



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**POTENCIAL CITOTÓXICO, PRÓ-INFLAMATÓRIO E
PROCOAGULANTE DA CEPA ET-12 E DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Burkholderia
cenocepacia*. CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE
DE PNEUMOSEPSE EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO.**

Luiz Gonzaga da Cunha Junior

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Luiz Gonzaga da Cunha Junior

Potencial Citotóxico, Pró-inflamatório e Procoagulante da cepa ET-12 e de Isolados Clínicos de *Burkholderia cenocepacia*. Correlação com a gravidade de pneumosepse em modelo experimental murino.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Humana

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Dr^a. Maria Cristina de Assis

Rio de Janeiro
2009

LUIZ GONZAGA DA CUNHA JUNIOR

Potencial Citotóxico, Pró-inflamatório e Procoagulante da cepa ET-12 e de Isolados Clínicos de *Burkholderia cenocepacia*. Correlação com a gravidade de pneumosepse em modelo experimental murino.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Humana.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade (Presidente)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dr^a. Margareth Maria Pretti Dalcolmo
Centro de Referência Professor Hélio Fraga - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Beatriz Meurer Moreira
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Grasiella Maria Ventura Matioszek (Suplente)
Instituto de Ciências Biomédicas - CCS/ UFRJ

Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade (Suplente)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

CUNHA JUNIOR, Luiz Gonzaga da

Potencial Citotóxico, Pró-inflamatório e Procoagulante da cepa ET-12 e de Isolados Clínicos de *Burkholderia cenocepacia*. Correlação com a gravidade de pneumosepse em modelo experimental murino. Rio de Janeiro, 2009

xii, 60p.: il.

Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica Humana - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas

Orientadora: Maria Cristina Maciel Plotkowski e Maria Cristina de Assis

1. *Burkholderia cenocepacia*; 2. Citotoxicidade; 3. Coagulação; 4. Fator tissular

I. Maria Cristina Maciel Plotkowski e Maria Cristina de Assis II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus por tudo, tudo mesmo!
- Aos meus pais, Luiz e Angela, por todo carinho e dedicação.
- Aos meus irmãos, Marcelo, Ana Lúcia e Patrícia, por todo apoio e companheirismo.
- Aos meus sobrinhos, Yasmin, Gabriel e Marcelinho que sempre me alegraram e motivaram.
- À minha namorada Andreza, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando e incentivando.
- À prof^a. Cristina Plotkowski, por me aceitar em sua equipe e me orientar.
- À Dr^a. Cristina Assis, por toda ajuda nos experimentos e conselhos que levarei para minha vida.
- À Dr^a. Alessandra Saliba pelo auxílio na parte de Biologia Molecular.
- À aluna de Doutorado Beatriz Machado, pela grande ajuda na parte *in vivo*.
- À equipe do laboratório 4, Carla, Carol, João, Filipe, Renata e Carlos.
- Aos amigos do laboratório 2, prof.^a Elizabeth, Robson, Alex, Rosana, Ana Paula, Rachel e Márcia Jones.
- Aos Professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.
- A todos os meus amigos e pessoas que contribuíram para esse trabalho, meu Muito Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDS: síndrome da angústia respiratória aguda
asHFT: alternatively spliced human tissue factor
ANOVA: análise de variância
AT: antitrombina
BAL: lavado bronco-alveolar
BEAS-2B: linhagem de células epiteliais respiratórias humanas
BCESM: *B. cepacia* Epidemic Strain Marker
BSA: soro albumina bovina
CaCl₂: cloreto de cálcio
CAM: moléculas de adesão celular
CBc: Complexo *Burkholderia cepacia*
CCI: *B. cenocepacia island*
cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl⁻: cloro
CID: coagulação intravascular disseminada
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: mistura de deoxinucleotídeos trifosfato
DO: densidade óptica
EDTA: ácido etileno diamino tetraacético dissódico
ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay
FACS: fluorescence activated cell sorter
FC: fibrose cística
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FS: fosfatidilserina
FT: fator tissular
FT/FVIIa: complexo FT/FVII ativado
FVII: fator VII da via da coagulação

FVIIa: fator VII ativado
FXa: fator X ativado
HETES: ácido hidroieicosatetranóico
GP: glicoproteína
HUPE: Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF-Fiocruz: Instituto Fernandes Figueira
IFN- γ : interferon gama
Ig: imunoglobulina
IL: interleucina
IP: iodeto de propídeo
KCl: cloreto de potássio
LPS: lipopolissacarídeo
MEC: matriz extracelular
MgCl₂: cloreto de magnésio
MIP-2: Proteína-2 inflamatória de macrófagos
MLST: multilocus sequencing typing
MODS: síndrome da falência de múltiplos órgãos e sistemas
MP: micropartícula
mRNA: RNA mensageiro
Na⁺: sódio
NaCl: cloreto de sódio
NF- κ B: fator nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
PAF: Fator de ativação plaquetária
PBS: solução salina tamponada fosfatada
PCR: reação em cadeia da polimerase
PFGE: pulsed-field gel electrophoresis
PLC: fosfolipase C
PM: peso molecular
pM: picomolar
RNA: ácido ribonucléico
ROS: espécies reativas de oxigênio;
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
SC: síndrome cepacia

SFB: soro fetal bovino

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TFPI: inibidor da via do fator tissular

TLR: receptor toll-like

TNF α : fator de necrose tumoral α

TSA: trypticase soy agar

TSB: trypticase soy broth

UFC: unidades formadoras de colônia

UV: ultravioleta

VG: variantes genômicas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da patogênese da sepse.....	8
Figura 2: Representação esquemática da ativação das vias da coagulação.....	9
Figura 3: O papel dos monócitos e endotélio na resposta à infecção.....	10
Figura 4: Esquema mostrando a formação de uma micropartícula a partir da membrana plasmática, em resposta à estimulação celular	12
Figura 5: Percentual de células marcadas com IP.....	26
Figura 6: Concentração de IL-6.....	27
Figura 7: Concentração de IL-8.....	28
Figura 8: Percentual de células positivas para o FT.....	29
Figura 9: Fotomicrografia de gel com os transcritos do FT e da β -actina presentes em células controle e em infectadas e gráfico da relação da densitometria do FT/ β -actina.....	29/30
Figura 10: Concentração do FT nos sobrenadantes.....	31
Figura 11: Atividade procoagulante dos sobrenadantes.....	32
Figura 12: MPs reativas com anexina V	33
Figura 13: Porcentagem de MPs reativas com anexina V positivas para o FT.....	34
Figura 14: Fotomicrografia do gel dos fragmentos de DNA cromossômico da cepa ET-12 e dos diferentes isolados clínicos e dendograma mostrando o percentual de similaridade entre as amostras estudadas.....	34/35
Figura 15: Distribuição por score e percentual de animais com score ≥ 3	36
Figura 16: Percentual de isolamento de <i>B. cenocepacia</i> no sangue, percentual de animais com cultura hepática positiva e número de UFC por 50 mg de tecido hepático.....	37
Figura 17: Concentração de leucócitos totais no sangue periférico e concentração de leucócitos totais no BAL.....	38

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

A infecção das vias aéreas de pacientes com fibrose cística (FC) por *Burkholderia cenocepacia* pode evoluir para pneumonia necrosante com deterioração pulmonar aguda associada à sepse, quadro clínico este chamado de síndrome cepacia (SC). No entanto, os mecanismos determinantes deste tipo de evolução não são conhecidos. Por ser a cepa epidêmica ET-12 de *B. cenocepacia* particularmente freqüente como agente da SC, os objetivos deste estudo foram i) estudar a cepa ET-12 quanto a atributos de virulência com potencial de favorecer o desencadeamento da SC, frente a células epiteliais respiratórias brônquicas humanas da linhagem BEAS-2B e em modelo experimental de pneumosepse; ii) compará-la com quatro isolados clínicos de *B. cenocepacia* procedentes de pacientes com FC com evolução clínica benigna. Nos testes *in vitro*, a cepa ET-12 foi mais citotóxica que os isolados clínicos, embora 3 deles também tenham sido citotóxicos. Esta mesma cepa, assim como o isolado clínico CL2 induziram a secreção de concentrações significativamente aumentadas de IL-6 e IL-8. A cepa ET-12 e CL 2 assemelharam-se, também, na indução de liberação de fator tissular (FT) nos sobrenadantes das culturas, na geração de importante atividade procoagulante nos sobrenadantes e na indução de liberação de micropartículas expressando resíduos de fosfatidilserina e FT. No entanto, nenhum dos microrganismos modulou positivamente a expressão do FT associado às células respiratórias. A determinação do perfil de fragmentação do DNA cromossômico dos microrganismos por PFGE mostrou que CL2, que teve um perfil de virulência semelhante ao de ET-12, não pertence ao grupo clonal da cepa epidêmica. Por outro lado, os isolados clínicos CL1 e CL2, com perfis de virulência nos testes *in vitro* bastante diferentes, apresentaram total identidade genômica cromossômica, indicativo de terem a mesma origem clonal. Para avaliar se a maior virulência de ET-12 e CL2 detectada nos testes *in vitro* têm relevância *in vivo*, comparamos camundongos inoculados, por via intratraqueal, com todos os microrganismos. Animais infectados pela cepa ET-12 mostraram maior pontuação numa escala de quantificação de sinais externos de infecção, seguida por CL2. Estes mesmos microrganismos foram isolados do sangue de 100% dos animais infectados, enquanto o percentual de isolamento dos demais variou de 83,3 a 85,7%. Os isolados clínicos CL2 e CL4 foram os microrganismos isolados do parênquima hepático de maior percentual de animais e também em maiores concentrações. Surpreendentemente, o menor percentual de isolamento do parênquima hepático foi o de ET-12 (42,8%). A concentração de leucócitos totais no sangue periférico dos animais infectados com os isolados clínicos foi significativamente inferior à dos animais controle, mas não houve diferença significativa entre as leucometrias de animais controle e infectados com a cepa ET-12. A concentração de leucócitos nos lavados bronco-alveolares dos animais infectados com todos os microrganismos, com exceção do isolado clínico CL4, foi significativamente superior à detectada nos lavados de animais controle. Nossos resultados sugerem que pelo menos alguns isolados clínicos têm atributos de virulência semelhantes ao da cepa epidêmica ET-12 e, portanto, são agentes potenciais de SC.

Palavras-Chaves: *Burkholderia cenocepacia*; citotoxicidade; atividade pró-inflamatória; atividade procoagulante, fator tissular, micropartículas, síndrome cepacia.

ABSTRACT

Airway infections of cystic fibrosis (CF) patients by *Burkholderia cenocepacia* can follow a rapidly fatal clinical deterioration associated with necrotizing pneumonia and sepsis, the so-called cepacia syndrome. The mechanism by which bacteria cause this syndrome is, as yet, unclear. Since the epidemic *B. cenocepacia* ET-12 strain have been linked to most of the cepacia syndrome death in CF patients, this study was carried out i) to investigate the virulence features of ET-12 potentially implicated in the development of the syndrome in both *in vitro* and *in vivo* assays; ii) to compare ET-12 with four *B. cenocepacia* clinical isolates recovered from CF patients with benign clinical course. ET-12 was shown to be significantly more cytotoxic to airway epithelial cells from the BEAS-2B lineage than all clinical isolates but three out of four of them were also cytotoxic. ET-12 as well as clinical isolate CL2 induced a significantly increased release of IL-6 and IL-8 from infected cells. ET-12 and CL2 were also similar in their ability to induce the release of tissue factor (TF) from infected cells, in the generation of a procoagulant environment in cell culture supernatants and in modulating the release of microparticles bearing phosphatidylserine residues and TF from infected cells. Any of the microorganisms under study modulated the expression of TF in cell surfaces. Although ET-12 and CL2 exhibited a similar virulence pattern, by PFGE definition of the fragmentation profile of their chromosomal DNA, these two microorganisms were shown to belong to different clonal groups. On the other hand, the clinical isolates CL1 and CL2, with very different virulence profiles, were shown to have the same clonal origin. To ascertain whether the higher virulence of ET-12 and CL2 detected in our *in vitro* assays has any clinical relevance, mice infected with ET-12 and the clinical isolates were compared with each other. Animals infected with ET-12 showed the maximal score in a scale aiming to quantify external signs of infection. CL2-infected mice showed the second maximal score. ET-12 and CL2 were recovered from blood of all infected animals whereas the percentage of mice infected with the other clinical isolates with positive hemocultures ranged from 83.3 to 85.7%. CL2 and CL4 were the microorganisms most recovered from the liver parenchyma, in both frequency (100% and 87.5%, respectively) and higher concentration. Surprisingly, ET-12 was recovered from the liver parenchyma of only 42.8% of the animals. Total leukocyte concentrations in peripheral blood of animals infected with all clinical isolates were significantly lower than in control animals. Surprisingly, no difference was detected between control and ET-12-infected animals in their peripheral leukocyte counts. The leukocyte concentrations in the broncho-alveolar lavage fluids from animals infected with all microorganisms were significantly higher than the concentration in fluids from control animals, with the exception of CL4-infected mice. Taken together, our results have shown that at least a few clinical isolates have virulence features similar to ET-12 ones and, therefore, are potential agents of the cepacia syndrome.

Keywords: *Burkholderia cenocepacia*; cytotoxicity; proinflammatory activity; procoagulant activity; tissue factor; microparticles; cepacia syndrome.

INTRODUÇÃO

Burkholderia cenocepacia

Burkholderia cenocepacia são bastonetes gram-negativos não fermentadores, móveis, estritamente aeróbios. Pertencem ao Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), um grupo de microrganismos que, até muito recentemente, compreendia nove espécies bacterianas com elevadas taxas de recombinação gênica e de variação genotípica e fenotípica. As nove espécies do CBc, outrora denominadas de variantes genômicas (VG) são: *B. cepacia* (VG I) *B. multivorans* (VG II), *B. cenocepacia* (VG III), *B. stabilis* (VG IV), *B. vietnamiensis* (VG V), *B. dolosa* (VG VI), *B. ambifaria* (VG VII), *B. anthina* (VG VIII) e *B. pyrrocinia* (VG IX) (Vandamme *et al.*, 2002; Coenye & Vandamme, 2003).

Com a utilização da técnica MLST (multilocus sequencing typing), proposta como o padrão ouro para a identificação genotípica de *Burkholderia* (Mahenthiralingam *et al.*, 2008), novas espécies foram acrescentadas ao CBc que, atualmente, compreende 17 espécies distintas (Holden *et al.*, 2009).

A análise da seqüência do gene *recA* de *Burkholderia* possibilitou a subdivisão da espécie *B. cenocepacia* em quatro subgrupos filogenéticos: IIIA, IIIB, IIIC e IIID (Vandamme *et al.*, 2003). Destes, o subgrupo IIIA é o mais freqüente e também aquele associado a quadros infecciosos mais graves (Mahenthiralingam *et al.*, 2008).

Bactérias do CBc estão amplamente distribuídas no ambiente, podendo ser encontradas em solo, água e vegetais. Podem também ser encontradas em reservatórios líquidos ou úmidos diversos, refletindo sua capacidade inata de crescer e sobreviver em ambientes nutricionalmente pobres (Compant *et al.*, 2008).

Além disso, estas bactérias participam de interações simbióticas com diferentes espécies de plantas, sendo utilizadas como agentes antagonistas contra algumas espécies de fitopatógenos encontrados no solo, como nematódeos e fungos, atuando como biopesticidas, podendo ser utilizadas

para substituir pesticidas químicos nocivos (Compant *et al.*, 2008) e como agentes de biorremediação (Tsang, 2004). Conseqüentemente, o interesse na aplicação biotecnológica dos membros do CBc na agricultura e na indústria aumentou nos últimos anos. Paralelamente a este interesse, aumentou, também, a preocupação em relação ao amplo uso comercial destas bactérias, uma vez que apresentam características de patogenicidade e virulência para o ser humano (Mahenthiralingam, Urban & Goldberg, 2005).

A partir do início da década de 1980, CBc passou a ser reconhecido como patógeno emergente em infecções hospitalares. Dados do Centro para Controle e Prevenção de Doenças, EUA (*Centers for Disease Control and Prevention*) mostraram o isolamento de 589 cepas relacionadas a infecções hospitalares no período de 1989 a 1996. As principais fontes de aquisição de cepas do CBc no ambiente hospitalar são fontes de água e superfícies úmidas, tais como destiladores, equipamentos para terapia respiratória e vários tipos de medicamentos e soluções desinfetantes (Pegues, 1999). Estas bactérias têm sido associadas a diversos casos de infecções do trato respiratório, bacteremias, infecções urinárias, infecções de ferida, peritonites, artrites sépticas, conjuntivites, além de casos de meningites neonatais e abscessos cerebrais (Speert, 2002).

Além da gravidade das infecções que provocam, outro fator que contribui para a importância destas bactérias como agente patogênico para humanos é sua resistência intrínseca a diversas drogas antimicrobianas, como aminoglicosídeos, colistina, carbenicilina, ticarcilina e imipenem. Podem também produzir, indutivamente, uma beta-lactamase. Assim, a resistência aos antimicrobianos representa um importante fator que favorece a persistência destas bactérias nos pacientes infectados (Gilligan, 1991; Golini, 2006).

Outro aspecto muito importante relacionado à infecção causada por estes microrganismos é a sua elevada capacidade de disseminação entre os pacientes, particularmente entre aqueles com fibrose cística. Esta disseminação ocorre principalmente através da transmissão cruzada, dentro e fora do ambiente hospitalar (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). Várias epidemias

por diferentes espécies do CBc foram descritas em diversos países e continentes, sendo *B. cenocepacia* a espécie mais freqüente nestas epidemias. Uma das cepas de *B. cenocepacia* mais representativas do grupo de amostras altamente transmissíveis é a cepa ET-12.

Esta linhagem de *B. cenocepacia* é particularmente interessante, pois foi capaz de disseminar-se desde o Canadá até a Europa. A possibilidade de disseminação de cepas epidêmicas entre os pacientes obriga a adoção de medidas de segregação entre os pacientes infectados, o que causa grande impacto psicossocial (Moore & Elborn, 2001).

O Complexo *B. cepacia* em Pacientes com Fibrose Cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, sistêmica, caracterizada por um defeito no transporte de íons cloro e sódio nas membranas apicais de células epiteliais de diferentes órgãos e glândulas exócrinas, decorrente de mutações no gene que codifica uma proteína denominada "*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*" (CFTR), localizado no cromossoma 7, na posição 31.2. As mutações neste gene levam à disfunção da proteína CFTR resultando no aumento da absorção de Na⁺ e perda ou redução da secreção de Cl⁻ (Vankeerberghen *et al.*, 2002; Kulczycki *et al.*, 2003; Cuppens *et al.*, 2004).

Nas vias aéreas, as secreções respiratórias dos pacientes com FC tornam-se desidratadas e têm suas propriedades bioquímicas bastante alteradas (Davis, Drumm & Konstan, 1996), o que resulta em uma grave disfunção no transporte mucociliar, favorecendo a colonização e posterior infecção das vias aéreas dos pacientes por um grupo restrito de microrganismos, dentre estes, o CBc.

Todas as espécies do CBc já foram isolados das vias aéreas de pacientes com FC, embora *B. cenocepacia* e *B. multivorans* sejam as espécies mais freqüentes nas infecções pulmonares. Em um estudo realizado no ano de 2005, envolvendo 1218 isolados clínicos de bactérias do CBc procedentes de pacientes com e sem FC, *B. cenocepacia* e *B. multivorans* foram as espécies mais frequentemente isoladas nos dois grupos de

pacientes. Os percentuais de isolamento de cada uma das espécies do CBc foram os seguintes: 3,1% de *B. cepacia*; 38,7% de *B. multivorans*; 45,6% de *B. cenocepacia*; 0,3% de *B. stabilis*; 5,9% de *B. vietnamiensis*; 3,8% de *B. dolosa*; 0,8% de *B. ambifaria*; 0,2% de *B. anthina*; 1,3% de *B. pyrrocinia* (Reik *et al.* 2005).

Quando a FC foi descrita pela primeira vez, em 1938, a maioria dos pacientes falecia antes do primeiro ano de vida. Atualmente, com o diagnóstico precoce, o surgimento de centros especializados de tratamento e o acesso à terapia adequada, muitos pacientes sobrevivem até a terceira década de vida (Ribeiro *et al.*, 2002). No entanto, apesar da disponibilidade de agentes antimicrobianos, o comprometimento pulmonar irreversível, decorrente das infecções respiratórias recorrentes, é o aspecto mais crítico da FC e a principal causa de morbidade e mortalidade (Ribeiro *et al.*, 2002).

A colonização das vias aéreas de pacientes com FC por bactérias do CBc pode evoluir de três formas: i) colonização assintomática, ii) infecção com declínio progressivo da função pulmonar e iii) pneumonia necrosante com deterioração pulmonar aguda associada a sepse e rápida evolução do paciente ao óbito. Esta evolução clínica desfavorável foi descrita em 20-30% dos pacientes infectados por cepas do complexo *B. cepacia* no Reino Unido, Canadá e Estados Unidos (Govan *et al.*, 1993) e o quadro clínico que os pacientes apresentam foi denominado de “síndrome cepacia”.

A maioria dos casos de síndrome cepacia foi relacionada com a infecção por cepas de *B. cenocepacia*, particularmente a cepa ET-12 (Govan & Deretic, 1996; Mahenthiralingam & Vandamme, 2005). Embora estudos mais recentes tenham mostrado que também *B. multivorans* e *B. dolosa* podem ser muito virulentas e apresentar elevada transmissibilidade (Jones *et al.*, 2004; Kalish *et al.*, 2006), em pelo menos alguns estudos comparativos do curso clínico e sobrevida de pacientes com FC colonizados/infectados por *B. cenocepacia* e *B. multivorans* foi observado que o número de pacientes que faleceram com infecção por *B. cenocepacia* foi significativamente superior (Mahenthiralingam *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004).

As causas da aparente maior virulência da *B. cenocepacia* permanecem desconhecidas. Estudos mostraram que apenas esta espécie apresenta o

chamado “cable pilus”, relacionado à aderência bacteriana às células epiteliais hospedeiras (Urban *et al.*, 2005), e a ilha de patogenicidade denominada *Cenocepacia Island*, onde estão inseridos o marcador de transmissibilidade *BCESM* (*B. cepacia* Epidemic Strain Marker) bem como o gene que codifica um sistema de *quorum-sensing*, necessário para a persistência e inflamação pulmonar desta bactéria em ratos (Baldwin *et al.*, 2004).

Outro atributo de virulência identificado em *B. cenocepacia* é sua capacidade de sobreviver no interior de células hospedeiras. Em estudo experimental com camundongos inoculados, por via intratraqueal, com *B. cenocepacia*, foi observada a presença de bactéria dentro de células epiteliais respiratórias e de macrófagos, bem como a disseminação de bactérias dos pulmões para o fígado dos animais e a presença de resposta inflamatória sistêmica, à semelhança do que ocorre no curso da “síndrome cepacia” em pacientes com FC (Chiu *et al.*, 2001).

Alguns fatores de virulência foram descritos em *B. cenocepacia*, mas nenhum, até o momento, pôde ser considerado capaz de sozinho, ser responsável pelo desenvolvimento da doença. Entre estes fatores de virulência estudados estão proteases, fosfolipase C, e exopolissacarídeos (Speert, 2002; Chung *et al.*, 2003). Hutchison *et al.* (1998) demonstraram que uma hemolisina produzida por *B. cenocepacia* foi capaz de induzir a apoptose de macrófagos e a degranulação de neutrófilos humanos.

Martin & Mohr (2000), estudando uma cepa de *B. cenocepacia* isolada de material clínico de paciente com FC, observaram que os microrganismos foram capazes de invadir, sobreviver e replicar-se em macrófagos e em células epiteliais respiratórias humanas, diferente de cepas ambientais que não foram capazes de sobreviver ou replicar-se no interior destas células.

A produção de biofilme também foi observada nas espécies do CBc, mas parece ser mais abundante em *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (Conway, Venu & Speert, 2002).

Carvalho *et al.* (2007), ao analisar a produção de exoenzimas em cepas de *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. multivorans* e *B. ambifaria*, observaram

que somente *B. cenocepacia* e *B. ambifaria* foram produtoras de protease. Ao contrário, todas as espécies produziram fosfolipase C. Estes resultados sugerem que as diferenças na produção de exoenzimas podem refletir diferenças também no potencial patogênico de cada espécie do CBc.

Além dos fatores de virulência específicos de *B. cenocepacia*, outros são comuns às outras espécies do CBc, como é o caso do LPS, dotado de atividade pró-inflamatória particularmente potente, evidenciada em estudo comparativo com o LPS de *P.aeruginosa* quanto à capacidade de indução da secreção de IL-6 e IL-8 por células epiteliais. Outros estudos *in vitro* mostraram a superioridade do LPS de bactérias do CBc na capacidade de induzir a produção de TNF- α por monócitos (Zughaier *et al.*, 1999; Reddi *et al.*, 2003). Essa maior atividade pró-inflamatória do LPS das cepas do CBc, e consequentemente maior potencial de dano aos organismos hospedeiros, parece resultar de uma estrutura bioquímica diferente daquela de outras bactérias Gram-negativas, decorrente de uma mudança no cerne do lipídeo A (Vinion-Dubiel & Goldberg, 2003).

Além do LPS, outros componentes das células de bactérias do CBc tem atividade pró-inflamatória. Estudos mostraram que a interação do flagelo de *B. cenocepacia* com os receptores transmembranares TLR 5 de células hospedeiras resultaram na ativação do fator transcricional NF- κ B e na secreção da citocina pró-inflamatória IL-8 (Urban *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2008).

Conhecendo a importância das reações inflamatórias na destruição do parênquima pulmonar dos pacientes com FC, é provável que componentes celulares das bactérias do CBc, ao contribuir para a manutenção do processo inflamatório nas vias aéreas dos pacientes, contribua, também, para o tipo de evolução clínica dos pacientes (Mohr *et al.*, 2001).

Embora, com antes mencionado, grande parte dos casos de síndrome cepacia ocorra após infecção por *B. cenocepacia*, a maioria dos pacientes com FC infectados por estes microrganismos apresentam evolução clínica benigna. Até o presente não se sabe por que somente algumas cepas de *B.*

cenocepacia desencadeiam alterações respiratórias tão graves, associadas ou não à sepse.

Sepse

A sepse é uma síndrome clínica decorrente da resposta inflamatória sistêmica excessiva a estruturas ou produtos de microorganismos, associada à incapacidade do organismo hospedeiro de eliminar os microorganismos infectantes (Buras, 2005). Quando a sepse é acompanhada de disfunções orgânicas e hipotensão, o quadro é denominado choque séptico. Uma frequente causa de morte em pacientes com sepse, a síndrome da falência de múltiplos órgãos e sistemas (MODS) é definida pela presença de alterações nas funções orgânicas em pacientes com doença aguda decorrente da deposição de fibrina na microcirculação e oxigenação inadequada dos tecidos (Zeerleder *et al.*, 2005) (Figura 1).

No curso da sepse, os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias encontram-se caracteristicamente elevados. Entre aquelas mais relacionadas com a gravidade da resposta a infecção ou inflamação destacam-se o $TNF\alpha$ e as interleucinas IL-6 e IL-8 (Engel *et al.*, 1998; Wakefield *et al.*, 1998).

Muitos dos mediadores inflamatórios responsáveis pela ativação do sistema imune na sepse determinam, também, a ativação da cascata da coagulação e posteriores alterações hemostáticas. Tais alterações podem ser discretas, sendo detectadas apenas por exames laboratoriais, como podem também gerar um quadro grave, conhecido como síndrome da coagulação intravascular disseminada (Esmon *et al.*, 1999; Levi *et al.*, 2003).

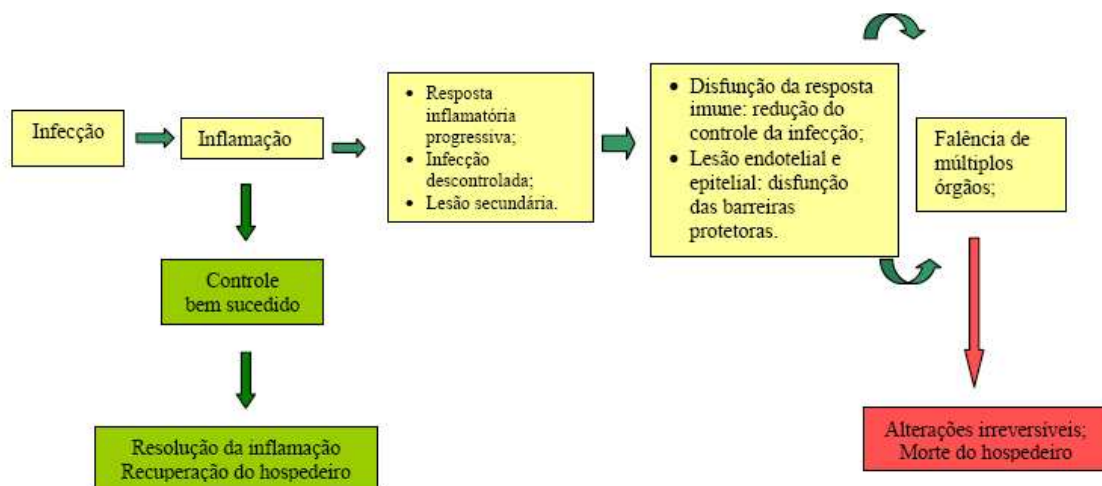


Figura 1: Representação esquemática da patogênese da sepse (Buras et al., 2005)

Três condições principais favorecem a ativação da coagulação na sepse: i) a maior geração de trombina mediada pela formação do complexo fator tissular/fator VII ativado (FT/FVIIa), ii) a regulação negativa dos mecanismos fisiológicos anticoagulantes (antitrombina, proteína C, proteína S e inibidor da via do fator tissular) e iii) a inibição da fibrinólise (Levi *et al.*, 2003; Levi & van der Poll, 2005). Em conjunto, estas alterações resultam na deposição de fibrina nos vasos sanguíneos e conseqüente trombose microvascular, lesão endotelial e falha da microcirculação, o que contribui para a patogênese da MODS (Esmon *et al.* 1999).

Os pulmões figuram entre os órgãos mais frequentemente acometidos no curso da sepse e caracteristicamente apresentam deposição de fibrina nos compartimentos alveolar e intersticial (Bachfen & Weibel, 1982). Além de comprometer as trocas gasosas, os processos de coagulação nos alvéolos e interstício pulmonar favorecem a ativação de neutrófilos e fibroblastos por produtos da degradação da fibrina e trombina, contribuindo para as manifestações inflamatórias locais e lesão adicional do parênquima pulmonar. Além disso, componentes do surfactante pulmonar podem ser incorporados nos polímeros de fibrina, resultando em instabilidade alveolar (Seeger *et al.*, 1993). Essas alterações favorecem a instalação de uma complicação grave da sepse, denominada síndrome da angústia respiratória aguda, caracterizada

pela presença de fluido rico em proteínas localizado no espaço aéreo, derivado do aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, decorrente de lesão endotelial (Ware, 2000). A perda da integridade dessa membrana resulta, também, no acesso de fatores de coagulação e do fator tissular circulante ao espaço alveolar, criando condições para a deposição adicional de fibrina nos alvéolos (Gando *et al.*, 2005).

Fator tissular (FT, tromboplastina ou ainda fator III da coagulação) é uma glicoproteína transmembranar de 45 kDa, expressa constitutivamente na membrana plasmática de diversos tipos celulares e membro da superfamília de receptores de citocinas. A interação desta proteína com o Fator VII da via da coagulação resulta na ativação da outrora chamada via extrínseca da coagulação (Franco *et al.*, 2000). Ao contrário de outros cofatores da cascata de coagulação, que circulam como precursores não-funcionais, o FT é um potente iniciador da cascata de coagulação que está completamente funcional quando expresso na superfície celular. O complexo FT/FVIIa cataliza a conversão do fator X em fator X ativado (FXa) que, combinado com FVa, em presença de cálcio e fosfolipídeos, transforma a protrombina em trombina, responsável pela clivagem do fibrinogênio em fibrina (Bogdanov *et al.*, 2003) (Figura 2).

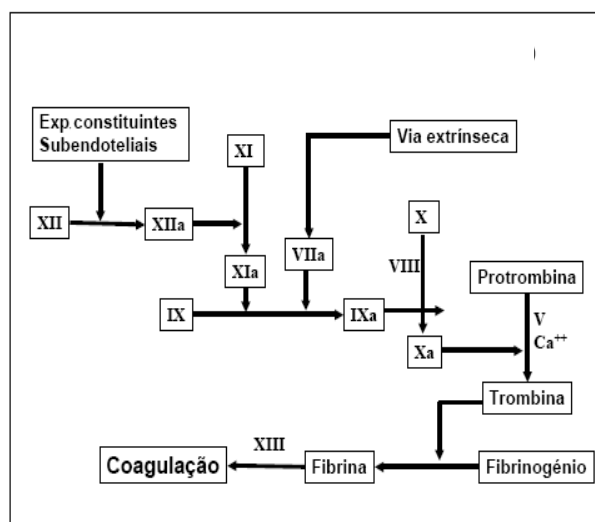


Figura 2: Representação esquemática da ativação das vias da coagulação.

Vários tipos celulares, que não estão em contato direto com os fatores da coagulação presentes no sangue, são capazes de sintetizar e expressar FT de forma constitutiva. Entre eles destacam-se diversos tipos de células encontradas no trato respiratório, como os macrófagos alveolares, células epiteliais alveolares e brônquicas (Welty-Wolf *et al.*, 2002). Outras células, como monócitos, granulócitos e células endoteliais, somente expressam FT em resposta à estimulação por mediadores pró-inflamatórios (Chu, 2005).

Mesmo células que expressam FT constitutivamente podem ter sua expressão modulada positivamente por estímulos pró-inflamatórios, como as citocinas IL-1 β e TNF α , eicosanoides, o LPS da parede celular de bactérias Gram-negativas e outros produtos microbianos (Lopes-Bezerra & Filler, 2003; Levi *et al.*, 2005; Mattsson *et al.*, 2008) (Figura 3). Nada se conhece sobre o potencial de produtos de *B. cenocepacia* de modular a expressão desta molécula.

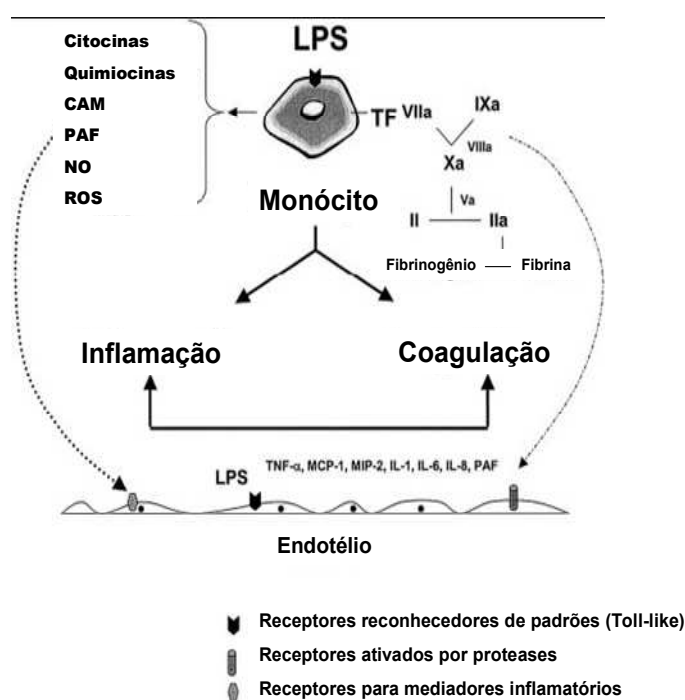


Figura 3: O LPS e/ou outros produtos de patógenos ativam receptores de reconhecimento presentes na superfície de monócitos, macrófagos tissulares e células endoteliais, causando a liberação de mediadores inflamatórios e do fator tissular, com conseqüente ativação da coagulação. Os mediadores inflamatórios ativam monócitos e endotélio local e os diversos componentes da cascata de coagulação levam à formação de fibrina, mas também ativam proteases regulatórias. CAM - moléculas de adesão celular; PAF - Fator de ativação plaquetária; NO - óxido nítrico; ROS - espécies reativas de oxigênio; MIP-2 – Proteína-2 inflamatória de macrófagos (Aird, 2003).

Além da forma associada às membranas celulares, o FT pode ser liberado por diferentes tipos de células e circular como uma molécula solúvel. Esse FT solúvel tanto pode ser derivado da clivagem do FT membranar como pode ser outra isoforma, derivada de uma forma alternativa de processamento do RNA mensageiro (asHTF). Células endoteliais e epiteliais, além de leucócitos, são possíveis fontes de FT solúvel em fluidos extracelulares (Szotowski *et al.* 2005). No entanto, o papel fisiológico do FT solúvel, bem como a identificação de moléculas envolvidas na regulação de sua expressão e liberação ainda não foram esclarecidos. Segundo muitos autores, sua participação em distúrbios coagulatórios é questionável devido à exigência da presença de componentes lipídicos para a ativação adequada da cascata da coagulação (Bogdanov *et al.*, 2003; Censarek *et al.*, 2007).

Além do FT associado às membranas plasmáticas e daquele solúvel presente na circulação sanguínea, estudos têm mostrado tanto a existência quanto a importância no desencadeamento de distúrbios coagulatórios do FT associado à micropartículas (MPs).

Micropartículas são vesículas com diâmetros de 0,1 a 1 μm derivadas de virtualmente todos os tipos celulares em resposta a diversos estímulos que resultam ou não em morte celular por apoptose (Morel *et al.*, 2004). Além de serem identificadas por seu tamanho, as MPs são caracterizadas pela exposição de fosfatidilserina, com carga negativa, no folheto externo da bicamada lipídica de sua membrana plasmática (Aras *et al.*, 2004) (Figura 4). A presença em sua superfície de fosfatidilserina é um dos mecanismos pelos quais micropartículas apresentam importante atividade procoagulante, sendo a presença do FT em suas membranas o segundo mecanismo (revisado por Hugel *et al.*, 2005).

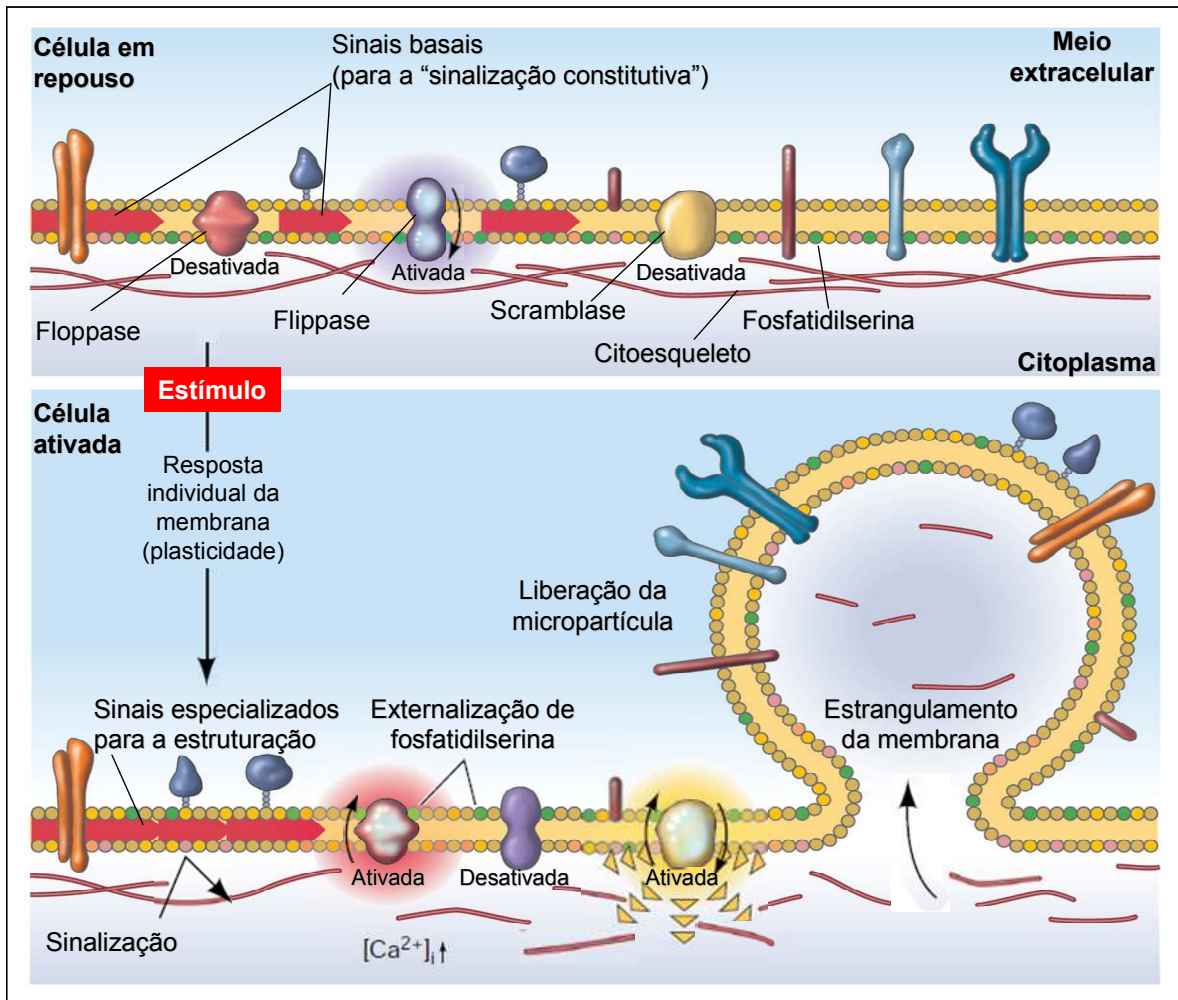


Figura 4: Esquema mostrando a formação de uma micropartícula a partir da membrana plasmática. O aumento da concentração de cálcio no citosol, acompanhado pela estimulação celular, pode levar ao colapso da assimetria da membrana, do que resulta uma significativa alteração na distribuição dos fosfolipídios das membranas, expondo fosfatidilserina na superfície celular. Segue-se a liberação da micropartícula em decorrência da degradação do citoesqueleto por uma proteólise dependente de cálcio (Hugel *et al.*, 2005).

Além do FT, MPs expressam diversas outras proteínas em suas superfícies derivadas das membranas plasmáticas das células de que originaram. Estas moléculas podem interagir com células que apresentem receptores específicos, favorecendo, por exemplo, a produção de citocinas. Como as MPs circulam por todo o organismo hospedeiro, tem o potencial de ativar células distantes do sítio em que foram originadas. Assim, MPs são consideradas como efetores bioativos capazes de, entre outros, modular as funções do endotélio (Keller *et al.*, 2003; Hugel *et al.*, 2005).

Embora MPs sejam detectadas no sangue periférico de indivíduos normais, sua concentração aumenta muito em situações em que células hospedeiras estão submetidas à estimulação excessiva, como ocorre na sepse.

Sabe-se que microrganismos figuram entre os estímulos capazes de ativar células epiteliais e favorecer a liberação de micropartículas dotadas de atividade procoagulante (Nieuwland *et al.*, 2000). No entanto, nenhum estudo foi feito, até o momento, sobre o potencial pró-coagulante de *B. cenocepacia* dependente ou não de sua capacidade de modular a liberação de micropartículas.

Como mencionado, as citocinas inflamatórias, $TNF\alpha$ e IL-1, bem como o LPS bacteriano são importantes mediadores implicados na patogênese da sepse e choque séptico (Parrilo, 1993). Um mecanismo pelo qual os mediadores inflamatórios contribuem para o choque séptico é através da estimulação da expressão do FT, que ativa a cascata de coagulação. Em modelo experimental de choque séptico causado por bactérias Gram-negativas, o tratamento de um grupo de animais com um anticorpo monoclonal contra FT atenuou a coagulopatia observada nos animais não tratados e protegeu-os contra a morte (Taylor *et al.*, 1991).

Por muito tempo acreditou-se que o processo inflamatório detectado nas vias aéreas de pacientes fibrocísticos fosse apenas uma resposta do hospedeiro às infecções bacterianas. No entanto, diversos estudos sugerem a existência de uma acentuada predisposição à inflamação, decorrente da síntese constitutiva de importantes concentrações de citocinas pró-inflamatórias ou de maior predisposição à ativação do regulador transcricional NF-kB (Tabary *et al.*, 2000). Seja qual for o fator desencadeador principal da resposta inflamatória nas vias aéreas dos pacientes com FC, é inegável que sua persistência resulta na destruição progressiva do parênquima pulmonar e contribui para o óbito precoce dos pacientes por insuficiência respiratória (Ribeiro *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi estudar *in vitro* e *in vivo* a cepa ET-12 de *B. cenocepacia* quanto a atributos de virulência, frente a células epiteliais respiratórias brônquicas humanas, com potencial de favorecer o desencadeamento da síndrome cepacia.

Nossos objetivos específicos foram:

Investigar o potencial citotóxico e pró-inflamatório da cepa ET-12 e dos isolados clínicos de *B. cenocepacia* ;

Avaliar a modulação da expressão do FT por células epiteliais respiratórias humanas pela cepa ET-12 e pelos isolados clínicos de *B. cenocepacia*;

Avaliar a modulação da expressão do mRNA do FT de células epiteliais respiratórias da linhagem BEAS-2B infectadas pela cepa ET-12 de *B. cenocepacia*;

Avaliar o potencial procoagulante da cepa ET-12 e dos isolados clínicos de *B. cenocepacia*;

Avaliar a capacidade de indução da liberação de MPs dotadas de atividade procoagulante;

Investigar a existência de clonalidade entre a cepa ET-12 de *B. cenocepacia* e os isolados clínicos estudados;

Validar os resultados dos testes *in vitro* utilizando um modelo experimental murino de pneumosepse pela cepa ET-12 e pelos isolados clínicos de *B. cenocepacia*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de células

Para a realização de nossos experimentos, foram utilizadas células epiteliais respiratórias humanas da linhagem BEAS-2B gentilmente cedidas pelo Dr. Mustapha Si-Tahar (Unité de Defense Inée et Inflammation, Instituto Pasteur, Paris França). As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células de 25cm² ou de 75cm² em meio 199 M (Sigma-Aldrich) completo, ou seja, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen) e glutamina (250µg/mL; Isofar), suplementado com os antibióticos gentamicina (50µg/mL – Hipolabor) e fungisona (Anfotericina B - 2,5µg/mL – Bristol-Myers Squibb). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂.

Quando confluentes, as culturas foram lavadas com salina tampão fosfato 0.01M, pH 7,4 (PBS) e tratadas com cerca de 5 mL de solução contendo 0,1% de tripsina (Sigma) e 0,01% de EDTA (Sigma) em salina tampão fosfato Dulbeco sem cálcio ou magnésio, com 1% de vermelho de fenol (solução de tripsina-EDTA). Após alguns segundos, o excesso da solução de tripsina-EDTA foi desprezado e as garrafas foram re-incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após cerca de 5 minutos, as células foram soltas da superfície das garrafas por meio de forte agitação e ressuspensas em meio de cultura completo em volume necessário para obtenção de suspensões celulares nas concentrações desejadas.

Alíquotas das suspensões celulares nas concentrações de 0,4 x 10⁵/mL e 1,5 x 10⁵/mL foram distribuídas em microplaca de 24 poços (1mL/poço) e em garrafas de cultura de células de 25cm² (5mL) respectivamente. Seguiu-se a incubação por período adicional de 48 horas, até a obtenção de tapetes confluentes.

2. Amostras Bacterianas e Infecção das Culturas de Células BEAS-2B

Foram utilizadas em nossos experimentos a cepa ET-12 de *B. cenocepacia* (amostra J2315), gentilmente cedida pelo Dr. Mustapha Si-Tahar (Unité de Defense Inée et Inflammation, Instituto Pasteur, Paris, França), e quatro

isolados clínicos de *B. cenocepacia* procedentes de pacientes com FC, atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e no Instituto Fernandes Figueira (IFF-Fiocruz), gentilmente fornecidos pela Dra. Elizabeth de Andrade Marques (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ).

As bactérias foram estocadas em meio de cultura *Trypticase Soy Broth* (TSB; Oxoid), contendo 20% de glicerol, a -20° C até sua utilização. Para realização dos testes, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura TSB a 37°C por 16-18 horas sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas (3000 x g por 10 minutos), os sobrenadantes descartados e os sedimentos foram ressuspensos em meio 199M suplementado com 10% de SFB e glutamina. As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro (Libri S2 Colorimeter) de forma a atingir a $A_{660nm} = 0,1$ correspondente a cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) / mL.

Para a realização dos experimentos, culturas de células confluentes foram infectadas com as suspensões bacterianas e as microplacas ou garrafas foram centrifugadas (3000 x g por 10 minutos a 15° C) para favorecer o contato entre as bactérias e as células hospedeiras. Após incubação por 1 hora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, as suspensões bacterianas foram retiradas e as células foram incubadas com meio 199M contendo gentamicina (1mg/mL) e ceftazidima (1mg/mL) para eliminar os microorganismos (Moura *et al.*, 2008). Seguiu-se a re-incubação por um período adicional de 19 horas, perfazendo um total de 20 horas de infecção. Culturas controle foram incubadas com meio de cultura completo por 1 hora e com meio contendo gentamicina e ceftazidima por 19 horas.

Em alguns experimentos, as células foram infectadas continuamente por 3 ou 6 horas, sem antibióticos, em estufa a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂, enquanto as células controle foram incubadas com meio de cultura completo por igual período.

3. Determinação da citotoxicidade bacteriana

A manutenção da integridade das membranas plasmáticas das células eucarióticas, após a infecção bacteriana, foi pesquisada pela determinação da reatividade das células com iodeto de propídio (IP) (Sigma). O IP se difunde passivamente através das membranas que perderam sua integridade, intercalando-se no DNA. A fluorescência celular foi detectada por citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickison).

As culturas celulares crescidas em microplaca de 24 poços foram infectadas com as diferentes cepas bacterianas por 20 horas, a cerca de 37° C em atmosfera contendo 5 % de CO₂, como descrito. Como controle negativo as culturas celulares receberam igual volume de meio 199M e foram submetidas às mesmas condições. Os sobrenadantes, contendo células eucarióticas que se soltaram das monocamadas celulares, em decorrência da infecção, foram removidos e transferidos para tubos cônicos, enquanto as culturas foram tripsinizadas e as células dissociadas transferidas para os tubos cônicos contendo seus respectivos sobrenadantes. Após centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a 20°C, os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 500 µL de PBS e transferidos para tubos *ependorf*, sendo novamente submetidos à centrifugação. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos em 500 µL de tampão de incubação [10mM HEPES (pH 7,4), NaCl150mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1,8mM]. Como controle positivo dos ensaios, utilizamos células tratadas pelo calor (56° C) por 15 minutos. Durante o período de tratamento das células controle, os tubos contendo as suspensões de células infectadas e não infectadas foram mantidos sob refrigeração.

Finalmente, todas as suspensões foram novamente submetidas à centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 1 µL de solução de iodeto de propídio (IP) na concentração de 1µg/mL e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Seguiu-se a análise, por citometria de fluxo, de dez mil células de cada suspensão. Os resultados obtidos foram analisados pelo “software” Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry Application (WinMDI), versão 2.8.

4. Determinação da indução de secreção de IL-6 e IL-8

Culturas confluentes em poços de microplacas de 24 poços foram infectadas pelas amostras em estudo, por 20 horas a cerca de 37° C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Como controle negativo as culturas celulares receberam igual volume de meio 199M e foram submetidas às mesmas condições. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C até a determinação das concentrações de IL-6 e IL-8 por ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo as orientações do fabricante dos *kits* utilizados (R&D Systems). A leitura da densidade óptica (D.O.) de cada poço foi feita em espectrofotômetro para microplacas (Biotec Instruments µQuant) a 450nm e as concentrações das citocinas foram determinadas com base nas curvas-padrão, através do programa KC4. Os resultados obtidos foram corrigidos pelo número de células existentes nos poços de cultura, após 1 hora de infecção com cada um dos isolados bacterianos.

5. Modulação da expressão de FT em células BEAS-2B

A avaliação da expressão do FT nas células BEAS-2B foi realizada pelas técnicas de citometria de fluxo e ELISA. Para a citometria de fluxo, células cultivadas em placa de 24 poços foram infectadas ou não (controles) por 20 horas com as cepas de *B. cenocepacia*, lavadas com PBS e dissociadas com solução de EDTA a 0,05%. As suspensões foram transferidas para tubos tipo *ependorf* e centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos a 15° C. Após lavagem com 500µL de PBS, as células foram fixadas com 200 µL de paraformaldeído e sacarose a 4% em PBS 0,01M. Após a incubação por 20 minutos, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e os sedimentos foram permeabilizados com 100 µL de solução a 0,007% de Triton X-100 em PBS por 5 minutos. Seguiu-se uma nova etapa de lavagem. Após centrifugação, os sobrenadantes foram completamente removidos e os sedimentos foram ressuspensos em 10µL da solução do complexo anti-FT-FITC (American Diagnostica Inc.) a 50µg/mL em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS-BSA). Após a incubação por 30 minutos no gelo, ao abrigo da luz, foi adicionado aos tubos

ependorf 200 μ L de PBS e as suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 200 μ L de PBS-BSA, transferidos para tubos de citometria e analisados em citômetro de fluxo FACScalibur.

Para realização da técnica de ELISA, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos em tubos *ependorf* de 1,5 mL e centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 15°C para remoção dos restos celulares. A concentração do FT dos sobrenadantes das células controle e infectadas foi detectada utilizando-se o *kit* IMUBIND^R TF ELISA (American Diagnostic Inc.) de acordo com as informações do fabricante.

6. Avaliação da modulação da expressão do mRNA do FT

Células BEAS-2B cultivadas em garrafas de cultura de células de 25cm² foram infectadas pela cepa ET-12 de *B. cenocepacia* por 1, 3 e 6 horas. Como controle negativo as culturas celulares receberam igual volume de meio 199M submetidas às mesmas condições. Seguiu-se a remoção da suspensão bacteriana e a tripsinização das culturas. Após o desprendimento total das células, foi adicionado 5 mL de meio 199 M contendo 10% de SFB visando à inativação da tripsina. O conteúdo das garrafas foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e centrifugado por 10 minutos, 3000 x g, 15°C, sendo o sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS e transferido para tubos *ependorf* de 1,5mL. O RNA total de células controle e infectadas foi isolado utilizando-se o *kit* RNeasy (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, foi determinada a concentração do RNA total por espectrofotometria (A_{260nm}). O RNA das amostras foi diluído em água DEPC (água livre de RNases e DNases) para que todas as amostras apresentassem a mesma concentração de RNA (3,2 μ g) e o volume total fosse 8 μ L. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total com auxílio do *kit* Super Script III (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. A amplificação do material foi feita em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) e o material foi estocado em freeezer -20° C até a realização do PCR.

O cDNA foi diluído em água milliQ estéril e 5 μ L foram adicionados ao *master mix* juntamente com tampão da enzima 5x (5 μ L), dNTPs 5mM (0,5 μ L),

10 μ mol de cada primer (0,5 μ L cada), 0,3 μ L da enzima Go Taq DNA (Invitrogen) e água milliQ para completar o volume de 25 μ L.

A amplificação por PCR ocorreu após uma etapa inicial de desnaturação (2 minutos a 94°C) e 33 ciclos de desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (50°C por 45 segundos) e alongamento (72°C por 45 segundos). Um passo adicional de extensão de 5 minutos a 72°C foi realizado após o último ciclo. O gene que codifica a β -actina (considerado um *housekeeping gene*) foi utilizado para normalizar a expressão do Fator Tissular. As reações de amplificação por PCR para β -actina foram uma etapa inicial de desnaturação (2 minutos a 94°C) e 26 ciclos de desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (52°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos), além de um passo adicional de extensão de 5 minutos a 72°C. Os primers usados nas reações foram: 5'-CCC GAA CAG TTA ACC GGA AGA-3' (fator tissular senso); 5'-GCT CCA ATG ATG TAG AAT ATT TCT CTG A-3' (fator tissular anti-senso); 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC -3' (β -actina senso) e 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3' (β -actina antisenso).

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídeo (10 μ g/mL). A densitometria das bandas foi realizada usando o "software" *LabImage* (Kaplan GmbH, Germany).

7. Pesquisa da modulação da atividade procoagulante das células BEAS-2B

A atividade procoagulante dos sobrenadantes das culturas controle tratadas com meio 199M e infectada pelas diferentes cepas de *B. cenocepacia* foi pesquisada com o *kit* Actichrome TF (American Diagnostis Inc.) segundo informações do fabricante. A reação foi feita em microplaca de ELISA e a leitura em espectrofotômetro a 405nm. Os resultados foram expressos em picomolar (pM) da atividade do FT lipidado fornecido pelo *kit* e utilizado para a construção da curva padrão.

8. Pesquisa de FT associado à micropartículas

Para verificar a produção de micropartículas, os sobrenadantes de culturas infectadas em placas de 24 poços por 20 horas com as cepas de *B. cenocepacia* e controles tratadas com meio 199M foram transferidos para tubos *ependorf* que foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 15° C, para remoção de restos celulares. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos *ependorf* e submetidos à centrifugação de 17500 x g por 30 minutos a 20° C, para deposição das micropartículas. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos lavados duas vezes e homogeneizados com 200µL de tampão contendo 10mM HETES/NaOH, 140mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4. Após nova centrifugação a 17500 x g por 30 minutos a 20° C, os sedimentos obtidos foram incubados com os complexos anti-FT-FITC (10µL; American Diagnostica Inc.) e anti-anexina V-Alexa Flúor 647 (10µL; Invitrogen). Após um período de trinta minutos no gelo e ao abrigo da luz, as amostras foram centrifugadas, os sedimentos foram ressuspensos em 200 µL de PBS-BSA 1% e as suspensões de micropartículas foram submetidas à análise em citômetro de fluxo durante 1 minuto.

A região de análise das micropartículas foi determinada com auxílio de microesferas fluorescentes (Megamix; Biocytex) de diâmetros similares aos das micropartículas (0,5µm e 0,9µm), de acordo com as instruções do fabricante.

9. Determinação do Perfil de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado, PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*):

As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA; Difco) e incubadas a 37±1°C por 20-24h. A seguir, as células bacterianas foram suspensas em 500µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,6) de forma a ter turvação equivalente a do padrão 5 da escala de McFarland. Foi adicionado 200µL da suspensão bacteriana a agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG agarose; FMC) a 2%

preparada em tampão PIV. A mistura obtida foi vertida em moldes para a obtenção de blocos.

Após a solidificação da agarose, os blocos foram colocados em 3,5mL de solução de lise (6mM Tris-HCl, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 0,5% Brij-58; 0,2% desoxicolato sódico; 0,5% lauril sarcosinato de sódio; 1mg/mL de lisozima) e incubados por 15-18h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação moderada. Após esse período, os tubos foram resfriados a $4^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ e a solução foi substituída por 2,0mL de solução ESP (0,5M EDTA, pH 8,0; 1% Sarcosyl; 0,1mg/mL de proteinase K) com incubação por 18-24h a $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ sob leve agitação. A seguir, a solução foi substituída por nova solução ESP e incubada durante 18-24h a $50\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os blocos foram, então, lavados em tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1mM EDTA) por 5 vezes a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação moderada.

Um bloco de cada amostra foi colocado em 200 μL do tampão da enzima (20 μL do tampão; 180 μL de água milliQ esterilizada) e incubado por 2h à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esse período, os blocos foram submetidos ao tratamento com solução contendo 15U da enzima de restrição *SpeI* (Boehringer Mannheim Corporation) por 16-18h a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ em aerobiose.

A enzima de restrição foi retirada e os blocos contendo o DNA digerido foram fundidos à 72°C e aplicados em gel de agarose (SeaKem GTG agarose; FMC) a 1,0% em 0,4X TBE. A separação eletroforética foi realizada no sistema CHEF DRIII (Bio-Rad Laboratories) por 18h a 6 V/cm, com pulso inicial de 5 segundos e pulso final de 35 segundos, a 14°C . Para a visualização das bandas obtidas, o gel de agarose foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos, sob agitação, descorado em água 2hs, observado em transiluminador de UV e posteriormente fotografado. As amostras foram analisadas com auxílio do aplicativo GelCompar versão 3 (Applied Maths).

10. Modelo experimental de pneumosepse por *B. cenocepacia*

Os procedimentos adotados foram submetidos à análise pelo Comitê de Bioética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (Protocolo no. 255/08).

Foram utilizados 100 camundongos suíços, fêmeas adultas, com 6 a 8 semanas de idade e peso médio de 20g, adquiridos no Biotério Central do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ, acondicionados em gaiolas distintas com água e ração *ad lib*. Dois dias antes da infecção, os animais foram tratados com o imunossupressor Ciclofosfamida (150 mg/kg), administrado por via intraperitoneal, visando à reprodução do modelo experimental descrito por Ventura (2007).

Imediatamente antes da infecção, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de ketamina (Dopalen injetável de uso veterinário, Vetbrands; 65mg/kg) e xilazina (Coopazine^R de uso veterinário, Schering Plough Coopers; 13 mg/kg) (Allewelt *et. al*, 2000) e divididos em seis grupos. Camundongos de cinco grupos foram infectados, via intra-traqueal, com 50µl de cada suspensão bacteriana, contendo cerca de 4×10^7 UFC, enquanto os animais do sexto grupo receberam igual volume (50µl) de solução salina estéril (grupo controle).

Para a injeção intra-traqueal das suspensões bacterianas, foi feita uma pequena incisão ventral no pescoço dos camundongos, na altura da linha do ombro, após assepsia com etanol. A traquéia foi exposta por dissecação e a injeção dos 50µl das suspensões bacterianas ou de solução salina na luz traqueal foi feita com seringa de insulina, devagar, de modo a não haver refluxo. Imediatamente após a inoculação, os animais foram colocados na posição vertical. As incisões foram, então, fechadas com 2 pontos de sutura com fio mononylon 3.0 e os animais recolocados em suas gaiolas. Após 24 horas de infecção, foi determinado o percentual de sobrevivência dos animais de cada grupo e os sobreviventes foram submetidos à avaliação clínica, visando à identificação de sinais externos de infecção. A presença ou ausência dos sinais relacionados a seguir deu origem a uma escala de pontuação denominada “Escala de Carnevale modificada” (Machado *et al.*, 2009). Os parâmetros utilizados para a construção da escala foram os seguintes: i) presença ou não

de pilo-ereção (positivo = 1; negativo = 0); ii) força motora (diminuída = 1; normal = 0); interesse pelo meio (ausente = 1; presente = 0); iv) aspecto dos olhos (com secreção = 1; normais = 0); v) frequência respiratória (alterada = 1; normal = 0).

Após o exame físico, os animais foram anestesiados e submetidos à sangria branca, através de punção cardíaca. Nas amostras de sangue coletadas foi feita a contagem de leucócitos totais em contador automático (Beckman Coulter) para a obtenção de um parâmetro adicional de definição da gravidade da infecção.

Após a coleta do sangue, as cavidades abdominais foram abertas para possibilitar a remoção do fígado dos animais e determinação da disseminação bacteriana. Finalmente, os animais foram submetidos à lavagem bronco-alveolar, como descrito no item 12.

11. Avaliação da disseminação bacteriana

Uma gota de sangue de cada animal foi cultivada em 3 mL de meio TSB por até 72 horas a 37°C. Além disso, fragmentos dos fígados, de cerca de 300 mg, foram transferidos, asépticamente, para tubos de ensaio contendo areia e 1 ml de solução salina estéril. Seguiu-se a maceração dos fragmentos, com o auxílio de outros tubos de ensaio estéreis, introduzidos no interior daqueles que continham a areia e os órgãos, e o plaqueamento de 100 µL do macerado hepático em ágar CLED. Após incubação a 37°C por 24-48 horas, as colônias bacterianas com morfologia sugestiva de *B. cenocepacia* foram submetidas à coloração de Gram, transferidas para a superfície de papel de filtro e expostas a solução de tetrametilfenilendiamino, para pesquisa da enzima citocromo-oxidase. As colônias de bactérias Gram negativas e oxidase positivas foram submetidas às provas bioquímicas de oxidação/fermentação, no meio de Hugh Leifson (Becton Dickinson, EUA), e descarboxilação de lisina no meio Moeller (Oxoid), para confirmação de se tratarem realmente de *B. cenocepacia*.

12. Obtenção do lavado bronco-alveolar

Após o óbito dos animais, suas traquéias foram expostas, através de uma incisão no meio do pescoço, e nelas foram introduzidas cânulas de plástico (Jelco no. 20), com as extremidades cortadas em bisel. Seguiu-se a instilação e posterior aspiração de 1 ml de solução salina estéril. Após remoção de alíquotas dos lavados para contagem do número total de células, em câmara de Neubauer, os lavados bronco-alveolares foram centrifugados (3000 rpm por 10 minutos em centrífuga clínica).

Os sobrenadantes foram estocados a - 70° C e os sedimentos dos lavados foram ressuspensos em 100 µL de solução salina para confecção de esfregaços, que foram corados pelo método de Wright e analisados, sob microscopia óptica, para determinação do percentual de células mono e polimorfonucleadas.

13. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão dos valores obtidos. Foram realizados no mínimo 2 ensaios para cada experimento. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.), através da análise de variância (ANOVA), seguido pelos testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunnett, exceto quando informação específica tiver sido fornecida.

RESULTADOS

1. Citotoxicidade bacteriana

A manutenção da integridade das membranas plasmáticas das células eucarióticas após a infecção bacteriana foi pesquisada pela determinação da reatividade das células com iodeto de propídio (IP). A análise, por citometria de fluxo, de culturas infectadas com as diferentes cepas de *B. cenocepacia* mostrou que os percentuais de células reativas com o IP em culturas infectadas com a cepa ET-12 (66,9% \pm 13,6) e com os isolados clínicos CL2 (45,3% \pm 10,0), CL3 (34,5% \pm 13,6) e CL4 (46,7% \pm 9,0) foram significativamente maiores que os percentuais detectados em culturas controle (13,12% \pm 5,2%) (Fig. 5), atestando a citotoxicidade dos microrganismos.

Quando comparada aos isolados clínicos, a cepa ET-12 mostrou ser significativamente mais citotóxica (ET-12 vs CL1 e CL3 $p < 0.001$; ET-12 vs CL2 e CL4 $p < 0,01$).

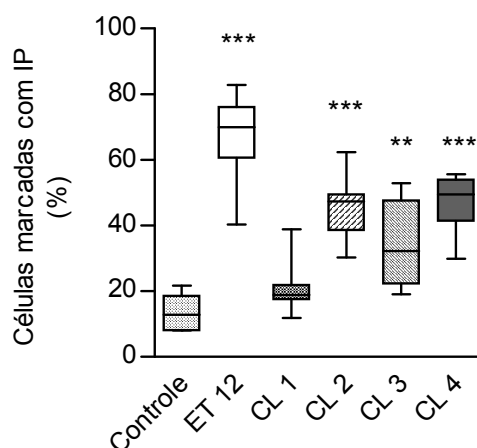


Fig. 5 - Percentual de células marcadas com Iodeto de propídio em culturas controle (n = 6) ou em culturas infectadas, por 20hs, com as cepas ET-12 (n = 7), CL 1 (n = 7), CL 2 (n = 7), CL 3 (n = 8) e CL 4 (n = 8). Os resultados apresentados foram obtidos em 2 ensaios distintos. No gráfico, as barras representam a dispersão dos resultados, as colunas, a maioria dos valores (entre 25 e 75%) e o traço no interior das colunas, as medianas. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando as culturas infectadas foram comparadas com as culturas controle.

2. Indução da secreção de IL-6 e IL-8

As concentrações de IL-6 nos sobrenadantes das células infectadas com a cepa ET-12 ($342,6 \pm 60,3$ pg/mL) e com os isolados clínicos CL2 ($391,7 \pm 81,8$ pg/mL) e CL4 ($238,7 \pm 114,9$ pg/mL) foram significativamente superiores às concentrações nos sobrenadantes de culturas controle ($109,0 \pm 32,3$ pg/mL) (Fig. 6).

Quando comparado aos sobrenadantes de células infectadas com os isolados clínicos, o sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 apresentou concentração de IL-6 significativamente superior, com exceção do sobrenadante de células infectadas com o isolado clínico CL 2 (ET-12 vs CL1 e CL3, $p < 0,001$; ET-12 vs CL4, $p < 0,05$).

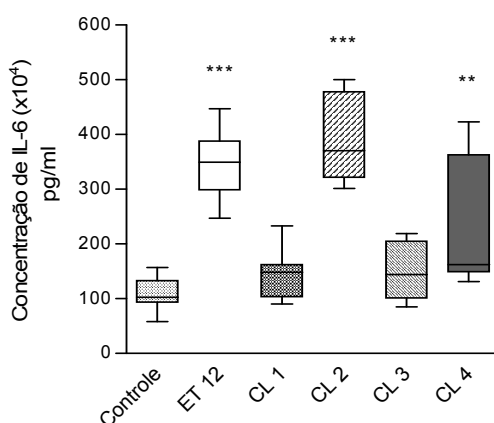


Fig. 6- Concentração de IL-6 no sobrenadante de células controle não infectadas ($n = 8$) e infectadas com a cepa ET-12 ($n = 9$) e com os isolados clínicos CL 1 ($n = 7$), CL 2 ($n = 7$), CL 3 ($n = 9$), CL 4 ($n = 9$). Os resultados apresentados foram obtidos em 3 ensaios distintos. No gráfico, as barras representam a dispersão dos resultados, as colunas, a maioria dos valores e o traço no interior das colunas, as medianas. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando as concentrações no sobrenadante das culturas infectadas foram comparadas com aquelas dos sobrenadantes das culturas controle.

As concentrações de IL-8 no sobrenadante das células infectadas com a cepa ET-12 ($207,5 \pm 38,9$ pg/mL) e com o isolado clínico CL2 ($258,9 \pm 73,5$ pg/mL) foram significativamente superiores às presentes nos

sobrenadantes de células controle ($140,6 \pm 35,8$ pg/mL). As concentrações nos sobrenadantes de células infectadas com os isolados clínicos CL1 ($193,8 \pm 45,0$ pg/mL), CL3 ($144,9 \pm 24,9$ pg/mL) e CL4 ($203,5 \pm 31,5$ pg/mL) foram similares às presentes nas culturas controle (Fig. 7).

O sobrenadante das células infectadas com a cepa ET-12 não diferiu significativamente dos sobrenadantes de culturas infectadas com os isolados clínicos estudados, quanto à concentração de IL-8.

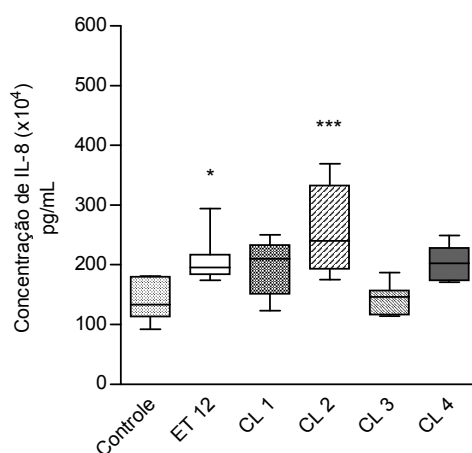


Fig. 7- Concentração de IL-8 no sobrenadante de células controle (n = 8) ou infectadas com a cepa ET-12 (n = 8) e com os isolados clínicos CL 1 (n = 9), CL 2 (n = 9), CL 3 (n = 7), CL 4 (n = 8). Os resultados apresentados foram obtidos em 3 ensaios distintos. No gráfico, as barras representam a dispersão dos resultados, as colunas, a maioria dos valores e o traço no interior das colunas, as medianas. * p < 0,05 e *** p < 0,001 quando as concentrações no sobrenadante das culturas infectadas foram comparadas com aquelas dos sobrenadantes das culturas controle.

3. Expressão do FT em células epiteliais respiratórias

A análise, por citometria de fluxo, mostrou que o percentual de células positivas para o FT nas culturas infectadas pela cepa ET-12 ($6,6\% \pm 3,5$) e pelos isolados clínicos CL 1 ($8,4\% \pm 4,3$), CL 2 ($6,4\% \pm 3,2$), CL 3 ($6,3\% \pm 4,2$) e CL 4 ($5,8\% \pm 3,2$) não diferiu significativamente do percentual detectado em culturas controle ($10,4\% \pm 3,3$) (Fig. 8). Nenhuma diferença significativa foi detectada, também, na intensidade de marcação das células com o anticorpo

anti-FT ou no índice obtido pela fórmula [% de células positivas x média da intensidade de fluorescência] (dados não mostrados).

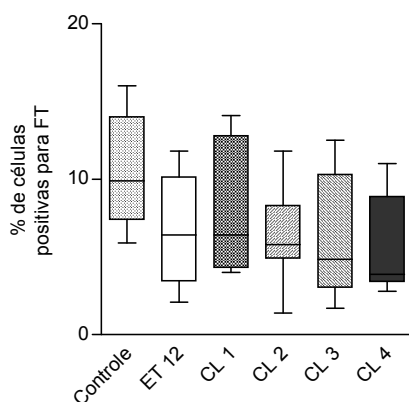


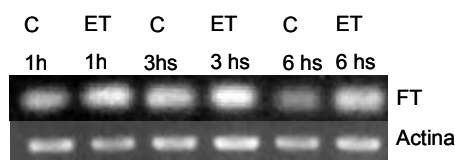
Fig. 8- Porcentagem de células positivas para FT em culturas controle (n = 10) ou infectadas com a cepa ET-12 (n = 9) e isolados clínicos CL1 (n = 9), CL2 (n = 8), CL3 (n = 8), CL4(n = 8). Os resultados obtidos em 3 ensaios distintos. No gráfico, as barras representam a dispersão dos resultados, as colunas, a maioria dos valores e o traço no interior das colunas, as medianas.

4. Indução do mRNA do FT em células BEAS-2B por *B. cenocepacia*

Como não houve diferença significativa entre as amostras clínicas e a cepa padrão na indução da expressão do FT, optamos pela avaliação inicial da modulação da transcrição do gene do FT apenas em células infectadas pela cepa ET-12.

Os resultados obtidos em 2 experimentos distintos não motivaram a continuação da pesquisa em células infectadas com os isolados clínicos porque as células infectadas pela cepa ET-12 de *B. cenocepacia* por 1, 3 e 6 horas não apresentaram diferenças relevantes no nível do mRNA do FT, quando comparadas com células controle (Fig. 9).

A



B

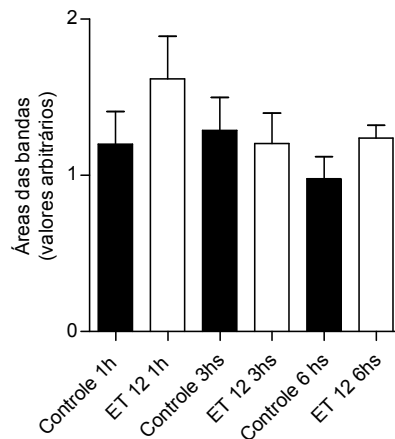


Fig. 9- Em A, fotomicrografia de gel com os transcritos do FT e da β -actina presentes em células controle e infectadas com a cepa ET-12 por 1h, 3hs e 6hs. Em B, o gráfico representa a relação da densidade das bandas dos transcritos do FT/ β -actina obtidas em 2 ensaios distintos.

5. Concentração do FT nos sobrenadantes celulares

Uma vez que FT pode ser liberado das membranas celulares, avaliamos a capacidade dos diferentes microrganismos de potencializar esta liberação.

Ao contrário dos resultados obtidos na pesquisa do FT associado às células respiratórias, as concentrações detectadas nos sobrenadantes de células infectadas pela cepa ET-12 ($77,5 \pm 11,9$ pg/mL) e pelo isolado clínico CL 2 ($213,7 \pm 58,9$ pg/mL) foram significativamente superiores à concentração no sobrenadante de células controle ($21,9 \pm 4,2$ pg/mL) (Fig. 10).

Quando comparado aos isolados clínicos, ET-12 induziu uma expressão de FT significativamente maior apenas que CL 3 ($p < 0,05$). Ao contrário, a concentração de FT no sobrenadante de culturas infectadas com o isolado clínico CL 2 foi significativamente maior que as concentrações nos sobrenadantes das culturas infectadas com os demais isolados clínicos, bem como no de culturas infectadas com a cepa ET-12 ($p < 0,001$).

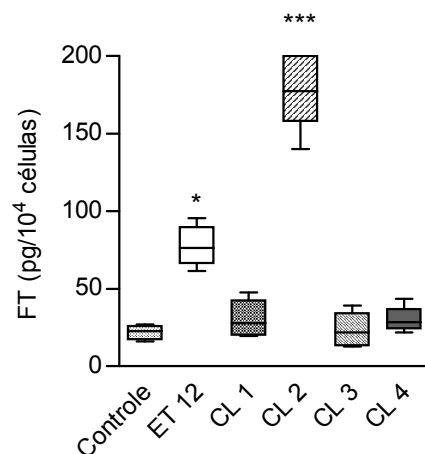


Fig. 10- Concentração de FT nos sobrenadantes de células controle (n = 6) e infectadas com a cepa ET-12 (n = 6) e isolados clínicos CL1 (n = 6), CL2 (n = 6), CL3 (n = 6), CL4 (n = 6). Os resultados apresentados foram obtidos em 3 ensaios distintos, realizados em duplicata. No gráfico, as barras representam a dispersão dos resultados, as colunas, a maioria dos valores e o traço no interior das colunas, as medianas. * p < 0,05 e *** p < 0,001 quando as concentrações no sobrenadante das culturas infectadas foram comparadas com aquelas dos sobrenadantes das culturas controle.

6. Atividade procoagulante no sobrenadante de células BEAS-2B

A funcionalidade do FT detectado no sobrenadante de células infectadas foi pesquisada por teste colorimétrico. Os resultados apresentados na Figura 11 mostram a presença de importante atividade procoagulante no sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 (17,4 pM ± 3,9) e com o isolado clínico CL2 (23,1 pM ± 17,3 pM), significativamente superior à detectada no sobrenadante de culturas controle (5,1 pM ± 2,5).

Quando comparada aos isolados clínicos, ET-12 mostrou atividade procoagulante significativamente superior apenas àquela de CL1 (p<0,05). Por outro lado, a atividade do sobrenadante de células infectadas com CL2 foi significativamente superior à dos sobrenadantes de culturas infectadas com os demais isolados clínicos (CL1, CL3 e CL4; p<0.05).

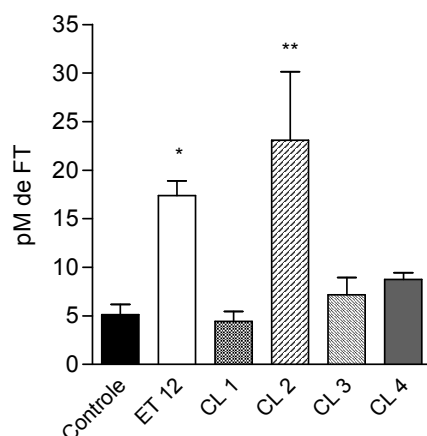


Fig. 11- Atividade pró-coagulante detectada nos sobrenadantes de células controle (n = 6) e infectadas com a cepa ET-12 (n = 7) ou com os isolados clínicos CL1 (n = 6), CL2 (n = 6), CL3 (n = 6) e CL4(n = 8). Os resultados apresentados foram obtidos em 2 ensaios distintos e representam as médias \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando os valores das culturas infectadas foram comparados com os das culturas controle.

7. Presença de FT associado à micropartículas

Conhecendo o potencial procoagulante de micropartículas, pesquisamos sua presença nos sobrenadantes de culturas controle e infectadas para avaliarmos a existência de correlação entre a atividade procoagulante acima descrita e a presença de micropartículas. Os dados apresentados na Figura 12 mostraram que o número total de micropartículas detectadas no sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 (11.277 ± 4.262) e com o isolado clínico CL 2 (11.337 ± 5.165) foi significativamente superior ao detectado no sobrenadante de células controle (5.587 ± 2.891).

O número de micropartículas detectadas no sobrenadante de culturas infectadas com ET-12 e com CL2 não diferiu daquele presente nos sobrenadantes de culturas infectadas com os demais isolados clínicos, com exceção do CL3 ($p < 0,05$).

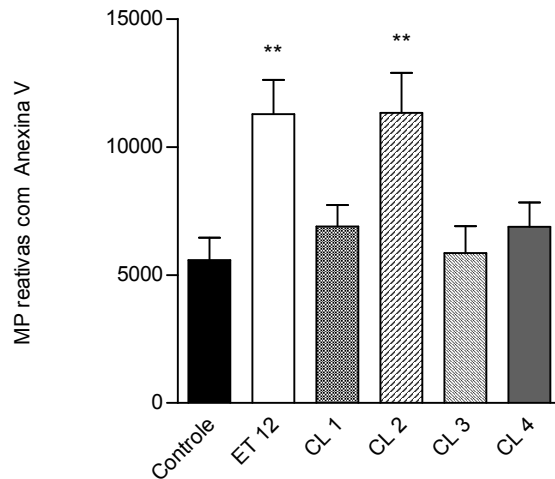


Fig. 12- Número de micropartículas (MP) detectadas, por minuto, no sobrenadante de células controle (n = 11) ou infectadas com a cepa ET-12 (n = 10) e isolados clínicos CL1 (n = 10), CL2 (n = 11), CL3 (n = 12), CL4(n = 11). Os resultados apresentados foram obtidos em 4 ensaios distintos e representam as médias ± erro padrão das médias. ** p < 0,001 quando os valores das culturas infectadas foram comparados com os das culturas controle.

A Figura 13 mostra que apenas um pequeno percentual das micropartículas presentes nos sobrenadantes de células epiteliais respiratórias, controle ou infectadas, apresentava FT em suas membranas. No entanto, os percentuais detectados nos sobrenadantes de culturas infectadas com a cepa ET-12 (1,9% ± 0,7) e com o isolado clínico CL2 (1,8% ± 0,3) foram significativamente superiores ao detectado no sobrenadante de culturas controle (1,1% ± 0,1).

O percentual de micropartículas contendo FT detectado no sobrenadante de culturas infectadas com ET-12 foi também significativamente superior ao detectado no sobrenadante de culturas infectadas com os isolados clínico CL1 (p<0,05), CL3 e CL 4 (p<0,001).

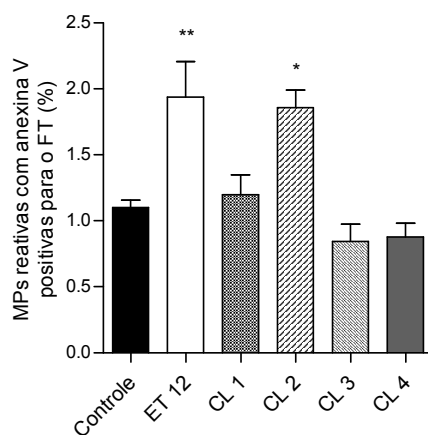
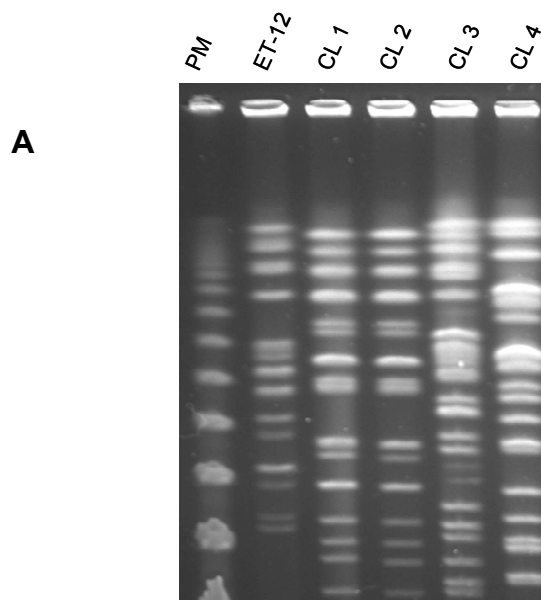


Fig. 13- Percentual de micropartículas com expressão simultânea de FT e fosfatidilserina presente no sobrenadante de células controle (n = 8) e infectadas com a cepa ET-12 (n = 8) ou isolados clínicos CL1 (n = 7), CL2 (n = 7), CL3 (n = 9), CL4(n = 9). Os resultados apresentados foram obtidos em 3 ensaios distintos e representam as médias \pm erro padrão das médias. * p < 0,05 e ** p < 0,01 quando os valores das culturas infectadas foram comparados com os das culturas controle.

8. Perfil de Fragmentação do DNA Cromossômico por PFGE

Ao longo deste estudo, foi observado que o potencial de virulência do isolado clínico CL2 assemelha-se ao da cepa padrão ET-12. Este achado nos motivou a pesquisar se esses dois microrganismos pertencem a um mesmo grupo clonal. Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que nenhum dos isolados clínicos pertence ao grupo clonal da cepa ET-12. Ao contrário, os isolados clínicos CL1 e CL2 apresentaram total identidade genômica cromossômica, indicativo de terem a mesma origem clonal.



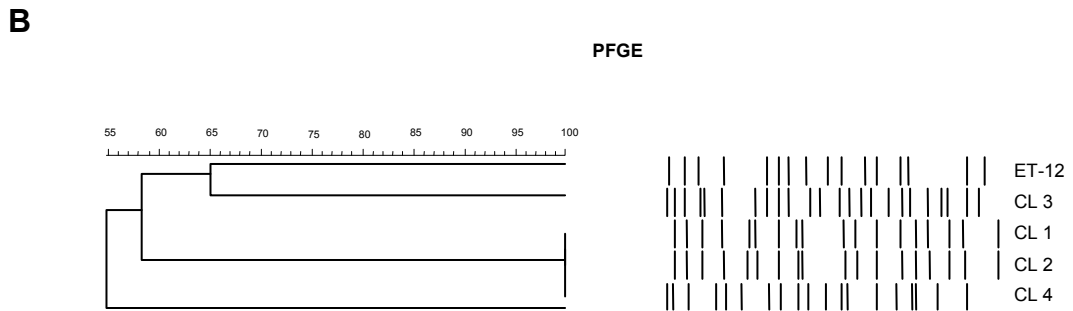


Fig. 14- Em A, fotomicrografia do gel dos fragmentos de DNA cromossômico da cepa ET-12 e dos diferentes isolados clínicos. Em B, dendograma mostrando o percentual de similaridade entre as amostras estudadas. É possível observar 100% de identidade entre as amostras CL1 e CL2. PM = padrão de peso molecular.

9. Modelo experimental de pneumosepse por *B. cenocepacia*

Para validar os resultados obtidos no estudo *in vitro*, que mostraram a maior virulência da cepa ET-12 e do isolado clínico CL2, camundongos infectados com os diferentes microrganismos foram comparados quanto a parâmetros utilizados na avaliação da gravidade de processos infecciosos.

9.1 Presença de sinais externos de infecção

O exame físico revelou que os animais do grupo controle não apresentaram sinais externos de infecção (*score* = 0). Já no grupo de animais infectados com a cepa ET-12 e com os isolados clínicos CL2 e CL4, os percentuais de camundongos com *score* \geq 3 foram de 100%, 85,7% e 62,5%, respectivamente. No grupo infectado com os isolados clínicos CL1 e CL3 esses percentuais foram de 57,1% e 28,6%, respectivamente (Fig. 15).

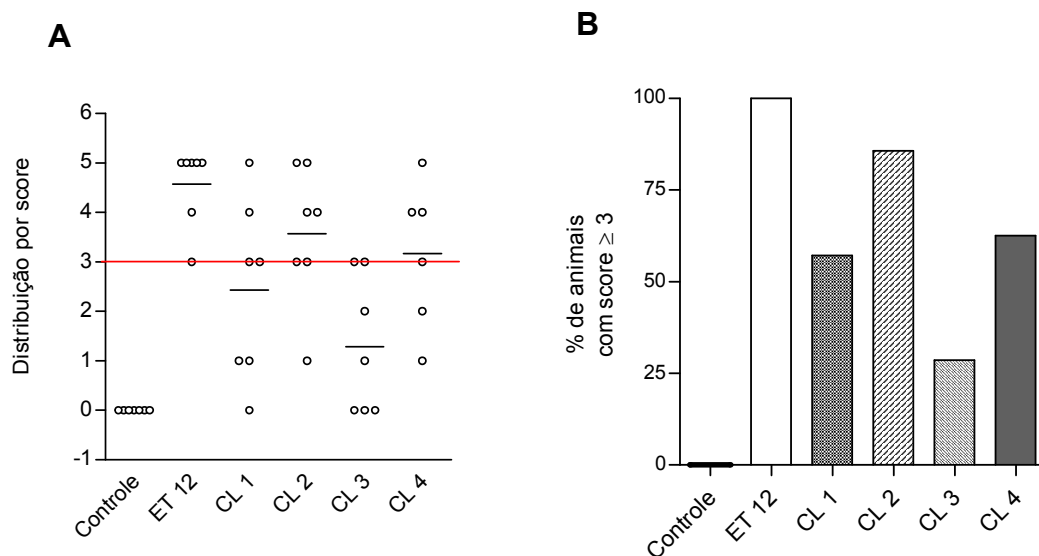


Fig. 15- Em A, distribuição por score dos animais controle (n = 7) e infectados com a cepa ET-12 (n = 7) ou com os isolados clínicos CL1 (n = 7), CL 2 (n = 7), CL 3 (n = 7) e CL 4 (n = 6). Em B, as barras representam o percentual de animais controle ou infectados com score ≥ 3 , 24hs após a infecção. Os dados representam os resultados obtidos em apenas um experimento.

9.2 Disseminação bacteriana a partir do foco inicial da infecção

Os dados apresentados na Figura 16 A mostram que o percentual de isolamento bacteriano no sangue dos animais infectados com a cepa ET-12 e com o isolado clínico CL2 foi de 100%. Os percentuais de hemoculturas positivas em animais infectados com os isolados clínicos CL1, CL3 e CL4 foram de 85,7%, 83,3% e 83,3% respectivamente.

A figura 16 B mostra o percentual de isolamento bacteriano no fígado dos animais infectados com os isolados clínicos CL2 (100%); CL4 (87,5%); CL1 e CL3 (57,1%) bem como com a cepa ET-12 (42,8%). Animais infectados com os isolados clínicos CL2 e CL4 apresentaram, também, uma concentração bacteriana por mg de tecido hepático superior a presente no fígado de animais infectadas com as demais amostras testadas (Fig. 16C).

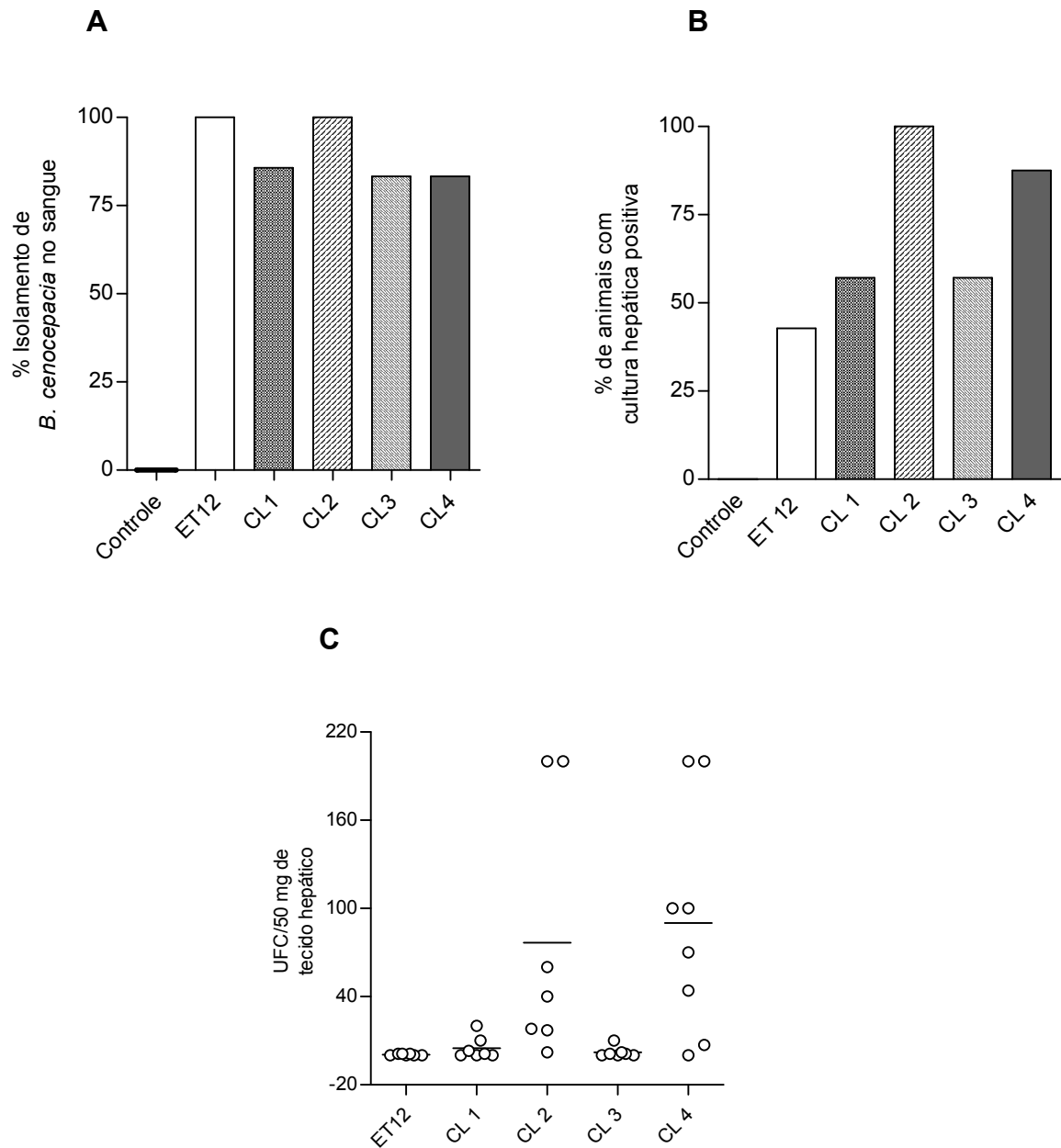


Fig. 16- Isolamento de *B. cenocepacia* em sítios distintos do foco inicial de infecção. Em A, as barras representam o percentual de isolamento bacteriano no sangue dos animais controle (n = 6) e infectados com a cepa ET-12 (n = 7) ou com os isolados clínicos CL1 (n = 6), CL 2 (n = 7), CL 3 (n = 6) e CL 4 (n = 6). Em B, as barras representam o percentual de animais com cultura de tecido hepático positiva. Em C, o gráfico apresenta o número de UFC por 50 mg de tecido hepático obtido em animais infectados com os diferentes microrganismos. Os dados apresentados foram obtidos em um único experimento.

9.3 Leucometria

A concentração de leucócitos totais no sangue periférico dos animais infectados com os isolados clínicos CL1 ($0,6 \pm 0,4 \times 10^6/\text{mL}$), CL2 ($0,6 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mL}$), CL3 ($0,5 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mL}$) e CL4 ($0,5 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mL}$) foi significativamente inferior à dos animais controle ($0,9 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mL}$). Surpreendentemente, não houve diferença significativa entre as leucometrias de animais controle e infectados com a cepa ET-12 ($0,7 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ mL}$) (Fig 17 A).

Ao contrário, a concentração de leucócitos totais no lavado broncoalveolar dos animais infectados com a cepa ET-12 ($16,8 \pm 10,4 \times 10^4/\text{mL}$) foi significativamente superior à detectada nos lavados de animais controle ($2,8 \pm 2,0 \times 10^4/\text{mL}$). As concentrações presentes nos lavados de animais infectados com os isolados clínicos CL1 ($25,5 \pm 21,6 \times 10^4/\text{mL}$), CL2 ($29,1 \pm 22,0 \times 10^4/\text{mL}$) e CL3 ($20,3 \pm 19,0 \times 10^4/\text{mL}$) também foram significativamente superiores às dos controle. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em animais infectados pelo isolado clínico CL4 ($7,2 \pm 7,4 \times 10^4/\text{mL}$) e nos do grupo controle (Fig. 17 B).

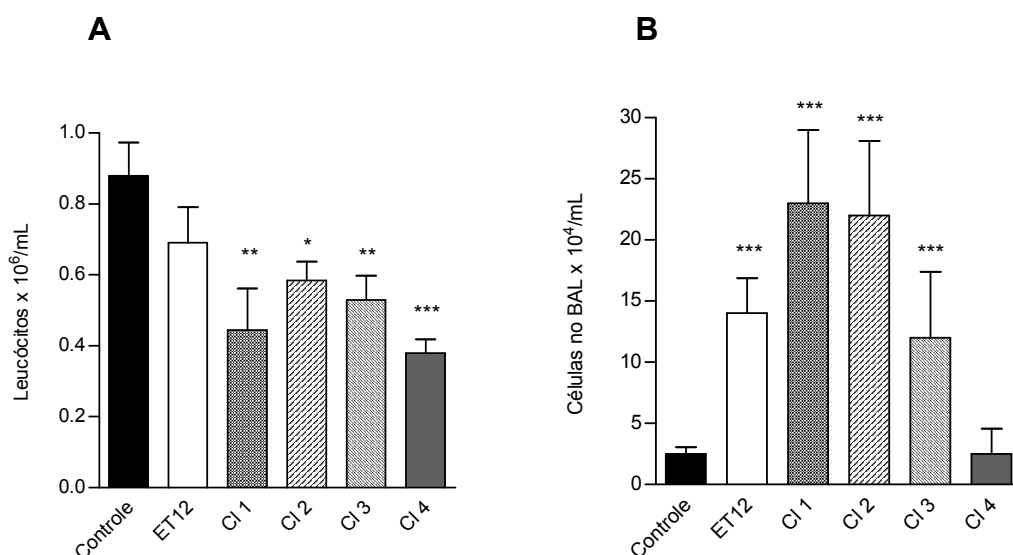


Fig. 17- Concentração de leucócitos no sangue periférico (A) e lavado broncoalveolar de animais controle (n = 13) e infectados com a cepa ET 12 ou com os diferentes isolados clínicos (n = 14). As barras representam as medianas \pm erros padrão obtidos em 2 ensaios diferentes. * p < 0,05 , ** p < 0,01 e *** p < 0,001 quando as medianas dos resultados obtidos com animais infectados foram comparadas com as medianas dos animais controle, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

Esse trabalho teve por objetivo geral estudar a cepa J2315 da linhagem ET-12 de *B. cenocepacia* quanto a atributos de virulência com potencial de favorecer o desencadeamento da síndrome cepacia e compará-la com quatro isolados clínicos de *B. cenocepacia* procedentes de pacientes com FC com evolução clínica benigna, definida neste estudo como ausência de síndrome cepacia.

Na avaliação do potencial de virulência dos microrganismos, utilizamos os parâmetros: i) potencial citotóxico e pró-inflamatório; ii) capacidade de modulação da expressão do FT associado às células e solúvel, no sobrenadante das culturas; iii) capacidade de modulação da expressão do mRNA do FT; iv) potencial procoagulante dos sobrenadantes das culturas; v) capacidade de indução da liberação de MPs dotadas de atividade procoagulante.

A análise dos resultados obtidos mostrou a existência de potencial de virulência diferenciado entre os microrganismos estudados, embora todos pertençam ao subgrupo IIIA, conhecido por ser o subgrupo mais frequentemente associado à presença de marcadores de virulência, como o *B. cepacia epidemic strain marker* (BCESM) e a *B. cenocepacia island* (CCI) (Baldwin *et al.*, 2004). Para validar os resultados dos testes *in vitro*, comparamos a virulência dos diferentes microrganismos utilizando um modelo experimental murino de pneumosepse.

Com o intuito de pesquisar o potencial de citotoxicidade da cepa ET-12 e dos isolados clínicos de *B. cenocepacia*, células epiteliais respiratórias foram infectadas por 20 horas e testadas quanto à incorporação da sonda iodeto de propídeo, utilizada para evidenciar alterações da permeabilidade da membrana celular induzidas pela infecção bacteriana. Nossos resultados mostraram que os percentuais de células reativas com o iodeto de propídeo em culturas infectadas com todos os microrganismos testados, com exceção de CL1, foram significativamente maiores que os detectados em culturas controle, atestando a

citotoxicidade dos microrganismos. Quando comparada aos isolados clínicos, a cepa ET-12 mostrou ser significativamente mais citotóxica.

A citotoxicidade de *B. cenocepacia* já foi relatada em alguns estudos, no mais recente destes, Holden *et al.* (2009) viram que o genoma da J2315 codifica 5 proteínas homólogas das PLCs de *P. aeruginosa*. Detectaram, também, uma fosfolipase específica para fosfatidil inositol.

É bastante conhecida a acentuada resposta inflamatória nas vias aéreas de pacientes fibrocísticos infectados por bactérias do Complexo *B. cepacia*, bem como por outros microrganismos. Por exemplo, Hendry *et al.* (1999), em estudos controlados com pacientes adultos portadores de FC e infectados por “*B. cepacia*”, observaram que os níveis de marcadores de inflamação, como contagem de glóbulos brancos e proteína C reativa, foram elevados durante os episódios de exacerbação das infecções. Acredita-se que destruição do parênquima pulmonar decorrente da resposta inflamatória exacerbada, contribua para a disfunção respiratória e gravidade do quadro clínico dos pacientes. Além disso, parece favorecer a persistência do processo infeccioso. Em condições normais, o epitélio respiratório ciliado é usualmente refratário à aderência bacteriana. No entanto, em condições patológicas em que está, por exemplo, exposto ao ambiente inflamatório, é comum a presença de metaplasia escamosa (Simel *et al.*, 1984). Estudos mostraram que células respiratórias metaplásicas, que exibem grande quantidade de citoqueratina 13 em suas superfícies apicais, são particularmente suscetíveis à aderência de bactérias do CBc (Sajjan *et al.*, 2002).

A ativação de genes pró-inflamatórios, com resultante síntese de citocinas, como IL-8, tem sido implicada na patogênese da deterioração da função respiratória de pacientes com FC (Reddi *et al.*, 2003). Estudos mostraram que os diferentes patógenos envolvidos na doença pulmonar de pacientes com FC, como *H. influenzae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, induzem a produção de IL-8 por células epiteliais respiratórias. No entanto, alguns desses estudos mostraram que a infecção por espécies do CBc resulta em resposta inflamatória mais intensa que a provocada por *P. aeruginosa* (Hendry *et al.* 1999; Reddi *et al.*, 2003). Quanto ao potencial pró-inflamatório de *B. cenocepacia*, em particular, Palfreyman *et al.* (1997) mostraram que estes

microrganismos foram capazes de induzir a produção de elevados níveis de IL-8 por células pulmonares “*in vitro*”.

Em nosso estudo, as concentrações de IL-8 no sobrenadante das células infectadas com a cepa ET-12 e com o isolado clínico CL2 foram significativamente superiores às aquelas presentes nos sobrenadantes de células controle.

Quanto à outra citocina pró-inflamatória pesquisada, nossos resultados mostraram que as concentrações de IL-6 nos sobrenadantes das células infectadas com a cepa ET-12 e com os isolados clínicos CL2 e CL4 foram significativamente superiores às concentrações nos sobrenadantes de culturas controle. Quando comparado aos sobrenadantes de células infectadas com os isolados clínicos, o sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 apresentou concentração de IL-6 significativamente superior à detectada no sobrenadante de células infectadas com todos os isolados clínicos, com exceção de CL 2, que apresentou capacidade de indução da citocina tão importante quanto à da cepa ET-12.

Com base nos resultados da dosagem de IL-6 e IL-8 concluímos que a cepa ET-12 e o isolado clínico CL2 apresentam potencial pró-inflamatório semelhante e superior ao dos outros microrganismos estudados. Conhecendo a associação existente entre a intensidade da resposta inflamatória nas vias aéreas de pacientes com FC, destruição do parênquima pulmonar e disfunção respiratória dos pacientes, parece razoável supor que as infecções por estes dois microrganismos possam resultar em maior gravidade do quadro clínico dos pacientes.

Apesar da importância da resposta inflamatória na imunidade inata de organismos hospedeiros, sua ativação sistêmica e descontrolada associada à incapacidade do organismo hospedeiro de conter um processo infeccioso resultam em um quadro clínico grave, chamado de sepse.

Pacientes com sepse por bactérias gram-negativas tem grande probabilidade de desenvolver quadros de lesão pulmonar aguda ou de sua forma mais grave, a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (ARDS), quadro

este de grande gravidade que pode levar o paciente à morte. Uma importante característica destes dois quadros clínicos é a deposição de fibrina nos compartimentos alveolar e intersticial, prejudicando seriamente as trocas gasosas. Além disso, nesses pacientes, há uma maior infiltração de células inflamatórias nos pulmões, perda da atividade do surfactante e espessamento no septo alvéolo capilar, pela formação de membrana hialina (Petty *et al.*, 1971; Welty-Wolf *et al.*, 2001).

Células epiteliais respiratórias, incluindo aquela da linhagem BEAS-2B, expressam constitutivamente o FT (Iakhiaev *et al.*, 2004) e Perrio *et al.* (2007) esclareceram o significado funcional desta expressão ao mostrarem que a deposição de fibrina é um passo importante para que as células epiteliais vizinhas a bordos de lesões do epitélio das vias aéreas possam migrar e com isso restabelecer sua integridade. Mostraram, também, que as próprias células do epitélio brônquico possuem a capacidade de expressar, além do FT, os fatores da cascata da coagulação VII, XIII, X e fibrinogênio, sendo capazes de induzir a formação de uma rede de fibrina independentemente da presença de fatores da coagulação plasmáticos. Sabendo-se que o FT é o fator responsável pelo início da cascata da coagulação, que, posteriormente, irá gerar a rede de fibrina (Neumann *et al.*, 1997 & Franco *et al.*, 2000), está explicada a importância da produção deste fator da coagulação dentro do ambiente pulmonar. Além disso, a deposição local de fibrina pode ser também um mecanismo pelo qual o parênquima pulmonar tenta localizar e confinar uma lesão, limitando o risco de disseminação da lesão ou de um agente infeccioso para a circulação sistêmica (Wang *et al.*, 2007).

Embora a deposição de fibrina no parênquima pulmonar seja um elemento de defesa do organismo, dependendo da intensidade do processo inflamatório deflagrado localmente, ocorrerá a transudação de plasma, aumentando o aporte de fatores da coagulação e, conseqüentemente, a quantidade de fibrina formada, com prejuízo potencial para as trocas gasosas e a estabilidade do parênquima pulmonar.

Sabendo que a expressão de FT em células endoteliais e monócitos de sangue periférico é modulada positivamente por estímulos pró-inflamatórios diversos (Neumann *et al.*, 1997), e conhecendo o potencial pró-inflamatório da cepa ET-12 e do isolado clínico CL 2, em nosso estudo pesquisamos a

modulação da expressão desta proteína em células epiteliais respiratórias infectadas pelos diferentes microrganismos em estudo. Ao contrário do esperado, nenhum aumento na expressão do FT, ou de seu mRNA, foi detectado. Estes resultados diferem dos obtidos por Plotkowski *et al.* (2008), que constataram um aumento na porcentagem de células positivas para o FT decorrente da exotoxina ExoU produzida pela cepa PA103 de *P. aeruginosa*, e nos surpreenderam, entre outros motivos, por sabermos que o LPS de *B. cenocepacia* é dotado de maior potencial pró-inflamatório que o de *P. aeruginosa* (Zughaier *et al.*, 1999; Reddi *et al.*, 2003).

Em consonância com a relação entre estimulação com moléculas pró-inflamatórias e superexpressão do FT, Bastarache *et al.* (2007) descreveram o aumento do FT em células do epitélio alveolar após sua estimulação com uma mistura de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IF- γ).

Além de células respiratórias, também monócitos e células endoteliais respondem a estímulos infecciosos, ou à ação do LPS, com superexpressão do FT e/ou de seu mRNA (Franco *et al.*, 2000; Bryant *et al.*, 2003; Mattson *et al.*, 2007). Por exemplo, Ettelaie *et al.* (2007), estudando a modulação do FT em células endoteliais infectadas por *Chlamydia pneumoniae*, encontraram um aumento tanto no mRNA do FT quanto na glicoproteína expressa na superfície das células infectadas, além do aumento no número de micropartículas com atividade pró-coagulante decorrente da presença de FT em sua superfície.

Entretanto, nosso trabalho é singular por ser o primeiro a pesquisar a modulação do FT em células epiteliais respiratórias pela cepa ET-12 e isolados clínicos de *B. cenocepacia*.

Ao contrário dos resultados encontrados na avaliação da expressão do FT associado às células respiratórias, concentrações significativamente aumentadas da proteína foram detectadas nos sobrenadantes de células infectadas pela cepa ET-12 e pelo isolado clínico CL 2, sendo as concentrações induzidas por CL2 muito superiores às induzidas por ET-12. A pesquisa da funcionalidade do FT presente nos sobrenadantes de células infectadas, por teste colorimétrico, mostrou a presença de importante atividade procoagulante no sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 e

com o isolado clínico CL 2, atividade esta mais acentuada no sobrenadante das culturas infectadas com CL 2.

Sabe-se que, além da isoforma associada às membranas plasmáticas, outra isoforma do FT, dita solúvel, é sintetizada por células diversas. Além disso, essa proteína pode ser expressa por micropartículas liberadas por células submetidas a estímulos diversos. Conhecendo o potencial procoagulante de micropartículas, pesquisamos sua presença nos sobrenadantes de culturas controle e infectadas para avaliarmos a existência de correlação entre a atividade procoagulante detectada nos sobrenadantes das culturas infectadas com ET-12 e CL 2 e a presença de micropartículas. Nossos resultados mostraram que o número total de micropartículas detectadas no sobrenadante de células infectadas com a cepa ET-12 e com o isolado clínico CL 2 foi significativamente superior ao detectado no sobrenadante de células controle. Também o percentual de micropartículas com expressão de FT em suas superfícies foi superior nos sobrenadantes de culturas infectadas pela cepa ET-12 e isolado clínico CL 2.

A indução da liberação de micropartículas por bactérias ou seus componentes foi descrita por outros autores. Por exemplo, Nieuwland *et al.* (2000) observaram o aumento da produção de micropartículas no plasma de pacientes com sepse por *Neisseria meningitidis*, sendo acompanhado pelo aumento na atividade pró-coagulante, enquanto Aras *et al.* (2004) descreveram a presença de micropartículas contendo FT na superfície, dotadas de atividade procoagulante, no plasma de voluntários tratados com endotoxina bacteriana. Em nosso laboratório, Plotkowski *et al.* (2008) mostraram que células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa* liberaram concentrações aumentadas de micropartículas contendo FT, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Como mencionado, o FT detectado no sobrenadante das culturas infectadas pela cepa ET-12 e pelo isolado clínico CL 2 tanto poderia ser a isoforma solúvel da proteína quanto aquele associado às micropartículas. Na tentativa de esclarecer esta questão, em estudo preliminar realizado uma única vez, comparamos a concentração de FT nos sobrenadantes de culturas submetidos à centrifugação, para eliminação das micropartículas, com as concentrações detectadas nos mesmos sobrenadantes não centrifugados. A

eliminação das micropartículas dos sobrenadantes resultou na redução das concentrações do FT nos sobrenadantes de células infectadas pela cepa ET-12 e pelo isolado clínico CL 2, de apenas 50% e 35%, respectivamente. Esses resultados sugerem que o FT associado às micropartículas foi responsável apenas em parte pela atividade procoagulante detectada no sobrenadante das culturas infectadas por estes microrganismos.

Ao longo deste estudo, foi observado que o potencial de virulência do isolado clínico CL 2 assemelhou-se ao da cepa padrão ET-12. Este achado nos motivou a pesquisar se esses dois microrganismos pertencem a um mesmo grupo clonal. Para isso, utilizamos a técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE). Esta técnica, que possibilita a separação de fragmentos de DNA com alto peso molecular e a diferenciação de cepas com base nas variações qualitativas e quantitativas dos fragmentos gerados, é utilizada para tipagem de amostras de uma mesma espécie, com base em suas diferenças clonais (Olive & Bean, 1999; Agodi *et al.*, 2000).

Nossos resultados do PFGE mostram que nenhum dos isolados clínicos pertence ao grupo clonal da cepa ET-12. Surpreendentemente, os isolados clínicos CL 1 e CL 2, que mostraram perfis de virulência distintos, apresentaram total identidade genômica cromossomial, indicativo de terem a mesma origem clonal.

Algumas características genóticas das espécies do Complexo *B. cepacia* são de relevância para o entendimento do fato de amostras clínicas com total identidade genômica cromossomial possuírem diferenças de comportamento *in vitro* e *in vivo*, como a presença de múltiplos cromossomos, a ampla variação no tamanho do genoma, já que diferentes cepas do complexo possuem entre 2 e 4 cromossomos e um tamanho genômico total de 5 a 9 Mb. Estas bactérias abrigam, ainda, um extenso conjunto de seqüências de inserção (elementos IS) que são capazes de promover rearranjos gênicos e aumentar a expressão de genes vizinhos a eles (Lessie *et al.*, 1996). Esses elementos contribuem significativamente para a plasticidade genômica dos membros do Complexo *B. cepacia*.

Os resultados de nossa pesquisa *in vitro* mostraram que a cepa ET-12 é dotada de potencial citotóxico e pró-inflamatório (devido à capacidade de induzir IL-6 e IL-8), bem como de capacidade de gerar um ambiente procoagulante decorrente da presença de FT no sobrenadante das culturas e da liberação de micropartículas. Esses atributos de virulência foram mais acentuados nesta cepa que nos isolados de pacientes com curso clínico benigno, com exceção do isolado clínico CL 2, que também foi capaz de promover um estado de hipercoagulabilidade, estado este observado, com freqüência, no curso da sepse.

Em busca da validação dos resultados observados *in vitro*, tivemos a preocupação de verificar se, também em um modelo de sepse experimental murina, a cepa ET-12 e o isolado CL 2 apresentariam virulência superior à dos demais isolados clínicos. Em nosso modelo, os animais foram tratados com agente indutor de leucopenia visando ao favorecimento da implantação dos microrganismos, uma vez que animais não tratados mostraram-se resistentes à infecção (dados pessoais não publicados), confirmando seu caráter oportunista.

A avaliação da gravidade da pneumosepse pelos diferentes microrganismos foi feita pela atribuição de pontuação a diferentes sinais clínicos observados, à semelhança do sistema de pontuação da gravidade do quadro de sepse humana (Sörensen *et al.*, 1994). Segundo os parâmetros selecionados, animais do grupo controle não apresentaram sinais externos de infecção (pontuação = 0), traduzindo sua sanidade. Os percentuais de animais infectados com a cepa ET-12 e com o isolado clínico CL 2 com pontuação ≥ 3 (100% e 85,7%, respectivamente) foram superiores aos de camundongos infectados com os demais isolados clínicos. Esses resultados corroboram a maior virulência de ET-12 e CL 2 detectada *in vitro*, virulência esta também confirmada pelo isolamento desses microrganismos no sangue de 100% dos animais infectados. No entanto, os percentuais de hemoculturas positivas em animais infectados com os demais isolados clínicos também foram elevados e variaram de 83,3% a 85,7%.

Outro critério utilizado em nosso trabalho foi a determinação do percentual de animais em que foi possível o isolamento bacteriano no parênquima hepático. *B. cenocepacia* foi isolada do parênquima de 100% dos

animais infectados com o isolado clínico CL 2. Além disso, esses animais apresentaram a maior relação “no. de UFC/massa de tecido hepático”, seguidos por aqueles infectados com o isolado clínico CL4. Surpreendentemente, o menor percentual de isolamento no parênquima hepático foi obtido no grupo de camundongos infectados com a cepa ET-12 (42,8%). Como esses animais apresentaram, também, uma baixa relação “no. de UFC/massa de tecido hepático”, não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre a capacidade dos microrganismos de interferir na integridade do epitélio respiratório, capacidade esta inferida com base em sua citotoxicidade detectada *in vitro*, e a disseminação sistêmica dos microrganismos.

A contagem de leucócitos totais no sangue periférico é muito utilizada na avaliação da sepse humana, sendo possível encontrar tanto leucocitose quanto leucopenia grave (Riedemann *et al.*, 2003; Suassuna, 2004). Embora nossos animais já fossem leucopênicos, em decorrência do tratamento com o quimioterápico, camundongos infectados com os quatro isolados clínicos apresentaram concentrações de leucócitos significativamente inferiores à dos animais controle. Novamente, muito nos surpreendeu a inexistência de diferença significativa entre a leucometria de animais controle e infectados com a cepa ET-12.

Ao contrário dos resultados de concentração de leucócitos no sangue periférico, sua concentração no lavado bronco-alveolar dos camundongos infectados com a cepa ET-12 foi significativamente superior à detectada nos lavados de animais controle. No entanto as concentrações presentes nos lavados de animais infectados com os isolados clínicos CL 1, CL 2 e CL 3 também foram significativamente superiores às do controle. Cabe ressaltar que nos grupos de animais infectados predominaram células polimorfonucleadas enquanto nos animais controle predominaram células mononucleadas, provavelmente refletindo a presença de macrófagos alveolares residentes.

Em conjunto, os resultados obtidos na avaliação de camundongos infectados com os diferentes microrganismos estudados confirmaram a virulência diferenciada do isolado clínico CL 2, mas não aquela da cepa

epidêmica ET-12, ressaltando a dificuldade da extrapolação direta de conclusões obtidas em estudos *in vitro* para seres vivos, humanos ou não.

CONCLUSÕES

- A cepa ET-12 de *B. cenocepacia* e o isolado clínico CL 2, procedente de paciente com FC, apresentaram citotoxicidade similar e capacidade de indução de secreção de IL-6 e IL-8, superior a dos demais isolados clínicos estudados;
- Nenhum dos microrganismos estudados foi capaz de aumentar a expressão de FT por células epiteliais brônquicas da linhagem humana BEAS-2B.
- A cepa ET-12 também não foi capaz de aumentar a transcrição do mRNA do FT em células BEAS-2B;
- A cepa ET-12 e o isolado clínico CL 2 assemelharam-se, também, na indução de maior liberação de FT nos sobrenadantes das culturas, na geração de importante atividade procoagulante e na indução de liberação, pelas células infectadas, de MPs expressando fosfatidilserina e FT;
- Apesar de apresentarem potencial de virulência similar, a cepa ET-12 e o isolado clínico CL 2 pertencem a grupos clonais distintos, identificados pela técnica de PFGE. Ao contrário, os isolados clínicos CL1 e CL2, que mostraram perfis de virulências distintos, apresentaram total identidade genômica cromossomial;
- Nos testes *in vivo*, um maior número de animais infectados com a cepa ET-12 apresentou sinais externos de infecção quando comparado as amostras clínicas.
- A maioria dos animais infectados tanto com a cepa ET-12 quanto os isolados clínicos apresentou isolamento de *B. cenocepacia* no sangue.

- Em relação aos isolados hepáticos, as amostras clínicas CL 2 e CL 4 apresentaram maior percentual de isolamento, como também maior número de UFC por 50 mg de tecido hepático.
- Em relação a leucometria dos animais, a concentração de leucócitos totais no sangue periférico dos animais infectados com todos isolados clínicos, foi significativamente inferior à dos animais controle. Surpreendentemente, não houve diferença significativa entre as leucometrias de animais controle e infectados com a cepa ET-12.
- Ao contrário, a concentração de leucócitos totais no lavado bronco-alveolar dos animais infectados com a cepa ET-12 foi significativamente superior à detectada nos lavados de animais controle. As concentrações presentes nos lavados de animais infectados com os isolados clínicos CL 1, CL 2 e CL 3 também foram significativamente superiores às do controle. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em animais infectados pelo isolado clínico CL 4 e nos do grupo controle.
- Nossos resultados sugerem que pelo menos alguns isolados clínicos têm atributos de virulência semelhantes aos da cepa epidêmica ET-12 e, portanto, são agentes potenciais de síndrome cepacia.

BIBLIOGRAFIA

Agodi, A., Sciacca, A., Campanile, F., Messina, C., Barchitta, M., Sciacca, S., Stefani, S. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis in Sicily: genome macrorestriction analysis and rapid PCR-ribotyping. **New Microbiol.** 2000; 23: 319-327.

Aird, W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood** 2003; 101: 3765-3777.

Aras, O., Shet, A., Bach, R.R., Hysjulien, J.L., Slungaard, A., Hebbel, R.P., Escolar, G., Jilma, B., Key, N.S. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. **Blood** 2004; 103: 4545-4553

Bachfen M., Weibel ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clin. Chest Med.** 1982; 3: 35-56

Baldwin, A., Sokol, P.A., Parkhill, J., Mahenthiralingam, E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. **Infect. Immun.** 2004; 72: 1537-1547.

Bastarache, J.A., Wang, L., Geiser, T., Wang, Z., Albertine, K.H., Matthay, M.A., Ware, L.B. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor. **Thorax** 2007; 62: 608-616.

Bogdanov, V.Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., Nemerson, Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. **Nat. Med.** 2004; 9: 458-462.

Bryant, A.E., Hayes-Schroer, S.M., Stevens. D.L. M type 1 and 3 group A streptococci stimulate tissue factor-mediated procoagulant activity in human monocytes and endothelial cells. **Infect. Immun.** 2003; 71: 1903-1910.

Buras, J.A., Holtzmann, B., Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat. Rev. Drug. Discov.** 2005; 4: 854-865

Carvalho, A.P., Ventura, G.M., Pereira, C.B., Leão, R.S., Folescu, T.W., Higa, L., Teixeira, L.M., Plotkowski, M.C., Merquior, V.L., Albano, R.M., Marques, E.A. *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. **APMIS.** 2007; 115: 311-318.

Censarek, P., Bobbe, A., Grandoch, M., Schrör, K., Weber, A.A. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. **Thromb. Haemost.** 2007; 97:11-14

Chiu, C.H.; Ostry, A., Speet, D.P. Invasion of murine respiratory epithelial cells in vivo by *Burkholderia cepacia*. **J. Med. Microbiol.** 2001; 50:594-601.

Chu, A.J. Tissue factor mediates inflammation. **Arch. Biochem. Biophys.** 2005; 440: 123-132.

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

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

Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., Ait Barka, E. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiol. Rev.** 2008; 32: 607-626.

Conway, B.A., Venu, V., Speert, D.P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **J. Bacteriol.** 2002; 184: 5678-5685.

Cuppens, H., Cassiman, J.J. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. **Int. J. Androl.** 2004; 27(5): 251-256.

Davis, P.B., Drumm, M., Konstan, M.W. Cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1996; 154:1229-1256.

Engel, A., Mack, E., Kern, P., Kern, W.V. An analysis of interleukin-8, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations to predict fever, gram-negative bacteremia and complicated infection in neutropenic cancer patients. **Infection** 1998; 26: 213-221.

Esmon, C.T., Fukudome, K., Mather, T., Bode, W., Regam, L.M., Stearns-Kurowasa, D.J. & Kurowasa, S. Inflammation, sepsis and coagulation. **Haematologica** 1999; 84: 254-259.

Ettelaie, C., Collier, M.E., James, N.J., Li, C. Induction of tissue factor expression and release as microparticles in ECV304 cell line by *Chlamydia pneumoniae* infection. **Atherosclerosis**. 2007; 190: 343-351.

Franco, R.F., De Jonge, E., Dekkers, P.E.P., Timmerman, J.I., Spek, C.A., Van Deventer, S.I.H., Van Deursen, P., Van Kerkhoff, L., Ten Cate, H., Van Der Poll. T., Reitsma, P.H. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. **Blood** 2000; 96: 554-559.

Gando, S., Kameue, T., Matsuda, N., Hayakawa, M., Hoshino, H., Kato, H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. **Thromb. Res.** 2005; 116: 91-100.

Gilligan, PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clin. Microbiol. Rev.** 1991; 4: 35-51.

Golini, G., Cazzola, G., Fontana, R. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 2006; 25: 175-180.

Govan, J.R., Nelson, J.W. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. **J. R. Soc. Med.** 1993; 86 Suppl 20:11-18.

Govan, J.R., Deretic, V. Microbial pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol. Rev.** 1996; 60: 539-574.

Hendry, J., Elborn, J.S., Nixon, L., Shale, D.J., Webb, A.K. Cystic fibrosis: inflammatory response to infection with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur. Respir. J.** 1999; 14: 435-438.

Holden, M.T., Seth-Smith, H.M., 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., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R., Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E., Parkhill, J. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. **J. Bacteriol.** 2009; 191: 261-277.

Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.M. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology** 2005; 20: 22-27.

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

Iakubovskii, A., Pendurthi, U., Idell, S. Asbestos induces tissue factor in Beas-2B human lung bronchial epithelial cells in vitro. **Lung** 2004; 182: 251-264.

Jones, A.M., Dodd, M.E., Govan, J.R., Barcus, V., Doherty, C.J., Morris, J. & Webb, A.K. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. **Thorax** 2004; 59: 948-951.

Kalish, L.A., Waltz, D.A., Dovey, M., Potter-Bynoe, G., McAdam, A.J., Lipuma, J.J., Gerard, C., Goldmann, D. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function

and survival in cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2006;173: 421-425.

Keller, T.T., Mairuhu, A.T.A., Kruif, M.D., Klein, S.K., Gerdes, V.E.A., Cate, H., Brandjes, D.P.M., Levi, M., Gorp, E.C.M. Infection and endothelial cells. **Cardiovasc. Res.** 2003; 60: 40-48.

Kulczycki, L.L., Kostuch, M., Bellanti, J.A. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. **Am. J. Med. Genet. A.** 2003; 116: 262–267.

Lessie, T.G., Hendrickson, W., Manning, B.D., Devereux, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiol. Lett.** 1996; 144: 117-128.

Levi, M., Van der Poll, T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. **Trends. Cardiovasc. Med.** 2005; 15: 254-259.

Levi, M., Keller, T.T., Van Gorp, E., Cate, H. Infection and inflammation and the coagulation system. **Cardiovasc. Res.** 2003; 60: 26-39.

Lopes-Bezerra, L.M., Filler, S.G. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2003; 36: 987-991.

Machado, G.B.S., Assis, M.C., Leão, R., Saliba, A.M., Silva, M.C.A., Suassuna, J.H., de Oliveira, A.V., Plotkowski, M.C. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. **Shock** .2009 (em publicação).

Mahenthalingam, E. *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.** 2002; 33: 143-149.

Mahenthalingam, E., Vandamme, P. Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. **Chron. Respir. Dis.** 2005; 2: 209-217.

Mahenthiralingam, E., Urban, T.A., Goldberg, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nat. Rev. Microbiol.** 2005; 3: 144-156.

Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Dowson, C.G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **J. Appl. Microbiol.** 2008; 104: 1539-1551.

Martin, D.W., Mohr, C.D. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. **Infect. Immun.** 2000; 68: 24-29.

Mattsson, E., Heying, R., van de Gevel, J.S., Hartung, T., Beekhuizen, H. *Staphylococcal* peptidoglycan initiates an inflammatory response and procoagulant activity in human vascular endothelial cells: a comparison with highly purified lipoteichoic acid and TSST-1. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 2008; 52: 110-117.

Mohr, C.D., Tomich, M., Herfst, C.A. Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection. **Microbes Infect.** 2001; 3: 425-435.

Moore, J.E., Elborn, J.S. *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis-50 years on. **Commun. Dis. Public. Health.** 2001; 4: 114-116.

Morel, O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Curr. Opin. Hematol.** 2004; 11: 156-164.

Moura, J.A., Cristina de Assis, M., Ventura, G.C., Saliba, A.M., Gonzaga, L. Jr., Si-Tahar, M., Marques, Ede. A., Plotkowski, M.C. Differential interaction of bacterial species from the *Burkholderia cepacia* complex with human airway epithelial cells. **Microbes Infect.** 2008; 10: 52-59.

Neumann, F.J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M., Schömig, A. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 1997; 17: 3399-33405.

Nieuwland, R., Berckmans, R.J., McGregor, S., Boing, A.N., Romijin, M., Westendorp, R.G.J. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood** 2000; 95: 930-935.

Olive, D.M., Bean, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** 1999; 37: 1661-1669.

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

Parrilo, J.E. Pathogenic mechanism of septic shock. **New England J. Med.** 1993; 328:1471-1477.

Pegues, D.A. *Burkholderia cepacia in: Antimicrobial therapy and vaccines.* **Willians & Wilkins**, Baltimore, Maryland. 1999. 89-93.

Perrio, M.J., Ewen, D., Trevethick, M.A., Salmon, G.P., Shute, J.K. Fibrin formation by wounded bronchial epithelial cell layers in vitro is essential for normal epithelial repair and independent of plasma proteins. **Clin. Exp. Allergy.** 2007; 37: 1688-1700.

Petty, T.L., Ashbaugh, D.G. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. **Chest.** 197; 60: 233-239.

Plotkowski M.C., Feliciano L.F., Machado G.B., Cunha, L.G.Jr., Freitas, C., Saliba, M., de Assis, M.C. ExoU-induced procoagulant activity in *Pseudomonas aeruginosa*-infected airway cells. **Eur. Respir. J** 2008. 32: 1591-1598

Reddi, K., Phagoo, S.B., Anderson, K.D., Warburton, D. *Burkholderia cepacia*-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signaling through CD14 and mitogen-activated protein kinase. **Pediatr. Res.** 2003; 54: 297-305.

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

Ribeiro, D.J., Ribeiro, M.A., Ribeiro, A.F. Controversies in cystic fibrosis – from pediatrician to specialist. **J. Pediatr.** 2002; 78 (supl.2): S171-S186.

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A. The enigma of sepsis. **J. Clin. Invest.** 2003; 112: 460-467.

Sajjan, U., Ackerley, C., Forstner, J. Interaction of *cblA*/adhesin-positive *Burkholderia cepacia* with squamous epithelium. **Cell. Microbiol.** 2002; 4: 73-86.

Seeger W., Günther A., Walmrath H.D., Grimminger F., Lasch H.G. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. **Clin. Investig.** 1993; 71: 177-190.

Simel, D.L., Mastin, J.P., Pratt, P.C., Wisseman, C.L., Shelburne, J.D., Spock, A., Ingram, P. Scanning electron microscopic study of the airways in normal children and in patients with cystic fibrosis and other lung diseases. **Pediatr. Pathol.** 1984; 2: 47-64.

Sörensen J., Kald B., Tagesson C., Lindahl M. Platelet-activating factor and phospholipase A2 in patients with septic shock and trauma. **Intensive Care Med.** 1994; 20: 555- 561.

Speert, D.P. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. **Pediatr. Respir. Rev.** 2002; 3: 230-235.

Suassuna J.H.R. Avaliação longitudinal da inflamação na sepsis. Investigação sobre as insuficiências agudas de órgãos e sistemas. Tese apresentada à Universidade do Estado do Rio de Janeiro para o Concurso Público de

Provisão ao Cargo de Professor Titular do Departamento de Medicina Interna, na área de Conhecimento de Nefrologia. 2004.

Szotowski, B., Antoniak, S., Poller, W., Schultheiss, H., Rauch, U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. **Circ. Res.** 2005; 96:1233-1239.

Tabary, O., Escotte, S., Couetil, J.P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., Jacquot, J. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. **J. Immunol.** 2000; 164: 3377-3384.

Taylor F.B. Jr., Chang A.C., Esmon C.T., Hinshaw L.B. Baboon model of Escherichia coli sepsis: description of its four stages and the role of tumor necrosis factor, tissue factors, and the protein C system in septic shock. **Curr. Stud Hematol. Blood Transfus.** 1991; 58: 8-14.

Tsang, J.S. Molecular biology of the *Burkholderia cenocepacia* complex. **Adv. Appl. Microbiol.** 2004; 54: 71-91.

Urban, T.A., Goldberg, J.B., Forstner, J.F., Sajjan, U.S. Cable pili and the 22-kilodalton adhesin are required for *Burkholderia cenocepacia* binding to and transmigration across the squamous epithelium. **Infect. Immun.** 2005; 73: 5426-5437.

Urban, T.A., Griffith, A., Torok, A.M., Smolkin, M.E., Burns, J.L., Goldberg, J.B. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. **Infect. Immun.** 2004; 72:5126-5134.

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

Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Cassiman, J.J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. **J. Cystic Fibrosis** 2002; 1:13–29.

Ventura, G. C., Legoffic, R., Balloy, V., Plotkowski, M.C.M., Chignard, M., Si-Tahar, M. Involvement of TLR5 but neither TLR2 nor TLR4 in airway epithelial cell response to *Burkholderia cenocepacia*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 2008; 54: 37-44.

Vinion-Dubiel, A.D., Goldberg, J.B. Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. **J. Endotoxin Res.** 2003; 9: 201-213.

Wang, X., Ren, J., Zhu, W., Li, N., Li, J. Fibrin sealant prevents gastrointestinal anastomosis dehiscence in intra-abdominal sepsis. **Int. Surg.** 2007; 92: 27-31.

Wakefield, C.H., Barclay, G.R., Fearon, K.C., Goldie, A.S., Ross, J.A., Grant, I.S., Ramsay, G., Howie, J.C. Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. **Br. J. Surg.** 1998; 85: 818-825.

Ware, L.B., Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **New England J. Med.** 2000; 342:1334-1349.

Welty-Wolf, K.E., Carraway, M.S., Miller, D.L., Ortel, T.L., Ezban, M., Ghio, A.J., Idell, S., Piantadosi, C.A. Coagulation blockade prevents sepsis-induced respiratory and renal failure in baboons. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2002; 164: 1988-1996.

Welty-Wolf, K.E., Carraway, M.S., Ortel, T.L., Piantadosi, C.A. Coagulation and inflammation in acute lung injury. **Thromb. Haemost.** 2008; 88:17-25.

Zeerleder, S., Hack, E., Wuillemin, W.A. Disseminated intravascular Coagulation in Sepsis. **Chest** 2005; 128:2864-2875

Zughaier, S., Ryley, H.C., Jackson, S.K. 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.** 1999; 67: 1505-1507.

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](#)