; Griffin, J. A.; Silverstein, S. C. 1976. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. **J. Exp. Med.** **144**: 788-809.

Gronow, S.; Noah, C.; Blumenthal, A.; Lindner, B. & Brade, H. 2003. Construction of a deep-rough mutant of *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 and characterization of its chemical and biological properties. **J. Biol. Chem.** **278**: 1645-1655.

Harding, C. V.; Song, R.; Griffin, J.; France, J.; Wick, M. J.; Pfeifer, J. D. & Geuze, H. J. 1995. Processing of bacterial antigens for presentation to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. **Infect. Agent. Dis.** **4**: 1-12.

Hart, P. D.; Young, M. R.; Gordon, A. H. & Sullivan, K. H. 1987. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. **J. Exp. Med.** **166**: 933-946.

Heintzen, R. A.; Scidmore, M. A.; Rockey, D. D. & Hackstadt, T. 1996. Differential interactions with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetti* and *Chlamydia trachomatis*. **Infect. Immun.** **64**: 796-809.

Heremans, H.; Van Damme, J.; Dillen, C.; Dijkmans, R. & Billiau, A. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Schwartzman-like shock reactions in mice. **J. Exp. Med.** **171**: 1853-1869.

Hisano, M.; Sugawara, K.; Tatsuzawa, O.; Kitagawa, M.; Murashima, A. & Yamagushi, K. 2007. Bacteria-associated haemophagocytic syndrome

and septic pulmonary embolism caused by *Burkholderia Cepacia* Complex in a woman with chronic granulomatous disease. **J. Med. Microbiol.** **56**: 702-705.

Hitchcock, P. J.; Leive, L.; Mäkela, P. H.; Rietschel, E. T.; Strittmatter, W. & Morrison, D. C. 1986. Lipopolysaccharide nomenclature – Past, present and future. **J. Bacteriol.** **166**: 699-705.

Holden, M. T.; Titball, R. W.; Peacock, S. J.; Cerdano-Tarraga, A. M.; Atkins, T.; Crossmann, L. C.; Pitt, T.; Churcher, C.; Mungall, K.; Bentley, S. D.; Sebahia, M.; Thomson, N. R.; Bason, N. Beacham, I. R.; Brooks, K.; Brown, K. A.; Brown, N. F.; Challis, G. L.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.; Cronin, A.; Crosset, B.; Davis, p.; DeShazer, D.; Feltwell, T.; Fraser, A.; Hance, Z.; Hauser, H.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Keith, K. E.; Maddison, M.; Moule, S.; Price, C.; Quail, M. A.; Rabinowitsch, E.; Rutherford, K.; Sanders, M.; Simmons, M.; Songsivilai, S.; Stevens, K.; Tumapa, S.; Vesaratchavest, M.; Whitehead, S.; Yeats, C.; Barrel, B. G.; Oyston, P. C. & Parkhill, J. 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **101**: 14240-14245.

Holden, M. T. G.; Seth-Smith, H. M. B.; Crossman, L. C.; Sebahia, M.; Bentley, S. D.; Cerdeño-Tárraga, A. M.; Thomson, N. R.; Bason, N.; Quail, M. A.; Sharp, S.; Cherevach, I.; Churcher, C.; Goodhead, I.; Hauser, H.; Holroyd, N.; Mungall, K.; Scott, P.; Walker, D.; White, B.; Rose, H.; Iversen, P.; Mil-Homens, D.; Rocha, E. P. C.; Fialho, A. M.; Baldwin, A.; Dowson, C.; Barrel, B. G.; Govan, J. R.; Vandamme, P.; Hart, A.; Mahenthiralingam, E. & Parkhill, J. 2009. The Genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an Epidemic Pathogen of Cystic Fibrosis Patients. **J. Bacteriol.** **191**: 261-277.

Hoshino, K.; Takeuchi, O. & Kawai, T. 1999. Toll like receptor 4 (TLR-4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR-4 as the LPS gene product. **J. Immunol.** **162**: 3749-3752.

Huang, F.; Yamaguchi, A.; Tsuchiya, N.; Ikawa, T.; Tamura, N.; Virtala, M. M.; Gransfors, K.; Yasaei, P. & Yu, D. T. . 1997. Induction of alternative splicing of HLA-B27 by bacterial invasion. **Arth. Rheum.** **40**: 694-703.

Huber, B.; Riedel, K.; Hentzer, M.; Heydorn, A.; Gotschlich, A.; Givskov, M.; Molin, S. & Eberl, L. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology** **147**: 2517-2528.

Huber, B. Riedel, K.; Köthe, M.; Givskov, M.; Molin, S. & Eberl, L. 2002. Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. **Mol. Microbiol.** **46**: 411-426.

Hueck, C. J. 1998. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **62**: 379-433.

Hughes, E. A.; Hammond, C. & Cresswell, P. 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**: 1896-1901.

Hutchinson, M. L.; Poxton, I. R. & Govan, J. R. W. 1998. *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. **Infect. Immun.** **66**: 2033-2039.

Isshiki, Y.; Kawahara, K. & Zähringer, U. 1998. Isolation and characterization of disodium (4-amino-4-deoxy-beta-L-arabinopyranosyl)-(1-->8)-(D-glycero-alpha-D-talo-oct-2-ulopyranosyl)-(2-->)-(methyl 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosid)onate from the lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia*. **Carbohydr. Res.** **313**: 21-27.

Isshiki, Y.; Zähringer, U. & Kawahara, K. 2003. Structure of the core-oligosaccharide with a characteristic D-glycero- $\alpha$ -D-talo-oct-2-ulopyranosyl-(2-->4)-3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosyl [Kdo] disaccharide in the lipopolysaccharide from *Burkholderia cepacia*. **Carbohydr. Res.** **338**: 2659-2666.

Isles, A.; MacCluskey, I.; Corey, M.; Gold, R.; Prober, C.; Fleming, P. & Levinson, H. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis; an emerging problem. **J. Pediatr.** **104**:206-210.

Janeway, C. A. & Medzhitov, R. 2002. Innate Immune Recognition. **Annu. Rev. Immunol.** **20**: 197-216.

Joiner, K. A.; Schmetz, M. A.; Goldman, R. C.; Leive, L. & Frank, M. M. 1984. Mechanism of Bacterial Resistance to Complement-Mediated Killing: Insert C5b-9 Correlates with Killing for *Escherichia coli* O111B4 Varying in O-Antigen Capsule and O-Polysaccharide Coverage of Lipid A Core Oligosaccharide. **Infect. Immun.** **45**: 113-117.

Jonsson, V. 1970. Proposal of a new species *Pseudomonas Kingii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **20**: 255-257.

Kang, P. J.; Hauser, A. R.; Apodaca, G.; Fleiszig, S. M.; Wiener-Kronish, J.; Mostov, K. & Engel, J. N. 1997. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. **Mol. Microbiol.** **24**: 1249-1262.

Kent, G.; Iles, R.; Bear, C. E.; Huan, L. J.; Griesenbach, U.; McKerlie, C.; Frndova, H.; Ackerley, C.; Gosselin, D.; Radzioch, D.; O'Brodoovich, H.; Tsui, L. C. & Buchwald, M. 1997. Lung disease in mice with cystic fibrosis. **J. Clin. Invest.** **100**: 3060-3069.

Kidd, T. J.; Bell, S. C. & Coulter, C. 2003. Genomovar diversity amongst *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Australian adult cystic fibrosis unit. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis** **22**: 434-437.

Kulich, S. M.; Yahr, T. L.; Mende-Mueller, M.; Barbieri, J. T. & Frank, D. W. 1994. Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (ExoS) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388. **J. Biol. Chem.** **269**: 10431-10437.

Lamothe, J.; Huynh, K. K.; Grinstein, S. & Valvano, M. A. 2006. Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. **Cell. Microbiol.** **9**: 40-53.

Lamothe, J. & Valvano, M. A. 2008. *Burkholderia cenocepacia*-induced delay of acidification and phagolysosomal fusion in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-defective macrophages. **Microbiology** **154**: 3825-3834.

Landry, R. M.; An, D.; Hupp, J. T.; Singh, P. K. & Parsek, M. R. 2006. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. **Mol. Microbiol.** **59**: 142-151.

Lefebvre, M. D. & Valvano, M. A. 2001. *In vitro* resistance of *Burkholderia cepacia* isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. **Microbiology** **147**: 97-109.

Lemes, G. A.; Kersanach, R.; da S Pinto, L.; Dellagostin, O. A. Yunes, J. S. & Matthiensen, A. 2007. Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a south Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **23**:

Lewenza, S.; Conway, B.; Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. **J. Bacteriol.** **181**: 748-765.

Lim, J.; Lee, T. H.; Nahm, B. H.; Choi, Y. D.; Kim, M. & Hwang, I. 2009. Complete Genome Sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. **J. Bacteriol.** **191**: 3758-3759.

LiPuma, J. J.; Dasen, S. E.; Nielson, D. W.; Stern, R. C. & Stull, T. L. 1990. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. **Lancet** **336**: 1094-1096.

Lipuma, J. J.; Dulaney, B. J.; McMenamin, J. D.; Whitby, P. W.; Stull, T. L.; Coenye, T. & Vandamme, P. 1999. Development of rRNA-based PCR assays for identification of Burkholderia Cepacia Complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 3167-3170.

McClellan, S. & Callaghan, M. 2009. *Burkholderia cepacia* complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. **J. Med. Microbiol** **58**: 1-12.

MacDonald, K. L. & Speert, D. S. 2008 Differential modulation of innate immune cell functions by the Burkholderia cepacia complex: Burkholderia cenocepacia but not Burkholderia multivorans disrupts maturation and induces necrosis in human dendritic cells. **Cell. Microbiol.** **10**: 2138-2149.

Machen, T. E. 2006. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** **291**: 218:230.

Markey, K. M.; Glendinning, K. J.; Morgan, J. A.; Hart, C. A. & Winstanley C. 2006. *Caenorhabditis elegans* killing assay as an infection model to study the role of type III secretion in *Burkholderia cenocepacia*. **J. Med. Microbiol** **55**: 967-969.

Masoud, H.; Perry, M. B.; Brisson, J. R.; Uhrin, D.; Li, J. & Richards, J. 2009. Structural elucidation of the novel core oligosaccharide from LPS of *Burkholderia cepacia* serogroup O4. **Glycobiology** **19**: 462-471.

Matousek, M. P.; Nedrud, J. G.; Cieplak, Jr. W. & Harding, C. V. 1998. Inhibition of class II major histocompatibility complex antigen processing by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin requires an enzymatically active a subunit. **Infect. Immun.** **66**: 3480-3484.

Millar, F. A.; Simmonds, N. J. & Hodson, M. E. 2009. Trends in pathogens colonizing the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. **J. Cyst. Fibros. 8**: 386-391.

Miller, S. C.; LiPuma, J. J. & Parke, J. L. 2002. Culture-based and non-growth-dependent detection of the Burkholderia Cepacia Complex in soil environments. **Appl. Environ. Microbiol. 68**: 3750-3758.

Molinaro, A.; Castro, C.; Lanzetta, R.; Evidente, A.; Parrili, M. & Holst, O. 2002. Lipopolysaccharides possessing two L-Glycero-D-manno-heptopyranosyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid moieties in the core region. **J. Biol. Chem. 277**: 10058-10063.

Morris, M. B. & Roberts, J. B. 1959. A group of pseudomonads able to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **Nature 183**: 1538.

Morrison, D. C. & Ryan, J. L. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. **Annu. Rev. Med. 38**: 417-432.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods. 65**: 55-63.

Mota, L. J.; Sorg, I & Cornelis, G. R. 2005. Type III secretion: The bacteria-eukariotic cell express. **FEMS Microbiol. Lett. 252**: 1-10.

Nansen, A. & Thomsen, A. R. 2001. Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-alpha beta. **J. Immunol. 166**: 982-988.

Nguyen, K. B. & Biron, C. A. 1999. Synergism for cytokine-mediated disease during concurrent endotoxin and viral challenges: roles for NK and T cell IFN-gamma production. **J. Immunol. 162**: 5238: 5246.

Nichols, D.; Chmiel, J. & Berger, M. 2007. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. **Clinic. Rev. Allerg. Immunol. 34**: 146-162.

Nierman, w. C.; DeShazer, D.; Kim, H. S.; Tettelin, H.; Nelson, K. E.; Feldblyum, T.; Ulrich, R. L.; Ronning, C. M.; Brinkac, L. M.; Daugherty, S. C.; Davidsen, T. D.; Haft, D. H.; Khouri, H.; Kolonay, J. F.; Madupu, R.; Mohammoud, Y.; Nelson, W. C.; Radune, D.; Romero, C. M.; Sarria, S.; Selengut, J. Shamblin, C.; Sullivan, S. A.; White, O.; Yu, Y.; Zafar, N.; Zhou, L. & Fraser, C. M. 2004. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101**: 14246-14251.

Nikaido, H. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. **Biochim Biophys Acta.** **433**: 118-132.

Ohno, N. & Morrison, D. C. 1989. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. **J. Biol. Chem.** **264**: 4434-4441.

Okoh, A.; Ajisebutu, S.; Babalola, G. & Trejo-Hernandez, M. R. 2001. Potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the degradation of heavy crude oil. **Int. Microbiol.** **4**: 83-87.

Ortega, X.; Hunt, T. A.; Loutet, S.; Vinion-Dubiel, A. D.; Datta, A.; Choudhury, B.; Goldberg, J. B.; Carlson, R. & Valvano, M. A. 2005. Reconstitution of o-specific lipopolysaccharide expression in *Burkholderia cenocepacia* strain J2315, which is associated with transmissible infections in patients with cystic fibrosis. **J. Bacteriol.** **187**: 1324-1333.

Pai, R. K.; Convery, M.; Hamilton, T. A.; Boom, W. H. & Harding, C. V. 2003. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. **J. Immunol.** **171**: 175-184.

Paiva, C. N.; Arras, R. H.; Lessa, L. P.; Gibaldi, D.; Alves, L.; Metz, C. N.; Gazzinelli, R.; Pyrrho, A. S.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M. T. 2007. Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. **Eur. J. Immunol.** **37**: 1355-1364.

Paiva, C. N.; Figueiredo, R. T.; Kroll-Palhares, K.; Silva, A. A.; Silvério, J. C.; Gibaldi, D.; Pyrrho, A. S.; Benjamim, C. F.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M. T. 2009. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Leukoc. Biol.** **86**: 1239-1246.

Palfreyman, R. W.; Watson, M. L. Eden, C. & Smith, A. W. 1997. Induction of biologically active interleukin-8 from lung epithelial cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* products. **Infect. Immun.** **65**: 617-622.

Palleroni, N. J. & Holmes, B. 1981. *Pseudomonas cepacia*, sp. nov., nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **31**: 479-481.

Peschel, A. 2002. How do bacteria resist human peptides? **Trends Microbiol.** **10**: 358-359.

Pegues, D. A.; Carson, L. A.; Tablan, O. C.; FitzSimmons, S. C.; Roman, S. B.; Miller, J. M.; Jarvis W. R. & The Summer Camp Study Group. 1994. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. **J. Pediatr.** **124**: 694-702.

Plüddermann, A.; Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. 2006. The interaction of macrophages receptors with bacterial ligands. **Expert. Rev. Mol. Med.** **8**: 1-25.

Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, L.; Liu, M. Y.; Huffel, C. V.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Riccirdi-Castagnoli, P.; Layton, B.; Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCR mice: mutations in Tlr4 gene. **Science** **282**: 2085-2088.

Poonguzhali, S.; Madhaiyan, M. & Sa, T. 2007. Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. **Res. Microbiol.** **158**: 287-294.

Potvin, E.; Lehoux, E. D.; Kukavica-Ibrulj, I.; Richard, K. L.; Sanschagrín, F.; Lau, G. W. & Levesque, R. C. 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. **Environ. Microbiol.** **5**: 1294-1308.

Pumpradit, W.; Ariyoshi, K.; Petkanchanapong, W.; Wichukchinda, N.; Chaiprasert, A.; Rojanawat, A.; Sawanpanyalert, P. & Pathipvanich, P. 2006. *Mycobacterium avium* and *Burkholderia pseudomallei* (Melioidosis) coinfection in an HIV-positive patient. **Asian. Pac. J. Allergy Immunol.** **24**: 239-243.

Rahman, M. M. & McFadden, G. 2006. Modulation of Tumor Necrosis Factor by microbial pathogens. **PLoS Pathog.** **2**: 66-77.

Raskin, S.; Phillips, J. A. 3<sup>rd</sup>; Krishnamani, M. R.; Vnencak-Jones, C.; Parker, R. A.; Rozov, T; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R. Reis, F.; Rosario, N. A.; Ludwig, N. & Pilotto, R. F.. 1993. DNA analyses of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am. J. Med. Genet.** **46**: 665-9.

Raskin, S.; Phillips, J. A. 3<sup>rd</sup>; Krishnamani, M. R.; Vnencak-Jones, C.; Parker, R. A.; Rozov, T; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R.; Reis, F.; Rosário, N. A.; Ludwig, N. & Culpi, L. 1997.

Cystic fibrosis in the Brazilian population: DF508 mutation and KM-19/XV-2C haplotype distribution. **Hum. Biol.** **69**: 499-508.

Reik, R.; Spilker, T. & Lipuma, J. J. 2005. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.** **43**: 2926-2928.

Renella, R. Perez, J. M.; Chollet-Martin, S.; Sarnacki, S.; Fischer, A.; Blanche, S.; Casanova, J. L. & Picard, C. 2006. *Burkholderia pseudomallei* infection in chronic granulomatous disease. **Eur. J. Pediatr.** **165**: 175-177.

Rietschel, E. T.; Brade, H.; Brade, L.; Brandenburg, K.; Schade, F. U.; Seydel, U.; Zahringer, U.; Galanos, C.; Luderitz, O.; Westphal, O.; Labischinski, H.; Kusumoto, S. & Shiba, T. 1987. Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. **Prog. Clin. Biol. Res.** **231**: 25-34.

Rommens, J. M.; Ianuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J.L.; Kennedy, D.; Hidaka, N.; Zsiga, M.; Buchwald, M.; Riordan, J. R.; Tsui, L. C. & Collins, F. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science** **245**: 1059-65.

Rosqvist, R.; Håkansson, S.; Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. 1995. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of Yersiniae, Salmonellae and Shigellae. **EMBO J.** **14**: 4187-4195.

Rudiger, A.; Stotz, M. & Singer, M. 2008. Cellular processes in sepsis. **Swiss. Med. Wkly.** **138**: 629-634.

Saiman, L.; Cacalano, G. & Prince, A. 1990. *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.** **58**: 2578-2584.

Saini, L. S.; Galsworthy, S. B.; John, M. A. & Valvano, M. A. 1999. Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. **Microbiology** **145**: 3465-3475.

Sajjan, U. S.; Sun, L.; Goldstein, R. & Forstner, J. F. 1995. 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. **J. Bacteriol.** **177**: 1030-1038.

Salmond, G. P. C. & Reeves, P. J. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. **Trends Biochem. Sci.** **18**: 7-12.

Schell, M. A.; Ulrich, R. L.; Ribot, W. J.; Brueggemann, E. E.; Hines, H. B.; Chen, D.; Lipscomb, L.; Kim, H. S.; Mrazek, J. Nierman, W. C. & De-Shazer, D. 2007. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. **Mol. Microbiol.** **64**: 1466-1485.

Schierholz, J. M.; Beuth, J.; König, D.; Nürnberger, A. & Pulverer, G. 1999. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. **Zentbl. Bacteriol** **289**: 165-177.

Schimdt, G.; Schelecht, S.; Lüderitz, O. & Westphal, O. 1968. Investigation work on the typing of *Salmonella*-R-forms. I. Communication: microbiological and serological tests on *Salmonella minnesota* mutants. **Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektion-skr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A** **209**: 483-496.

Shaw, D.; Poxton, I. R. & Govan, J. R. W. 1995. Biological activity of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* lipopolysaccharide. **FEMS Immunol. Med. Microb.** **11**: 99-106.

Shi, L.; Chowdhury, S. M.; Smallwoods, H. S.; Yoon, H.; Motaz-Brewer, H. M.; Norbeck, A. D.; McDermott, J. E.; Claus, T. R.; Heffron, F.; Smith, R. D. & Adkins, J. N. 2009. Proteomic investigation of the time course responses of Raw 264.7 macrophages to infection with *Salmonella enterica*. **Infect. Immun.** **77**: 3227-3233.

Shields, M. S. & Reagin, M. J. 1992. Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 3977-3983.

Silipo, A.; Molinaro, A.; Comegna, D.; Sturiale, L.; Cescutti, P.; Garozzo, D.; Lanzetta, R. and Parrilli, M. 2006. Full structural characterization of the lipooligosaccharide of a *Burkholderia pyrrocinia* clinical isolate. **Eur. J. Org. Chem.** **21**: 4874-4833.

Silipo, A.; Molinaro, A.; Ieranò, T.; De Soyza, A.; Sturiale, L.; Garozzo, D.; Aldridge, C.; Corris, P. A.; Anjam Khan, C. M.; Lanzetta, R. & Parrilli, M. 2007. The complete structure and pro-inflammatory activity of the lipooligosaccharide of the highly epidemic and virulent gram-negative bacterium *Burkholderia cenocepacia* (strain J2315). **Chem. Eur. J.** **13**: 3501-3511.

Sinai, A. P. & Joiner, K. A. 1997. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. **Annu. Rev. Microbiol.** **51**: 415-462.

Sing, A.; Rost, D.; Tvardovskaia, N.; Roggenkamp, A.; Wiedemann, A.; Kirschning, C. J.; Aepfelbacher, M. & Heeseman, J. 2002. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. **J. Exp. Med.** **196**: 1017-1024.

Sinsabaugh, H. A. & Howard, G. W. 1975. Emendation of the description of *Pseudomonas cepacia* Burkholder (synonyms: *Pseudomonas multivorans* Stanier et al., *Pseudomonas Kingae* Jonsson; EO-1 group). **Int. J. Syst. Bacteriol.** **25**: 187-201.

Skerman, V. B. D.; McGowan, V. & Sneath, P. A. H. 1980. Approved lists of bacterial names. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **30**: 225-420.

Smith, S. R.; Calzetta, A.; Bankowski, J. Kenworthy-Bott, L. & Terminelli, C. 1993. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. **J. Leukoc. Biol.** **54**: 23- 29.

Smith, E. E., Buckley, D. G.; Wu, Z.; Saenphimmachak, C.; Hoffman, L. R.; D'Argenio, D. A.; Miller, S. I.; Ramsey, B. W.; Speert, D. P.; Moskowitz, S. M.; Burns, J. L.; Kaul, R. & Olson, M. V. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** **103**: 8487-8492.

Snell, J. J. S.; Hill, L. R.; Lapage, S. P. & Curtis, M. A. 1972. Identification of *Pseudomonas cepacia* Burkholder and its synonymy with *Pseudomonas kingii* Jonsson. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **22**: 127-138.

Speert, D. P.; Henry, D. Vandamme, P.; Corey, M. & Mahenthiralingam, E. 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. **Emerg. Infect. Dis.** **8**: 181-187.

Stanier, R. Y.; Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **J. Gen. Microbiol.** **43**: 159-271.

Stevanin, T. M.; Poole, R. K.; Demoncheaux, A. G. & Read, R. C. 2002. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. **Infect. Immun.** **70**: 4399-4405.

Stuehr, D. J. 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **J. Nutr.** **134**: 2748s-2751s.

Sweeley, C. C.; Bentley, R.; Makita, M. & Well, W. W. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. **J. Am. Chem. Soc.** **85**: 2497

Tansini, A. & Medeiros, B. M. M. 2008. Susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* infection is linked to the pattern of macrophage activation. **Scand. J. Immunol.** **69**: 310-318.

Thanassi, D. G. & Hultgren, S. J. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.** **12**: 420-430.

Thomassen, M. J.; Demko, C. A.; Klinger, J. D. & Stern, R. C. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. **Am. Rev. Respir. Dis.** **131**:791-6.

Tomich, M.; Herfst, C. A.; Golden, J. W. & Mohr, C. D. 2002. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. **Infect. Immun.** **70**: 1799-1806.

Tomich, M.; Griffith, A.; Herfst, C. A.; Burns, J. L. & Mohr, C. D. 2003. Attenuated virulence of a *Burkholderia cepacia* type III secretion mutant in a murine model of infection. **Infect. Immun.** **71**: 1405-1415.

Tracey, K. J.; Fong, Y.; Hesse, D. G.; Manogue, K. R.; Lee, A. T.; Kuo, G. C.; Lowry, S. F. & Cerami, A. 1987. Anti-cachetin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature** **330**: 662-664.

Ulevitch, R. J. & Tobias, P. S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu. Rev. Immunol** **13**: 437-457.

Ulmer, A. J.; Heine, H.; Feist, W.; Kusumoto, S., Kusama, T.; Brade, H.; Schade, F. U.; Rietschel, E. T. & Flad, H. D. 1992. Biological activity of synthetic phosphono-oxyethyl analogues of lipid A and lipid A partial structures. **Infect. Immun.** **60**: 3309-3314.

Unger, F. M. 1983. The chemistry and biological significance of 3-deoxy-d-manno-2-octulosonic acid (Kdo). **Adv Carbohydr Chem Biochem** **348**: 323-387.

Urban, T. A.; Griffith, A.; Torok, A. M.; Smolkin, M. E.; Burns, J. L. & Goldberg, J. B. 2004. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. **Infect. Immun.** **72**: 5126-34.

Vandamme, P.; Holmes, B.; Vancanneyt, M.; Coenye, T.; Hoste, B.; Coppman, R.; Revets, H.; Lauwers, S.; Gillis, M.; Kersters, K. & Govan, J. R. W. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **Int. J. Syst Bacteriol** **47**: 1188-1200.

Vandamme, P.; Mahenthiralingam, E.; Holmes, B.; Coenye, T.; Hoste, B.; De Vos, P.; Henry, D. & Speert, D. P. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **J. Clin. Microbiol.** **38**: 1042-1047.

Vandamme P.; Henry, D.; Coenye, T.; Nzula, S.; Vancanneyt, M.; LiPuma, J. J.; Speert, D. P.; Govan, J. R. & Mahenthiralingam, E. 2002. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia Cepacia* Complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **33**: 143-149.

Vandamme, P.; Holmes, B.; Coenye, T.; Goris, J.; Mahenthiralingam, E.; LiPuma, J. J. & Govan, J. R. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. **Res. Microbiol.** **154**: 91-96.

Van Gijsegem, F.; Genin, S. & Boucher, C. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends Microbiol.** **1**: 175-180.

Vankeerberghen, A.; Cuppens, H. & Cassiman, J. J. 2002. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. **J. Cyst. Fibros.** **1**: 13-29.

Vermis, K.; Brachkova, M.; Vandamme, P & Nelis, H. 2003. Isolation of *Burkholderia Cepacia* Complex genomovars from waters. **Syst. Appl. Microbiol.** **26**: 595-600.

Vermis, K.; Coenye, T.; LiPuma, J. J.; Mahenthiralingam, E.; Nelis, H. J. & Vandamme, P. 2004. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. Nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol** **54**: 689-691.

Villeneuve, A.; Brossay, L.; Paradis, G. & Hébert, J. 1994. Characterization of the Humoral Response Induced by a Synthetic Peptide of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* Serovar B. **Infect. Immun.** **62**: 3547-3549.

Walport, M. J. 2001a. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.** **344**: 1058-1066.

- Walport, M. J. 2001b. Complement. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.** **344**: 1140-1144.
- Winans, S. C.; Burns, D. L. & Christie, P. J. 1996 Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. **Trends Microbiol.** **4**: 64-68.
- Wang, G.; Petzke, M. M.; Iyer, R.; Wu, H. & Scharz, I. 2008. Pattern of pro-inflammatory cytokine induction in RAW264.7 mouse macrophages is identical for virulent and attenuated *Borrelia burgdorferi*. **J. Immunol.** **180**: 8306-8315.
- Welsh, M.J.; Ramsey, B.W.; Accurso, F.; Cutting, G. 2001. The metabolic and molecular basis of inherited diseases, **8<sup>th</sup> ed.** **New York: McGraw-Hill**, p.5121-88.
- Wen, J.; Wang, J. Kuipers, J. G.; Huang, F.; Williams, K. M.; Raybourne, R. B. & Yu, D. T. 1994. Analysis of HLAB\*2705 peptide motif, using T2 cells and monoclonal antibody me1. **Immunogenetics** **39**: 444-446.
- West, T. E.; Ernst, R. K.; Jansson-Hutson, M. J. & Skerrett, S. 2008. Activation of toll-like receptors by *Burkholderia pseudomallei*. **BMC Immunol.** **9**: 46.
- Westphal, O. & Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods Carbohydr. Chem.** **5**: 83-91.
- Westphal, O.; Westphal, U. & Sommer, T. 1977. The history of pyrogen research. D. Schlessinger (ed.), **American society for Microbiology, Washington D. C., Microbiology**: 221-238.
- Wu, W.; Mehta, H.; Chakrabarty, K.; Booth, J. L.; Duggan, E. S.; Patel, K. B.; Ballard, J. D.; Coggeshall, K. M. & Metcalf, J. P. 2009. Resistance of human alveolar macrophages to *Bacillus anthracis* lethal toxin. **J. Immunol.** **183**: 5799-5806.
- Xu, K. D.; McFeter, G. A. & Stewart, P. S. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology** **146**: 547-549.
- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T. & Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven 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.

Yahr, T. L.; Mende-Mueller, L. M.; Friese, M. B. & Frank, D. W. 1997. Identification of type III secreted products of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. **J. Bacteriol.** **179**: 7165-7168.

Zhang, H.; Hanada, S.; Shigematsu, T.; Shibuya, K.; Kamagata, Y.; Kanagawa, T. & Kurane, R. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. Nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **50**:743-749.

Zughaier, S. M.; Ryley, H. C. & Jackson, S. K. 1999. A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocytic respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. **Infect. Immun.** **67**: 908-913.

Zughaier, S. M.; Ryley, H. C. & Jackson, S. K. 1999. Lipopolysaccharide (LPS) from *Burkholderia cepacia* is more active than LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **Infect. Immun.** **67**: 1505-7.

Zychlinsky, A.; Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature** **358**: 167-169.

## **10. Anexo 1**

Paiva, C. N.; Arras, R. H.; Lessa, L. P.; **Gibaldi, D.**; Alves, L.; Metz, C. N.; Gazzinelli, R.; Pyrrho, A. S.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M. T. 2007. Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. **Eur. J. Immunol.** **37**: 1355-1364.

## Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: A role for increased macrophage reactivity

Cláudia N. Paiva<sup>1</sup>, Rosa H. Arras<sup>1</sup>, Luiz P. Lessa<sup>1,2</sup>, Daniel Gibaldi<sup>1</sup>, Letícia Alves<sup>1</sup>, Christine N. Metz<sup>3</sup>, Ricardo Gazzinelli<sup>4</sup>, Alexandre S. Pyrrho<sup>5</sup>, Joseli Lannes-Vieira<sup>2</sup> and Marcelo T. Bozza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Laboratory of Medicinal Biochemistry, The Feinstein Institute for Medical Research, North Shore-LIJ Health System, Manhasset, NY, USA

<sup>4</sup> Departamento de Imunologia e Bioquímica, ICB, UFMG, Minas Gerais, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

Various infections sensitize to lethal shock by promoting hyperactivation of macrophages to LPS stimulation. Although macrophages are thought to be deactivated upon contact with apoptotic cells during *Trypanosoma cruzi* infection, *T. cruzi* infection also sensitizes mice to endotoxemia. Herein, we studied the mechanisms of sensitization to endotoxemia in *T. cruzi*-infected mice in order to solve the paradox. Live (but not fixed) trypomastigotes from various stocks sensitized mice to endotoxemia. Mice deficient in glycolipid recognition (TLR2<sup>-/-</sup> and CD1d<sup>-/-</sup>) were sensitized by infection to challenge with LPS. Infected mice hyperproduced TNF and IL-10 upon LPS challenge. Infected TNF-R1<sup>-/-</sup>, macrophage migration inhibitory factor (MIF)<sup>-/-</sup> and IPN-γ<sup>-/-</sup> mice were lethally sensitized, but infected TNF-R1<sup>-/-</sup> mice administered anti-MIF survived shock with LPS. Macrophages from infected mice hyperproduced TNF in response to LPS stimulation and displayed increased expression of TLR4 compared to non-infected controls. Treatment with the PGE<sub>2</sub> synthesis inhibitor acetylsalicylic acid (AAS) *in vivo* reduced parasitemia and enhanced LPS-stimulated production of TNF by macrophages, but the effect was less in infected mice than in normal mice. Nevertheless, AAS treatment did not increase the susceptibility of infected mice to sublethal shock with LPS. Our results point to independent MIF and TNF/TNF-R1 lethal pathways and suggest a role for hyperactivated macrophages in *T. cruzi*-sensitized LPS-induced shock.

Received 12/9/06

Revised 8/1/07

Accepted 19/2/07

[DOI 10.1002/eji.200636705]

### Key words:

Endotoxemia

· Macrophage · Septic shock · *Trypanosoma cruzi*

### Introduction

Septic shock is a highly lethal consequence of widespread infection, and tissue damage caused by both the microbe itself and the host inflammatory response contributes to its final outcome [1]. LPS, a constituent of gram-negative bacterial cell walls, is an inflammatory toll-receptor ligand of prime importance in septic shock. A single LPS injection can partially mimic the inflammatory response in septic shock, triggering the release of high amounts of pro-inflammatory cytokines

Correspondence: Cláudia N. Paiva, PhD, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, CCS Bloco I, UFRJ, Avenida Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902 Brazil  
Fax: +55 21 25608344  
e-mail: cn.paiva@inam.com

Abbreviations: AAS: acetylsalicylic acid · dpi: days post-infection · MIF: macrophage migration inhibitory factor

such as TNF and macrophage migration inhibitory factor (MIF) and causing multiple organ failure and even death [2]. Blockage of inflammatory cytokines either attenuates or prevents lethality induced by LPS, and macrophages are thought to be an important source of these mediators.

The course of sepsis can be highly variable among individuals, and the basis for such discrepancy is currently unknown. A candidate factor to explain this variability is prior contact of susceptible patients with pathogens, resulting in hyperactivation of an inflammatory response and lethal septic shock. In support of this theory, a number of experimental infections, including lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) [3, 4], vesicular stomatitis virus (VSV) [5], adenovirus [6] and *Propionibacterium acnes* [7, 8], are known to sensitize mice to low doses of LPS. In most of these models, priming by IFN- $\gamma$  is at least partially responsible for macrophage hyperactivation. During a narrow time window, primed macrophages release high amounts of inflammatory mediators in response to further LPS stimulation, leading to septic shock. Sensitization of mice to lethal shock can also be achieved by a low-dose s.c. or footpad LPS injection 18–24 h prior to i.v. challenge with LPS, a phenomenon known as the Shwartzman reaction [9]. At the priming stage of the Shwartzman reaction, LPS-stimulated macrophages secrete IL-12 and IL-15, which in turn trigger NK cells and NKT cells to secrete IFN- $\gamma$  [10]. This cytokine then activates macrophages to release high amounts of TNF in response to challenge with LPS [10, 11], and any unbalanced production of anti-inflammatory factors, such as IL-10, can increase mortality [12]. Thus, sensitization to lethal LPS-induced shock can result from prior recognition of microbe molecules or infection-induced release of inflammatory mediators, a phenomenon that in general requires IFN- $\gamma$  secretion and macrophage activation during a limited time interval.

There is evidence that *Trypanosoma cruzi* infection leads to a state of increased susceptibility to septic shock. In fact, *T. cruzi*-infected mice are susceptible to lethal shock upon inoculation of low TNF amounts [13], but they also hyperproduce TNF and die of septic shock under various circumstances, such as in the absence of IL-10 production [14] or under polyclonal T cell activation [15, 16]. *T. cruzi*-infected mice are known to be highly susceptible to LPS-induced shock [17] and to release high amounts of TNF in response to LPS administration [18], a phenomenon originally thought to result from macrophage stimulation [19]. An obvious assumption to explain these latter findings would be that *T. cruzi*, by promoting the release of IFN- $\gamma$  at an early stage [20] or priming a Shwartzman-like reaction through inflammatory *T. cruzi* glycolipids [21], activates

macrophages to release high amounts of TNF upon LPS stimulation, much like other sensitizations to endotoxemia. However, the case for macrophages in *T. cruzi* infection is very different from other LPS-sensitizing infections. High numbers of apoptotic cells are generated in acute *T. cruzi* infection [22], and engagement of these cells with the vitronectin receptor triggers macrophages to release TGF- $\beta$  and PGE $_2$ , which reduce the LPS-stimulated NO production and trypanocidal activity of the macrophages [23]. Consistently, inhibition of prostaglandin synthesis *in vitro* is able to rescue the trypanocidal capacity of macrophages, while treatment with such PGE $_2$  synthesis inhibitors *in vivo* reduces parasitemia of infected mice. Thus, different from other LPS-sensitizing infections, there is strong evidence pointing to macrophage deactivation rather than hyperactivity during acute *T. cruzi* infection [24]. In this paper, we investigated the mechanisms by which *T. cruzi* infection sensitizes mice to endotoxemia in order to elucidate whether it follows the general rule for sensitizing infections, thereby challenging the paradigm of macrophage deactivation during *T. cruzi* infection, or can be somehow reconciled with this notion.

## Results

### Infection by *T. cruzi* is required to sensitize mice to LPS

Infected ( $10^5$  Y strain blood trypomastigotes) adult BALB/c mice (6–8 wks) died of acute infection between 9–30 days post-infection (dpi) (mortality: 7 dpi: 0/10; 9 dpi: 1/10; 15 dpi: 4/10; 30 dpi: 10/10). Therefore, we chose 0–6 dpi to study the susceptibility of infected mice to LPS-induced shock, a time frame that totally avoided mortality associated with *T. cruzi* infection itself.

All BALB/c mice infected with either  $10^4$  or  $10^5$  Y strain blood trypomastigotes were sensitized to lethal shock with 100  $\mu$ g LPS administered 4 days after infection (Fig. 1A), while all non-infected controls injected with vehicle (PBS) at various intervals (0, 1, 2, 3, 4, 5, 60 days) before injection of LPS survived challenge. Infected mice died with clinical signs of septic shock (shivering, rough hair, prostration, vasodilation) within 4–12 h after LPS injection (Fig. 1A, insert). As diluted blood was used as a source of trypomastigotes to infect mice and could possibly increase mortality in sepsis [25], blood from non-infected mice (200  $\mu$ L) was used as a sensitization control at various intervals (0, 1, 2, 5 days) before LPS injection (100  $\mu$ g) and did not sensitize mice to shock ( $n=3-5$  mice per group). In mice infected with a low number of Y strain trypomastigotes ( $10^2$ ) to allow the establishment of chronic phase (60 days after infection), we also observed lethal

synergism with LPS (Fig. 1A), indicating that sensitization persists up to the chronic stage of infection.

During acute infection ( $10^7$  Y strain blood trypomastigotes, 5 dpi), mice were sensitized to low doses of LPS: 4/6 infected mice (66%) died after challenge with 25  $\mu$ g LPS, while none of the non-infected controls (0%, 0/6) were dead after 48 h ( $p < 0.05$ ). Also, a 100-fold greater inoculum of Y strain trypomastigotes ( $10^7$ ) was able to sensitize 57% of mice to lethal shock when injected concomitantly (both i.p., at different sides) with 100  $\mu$ g LPS (Table 1), indicating that injection of high numbers of trypomastigotes can at least partially bypass the need for an interval in sensitization. Thus, all three variables – interval between infection and challenge, dose of LPS and inoculum of trypomastigotes – were relevant to determine the mortality rate of infected mice upon LPS challenge. Therefore, in most experiments we

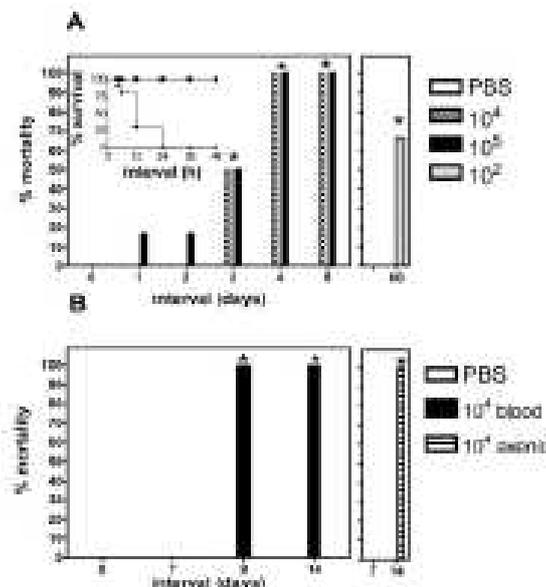
**Table 1** Live trypomastigotes but not fixed trypomastigotes sensitize mice to lethal endotoxemia.

Treatment <sup>1</sup>	Interval <sup>2</sup>	n	Mortality <sup>3</sup>
Live $10^7$	0	7	57%
Fixed-Fixed $10^7$	0	3	0%
Fixed-PBS	0	3	0%
Live $10^7$	1	4	50%
Fixed-Fixed $10^7$	1	7	0%
Fixed-PBS	1	3	0%
Live $10^7$	5	6	100%
Fixed-Fixed $10^7$	5	10	100%
Fixed-PBS	5	5	0%
Formol-Fixed $10^7$	5	6	17%

<sup>1</sup> BALB/c males and females were inoculated with live, alcohol-fixed or formal-fixed Y strain blood trypomastigotes ( $10^7$  or  $10^8$ ) or vehicle.

<sup>2</sup> Interval (days) between inoculation with trypomastigotes and challenge with 100  $\mu$ g LPS.

<sup>3</sup> Mortality determined 48 h after challenge is shown; the death kinetic did not differ among groups ( $p < 0.05$  compared to mice treated with live trypomastigotes under similar conditions).



**Figure 1.** *T. cruzi* sensitization to lethal endotoxemia. Groups of sex- and age-matched BALB/c mice (n=7) were injected with either PBS or live trypomastigotes i.p. and submitted to challenge with LPS (100  $\mu$ g) at various intervals after injection. Graphs show the percent mortality for each group determined 48 h after challenge with LPS. (A) Mice were infected with  $10^4$  or  $10^7$  Y strain blood trypomastigotes and challenged 0–5 dpi (left) or infected with  $10^7$  Y strain blood trypomastigotes and challenged 50 dpi (right). The inset shows the percent survival at various intervals after LPS challenge for mice infected with  $10^7$  trypomastigotes 5 days prior to shock (n=10, diamonds) or PBS-injected controls (n=5, squares). (B) Mice were infected with  $10^4$  DM-28c blood trypomastigotes and challenged 7, 9 or 14 dpi (left) or infected with  $10^8$  axenic culture trypomastigotes and challenged 7 and 14 dpi (right). \* $p < 0.05$  compared to respective non-sensitized controls.

chose a challenge of with 100  $\mu$ g LPS at 5–6 dpi in order to achieve a 100% mortality rate of mice infected with  $10^7$  blood trypomastigotes of the Y strain i.p. versus 0% mortality of non-challenged infected or LPS-challenged non-infected mice.

As the reports of increased LPS reactivity [17] and decreased macrophage reactivity [23] during *T. cruzi* infection were based on findings with different *T. cruzi* stocks, Y strain blood trypomastigotes and DM-28c clone axenic culture metacyclics, respectively, we tested whether infections caused by the two stocks lead to different outcomes upon LPS-induced shock. Infection with  $10^4$  DM-28c clone trypomastigotes sensitized BALB/c mice to lethal LPS-induced shock when either blood trypomastigotes or axenic culture metacyclics (as performed by Freire-de-Lima *et al.* [23]) were used, requiring a longer interval between infection and LPS administration than Y strain blood trypomastigotes (Fig. 1B). Mice infected with DM-28c clone and challenged with LPS also presented clinical signals of acute septic shock, and most non-challenged infected mice survived until 30 dpi (data not shown). The enhanced susceptibility to endotoxemia seems to be a general feature of *T. cruzi* infection, as we also observed sensitization to LPS in mice chronically or acutely infected with the Colombiana or CL strains (data not shown).

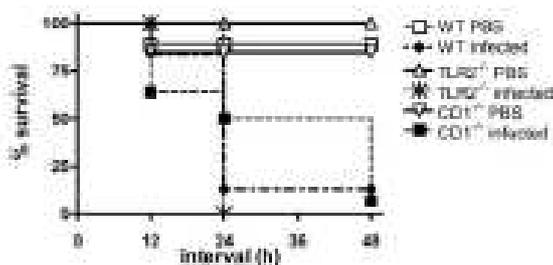
To test if infection is required to cause sensitization to LPS, we injected mice with Y strain purified blood trypomastigotes either alive or killed with alcohol or formaldehyde. Mice injected with  $10^7$  dead Y strain trypomastigotes survived LPS injection, in contrast to mice injected with live parasites 5 days prior to shock (Table 1). Even when  $10^7$  alcohol-killed trypomastigotes were injected 1 day prior to LPS injection, all mice survived shock, while 50% died when live parasites were used instead.

In order to further test if recognition of *T. cruzi* inflammatory molecules is involved in sensitization to LPS, we infected mice deficient in two host molecules putatively involved in the triggering of its inflammatory activity, TLR2 [21] and CD1 [26]. Y strain-infected TLR2<sup>-/-</sup> and CD1<sup>-/-</sup> mice were as susceptible as their infected wild-type (WT) counterparts to LPS-induced shock at 5 dpi, while all non-infected LPS-challenged controls remained alive (Fig. 2).

Together, these data indicate that *T. cruzi* infection induces a long-lasting state of sensitization to endotoxemia that does not depend on the strain or *T. cruzi* stock used and point to the need for infection to sensitize mice to LPS-induced shock.

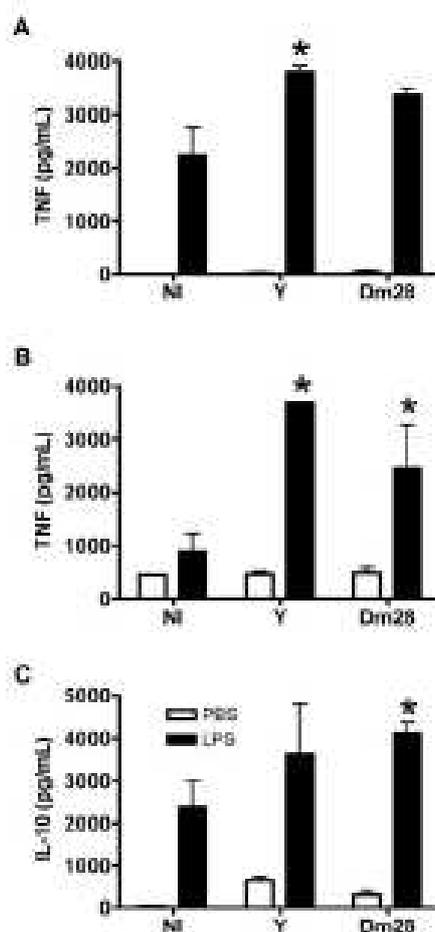
#### Hyperproduction of inflammatory cytokines contributes to lethal shock of infected mice

We then searched for a mechanism to explain the lethal synergism between *T. cruzi* infection and LPS-induced shock. A number of similar synergisms have been described in the literature, highlighting the role of IFN- $\gamma$  produced during a sensitization stage (caused by infection or inflammatory molecules) in priming macrophages to release high amounts of TNF upon LPS administration [9]. An increase in plasma levels of



**Figure 2.** Sensitization to endotoxemia induced by *T. cruzi* does not require the recognition of molecular patterns mediated by TLR2 or CD1. Groups of TLR2<sup>-/-</sup>, CD1<sup>-/-</sup> and WT mice (n=4–24) were infected i.p. with  $10^7$  blood-purified trypomastigotes from the Y strain or injected with vehicle (PBS) as a control and challenged 5 days later with LPS (100  $\mu$ g). Mortality was recorded for 48 h and was found to be similar among the different groups of infected mice.

TNF and/or a decrease in IL-10 late after LPS shock has also been suspected to be involved in the effector stage of shock [27]. We thus studied the release of TNF and IL-10 in *T. cruzi*-lethally sensitized mice upon LPS injection. Higher amounts of TNF were found in the sera of infected mice than in non-infected counterparts 90 min after administration of LPS (Fig. 3A) and remained elevated 4 h (Fig. 3B) after LPS injection compared to non-infected controls. Serum IL-10 was also significantly increased above non-infected levels in Dm28c-infected mice 4 h after challenge (Fig. 3C). These results are consistent with priming by *T. cruzi* infection leading

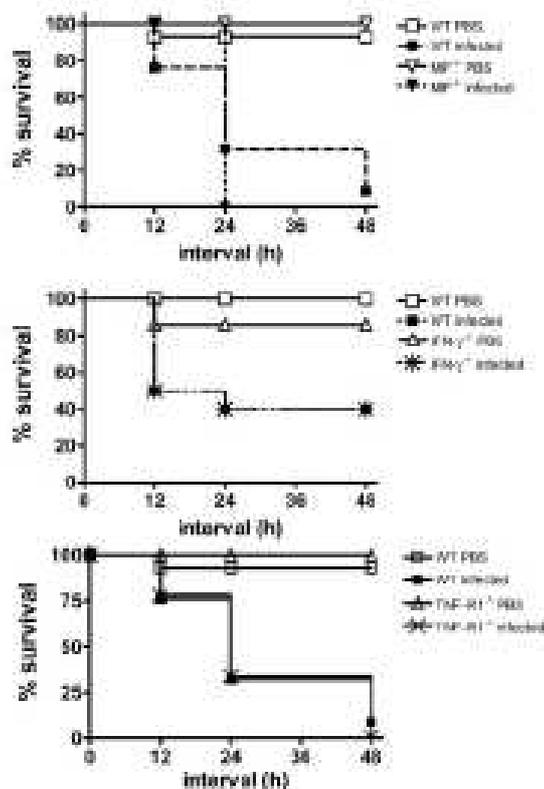


**Figure 3.** *T. cruzi*-infected mice hyperproduce TNF upon challenge with LPS. Groups of BALB/c mice infected i.p. with  $10^7$  Yeastin (7 dpi),  $10^7$  Dm28c blood trypomastigotes (14 dpi) or non-infected (Ni) were challenged with LPS (100  $\mu$ g) or injected with PBS as a control, and their sera was collected 90 min (A) or 4 h (B–C) after challenge. Data represent mean  $\pm$  SEM for 2–4 independent samples of pooled sera (2–4 mice) assayed by ELISA (\* $p$  < 0.05).

to overproduction of TNF upon LPS injection and rule out a defect in IL-10 secretion as a cause for lethal shock.

To investigate the role of candidate TNF inducers and downstream TNF-mediated events in sensitization to shock, we tested whether IFN- $\gamma$ , MIF- or TNF-R1-knockout mice could be sensitized to LPS shock by prior *T. cruzi* infection. These mice are known to be at least partially resistant to infection-enhanced susceptibility to shock [4, 5, 8] or endotoxaemia itself [28, 29] due to decreased TNF actions. Infected MIF-, IFN- $\gamma$ - and TNF-R1-knockout mice (5 dpi) did not differ from their WT infected controls in susceptibility to LPS-induced shock (Fig. 4). Non-challenged infected WT and knockout mice remained alive until at least 7 dpi ( $n=2-4$ ).

However, when infected TNF-R1 $^{-/-}$  mice (5 dpi) were treated with anti-MIF 1 h prior to LPS injection,



**Figure 4.** MIF, IFN- $\gamma$  and TNF-R1 are not essential for *T. cruzi*-induced sensitization to endotoxaemia. Groups of MIF $^{-/-}$ , IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  and WT mice ( $n=7-10$ ) or TNF-R1 $^{-/-}$  and WT ( $n=6-10$ ) were infected i.p. with  $10^5$  blood-purified trypomastigotes from the Y strain or injected with P26 as a control and challenged 5 days later with LPS (100  $\mu$ g). Mortality was recorded for 48 h and was found to be similar among the different groups of infected mice in each experiment.

**Table 2.** Neutralization of MIF in *T. cruzi*-infected TNF-R1 $^{-/-}$  mice prevents lethal endotoxaemia.

Treatment <sup>a)</sup>	n	Mortality <sup>b)</sup>
WT-isotype control Ig	5	0%
TNF-R1 $^{-/-}$ -isotype control Ig	5	50%
WT+anti-MIF	4	100%
TNF-R1 $^{-/-}$ +anti-MIF	5	0%*

<sup>a)</sup> Mice were infected (5 d<sup>+</sup> Y strain blood trypomastigotes) and treated at day 5 post-infection with monoclonal anti-MIF or isotype control IgG<sub>1</sub> (200  $\mu$ g) i.p. 1 h before challenge with 100  $\mu$ g LPS.

<sup>b)</sup> Mortality determined 48 h after challenge is shown; the death kinetics did not differ among groups (\* $p < 0.05$  compared to WT mice treated with anti-MIF).

their survival was increased compared to TNF-R1 $^{-/-}$  mice injected with isotype-matched Ig, while infected WT mice did not benefit from treatment with anti-MIF (Table 2). Infected TNF-R1 $^{-/-}$  mice treated with anti-MIF and not submitted to challenge with LPS survived infection until at least 9 dpi ( $n=3$ ). Similar results were obtained with polyclonal anti-MIF antibodies (data not shown). We also treated infected IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  mice and WT controls (6 dpi) with either anti-MIF or control Ig 1 h prior to challenge with LPS. Anti-MIF failed to protect infected IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  mice or WT controls from lethal shock (mortality 48 h after challenge with 100  $\mu$ g LPS: WT + isotype control Ig, 100%  $n=5$ ; IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  + isotype control Ig, 100%  $n=6$ ; WT + anti-MIF, 100%  $n=5$ ; IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  + anti-MIF, 100%  $n=6$ ). Infected IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  mice treated with anti-MIF and not subjected to challenge with LPS survived infection until 14 dpi ( $n=3$ ). All non-infected WT mice survived shock ( $n=3$ ).

Our results demonstrate the involvement of TNF and MIF production in lethality and show that MIF production or TNF-R1-mediated events are sufficient to cause death of infected mice upon LPS-induced shock.

#### Macrophages from *T. cruzi*-infected mice hyperproduce TNF and have increased TLR4 expression

Macrophages are the main source of TNF production in LPS-induced shock, but these cells are thought to be deactivated during *T. cruzi* infection. To get insight into the activation status of macrophages *in vivo* during *T. cruzi* infection and their putative role in the increased susceptibility to endotoxaemia displayed by infected mice, we first assessed the LPS-stimulated production of TNF and NO by macrophages *ex vivo*. Freshly obtained peritoneal macrophages from mice acutely infected with either Dm28c (14 dpi) or Y strain (7 dpi) overproduced TNF and produced normal to slightly elevated amounts

of NO upon LPS stimulation compared to cells from non-infected controls (Fig. 5A).

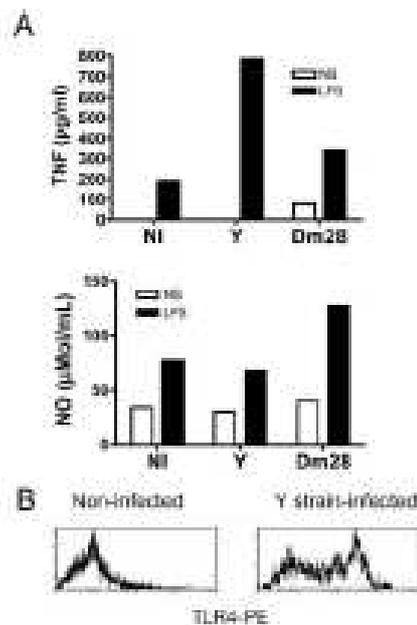
We also studied TLR4 expression on peritoneal macrophages from infected mice as a candidate explanation for their enhanced reactivity to LPS. F4/80<sup>+</sup> peritoneal adherent cells from Y strain-infected mice displayed increased TLR4 surface levels compared to non-infected controls (Fig. 5B). Further studies are needed to determine whether the increased expression of TLR4 among macrophages from infected mice is responsible for their increased reactivity to LPS stimulation.

#### AAS enhances macrophage reactivity to LPS but not susceptibility to shock

We treated Y strain-infected mice with the prostaglandin synthetase inhibitor acetylsalicylic acid (AAS, or aspirin)

to determine if such treatment is also able to decrease parasitemia in this infection model. AAS-treated mice had decreased parasitemia and survived longer than PBS-treated controls (Fig. 6A). *In vitro*, AAS did not kill blood trypomastigotes when employed at concentrations that inhibit PGE<sub>2</sub> synthesis by macrophages (Fig. 6A, insert). These data are consistent with a host-mediated rather than a direct AAS microbicidal activity as a cause for the observed decrease in parasitemia. Treatment with AAS was efficient in increasing LPS-stimulated TNF and NO production by macrophages from non-infected mice but presented a somewhat lower efficiency when applied to infected mice (Fig. 6B–C).

Then we evaluated whether the enhancement of macrophage reactivity to LPS caused by treatment with AAS *in vivo* could cause a further increase in susceptibility of infected mice to LPS-induced shock. We chose a short interval between infection and LPS injection (3 days) and used a low LPS dose (50 µg) in order to achieve low sensitization rates to endotoxemia. Treatment with AAS *in vivo* did not significantly alter the survival of infected mice to LPS-induced shock (Table 3). These results are consistent with the notion of minor enhancement of macrophage TNF production achieved by *in vivo* AAS treatment of Y strain-infected mice.



**Figure 5.** (A) Production of TNF and NO by macrophages from *T. cruzi*-infected mice stimulated with LPS. Peritoneal adherent cells were collected from groups of 2–3 non-infected (NI) BALB/c mice or mice infected with  $10^7$  Y strain (7 dpi) or  $10^7$  Dm28 blood trypomastigotes (74 dpi). Cells were stimulated with LPS (100 ng) or left non-stimulated (NS) for 24 h in duplicate wells. Culture supernatant was assayed for TNF production by ELISA and for NO by Griots. Data represent the mean of values found for two independent cell pools. These results are representative of three similar experiments. (B) Expression of TLR4 on F4/80<sup>+</sup> adherent cells from non-infected or Y strain-infected BALB/c mice (50<sup>6</sup> blood trypomastigotes 7 dpi). Data are representative of three independent pools of cells (composed of cells from 2–4 individual mice).

#### Discussion

Infection-triggered sensitization to endotoxemia has been extensively studied and is known to depend on IFN- $\gamma$  production in responses to LCMV [4], vesicular stomatitis virus (VSV) [5] and *P. acnes* [8]. Recently, IFN- $\gamma$  was found to be dispensable for TNF production in adenovirus-sensitized mice [6], though the role of TNF in this model still needs to be determined, as does the mortality of infected IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> mice upon LPS challenge. Herein, we have shown that macrophages from infected mice are hyperreactive to stimulation with LPS, and the TNF/TNF-R1 pathway is involved in mortality of *T. cruzi*-infected mice upon LPS challenge, yet IFN- $\gamma$  was dispensable for such sensitization. A possible hypothesis to explain this data is that recognition of *T. cruzi* molecular patterns leads to hyperactivation of macrophage responses to LPS stimulation, though it does not involve TLR2, CD1 or IFN- $\gamma$  secretion. Alternatively, *T. cruzi* infection could directly activate macrophages, resulting in sensitization to LPS stimulation. Still, TNF and MIF production involved in shock could come from a macrophage-independent source activated by *T. cruzi* infection. These hypotheses still need to be tested in our model. Also, it remains to be determined whether there is an interplay between T lymphocytes and macrophages involved in lethal shock of *T. cruzi*-infected mice, as they

are known to be sensitized to low doses of anti-CD3 [15] and our own unpublished results) or staphylococcal enterotoxin B (SER) [16].

Hyperproduction of TNF seems to be a common feature in infection-mediated sensitization to endotoxemia [6, 8] and Shwartzman reaction [9]. Though we

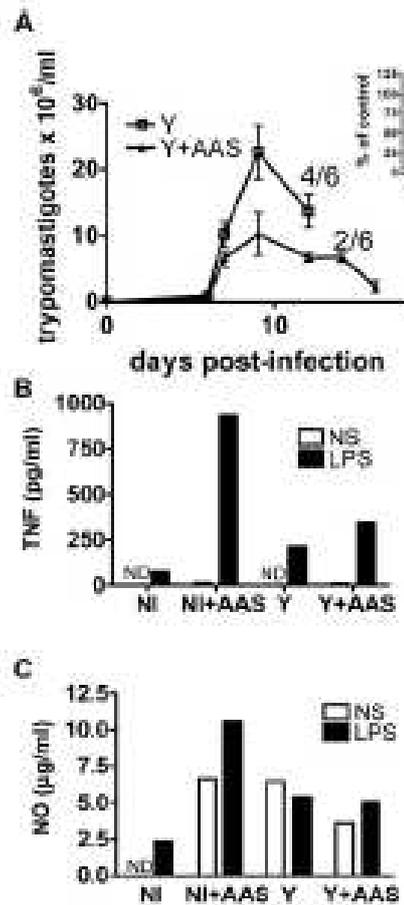
**Table 1** Treatment of *T. cruzi*-infected mice with the cyclooxygenase inhibitor AAS does not alter the susceptibility to lethal endotoxemia.

Treatment <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	Mortality <sup>c</sup>
Non-infected-PBS	12	0%
Non-infected-AAS	12	0%
Infected-PBS	24	33%*
Infected-AAS	36	44%*

<sup>a</sup> AAS (1.5 mg/day/mouse) or PBS (vehicle) was administered i.p. concomitantly (day 0) and on days 1, 2 and 3 after infection with 10<sup>7</sup> Y strain blood trypomastigotes.

<sup>b</sup> 4 dpi, mortality 48 h after challenge is shown; the death kinetic did not differ among groups (*P* > 0.05 compared to respective non-infected controls).

<sup>c</sup> BALB/c males 4 wks of age



**Figure 6.** Treatment of *T. cruzi*-infected mice with AAS reduces parasitemia and partially neutralizes macrophages. BALB/c mice infected with 10<sup>7</sup> Y strain *T. cruzi* (or non-infected, NI) were treated from day 0–5 with 1.5 mg AAS/mouse/day. (A) Data represent the mean ± SEM parasitemia (not representative of two experiments). Fractions represent the mortality at each time point. Four out of six AAS-treated mice survived post 10 dpi, while all non-treated mice died. Inset in (A): AAS has no trypanocidal activity. Purified Y strain blood trypomastigotes (10<sup>7</sup>) were placed in the presence of different concentrations of AAS, as indicated, and viability was counted after 24 h (representative of two experiments). (B–C) Peritoneal adherent cells were assayed at day 6 for production of TNF (B) and NO (C) upon stimulation with LPS (100 µg/ml) (ND = non-detectable). The mean of two independent cell pools is shown. Results are representative of three (TNF) or two (NO) experiments.

demonstrated that an intact TNF/TNF-R1 pathway leads to death of infected mice upon LPS challenge, lack of TNF-R1 expression per se was not enough to prevent death. The need for simultaneous MIF neutralization and TNF-R1 disruption points to two independent and highly lethal effector pathways in this model. In the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis, in which the lack of TNF seems to impair host natural defenses, anti-MIF treatment prevents the lethal shock of highly susceptible TNF<sup>-/-</sup> mice [30]. These data support the notion that although MIF and TNF can be intercepting inflammatory pathways, they can function independently [31]. To date, there are no reports of fulminant shock in chronic Chagasic patients undergoing sepsis, a possibility predictable by our data showing that enhanced susceptibility to endotoxemia extends up to the chronic stage of infection.

*T. cruzi* glycolipids are well known for their inflammatory properties, including IL-12 and TNF through TLR2 ligation [21]. Moreover, during a certain interval, administration of glycolipids induce tolerance to stimulation with LPS in macrophages [32], posing them as feasible primers of a Shwartzman reaction [19]. *T. cruzi* glycolipids are also presented by CD1 to NK T cells [26], a cell population previously demonstrated to be involved in the Shwartzman reaction [10]. Therefore, an easy explanation of sensitization would be that *T. cruzi* glycolipids either directly activate NK T cells to produce IFN-γ through CD1 presentation or elicit IL-12 production through TLR2 engagement on macrophages, thereby activating NK cells to produce IFN-γ. For instance, mice treated with killed *P. acnes* develop an enhanced susceptibility to LPS, strictly dependent on IFN-γ production [8] and expression of TLR9 [33]. Nevertheless, we have found that the sensitization caused by *T. cruzi* infection cannot be mimicked by fixed parasites, and neither IFN-γ nor

molecules known to be involved in recognition of inflammatory glycolipids (such as TLR2 and CD1) are necessary for sensitization. These data argue against a possible role for *T. cruzi* glycolipids in sensitization to LPS. It is possible that *T. cruzi*-induced sensitization still involves recognition of simple pathogen-associated molecular patterns, activating either the Myd88-dependent [34] or TLR4 pathway [35]. In this case, sensitizing *T. cruzi* molecules would either be unreserved or unavailable to intracellular receptors when fixed parasites instead of live ones are used.

We stimulated macrophages with LPS and observed increased TNF production by macrophages from *T. cruzi*-infected mice as well as increased TLR4 expression on the macrophages. Others have found even more pronounced spontaneous [36] or LPS-stimulated [37] TNF and NO production by macrophages during acute *T. cruzi* infection. On the other hand, Freire-de-Lima et al. studied macrophages stimulated with LPS+IFN- $\gamma$  and concluded that they are somewhat deactivated by contact with apoptotic cells during infection [23]. The possibility that the different conclusions found in these reports came from the effects of IFN- $\gamma$  in the latter cannot be disregarded. Borges et al. [38] studied the effects of treating macrophages from *T. cruzi*-infected mice with cyclooxygenase inhibitors upon LPS stimulation *in vitro*. They found that cyclooxygenase inhibitors greatly enhanced LPS-stimulated production of TNF by cells from non-infected mice but only modestly increased production by macrophages from infected mice. Moreover, when non-stimulated macrophages were treated with cyclooxygenase inhibitors *in vitro*, increased TNF production by cells from normal but not from infected mice was detected [38]. These results parallel our observations of macrophages from mice treated *in vitro* with the cyclooxygenase inhibitor AAS, and together they point to a rather modest effect of PG $_2$  on the activation state of macrophages from infected mice.

Herein, we investigated the activation status of macrophages during *T. cruzi* infection using an *ex vivo* approach. In contrast, Freire-de-Lima et al. [23] analyzed the function of macrophages from infected mice pre-incubated (or not) with apoptotic cells; their results show that macrophages from infected mice can be deactivated by prior contact *in vitro* with apoptotic cells, as previously demonstrated in normal mice [39]. As the effects of contact with apoptotic cells *in vivo* can be observed *ex vivo* for at least 36 h [40], mimicking the contact between macrophages and apoptotic cells *in vitro* should be dispensable. Though we cannot disregard the possibility that macrophages change their activation status rapidly when cultured, the increased reactivity of freshly obtained macrophages from infected mice to LPS stimulation parallels their increased susceptibility to endotoxemia. Moreover, Freire-de-Lima

et al. [23] assumed that macrophage deactivation does occur *in vivo*, since treatment with cyclooxygenase inhibitors is able to reduce parasitemia, but we show here that this treatment produces modest macrophage reactivation in infected mice and does not alter the outcome of sublethal LPS shock. However, our results are not necessarily contradictory. Whether this rather modest enhancement of macrophage function can account for the decrease in parasitemia induced by AAS still needs to be determined. A reconciling hypothesis would be that macrophages are relatively deactivated during infection, hence their function can be enhanced by treatment with cyclooxygenase inhibitors, but they still display LPS reactivity above that of normal mice, which is responsible for the increased susceptibility to endotoxemia among infected mice. Alternatively, cyclooxygenase inhibitors could act through additional mechanisms to help reduce parasite load. Based on these observations, we rule out a direct trypanocidal activity of cyclooxygenase inhibitors.

## Materials and methods

### Mice

Male and female mice 4–8 weeks of age were used in sensitization experiments. BALB/c mice were obtained from our local facilities (IMPPG, UFPA, Rio de Janeiro) and maintained in our animal house. C57BL/6, CD1<sup>-/-</sup> and TNF-R1<sup>-/-</sup> mice were produced by CICAL (IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro); the TLR2<sup>-/-</sup> mouse was kindly provided by Dr. Shinzo Akira [41]; IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (GKO) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and kindly provided by Dr. João Vitor (INCA, Rio de Janeiro) or bred at UFPA (Seto Horizonte, Minas Gerais). MF<sup>-/-</sup> [28] (mixed D19  $\times$  B6 background) were bred at DFF (Fiocruz, Rio de Janeiro). All knockout mice were paired with age- and sex-matched WT controls of similar genetic background. The study was approved by the Institutional Ethical Committee.

### Parasites and infection

*T. cruzi* Y strain and Dm28c clone were kept by weekly or quinquennial blood passages i.p. through BALB/c mice, respectively. Either diluted blood or isolated trypomastigotes (washed and diluted in PBS) were used to infect mice by i.p. injection. Isolation from blood was performed by centrifugation at low speed, then allowing an interval for trypomastigotes to swim to the supernatant. Dm28c epimastigotes were also grown in axenic cultures and differentiated to the trypomastigote stage, as described, in TAOF medium [42]. Parasitemia was monitored by tail blood examination.

### Challenge with LPS and pre-treatment of mice

For ethical reasons, in order to reduce the number of animals used in mortality curves and still preserve statistical

significance, a 100 µg dose of LPS i.p. (Sigma, 055:85 or 011:84, diluted in PBS) was chosen as a standard from control experiments, since it was capable of killing 100% of BALB/c mice infected with 10<sup>7</sup> Y strain typhosa: signs at 5 dpi, while leaving all non-infected (injected with vehicle only) controls alive. Monoclonal anti-MIP Ab (3D7.15.5) was previously described [30], and control IgG<sub>1</sub> (purified from normal mice sera) was a kind gift from Bio-Manguinhos-Fiocruz; 200 µg were i.p. injected per mouse. AAS was purchased from Sigma (St. Louis, MO). AAS was diluted in PBS, and the solution was neutralized and sterilized. Male BALB/c mice (4 wks of age) received 1.5 mg AAS/day by i.p. injection.

### Flow cytometry

Peritoneal cells were left to adhere in complete medium (RPMI with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml gentamicin, 10 mM HEPES and 50 µM 2-ME) for 4 h in 6-well plates. Non-adherent cells were then discarded and adherent cells released from the plates with the help of a rubber policeman. Cells were kept in ice-cold PBS/2% BSA/5% FCS. Receptors were blocked by 30 min incubation with 0.5 µg anti-CD16/32, and then the cells were washed and incubated with anti-F4/80-FITC and anti-TRB4-PE (all antibodies from Pharmingen, San Diego, CA) for 60 min. After new washes, pellets were fixed in 2.8% formaldehyde-PBS and stored until acquisition. A total of 10 000 events were acquired using a FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA); data were collected and analyzed using CellQuest software.

### Macrophage assays

Mouse peritoneum was washed with 5 ml ice-cold RPMI. Peritoneal cells from 2–3 mice were pooled and left to adhere in complete medium (RPMI, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml gentamicin, 10 mM HEPES and 50 µM 2-ME) for 4 h in 24-well plates at 10<sup>6</sup> cells/well. Each suspension of pooled peritoneal cells was placed in duplicate wells. Then non-adherent cells were washed away and adherent cells received 1 ml pure RPMI or RPMI containing 100 ng LPS (Sigma, 055:85). After 24 h, culture supernatants were collected and stored at –20°C.

### Cytokines and NO production

ELISA kits for detection of murine TNF and IFN-γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ) and murine IL-10 (R&D, Minneapolis, MN) were used in duplicate assays as recommended by the manufacturers. NO levels in the supernatants were determined by adding 100 µl Griess reagent and determination of the OD at 595 nm with a Biorad multiple reader (Hercules, CA). NaNO<sub>2</sub> was used to produce the standard curve.

### Statistical analysis

Survival curves were generated with Prism computer software (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA), and comparisons between curves were made the Mantel-Cox logrank test. All other data are expressed as mean ± SEM and were compared using a two-tailed Student's *t*-test. Data were considered

statistically significant if *p* values were less than 0.05. *Ac-kno* study was not. We had the financial support from CNPq and FAPERJ (C. N. P., J. L. V. and M. T. B.), Pronex (M. T. B.) and Fiocruz (J. L. V.).

### References

- 1 Amara, D., Bellmann, E. and Cavillon, J. M., Septic shock. *Lancet* 2005, 365: 63–70.
- 2 Glauser, M. P., Bassett, G., Baumgartner, I. B. and Cohen, J., Septic shock pathogenesis. *Lancet* 1991, 338: 732–735.
- 3 Hansen, A., Chaturvedi, J. P., Marink, O. and Thomson, A. B., Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T cell-dependent production of interferon-gamma. *J. Infect. Dis.* 1997, 176: 151–157.
- 4 Nguyen, B. B. and Haux, C. A., Spontaneous cyclophosphamide disease during concurrent endotoxin and viral challenge: roles for B2 and T cell IFN-gamma production. *J. Immunol.* 1999, 162: 6239–6244.
- 5 Hansen, A. and Rasmussen-Thomsen, A., Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-α beta. *J. Immunol.* 2001, 166: 902–909.
- 6 Jeger, G., Staley, K., Groy, J., Rojas, M., Haux, C., Williams, S., Fall, T. et al., Adenovirus infection dramatically augments lipopolysaccharide-induced TNF production and sensitizes to lethal shock. *J. Immunol.* 2005, 175: 1499–1506.
- 7 Smith, S. B., Calzavara, A., Beckowski, J., Kamezaki-Hori, L. and Tomaszewski, C., Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. *J. Leukoc. Biol.* 1993, 54: 23–29.
- 8 Mehta, T., Garmarshelmer, M., Galanos, C. and Poeschlberg, M. A., TNF-α hyperresponse to Gram-negative and Gram-positive bacteria in *Propionibacterium acnes* primed or *Salmonella typhimurium* infected mice. *J. Endotoxin Res.* 2001, 7: 157–163.
- 9 Himmelfarb, H., Van Damme, J., Dillen, C., DeGroot, B. and Hillen, A., Interferon gamma: a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Streptococcus-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 1990, 171: 1853–1859.
- 10 Pedraza, Y. A., Yu, H., Granger, M. A., Smith, K., Shah, M. H. and Galispart, M. A., Cutting edge: IL-10 modulates the generalized Streptococcus reaction and immune response (IFN-gamma) production in vivo. *J. Immunol.* 2000, 164: 1649–1647.
- 11 Chavakis, J. S., Chaca, J. H., Yi, A. K. and Entig, A. M., Bacterial DNA induces K6 cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 1998, 161: 6770–6775.
- 12 Berg, D. J., Kahn, R., Rajewsky, R., Müller, W., Meese, S., Santoro, S., Girard, G. and Bernick, D., Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxin shock and the Streptococcus reaction barrier endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 2339–2347.
- 13 Black, C. M., Iwasaki, D. M., Suzuki, Y. and Himmelfarb, J. S., Effect of constitutive tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Typhlocyba grandis* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 1999, 96: 370–374.
- 14 Holachek, C., Miller, M., Dai, W. J., Shi, N., G., Ryffel, B., Schaub, G. A., Mosmann, H. and Himmelfarb, J., Tumor necrosis factor-α-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 2000, 68: 4075–4080.
- 15 Jacobs, P., Sobota, C., Castles, Y. and Goldman, M., Administration of anti-CD11 monoclonal antibody during experimental Chagas disease induces CD11<sup>+</sup> cell-dependent lethal shock. *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 103: 223–228.
- 16 Falva, C. H., Pytel, A. S., Lamas-Whinn, J., Vachon, M., Soanes, M. B. and Gellman, C. B., *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant IL1β-induced shock: over-views of inflammatory cytokines and independence of Chagas disease or TCR Vβ rearrange. *Shock* 2003, 19: 163–168.
- 17 Barahona, E. A., de Cruz, M. O., Campos, D. S. and Lima, A. O., Sensitization to the hyperactivity in bacterial lipopolysaccharide induced in mice by *Trypanosoma cruzi* infection. *Mém. Inst. Oswaldo Cruz* 1994, 79: 433–437.

- 17 Basso, N. and Stambolic, N., Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Sex. Immunol.* 1991, 102: 144–146.
- 18 Dobrowskaja, M. A. and Vogel, S. H., TNF receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Mol. Cell. Protop.* 2002, 4: 903–904.
- 19 Nabian, G. I. and Bielecki, R. L., Differential control of IFN- $\gamma$  and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 1991, 146: 3291–3294.
- 20 Almeida, I. C. and Gazzinelli, R. T., Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 70: 467–477.
- 21 Lopez, M. E., de Veiga, V. E., Barros, A. R., Fonseca, M. E. and DosReis, G. A., Activation-induced CD4<sup>+</sup> T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 1995, 154: 764–767.
- 22 Frade-de-Almeida, C. G., Nardinello, D. O., Sousa, M. B., Brito, P. T., Carne-Faria-Neto, H. C., de Mello, H. G., DosReis, G. A. and Lopez, M. E., Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000, 403: 199–201.
- 23 Lopez, M. E., Frade-de-Almeida, C. G. and DosReis, G. A., The macrophage network by cell-growth: a pathogen grows. *Immunol. Today* 2000, 21: 489–494.
- 24 Yang, H., Wang, H., Sun, K., Li, J., Ivanova, S., Hino, I., Roth, J., Baron, J. W. and Tsao, K. J., Ghb1n attenuates the innate immune response to endotoxin. *Shock* 2002, 17: 485–491.
- 25 Preopich, D. O., Almeida, I. C., Tomazella, A. C., Cardoso, J. R., Wyton, L., Taramoni, L. B., Barallob, A. and Gazzinelli, R. T., Glycosylphosphatidylinositol-anchored man-6-like glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* bind to CD14 but do not elicit distinct innate or adaptive immune responses via the CD14/MyD88 cell pathway. *J. Immunol.* 2002, 169: 3926–3933.
- 26 Pijer, J. W., Hohfeld, A. C., de Man, P., Jones, C. B., van der Werf, T. S., Tervast, J. W., Eljima, J. G. and DeLisio, J. R., Leukocyte activation and cytokine production during experimental human endotoxaemia. *Am. J. Trop. Med.* 2000, 11: 89–95.
- 27 Roma, M., Jaroskat, A. B., Liu, G., Lu, H., Hershko, A. A., Genot, C. and David, J. R., Targeted disruption of migration inhibitory factor gene results in critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* 1999, 189: 348–360.
- 28 Pearson, J. I., Brance, B. E., Stocking, K. L., Gibbins, M. B., Green, C., Willis, C. A., Church, K. et al., TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* 1998, 160: 940–952.
- 29 Calandra, T., Schramfer, B., Fog, B. I., Fugh, J., Metz, C. N., Hubner, L., Hasmann, D. et al., Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* 2003, 9: 169–175.
- 30 Rogier, Y., David, J., Glauser, M. P. and Calandra, T., MIP regulates innate immune response through modulation of Toll-Interleukin-1. *Nature* 2001, 414: 920–924.
- 31 Rogier, Y., Ched, M., Charre, A. C. and Gazzinelli, R. T., Inhibition of a p38/area-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restricts function of IL-1 receptor-associated kinase-1 and related MyD88 receptor 3- and 4-dependent clearance of macrophages. *J. Immunol.* 2003, 171: 1459–1465.
- 32 Kalia, C., Gomes-Oliveira, M., Frenkelstein, N., Tishapeter, S., Pejer, G., Hain, A., Adim, S. et al., Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol.* 2005, 174: 4295–4300.
- 33 Campos, M. A., Ched, M., Valente, E. F., Cardoso, J. R., Adim, S., Abrams-Lain, J. I., Rogier, Y. and Gazzinelli, R. T., Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 2006, 177: 1711–1718.
- 34 Oliveira, A. C., Paimon, J. R., de Almeida, L. B., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., Golmbeck, D. T., Adim, S. et al., Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycosylphosphatidylinositol and higher resistance to infection with T. cruzi. *J. Immunol.* 2004, 173: 5595–5599.
- 35 Havelius, L., Thomas, M. C., Marston, C., Merrill, M. and Lopez, M. E., Differential CD85 and CD80 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 2002, 131: 41–47.
- 36 Fenng, H., Rosenburg, M. E., Gironde, E. and Orr, A., Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1994, 16: 193–199.
- 37 Borges, M. M., Escorial, J. R., Andrade, H. F. B., Tadokoro, C. B., Pinheiro, S. and Abramowski, I., Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Lett.* 1996, 52: 1–6.
- 38 Radak, V. A., Barton, D. L., Kocross, A., Pined, B. W., Wainson, J. Y. and Hanson, R. M., Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through alternative/pasmerine mechanism involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and Fas. *J. Clin. Invest.* 1998, 101: 990–999.
- 39 Hayak, M. L., Radak, V. A. and Hanson, R. M., Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 2002, 109: 48–55.
- 40 Takasaki, O., Nozawa, H., Kasai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takada, H. and Adim, S., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, 11: 493–502.
- 41 Grossman, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Merrill, C. M. and Goldenberg, S., *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. 864 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 195: 215–221.

## **11. Anexo 2**

Paiva, C. N.; Figueiredo, R. T.; Kroll-Palhares, K.; Silva, A. A.; Silvério, J. C.; **Gibaldi, D.**; Pyrrho, A. S.; Benjamim, C. F.; Lannes-Vieira, J. & Bozza, M. T. 2009. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Leukoc. Biol.** **86**: 1239-1246.



## CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection

Cláudia N. Paiva,<sup>\*,†</sup> Rodrigo T. Figueiredo,<sup>\*</sup> Karina Kroll-Palhares,<sup>†</sup> Andrea A. Silva,<sup>†</sup> Jeline C. Silveiro,<sup>†</sup> Daniel Gibaldi,<sup>\*,†</sup> Alexandre dos S. Pyrrho,<sup>†</sup> Claudia F. Benjamin,<sup>‡</sup> Joseli Lannes-Vieira,<sup>†</sup> and Marcelo T. Bozza<sup>\*,†</sup>

Departamentos de <sup>\*</sup>Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, <sup>†</sup>Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, and <sup>‡</sup>Farmacologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil; and <sup>§</sup>Laboratório de Pesquisa em Auto-Imunidade e Imuno-regulação, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

RECEIVED MARCH 23, 2009; REVISED JUNE 24, 2009; ACCEPTED JUNE 30, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0909107

### ABSTRACT

CCL2/MCP-1 has emerged recently as a critical factor in infectious and autoimmune myocarditis. In fact, this chemokine is produced in great amounts in hearts from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and is known to enhance parasite uptake and destruction by macrophages. Herein, we studied the involvement of CCL2 in tissue inflammation and resistance to *T. cruzi*. Infected CCL2<sup>-/-</sup> mice developed higher parasitemias and died earlier than WT mice. Close to their death, *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> presented greater amounts of TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-10 in plasma than WTs and clinical signs of systemic inflammatory response. Amastigote nests were more frequent in hearts and livers from infected CCL2<sup>-/-</sup> tissues than in WTs, and reduced numbers of leukocytes infiltrated their tissues. Leukocytes formed diffuse but not focal infiltrates in hearts from infected CCL2<sup>-/-</sup> mice, and perivascular cuffs could still be found in their livers. Infected CCL2<sup>-/-</sup> mice had smaller percentages of activated CD11b (Mac-1)<sup>+</sup>CD107b (Mac-3)<sup>+</sup> macrophages and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells among heart and liver infiltrates than WTs (flow cytometry), indicating that CCL2 controls subset migration/activation. CCL2 accumulated among focal heart infiltrates, suggesting that this chemokine is involved in retention of mononuclear cells in particular spots. Peritoneal macrophages from CCL2<sup>-/-</sup> mice displayed decreased trypanocidal activity. Our results demonstrate that CCL2 contributes to reduce parasite growth and indicate that it does so by controlling the distribution, cellular composition, and state of activation of inflammatory infiltrates in acute *T. cruzi* infection. *J. Leukoc. Biol.* 88: 000-000; 2009.

### Introduction

CCL2/MCP-1/JE is a chemokine secreted by a variety of cells in response to inflammation and represents a critical factor to the recruitment of monocytes to tissues [1-3]. The capacity to control infection can be hampered in the absence of CCL2/CCR2-mediated monocyte recruitment, generating susceptibility to pathogens such as *Toxoplasma gondii* [4, 5] and *Mycobacterium tuberculosis* [4]. Like monocytes, T lymphocytes are also targets to CCL2 [6]. Besides being a T cell chemoattractant, CCL2/CCR2 interaction can rescue CD8 lymphocytes from antigen/growth factor deprivation-apoptosis [7], enabling them to migrate to sites where antigen is available. Moreover, the generation of effector and central memory CD8<sup>+</sup> T cells is deficient in the absence of CCL2, as well as the migration of central memory CD8<sup>+</sup> cells to inflammatory sites [8].

CCL2 emerged recently as an essential factor to the development of autoimmune and infectious myocarditis. Full development of autoimmune myocarditis caused by immunization with myosin depends on the CCL2/CCR2 interaction [9, 10], as well as the myocardium mononuclear infiltrates produced by infection with Coxsackie B9 virus [11], and enhanced heart expression of CCL2 accelerates the inflammation caused by cytomegalovirus [12]. Above all, enhanced expression of CCL2 targeted to the heart can, per se, produce leukocyte infiltration and progress to dilated cardiomyopathy [13], reinforcing its pivotal role in myocarditis.

*Trypanosoma cruzi* acute infection is accompanied by a severe tissue inflammation. Highly parasitized organs such as the heart are infiltrated by mononuclear cells concentrated in foci around parasite-containing areas and mononuclear infiltrates scattered throughout the organ. During acute

Abbreviations: dpi=days postinfection, Fc $\alpha$ L=Fc $\alpha$ L $\alpha$ 1, TGF- $\beta$ =transforming growth factor- $\beta$ , Mac-1/3=macrophage-activated complex 1/3, WT=wild type.

1. Correspondence: Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho 373, CCS Bloco 1, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21941-902. E-mail: cnpaiva@inamc.com; mbozza@micro.ufrj.br

stage, parasite growth in tissues is contained by recruited CD8-specific cells that destroy intracellular reservoirs [14, 15] and possibly by IFN- $\gamma$ -activated macrophages that detect *T. cruzi* molecular patterns [16, 17]. The chemokine CXCL2 participates in parasite uptake/destruction by macrophages, acting as a mediator of platelet-activating factor-induced parasite uptake [18] and reducing *T. cruzi* growth in cultures of peritoneal macrophages through a NO-dependent mechanism [19]. In the pleural cavities of IFN- $\gamma$ -primed mice, *T. cruzi* GPI molecules act through TLR2 to induce tissue chemokine production and inflammation, and neutralization of CXCL2, but not other chemokines, abolishes leukocyte recruitment [20]. We and others [16, 21, 22] have shown previously that the expression of CXCL2 is increased highly in the hearts of *T. cruzi*-infected mice, and there is a correlation between heart dysfunction and CXCL2 serum concentrations in Chagasic patients [23, 24], indicating that CXCL2 might be a contributor to recruitment and retention of leukocytes in infected hearts. These data prompted us to investigate the participation of CXCL2 in acute, infectious *T. cruzi* myocarditis. Herein, we studied the role of CXCL2 in *T. cruzi* growth control and tissue inflammation, with emphasis on the composition and distribution of activated leukocytes recruited to infected hearts.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice and infection

Five- to 10-week-old female and male CXCL2<sup>-/-</sup> and WT (C57BL/6J129SvEv) congenic mice were obtained from Harvard Medical School (Boston, MA, USA) and kept in our animal facilities (Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil). *T. cruzi* T strain was maintained by weekly blood passages i.p. in mice. Parasitemia was estimated by Brewer's method from blood obtained from the tail vein [25]. Leishain was accompanied daily during acute infection. Animals were treated with heparin i.p. (50  $\mu$ L) to prevent blood clotting, and 18 min after injection, they were killed by blood removal through a mini-orbital plasma-injured pipette under anesthesia. The experiments were performed according to guidelines of the Institutional Animal Welfare Committee.

### Flow cytometry

Mononuclear cell suspensions were prepared from spleen cells by lysing red cells in 10% FCS-PBS. Heart and liver mononuclear cells were purified by washing tissues in warm PBS to remove blood, cutting it in small pieces (<1 mm), passing it through a stainless-steel mesh (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and then resuspending in 80% Percoll, followed by the addition of an equal volume 40% Percoll layer. Suspension was then centrifuged for 50 min at 4°C to recover leukocytes [26]. Cells ( $10^5$  spleen or  $10^4$  heart/liver) were washed and incubated in the presence of 2% mouse serum, 0.5  $\mu$ g anti-CD16/CD32, 0.05% mouse IgG1, and 0.1% sodium azide with 0.5  $\mu$ g specific fluorescein-conjugated antibodies (whole mouse IgG1 and anti-CD16/CD32, Mac-1-ITTC, Mac-3-PE, CD45PE, CD45PE, and CD45-ITTC; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 1000 to 10,000 cells were acquired using a FACSCalibur (Becton Dickinson). Single-color labeled samples were prepared to set up compensation ratios. Gated cells for positive cells were established based on curve inflection and unstained or isotype-labeled staining controls (rat IgG1-PE as a control for Mac-3 staining).

### Histopathology

Tissues were embedded in paraffin, cut in sections (5  $\mu$ m), mounted in glass slides, and stained with H&E. Tissue parasitemia was assessed by counting the parasitose area in 20 microscopic fields (100 $\times$ ). Images were digitized (color view 3.5 digital video camera, Zeiss microscope) and analyzed with AutoImage 2 Software. Leukocytes were counted using digital photos of these sections (200 $\times$ ) from infected mice. Inflammatory infiltrates were characterized as diffuse or focal depending on how closely the inflammatory cells were associated. We standardized the analysis of focal infiltration in heart sections as follows. In samples of 20 fields/section from a single individual (200 $\times$ ), we measured the percent area of the field occupied by nucleus staining, an indirect measure of the intensity of leukocyte infiltration. The presence of focal infiltrates was indicated by a high percentage of leukocyte infiltrate area concentrated in just a few of the 20 fields, producing a high dispersion of data. Therefore, we used standard deviation between percent area of the field occupied by the leukocyte infiltrate for 20 fields/individual as a parameter for the presence of focal infiltrates in the tissues from an individual, and we named it "focal infiltrations index." Automated analysis was confirmed by the observation of these identified aspects and was only performed after visually discarding the possibility of multifocal infiltrate spread throughout the fields (in which case, percentage of fields occupied by infiltrates would be expected to be higher).

### Immunohistochemistry

Heart and liver were removed, embedded in tissue-fixing medium (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA), and stored in liquid nitrogen. Serial 5  $\mu$ m-thick sections were fixed in cold acetone and subjected to indirect immunoperoxidase staining as described previously [18, 21]. Two sections from each of three to four mice were analyzed/group. Polyclonal anti-CXCL2 produced in rabbits was a kind gift from Dr. Mauro Marino Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil).

### Macrophage assay

Resident peritoneal macrophages were obtained from CXCL2<sup>-/-</sup> or WT mice and infected with purified blood trypomastigotes in a parasite:cell ratio of 1:1 in 24-wells plates. Cells were then incubated for 2 h in the presence of parasite, washed extensively to remove free parasite, and stimulated with LPS (50 ng/ml). The number of trypanostigotes in supernatants was counted in Neuman chambers.

### Cytokines

Purified plasma samples were prepared from individual blood samples (three to four mice) and assayed in duplicate in quantitative ELISA assays as proposed by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

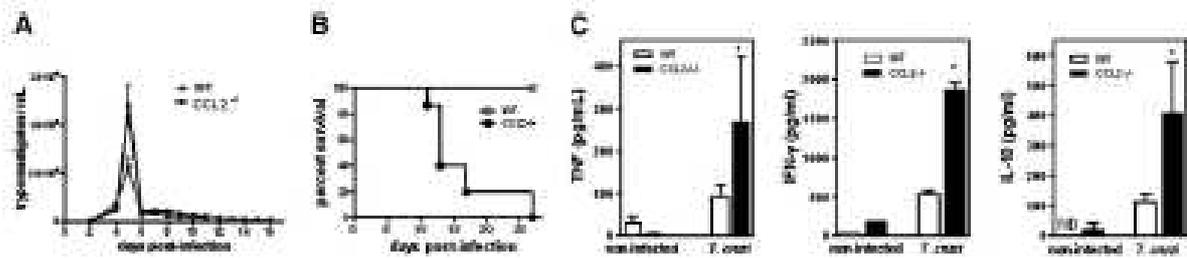
### Statistical analyses

Parasitemias were compared by U-test. Survival analysis was performed by Fisher's exact test, and the evaluation of cytokine production and tissue parasitemia was performed by unpaired Student's *t*-test.

## RESULTS

### CXCL2<sup>-/-</sup> mice had increased susceptibility to *T. cruzi* infection

CXCL2<sup>-/-</sup> mice infected with 10<sup>4</sup> Y strain blood trypomastigotes displayed higher peaks of parasitemia than WT mice but were still able to control it during acute phase (Fig. 1A). Nevertheless, CXCL2<sup>-/-</sup> died early (most of them were dead between 11 and 17 dpi), and WT mice survived acute infection (Fig. 1B). Close to the time of their death, mice



**Figure 1.** *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice have increased peaks of parasitemia, mortality rate, and systemic cytokine responses than WT mice. CCL2<sup>-/-</sup> and WT mice were infected with 10<sup>4</sup> blood trypomastigotes from the Y strain. (A) Parasitemia was evaluated as described in Materials and Methods for each of five individual mice/group (mean ± SEM) and found to be significantly different by U-test ( $P < 0.05$ ). (B) Mortality after infection for groups of 15 CCL2<sup>-/-</sup> and 10 WT mice. Mortality was significantly different when compared through Fisher's test ( $P < 0.05$ ). Data represent the sum of two independent experiments. (C) *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice presented higher plasma concentrations of TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-10 than WT mice. Mice were killed 13 dpi, and their plasma samples (two to six pools each from three to four mice/group) were analyzed by ELISA. Data represent mean ± SEM between independent samples ( $n = 3-6$ ). \*, Differences were considered significant ( $P < 0.05$ ) between infected WT and CCL2<sup>-/-</sup> mice when compared by unpaired Student's *t*-test.

prevented prostration, vasodilation, and rough hair. At this time-point, concentrations of TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-10 in plasma were greater in infected CCL2<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 1C), indicating the sudden establishment of a severe systemic inflammatory response.

#### *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice displayed an increased tissue parasite burden with reduced focal infiltration of leukocytes

Hearts from *T. cruzi*-infected WT mice presented focal and diffuse mononuclear infiltrates at 14 dpi, as described previously [15, 21], and a marked decrease in mononuclear focal infiltrates was observed in hearts from infected CCL2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2, A and D). Parasite burden, as assessed by number of amastigote nests/area, was greater in hearts from CCL2<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 2B). A smaller number of mononuclear cells infiltrated the hearts from infected CCL2<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice (Fig. 2, A and C).

A less marked but similar picture was found in the livers, which from *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice, presented a trend toward more diffuse parenchyma infiltration of mononuclear cells than WT, although perivascular cuffs and small focal infiltrates could still be found (Fig. 2, E and H). Amastigote nests were also more frequent in the livers from CCL2<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 2F), and there were a smaller number of leukocytes infiltrating their livers (Fig. 2G).

#### CCL2 is required to the recruitment of activated CD8 cells and monocytes to hearts and livers from *T. cruzi*-infected animals

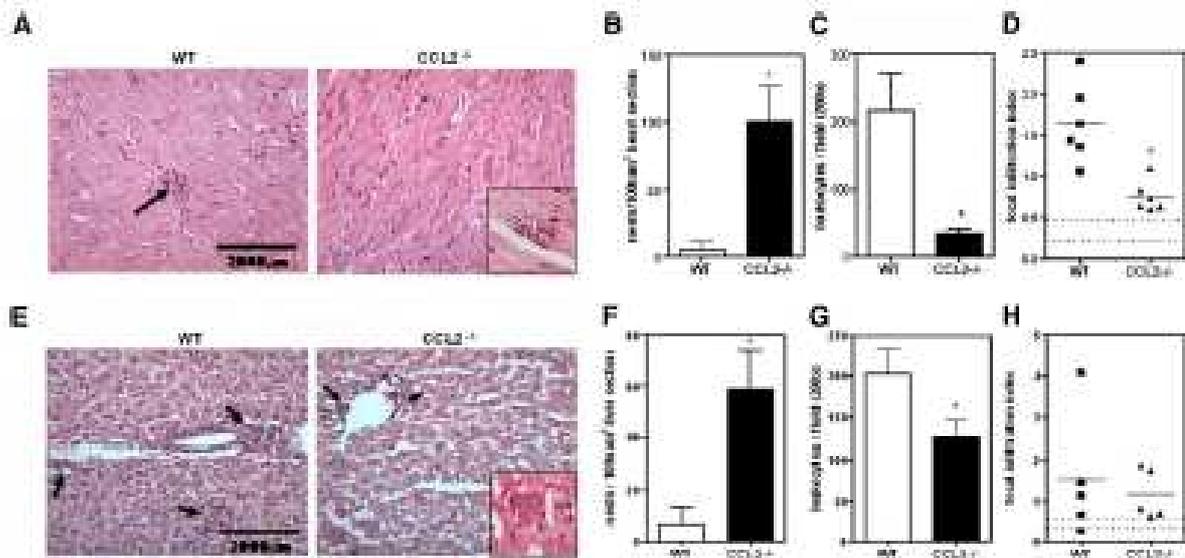
The presence of focal infiltrates has been assigned to the establishment of a specific antiparasitic response, in which CD8 T cells predominate [21, 27]. We studied by flow cytometry the representation of recently activated CD69<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells among mononuclear heart and liver infiltrates in CCL2<sup>-/-</sup> mice at 13 dpi to determine whether this chemokine selectively controls infiltrate subset composition and/or function.

A greater percentage of CD69<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> infiltrated the hearts of infected CCL2<sup>-/-</sup> than that of WT mice (Fig. 3, upper), a phenomenon also paralleled by increased splenic percentages of CD69<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> among total mononuclear infiltrates. In livers, although there was an increase in percentage of activated CD69<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> cells in WT upon infection, no such phenomenon was observed in CCL2<sup>-/-</sup> mice.

The percentage of CD69<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> among cells infiltrating the hearts and livers was smaller in infected CCL2<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 3, lower). Decreased percentages of CD69<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> were also found in the spleens from infected CCL2<sup>-/-</sup> compared with WT mice, indicating a general deficiency in the activation of CD8 cells in the absence of CCL2. At later time-points, the total percentage of CD8<sup>+</sup> cells in WT surpassed CD4<sup>+</sup> cells, most of them displaying an activated profile (data not shown).

The expression of CD11b (Mac-3) correlates with recent monocyte/macrophage recruitment to lesions and activation [28, 29]. We assessed the recruitment of monocytes to the hearts and livers of infected mice by flow cytometry to CD11b (Mac-3)<sup>+</sup>CD11b (Mac-1)<sup>+</sup> cells. The percentage of CD11b (Mac-3)<sup>+</sup>CD11b (Mac-1)<sup>+</sup> cells was smaller in hearts and livers from infected CCL2<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 4A), confirming that CCL2 is involved in recruitment and/or activation of monocytes to *T. cruzi*-infected tissues.

Addition of CCL2 to infected macrophage cultures is known to reduce parasite growth, supporting an autocrine/paracrine role for CCL2 in the trypanocidal activity of macrophages [19]. To determine whether trypanocidal activity of macrophages is impaired in CCL2<sup>-/-</sup> mice, we evaluated parasite growth in their macrophages after activation with LPS. Activated macrophages from CCL2<sup>-/-</sup> mice cleared trypomastigotes less efficiently than cells from WT mice, pointing to a compromised macrophage effector function in the absence of CCL2 (Fig. 4B). These data indicate that CCL2 controls not only monocyte/macrophage recruitment to tissues but also their trypanocidal activity.



**Figure 2. *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> displayed a more diffuse heart infirm and a higher parasitic burden than WT mice.** CCL2<sup>-/-</sup> and WT mice were infected with 10<sup>4</sup> blood trypomastigotes from the Y strain and killed 14 dpi. Representative heart (A) and liver (E) sections from infected mice, showing more intense and focal (arrows) mononuclear infiltration in WT than in CCL2<sup>-/-</sup> mice. Granula in CCL2<sup>-/-</sup> mice (A and E), show amastigote nests, scarce in infected WT sections and more frequent in CCL2<sup>-/-</sup> mice tissues (400 $\times$  original magnification). Number of amastigote nests in hearts (B) and livers (F) is expressed as mean  $\pm$  sem (n=7 mice/group). The number of nests/individual mouse was estimated from 20 tissue fields/section, taken from each of two sections. Number of leukocytes/field in heart (C) and liver (G) sections expressed as mean  $\pm$  sem (n=5–7 mice/group). At least two sections from each infected individual mice were counted. Quantification of focal infiltration in heart (D) and liver (H) sections. Data represent mean for the focal infiltration index, calculated as described in Materials and Methods, for each individual mice. Dotted lines in graphs represent percent change of focal infiltration index for normal mice sections. \*, Differences were considered significant (P<0.05) between infected WT and CCL2/MCP1<sup>-/-</sup> mice when compared by unpaired Student's t-test.

**CCL2 is accumulated in areas of focal infiltrates in the heart of *T. cruzi*-infected mice**

As focal infiltrates were rare in infected CCL2<sup>-/-</sup> mice, we studied the correlation between CCL2 and focal infiltrates in tissues from infected C57BL/6 mice. Faint CCL2 expression was detected in the myocardium from noninfected controls (Fig. 5). CCL2 staining was observed in endothelial cytoplasmic vesicles in infected and noninfected mice and on the luminal endothelial surface in infected mice (nests in Fig. 5), as shown previously in ischemic muscles [30]. CCL2 staining was also found among cardiomyocytes from infected mice. A remarkable increase in the expression of CCL2 was observed in hearts from infected C57BL/6 mice, most of it confined to the mononuclear foci scattered throughout the myocardium (Fig. 5). Many CCL2<sup>+</sup> cells were also found among infiltrating inflammatory cells. No CCL2 staining was observed in control sections prepared by omitting anti-CCL2 antibodies, and a diffuse, faint labeling was achieved by replacing anti-CCL2 with rabbit IgG.

**DISCUSSION**

CCL2 is secreted in the course of *T. cruzi* infection [21] and participates in *T. cruzi* uptake [18] and activation of macro-

phages to trypanocidal activity [19]. A role for CCL2 as a leukocyte recruiter during *T. cruzi* infection was suggested by CCL2-mediated recruitment of leukocytes to the pleural cavity after TLR2 recognition of tGPI maxima [20]. In agreement with these data, we have shown here that in the absence of CCL2, mononuclear cells do not form focal infiltrates in *T. cruzi*-infected hearts, the parasite burden is greater, and tissue infiltrates are composed by less-activated CD8 lymphocytes and macrophages, cells thought to be essential to control parasite growth. A similar but milder effect was found in the liver. Hearts from infected CCL2<sup>-/-</sup> were almost devoid of focal infiltrates (in contrast with WT mice), and perivascular cuffs and small focal infiltrates were found in their livers.

In contrast with our data, mice deficient in CCL2 receptor CCR2 infected with the *T. cruzi* Colombian strain did not present differences in intensity or composition of heart leukocyte infiltration, preserving monocyte and CD8<sup>+</sup> infiltration [31]. Although they also found a greatly increased heart parasitism in acute infection, parasitemias were similar to WT in Colombian-infected CCR2<sup>-/-</sup> mice, unlike in Y strain-infected CCL2<sup>-/-</sup>. The reasons for conflicting results between our work and that by Harrison et al. [31] more probably lie in the use of different parasite strains to infect

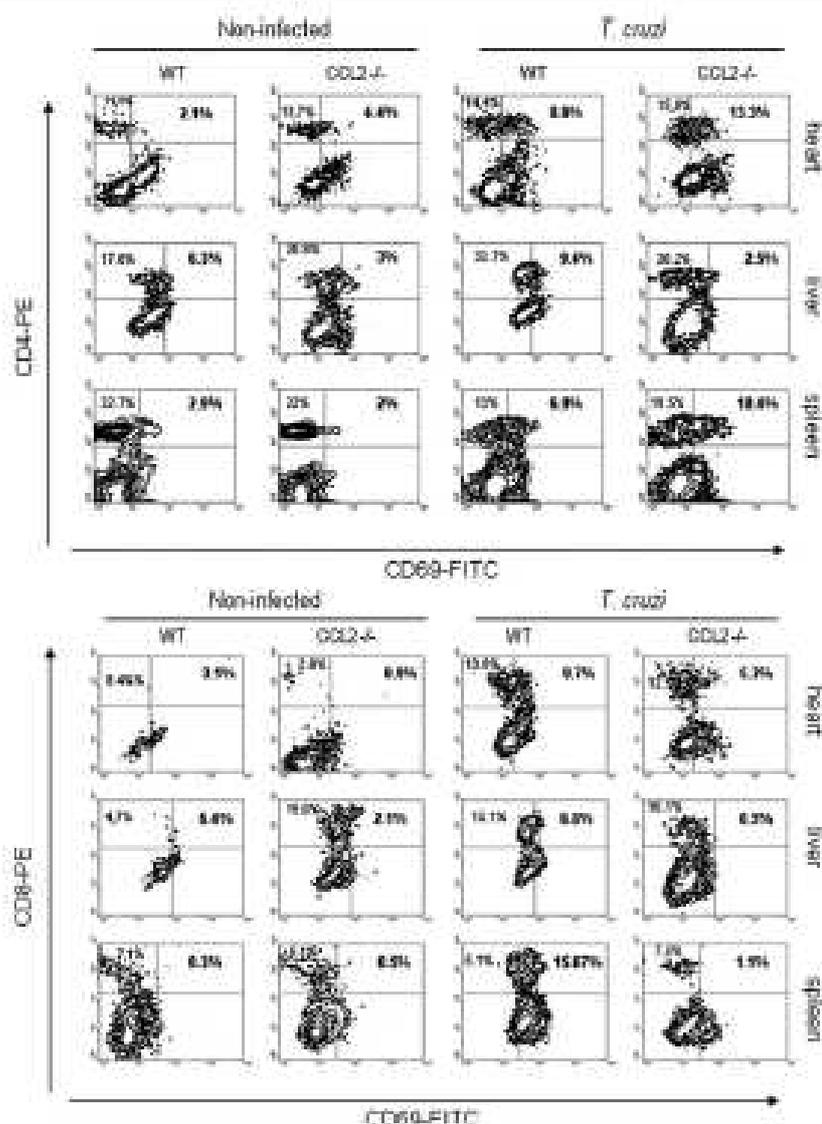
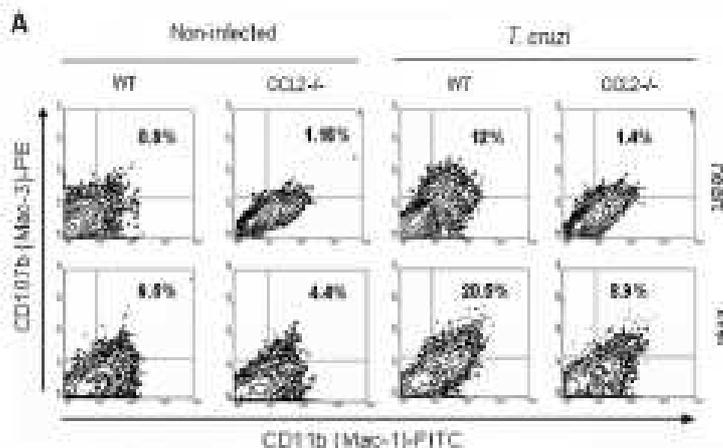


Figure 3. Percentage of CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells infiltrating hearts and livers from CCL2<sup>-/-</sup> and WT mice, which were left uninfected or infected with 10<sup>6</sup> blood trypomastigotes from the Y strain and killed 18 dpi. Mononuclear cell samples were prepared after their isolation from pooled tissues from three to eight mice/group, labeled for surface markers, and studied by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Contour plots are representative of two independent samples/group, and three to four similar experiments were performed.

mice, although some of the differences can be a result of particularities of these knockout mice strains. In fact, we observed that CCL2<sup>-/-</sup> mice infected with Y strain have increased parasitemia and heart parasitism and reduced numbers of Mac-2<sup>+</sup> cells infiltrating their hearts, similar to Y strain-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice, but unlike them, do not die during acute phase (data not shown). Moreover, Hardison et al. [31] did not analyze individual cells from heart infiltrates but rather, quantified the mRNA for CD4, CD8, and I4/80 markers and did not assess the state of activation of these cells, so it is possible that different conclusions came from different sensitivities of the experimental approaches.

Our data reinforce CCL2 as an essential factor to monocyte recruitment and activation to trypanocidal activities. Similar to *T. gondii* infection [4], the increase in parasite burden that we found in the absence of CCL2-induced macrophage tissue infiltration/effector function corroborates the notion that macrophages are active trypanocidal agents during *T. cruzi* infection [32, 33].

Highly increased IFN- $\gamma$  and TNF were found in *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice. Previously, we have shown that CCL2<sup>-/-</sup> mice are highly susceptible to septic shock, secreting small amounts of IL-10 [34]. Our data do not allow us to discard the possibility that *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> mice rather die of septic shock than of uncontrolled parasit-



(Mac-1)<sup>+</sup>CD117b<sup>+</sup> (Mac-2)<sup>+</sup> mononuclear cells infiltrating hearts and livers was smaller in infected CCL2-deficient WT mice. CCL2<sup>-/-</sup> mice and WT mice were infected with 10<sup>4</sup> blood trypomastigotes from the Y strain and killed 14 dpi. Mononuclear cell samples were prepared after their isolation from perfused tissues from three to eight mice/group, labeled for surface markers, and studied by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Contour plots are representative of two independent samples/group, and two similar experiments were performed. (B) Peritoneal macrophages from CCL2<sup>-/-</sup> have decreased trypanocidal activity compared with WT mice. Resident peritoneal macrophages were obtained from mice and infected with purified blood trypomastigotes in a parasite:cell ratio of 1:1 in duplicate. Cells were then incubated for 2 h in the presence of parasites, washed extensively to remove free parasites, and stimulated with LPS (50 ng/ml). Results represent mean ± s.e.m. of duplicate. The number of trypanomastigotes in supernatants was counted in Neubauer chambers. Data are representative of two similar experiments performed. \*, Differences were consistent and significant (*P* < 0.05) between infected WT and CCL2<sup>-/-</sup> mice when tested by unpaired Student's *t* test.

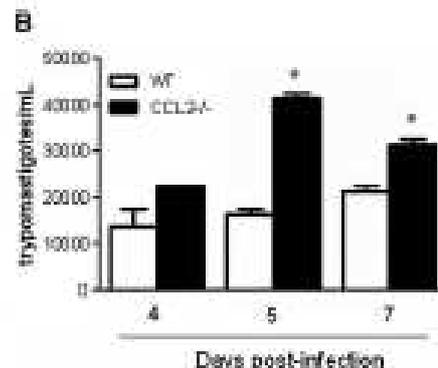


Figure 4. Reduced infiltration and effector function of monocytes/macrophages in the absence of CCL2. (A) The percentage of activated CD11b<sup>+</sup> cells in hearts and livers was smaller in infected CCL2-deficient WT mice. CCL2<sup>-/-</sup> mice and WT mice were infected with 10<sup>4</sup> blood trypomastigotes from the Y strain and killed 14 dpi. Mononuclear cell samples were prepared after their isolation from perfused tissues from three to eight mice/group, labeled for surface markers, and studied by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Contour plots are representative of two independent samples/group, and two similar experiments were performed. (B) Peritoneal macrophages from CCL2<sup>-/-</sup> have decreased trypanocidal activity compared with WT mice. Resident peritoneal macrophages were obtained from mice and infected with purified blood trypomastigotes in a parasite:cell ratio of 1:1 in duplicate. Cells were then incubated for 2 h in the presence of parasites, washed extensively to remove free parasites, and stimulated with LPS (50 ng/ml). Results represent mean ± s.e.m. of duplicate. The number of trypanomastigotes in supernatants was counted in Neubauer chambers. Data are representative of two similar experiments performed. \*, Differences were consistent and significant (*P* < 0.05) between infected WT and CCL2<sup>-/-</sup> mice when tested by unpaired Student's *t* test.

am, but we have found increased IL-10 secretion among infected CCL2<sup>-/-</sup>, ruling out unbalanced production of this anti-inflammatory cytokine as a cause for death.

Heart infiltration by CD8 cells during infection with the Colombian strain of *T. cruzi* has been associated with an early chemokine production, such as CCL2, CCL5/RANTES, and CCL3/MIP-1α [35, 36]. This influx of T cells was assigned partially to the increased mononuclear expression of CCR5, as it was inhibited by CCR5 antagonist Mar-RANTES. However, CCR5<sup>-/-</sup> cells transferred to RAG<sup>-/-</sup> mice were still able to increase heart inflammation and reduce parasitemia significantly [37], indicating that other mechanisms for recruiting mononuclear cells are operative. We showed here evidence that recruitment to and/or activation of CD8 cells within infected tissues also depend on the expression of CCL2. Although CCL2 can determine CD8 cell migration in other models [8, 38], it has not been examined in this or other studies whether it acts directly on CD8 cells. It is possible that the extensive crosstalk between CCL2 and LTB4 [39] is involved in recruitment of CD8 effector cells, as LTB4 is a well-known chemoattractant for CD8 [40], and CD8 function is essential to control *T. cruzi* infection [14, 15, 41]; as CTL activity [38], ability to reject grafts, and generation of memory CD8 cells [8] are reduced in the absence of CCL2, the general decrease in CD8 activation that we have found in *T. cruzi*-infected CCL2<sup>-/-</sup> is probably one of the main reasons for their increased parasite growth. To our knowledge, this is the first report about the participation of CCL2 in CD8<sup>+</sup> activated cell recruitment to the heart and awaits further assessment in models of infectious and autoimmune myocarditis.

A role for CCL2 in recruitment of mononuclear cells to the heart and generation of myocarditis has been the subject of much research, as overexpression of this cytokine in the heart, although slow (2–12 months), can, per se, produce cardiomyopathy [13]. Recruitment of activated mononuclear cells in CCL2 transgenic during cytomegalovirus infection accelerates cardiomyopathy [12], and CCL2 blockade can prevent mononuclear infiltration in Cocksackie B3 infection [11] and development of autoimmune myocarditis [9]. Consistently, we have shown that in acutely *T. cruzi*-infected tissues, the accumulation of mononuclear cells in foci was impaired severely in the absence of CCL2 expres-

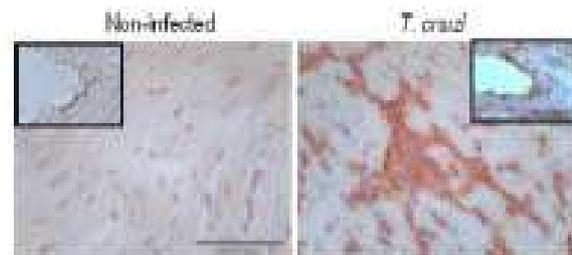


Figure 5. CCL2 was concentrated in areas of focal infiltrates in hearts from infected mice. C57BL/6 mice were infected i.p. with 10<sup>4</sup> blood trypomastigotes, as described in Materials and Methods, and killed 14 dpi. Frozen heart sections were subjected to indirect immunoperoxidase staining to CCL2 expression. Two sections from each of three to four mice were analyzed/group. The picture shows CCL2 staining in the space between cardiomyocytes. (Insert) Details of blood vessels.

tion. Also, expression of CCL2 correlated with focal mononuclear infiltrates in hearts from *T. cruzi*-infected WTs, indicating that cells gather in areas where large amounts of CCL2 are present. The impaired infiltration of Mac-5<sup>+</sup> cells shown here is consistent with the increased heart infiltration of these cells in mice that overexpress CCL2 in their hearts [42]. It remains to be tested whether in the pathogenesis of *T. cruzi* myocarditis there is a contribution of the FasL released by dying, infiltrating mononuclear cells, a mechanism described as the basis for CCL2-generated cardiomyopathy [42, 43]. Indeed, Chagas' disease patients with heart failure present increased numbers of apoptotic, inflammatory cells in their hearts [44], and *gld1/gld1* mice (which have no functional FasL) have a greatly decreased mononuclear infiltration and myocarditis upon *T. cruzi* infection [45], suggesting that it might be the case.

Our data support that CCL2 is critical in parasite burden and tissue inflammation during acute *T. cruzi* infection, particularly in the heart, controlling the distribution, cellular composition, and state of activation of inflammatory infiltrates. Still, they suggest that CCL2 is involved in focusing activated leukocytes to destroy parasite reservoirs.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was from FAPERJ, CNPq, Pronex, and Fiocruz. We thank Dr. Barret J. Rollins from the Dana-Farber Cancer Institute for kindly providing *mip-1/ccl-2*<sup>-/-</sup> mice and their WT controls. We are grateful to the computer expert Rafael F. M. Moraes for his assistance with the graphics and statistical analyses.

## DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., Pamer, E. G. (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.
- Lu, S., Riedinger, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Laksza, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., Rollins, B. J. (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein-1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187, 601–608.
- Kuziel, W. A., Murray, S. J., Dawson, T. C., Golson, S., Srinivasan, O., Ley, K., Littman, D. R. (2002) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12033–12038.
- Robben, P. M., LaRocca, M., Kuziel, W. A., Sibley, L. D. (2006) Recruitment of CCR2<sup>+</sup> monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* 201, 1761–1770.
- Benevides, L., Milanesi, C. M., Yamachi, L. M., Benjamin, C. F., Silva, J. S., Siqueira, N. M. (2008) CCR2 receptor is essential to activate microbial mechanisms to control *Trypanosoma cruzi* infection in the central nervous system. *Am. J. Pathol.* 173, 741–751.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1994) Monocyte chemoattractant proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *FASEB J.* 8, 1065–1069.
- Das-Gupta, E., Verma, R., del Prete, M. J., Silva, A., Garcia-Sanz, J. A. (2007) CCL2 inhibits the apoptosis program induced by growth factor deprivation, rescuing functional T cells. *J. Immunol.* 179, 7312–7317.
- Wang, T., Dai, H., Wan, N., Moser, B., Dai, Z. (2008) The role for monocyte chemoattractant protein-1 in the generation and function of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 180, 2885–2893.
- Goerz, S., Ouil, R., Bendner, A., Dangler, T. J., Torzewski, J., Egashira, K., Rose, N. R., Katus, H. A., Rysa, Z. (2005) Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in induction of experimental autoimmune myocarditis and of active anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. *Circula-tion* 112, 3400–3407.
- Matsunaga, Y., Tsukada, Y., Miyazaki, A., Sokuwa, H., Kobayashi, K. (2004) C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy: rescue from death and prevention of dilated cardiomyopathy by chemokine receptor DNA therapy. *J. Immunol.* 173, 3635–3641.
- Shan, Y., Xu, W., Chu, Y. W., Wang, Y., Liu, Q. S., Xiong, S. D. (2004) Coxsackievirus group B type 3 infection upregulates expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cardiac myocytes, which leads to enhanced migration of mononuclear cells in viral myocarditis. *J. Virol.* 78, 12548–12555.
- Friedberg, M. K., Adams, A., Scanzette, N., Parker-Thornburg, J., Kotelikovsky, P. (2001) Cytomegalovirus infection accelerates inflammation in vascular tissue overexpressing monocyte chemoattractant protein-1. *Circ. Res.* 89, 1224–1230.
- Kobayashi, P. E., Quach, T., Bergsma, S., Brockbridge, S., Hensley, J., Altschuld, R., Gerschlager, G., Klotz, S., Orens, C., Parker-Thornburg, J. (1998) Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am. J. Pathol.* 152, 101–111.
- Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L., Foster, M. (1990) Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and pericarditis in experimental Chagas' disease. *Am. J. Pathol.* 137, 1829–1839.
- Russo, M., Starobinets, N., Marcondes, M. C., Minoprio, P., Hontela-Berlinck, M. (1995) The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol. Lett.* 49, 163–168.
- Talmon, A., Ribeiro, C. S., Aliberti, J. C., Michalowski, V., Souza, P. V., Mota, S. M., Romão, A. J., Almeida, L. C., Farber, J., Lanna-Vieira, J., Silva, J. S., Gazzinelli, R. T. (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental Chagasic cardiomyopathy: tissue peritissular and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microb. Infect.* 2, 851–856.
- Medo, R. G., Machado, C. R. (2001) *Trypanosoma cruzi* peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp. Parasitol.* 97, 15–23.
- Talmon, A., Santana, G., Barcelos, L. S., Ishii, S., Shimizu, T., Romão, A. J., Silva, J. S., Soares, M. B., Teixeira, M. M. (2000) Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Microb. Infect.* 2, 789–796.
- Aliberti, J. C., Machado, F. S., Souza, J. T., Gazzinelli, A. P., Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., Silva, J. S. (1999)  $\beta$ -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbicidal activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Pathol.* 154, 4819–4826.
- Cordão, P. S., Klein, A., Talmon, A., Cruzinho, S. F., Takachi, O., Akira, S., Silva, J. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, M. M. (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- $\gamma$ -primed macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71, 837–844.
- Das-Gupta, E., Ruffe, E., Santiago, H. C., Torres, R. A., Mariano, A. P., Pires, C. N., Silva, A. A., Gazzinelli, R. T., Lanna-Vieira, J. (2005) Presence of CD8<sup>+</sup>  $\beta$  T cells in *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis is associated with acquisition of CD62L<sup>low</sup>/LFA-1<sup>High</sup>/VLA-4<sup>High</sup> activation phenotype and expression of IFN- $\gamma$ -inducible adhesion and chemottractant molecules. *Microb. Infect.* 7, 971–984.
- Ruffe, E., Soares, A. L., Gastano, R. C., Machado, P. P., Barcelos, L. S., Russo, R. C., Santiago, H. C., Souza, D. G., Pinho, V., Tanowitz, H. B., Camargo, E. B., Souza-Romero, O., Teixeira, M. M. (2005) A DNA vaccine encoding CCL4/MIP-1 $\beta$  enhances myocarditis in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microb. Infect.* 7, 2741–2751.
- Talmon, A., Rocha, M. O., Copan, J., Maxwell, P., de Lencastre, J., Ribeiro, A. L., Teixeira, M. M. (2000) Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagasic cardiomyopathy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 909, 645–649.
- Ramos-Baron, R., Cunha-Neto, E., Fae, K. C., Martelli, F. G., Müller, N. G., Cavalcanti, V. L., Lottin, R., Mady, C., Katz, J., Goldberg, A. C. (2006) The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 43, 805–811.
- Breiner, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 395–396.
- Denlinger, E. M., Walker, F. M. (1991) A simple method for the purification of human peripheral blood monocytes. A substitute for Sephadex-MN. *J. Immunol. Methods* 144, 247–251.
- Hipatchi, M. D., Rios, M. M., Aiello, V. D., Benvenuti, L. A., Gattieres, P. S., Bellotti, G., Pluggi, F. (1997) Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, Chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 486–489.
- Wachtel, L., Mallat, Z., Polenzon, S., Corradi, C., Clergue, M., Duriez, M., Bao, L., Gerard, C., Rollins, B. J., Tardif, A., Lavoie, B. L., Sirois, J. S. (2005) Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ. Res.* 96, 576–582.

29. Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Weisinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weisleder, R., Pittet, M. J. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037-3047.
30. Shoreman, P. K., Contreras-Saucedo, V., Reyes-Reyna, S. M., Robinson, S. C., McManus, L. M. (2006) MCP-1 parallels inflammatory and regenerative responses in ischemic muscle. *J Surg Res* **114**, 140-157.
31. Herlihy, J. L., Kuziel, W. A., Manning, J. E., Lane, T. E. (2006) Chemokine CXCR2 receptor 2 is important for acute control of cardiac parasitemia but does not contribute to cardiac inflammation after infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* **193**, 1684-1688.
32. Coleman, A. M., Gonzalez-Caprio, S. M. (1993) In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop* **55**, 171-180.
33. Pains, C. N., Arrais, R. H., Lemos, L. P., Giladi, D., Alves, L., Metz, C. N., Gazzinelli, R., Pyrcio, A. S., Lannes-Vieira, J., Bozza, M. T. (2007) Unraveling the bidirectional interplay between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. *Eur J Immunol* **37**, 1331-1364.
34. Gomes, R. N., Figueiredo, K. T., Bozza, F. A., Pacheco, P., Amancio, R. T., Laranjeira, A. P., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., Bozza, M. T. (2006) Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cx chemokine ligand 2 deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock* **26**, 457-465.
35. Marino, A. P., da Silva, A., dos Santos, P., Faria, L. M., Gazzinelli, R. T., Teixeira, M. M., Lannes-Vieira, J. (2004) Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Meo-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis. *Circulation* **110**, 1443-1449.
36. Monteiro, G. A., Siverio, J. C., Marino, A. P., Koffe, E., Vieira, V., Kohl-Palhares, K., Cavallho, C. E., Silva, A. A., Teixeira, M. M., Lannes-Vieira, J. (2009) Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR2 antagonist (Meo-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbe Infect* **11**, 264-273.
37. Herlihy, J. L., Wrightman, R. A., Carpenter, P. M., Kuziel, W. A., Lane, T. E., Manning, J. E. (2006) The CX chemokine receptor 2 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **74**, 131-143.
38. Shiramachi, Y., Iyoda, T., Tanimoto, N., Kogai, D., Nagata, K., Kobayashi, Y. (2007) Infiltrating neutrophils induce allo-specific CTL in response to immunization with apoptotic cells via MCP-1 production. *J Leukoc Biol* **81**, 412-420.
39. Mutsaers, A., Hoogboom, C. M., Lukacs, N. W., Lincden, P. M., Strieter, R. M., Kunkel, S. L. (1999) Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B<sub>4</sub>. *J Immunol* **163**, 6148-6154.
40. Goodwin, K., Goodfellow, M., Tager, A. M., Lemos, A. D., van Andrian, U. H. (2003) Leukotriene B<sub>4</sub> and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol* **4**, 966-973.
41. Tachibana, R. L. (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* **19**, 430-434.
42. Niu, J., Adler, A., Kubota-kubota, P. E. (2006) Monocyte-specific Bcl-2 expression attenuates inflammation and heart failure in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-induced cardiomyopathy. *Circ Res* **71**, 139-148.
43. Niu, J., Adler, A., Deucher, M. F., Goldschmidt-Clermont, P. J., Kubota-kubota, P. E. (2006) Targeted cardiac expression of soluble Fas prevents the development of heart failure in mice with cardiac-specific expression of MCP-1. *J Mol Cell Cardiol* **40**, 810-820.
44. Rodrigues Jr., V., Aguiar, G. S., Lemos, S. C., Silva Teixeira, D. N., Travena, S., Rocha-Rodrigues, D. B. (2008) Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbe Infect* **10**, 29-37.
45. De Oliveira, G. M., Datta, R. L., Batista, W., Batista, M. M., Ratti Correa, C., de Araujo-Jorge, T. C., Henriques-Pereira, A. (2007) Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **171**, 75-86.

**KEY WORDS:**  
heart · liver · myocarditis · flow cytometry · recruitment · CCR2 · monocytes · Chagas' disease



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)