



Andreia Rodrigues Josefino Lopes

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Avaliação de mecanismo de escape imunológico do Complexo *Burkholderia cepacia*

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof^ª. Dra. Paula Videira, Professora Auxiliar (FCM/UNL)

Co-orientador: Prof^ª. Dra. Isabel Sá-Correia, Professora Catedrática (IST/UTL)

Júri:

Presidente: Prof^ª. Dra. Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves

Arguente: Dra. Carla Patrícia da Silva Coutinho

Orientadora: Prof^ª. Dra. Paula Alexandra Quintela Videira



Dezembro de 2012

Andreia Rodrigues Josefino Lopes

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação de mecanismo de escape imunológico do
Complexo *Burkholderia cepacia***

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof^a. Dra. Paula Videira, Professora Auxiliar (FCM/UNL)

Co-orientador: Prof^a. Dra. Isabel Sá-Correia, Professora Catedrática (IST/UTL)

Júri:

Presidente: Prof^a. Dra. Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves

Arguente: Dra. Carla Patrícia da Silva Coutinho

Orientadora: Prof^a. Dra. Paula Alexandra Quintela Videira

Dezembro de 2012

Avaliação de mecanismo de escape imunológico do Complexo *Burkholderia cepacia*

Copyright Andreia Rodrigues Josefino Lopes, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto Superior Técnico e ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, por me receber nos seus laboratórios. Às Professoras Doutoras Paula Videira e Isabel Sá-Correia pela oportunidade oferecida, por acreditarem no meu trabalho, pelo apoio no âmbito desta dissertação e pela inestimável orientação.

Às Doutoras Carla Coutinho e Guadalupe Cabral, pela ajuda constante ao longo desta tese, pela amizade, preocupação, companheirismo e disponibilidade, um grande muito obrigada!

À mestre Mariana Silva, pela disponibilidade e sobretudo pela amizade demonstrada e que se manterá.

Ao Doutor Hélio Crespo, às Doutoras Andreia Madeira e Catarina Rodrigues, pelo apoio, pela boa disposição, que tornaram mais fácil e mais animado cada dia de trabalho.

Aos restantes membros de ambos os departamentos, por estarem sempre disponíveis para ajudar, ensinar, e pela boa disposição.

Aos professores que mais me inspiraram a seguir este caminho de conhecimento, nomeadamente a Professora Marina Pinto Basto, à qual eu devo estar neste momento a escrever uma tese.

À minha família, sobretudo à minha Mãe e Pai, por todo o amor incondicional e por me ajudarem a ser quem sou hoje. À Mana, por ser a minha irmã, a quem eu agradeço tanto por estar do meu lado.

Às minhas gurias e à Sónia, companheiras e amigas de mestrado, por todos os momentos, apoio e amizade. À Táni, à minha Mon Amour e Andreia T., desde a licenciatura a apoiar-me e a dar-me toda a amizade. Ao Babes, por ser dos melhores amigos do mundo. À Rita por estar de novo no seu lugar, de amizade próxima. À Luzinha que apostou que eu conseguia, pela amizade e “sisterhood”. Ao Carlos, por ser quem é para mim e por tudo.

Aos meus companheiros, companheiras e treinadores dos Alunos de Apolo, que me apoiam, que me encorajam e acarinham sempre, que me fizeram sempre acreditar em mim e não desistir, mas em especial ao meu par, por ser único na minha vida e estar sempre lá com o seu amor e preocupação incondicionais. Aos meus companheiros, companheiras e pares de outras danças pela admiração, carinho e amizade.

À Andreia Sofia, João Carrilho, Raquel e Carlos Lino, Olga Carreira e Orlando Teodoro, amigos-irmãos, a quem agradeço o apoio, confiança, amizade e exemplo.

A todos que me perguntaram todos os dias pela tese, que me encorajaram a dar o meu melhor, a todos estes e outros aos quais me sinto tão grata por tudo o meu mais sincero Muito Obrigada!

Resumo

O Complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) tem vindo a ter cada vez mais atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao perigo que representa para os doentes com fibrose quística (FQ). Os mecanismos de infecção e invasão estão a ser cada vez mais estudados, e a versatilidade deste grupo de bactérias tem-se provado excepcional. Por outro lado, também se tem começado a estudar a sua interacção com o hospedeiro. Assim com o objectivo de contribuir para o esclarecimento desta questão são estudados, neste trabalho, de forma comparativa 4 variantes clonais de *B. cenocepacia* isoladas de um mesmo doente, sendo este o primeiro trabalho a abordar questões imunológicas em isolados clonais. O objectivo deste trabalho foi verificar se existiam diferenças entre os isolados ao nível de: internalização por células dendríticas (DCs) e macrófagos derivados de monócitos humanos, capacidade para induzir morte celular nas DCs e macrófagos, indução de maturação das DCs e no tipo e capacidade de produção de citocinas pelas DCs. Este trabalho sugere que parte do sucesso na adaptação da *B. cenocepacia* ao ambiente pulmonar dos doentes de FQ e na infecção do mesmo passa também pela evolução nos mecanismos de escape imunológico desta bactéria. Demonstrou-se que os isolados mais virulentos são os menos internalizados, estimulam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e maior supressão da sua maturação. Os nossos resultados sugerem ainda que a morte celular induzida por estas bactérias é provocada maioritariamente por apoptose. Estes factores poderão explicar as diferenças de virulências entre os vários isolados clonais, através da subversão da resposta imune para uma melhor instalação da infecção.

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) – Células Dendríticas (DCs) – Internalização – Maturação – Inflamação – Apoptose

Abstract

Burkholderia cepacia complex (BCC) has drawn attention from the scientific community, specially because of the danger it represents for cystic fibrosis (CF) patients. Studies on the mechanisms of infection and invasion have proved that the versatility and adaptation of this group of bacteria to the host is exceptional. Nevertheless, there is still scarce information regarding the interaction of BCC with the host immune system. Therefore with the objective of elucidate more about this interaction, 4 clonal variants of *Burkholderia cenocepacia* isolated from the same patient were studied in this work. This is also the first time that immunological issues concerning clonal isolates are addressed. The aims of the present dissertation were to verify if there were any differences between the isolates in their capacity to modulate functions of human dendritic cells (DCs) and macrophages, two critical orchestrators of the immune responses. Functions such as internalization by these cells, and their capacity to induce cellular death, DC maturation, production of cytokine production, and what type of cytokine production, from DCs have been addressed. This work suggests mechanisms of immunological evasion as part of the success of *Burkholderia cenocepacia* in adapting and infecting the airways of CF patients. It was demonstrated that the more virulent isolates are less internalized, stimulate more pro-inflammatory cytokine expression and cause more suppression of DC maturation. Our results also suggest that these bacteria cause cellular death essentially through apoptosis. These factors combined could explain the differences found in clinical virulence between the clonal isolates, proposing the subversion of the immune response as relevant factor for the establishment of more severe infections.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex (BCC) - Dendritic Cells (DCs) – Internalization – Maturation – Inflammation - Apoptosis

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract.....	V
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Abreviaturas e Siglas.....	XV
1.Introdução.....	1
1.1 <i>Burkholderia</i> spp.....	1
1.1.1 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	1
1.1.2 Relevância clínica.....	3
1.2 Sistema imunitário.....	4
1.2.1 Imunidade inata.....	5
1.2.2 Imunidade adaptativa.....	6
1.2.3 Células Dendríticas (DCs).....	8
1.2.4 Ambiente pulmonar em doentes com FQ.....	11
1.3 Introdução ao tema de tese.....	12
2. Materiais e Métodos.....	15
2.1 Isolados de <i>B. cenocepacia</i> , meio e condições de crescimento.....	15
2.2 Obtenção de DCs e macrófagos derivados de monócitos humanos.....	16
2.3 Técnicas.....	17
2.3.1 Citometria de Fluxo.....	17
2.3.2 Reacção de polimerização em cadeia em tempo real quantitativo (RT-PCR).....	18
2.4 Avaliação da internalização de <i>B. cenocepacia</i>	19

2.4.1 Marcação dos isolados de <i>B. cenocepacia</i> com fluorescência.....	19
2.4.2 Ensaios de internalização de <i>B. cenocepacia</i> por DCs e macrófagos.....	19
2.5 Avaliação do estado de maturação de DCs na presença de <i>B. cenocepacia</i>	20
2.6 Avaliação da morte celular de DCs e macrófagos na presença de <i>B.cenocepacia</i>	21
2.6.1 Determinação da morte celular por citometria de fluxo.....	21
2.6.2 Determinação da viabilidade celular por microscopia óptica.....	22
2.7 Avaliação da produção de citocinas pelas DCs na presença de <i>B.cenocepacia</i>	22
2.7.1 Extração de RNA e transcrição reversa para DNA complementar (cDNA).....	22
2.7.2 PCR em tempo real (RT-PCR).....	23
2.8 Análise estatística.....	24
3. Resultados.....	25
3.1 Estudo da internalização de isolados clonais de <i>B. cenocepacia</i> por DCs e macrófagos e dos seus efeitos na viabilidade destas células.....	25
3.1.1 Internalização dos isolados I e II por DCs e macrófagos.....	25
3.1.2 Avaliação da morte celular de macrófagos e DCs na presença de 4 isolados clonais de <i>B. cenocepacia</i>	28
3.1.3 Cinética de internalização e curva dose-resposta com DCs e o isolado II.....	30
3.1.4 Internalização dos isolados clonais de <i>B. cenocepacia</i> por DCs e verificação da viabilidade celular.....	31
3.2 Análise da expressão genética de citocinas a partir de DCs na presença de 4 isolados clonais de <i>B. cenocepacia</i>	34
3.3 Avaliação da influência de isolados clonais de <i>B. cenocepacia</i> na maturação das DCs.....	36
4. Discussão.....	39
4.1 Isolados II e IV são menos internalizados pelas DCs, após 6 horas de incubação...39	
4.2 <i>B. cenocepacia</i> provoca morte celular em DCs e macrófagos essencialmente por apoptose...42	

4.3 Expressão diferencial de citocinas pelas DCs dependente do isolado.....	43
4.4 <i>B. cenocepacia</i> tem capacidade de modular a maturação das DCs.....	46
4.5 Perspectivas futuras.....	47
4.6 Conclusões gerais.....	48
5.Bibliografia.....	49
Anexos.....	59
Anexo I - Constituição de soluções utilizadas neste trabalho.....	59
Anexo II - Exemplo de uma análise de resultados de um ensaio de internalização obtidos por citometria de fluxo.....	61
Anexo III - Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de apoptose obtidos por citometria de fluxo.....	63
Anexo IV - Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de maturação obtidos por citometria de fluxo.....	65

Índice de Figuras

Figura 1.1	Árvore filogenética do género <i>Burkholderia</i> – Parte do género <i>Burkholderia</i> em que são destacadas algumas espécies pertencentes ao Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	2
Figura 1.2	Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta inata - A barreira física da pele, neste caso quebrada, as substâncias químicas produzidas para estimular a inflamação como citocinas e quimiocinas, o sistema do complemento e a fagocitose pelos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas	5
Figura 1.3	Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta adaptativa - Resposta humoral e celular, iniciada por DCs ou macrófagos. As subpopulações de células T não se encontram diferenciadas neste esquema	7
Figura 1.4	Diferentes populações de DCs e seus precursores - O precursor hematopoiético, as duas principais linhagens celulares, a mielóide e linfóide, que originam as populações de DCs, plasmocitárias, derivadas de monócitos, convencionais ou intersticiais e células de Langerhans	9
Figura 1.5	Maturação das DCs - O precursor hematopoiético em circulação no sangue vai para um tecido, sendo então uma DC imatura, que internalizando um antígeno migra para um nódulo linfático, apresentando o antígeno processado a uma célula T, e secretando citocinas e quimiocinas. Dar-se-á início à resposta adaptativa	10
Figura 1.6	Ambiente pulmonar alterado na FQ - Papel do gene “CF transmembrane conductance regulator” (CFTR) em regular o “airway surface liquid” (ASL) em indivíduos normais e em doentes com FQ	11
Figura 1.7	Cronologia dos isolados clonais obtidos do doente J colonizado com <i>B.cenocepacia</i> - Em destaque os 4 isolados em estudo nesta dissertação	14
Figura 3.1	Comparação entre macrófagos e DCs quanto à percentagem de células que internalizaram os isolados I e II de <i>B. cenocepacia</i> após 1 hora de incubação (n=3 para macrófagos e n=2 para DCs).	25
Figura 3.2	Comparação entre macrófagos e DCs quanto à internalização dos isolados I e II de <i>B. cenocepacia</i> após 1 hora de incubação. A normalização dos valores de MFI foi realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C})$ (n=3 para os macrófagos e n=2 para as DCs)	26
Figura 3.3	Comparação entre macrófagos e DCs quanto à percentagem de células que internalizaram os isolados I e II de <i>B. cenocepacia</i> após 24 horas de incubação (n=3 para os macrófagos e n=2 para as DCs)	27
Figura 3.4	Comparação entre macrófagos e DCs quanto à internalização dos isolados I e II de <i>B. cenocepacia</i> após 24 horas de incubação. A normalização dos valores de MFI foi	28

realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controle } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI controle } 4^{\circ}\text{C})$
(n=3 para os macrófagos e n=2 para as DCs)

- Figura 3.5 Curva de cinética de internalização com DCs com o isolado II, por citometria de 30
fluxo (n=1)
- Figura 3.6 Curva de cinética de internalização com DCs com o isolado II, por citometria de 31
fluxo (n=1)
- Figura 3.7 Análise por citometria de fluxo da percentagem de DCs que internalizaram os 32
isolados I, II, III e IV de *B. cenocepacia* após 6 horas de incubação (n=4)
- Figura 3.8 Análise por citometria de fluxo da internalização dos isolados I, II, III e IV de *B.* 33
cenocepacia por DCs após 6 horas de incubação (n=4). A normalização dos valores
de MFI foi realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controle } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI}$
 $\text{controle } 4^{\circ}\text{C})$
- Figura 3.9 Análise dos níveis de mRNA dos genes das citocinas IL 10 (a) e TGF- β (b) nas 34
DCs sem incubação com bactérias (DCs) e incubadas com os isolados isolados I
(IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134), durante 6 horas, por RT-
PCR (n=3)
- Figura 3.10 Análise dos níveis de mRNA dos genes das citocinas IL 1 β (a), TNF- α (b), IL 12 35
(c), IL 6 (d) e IL 23 (e) nas DCs sem incubação com bactérias (DCs) e incubadas
com os isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134) durante 6
horas, por RT-PCR (n=3)
- Figura 3.11 Análise dos valores de MFI obtidos, resultantes da marcação com os anticorpos 37
anti-CD80 (a) e anti-CD86 (b e c) de DCs sem bactérias e de DCs que estiveram
em co-cultura com os isolados isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e
IV (IST4134), pelo período de 6 horas (n=2)
- Figura 3.12 Análise dos valores de MFI obtidos, resultantes da marcação com o anticorpo anti- 38
HLA-DR de DCs sem bactérias e de DCs que estiveram em co-cultura com os
isolados isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134) e *E.coli*
K12, pelo período de 6 horas (n=3). Valor estatisticamente significativo: ***
significa $p < 0,0001$

Índice de Tabelas

Tabela 2.1	Denominação de cada isolado no decorrer da dissertação	15
Tabela 2.2	Identificação do ensaio para cada um dos genes analisados	24
Tabela 3.1	Resultados da avaliação da morte celular, por citometria de fluxo, de macrófagos incubados 24 horas com cada um dos isolados. Os valores representam percentagens de células (n=1, excepto nos ensaios assinalados com * que correspondem a uma média entre dois ensaios e para os quais se apresenta o valor do desvio padrão; para se verificar como a análise foi feita ver Anexo III)	29
Tabela 3.2	Resultados da avaliação da morte celular, por citometria de fluxo, de DCs incubadas 24 horas com cada um dos isolados. Os valores representam percentagens de células (n=1)	29
Tabela 3.3	Resultados do ensaio de verificação da viabilidade celular de DCs incubadas 6 horas com cada um dos isolados, e sem incubação com bactérias – controlo negativo (n=2).	33

Abreviaturas e Siglas

7 – ADD – 7-amino-actinomicina D

ABC – Transportador ABC (“ATP-binding cassette”)

APC – Aloficocianina

APCs – Células apresentadoras de antígenos

ASL – Líquido de superfície das vias respiratórias (“Airway surface liquid”)

BCC – Complexo *Burkholderia cepacia*

CD – Antígenos de diferenciação (“Cluster of differentiation”)

CFTR – Regulador de condutância transmembranar (“Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”)

CFU – Unidade formadora de colônias

CMTMR – 4-clorometil benzoil amino tetrametil rodamina

DCs – Células dendríticas

ENaC – Canal de sódio (“Epithelial Na⁺ channel”)

FITC – Fluoresceína isotiocianato

FQ – Fibrose quística

FSC – Direcção longitudinal (“Forward Scatter”)

FT-IRS - “Fourier transform infrared spectroscopy”

GAPDH – Desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato

GM-CSF - “Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”

HLA-DR - Antígenos leucocitários humanos

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacárido

MALDI-TOF - “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectroscopy”

MFI – Intensidade média de fluorescência

MHC-I – Complexo Major de Histocompatibilidade da classe-I

MHC-II – Complexo Major de Histocompatibilidade da classe-II

MLST – “Multi locus sequence typing”

NK – “Natural killer”

PAMP – Padrões moleculares associados a patogénicos

PBS – Tampão salino de fosfato (“Phosphate buffered saline”)

PCL – Líquido periciliar

PE – Ficoeritrina

PRR – Receptores de padrões moleculares (“Pattern recognition receptor”)

PS – Fosfatidilserina

RT-PCR - Reacção de polimerização em cadeia em tempo real

SSC – Direcção transversal (“Side scatter”)

Tc – Linfócitos T citotóxicos

TCR – Receptor de células T

TGF – “Transforming growth factor”

Th – Linfócitos T ajudadores (“helper”)

TLR – Receptor do tipo Toll (“Toll like receptor”)

TNF – Factor de necrose tumoral (“Tumor necrosis factor”)

Treg – Linfócitos T reguladores

VacA - “Vacuolating cytotoxin”

1. Introdução

1.1 *Burkholderia* spp.

Pseudomonas cepacia (actualmente *Burkholderia cepacia*) foi descrita pela primeira vez em 1950 por Walter Burkholder como sendo um agente fitopatogénico, associado ao apodrecimento dos bulbos de cebolas (Burkholder, 1950 e Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011).

Nos anos 70, com as novas técnicas de análise genómica, sobretudo hibridação DNA-rRNA e sequenciação, as espécies até então descobertas e classificadas foram submetidas a uma revisão. Um dos géneros revistos foi o género *Pseudomonas*, verificando-se que estas bactérias eram fenotipicamente semelhantes, mas com diferenças significativas ao nível genómico (baseados na homologia do RNA), levando a sua classificação em 5 novas espécies (Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011). Em 1992, após o estudo das sequências do RNA 16s, valores de homologia DNA-DNA e composição em ácidos gordos, *Pseudomonas cepacia* juntamente com outras 6 espécies pertencentes ao grupo II do género *Pseudomonas* foram transferidos para um novo género: *Burkholderia*, em homenagem ao trabalho de Burkholder. Ao contrário do género *Pseudomonas* que pertencem ao subgrupo das γ -proteobactérias, o género *Burkholderia* pertence ao grupo das β -proteobactérias (Yabuuchi *et al.*, 1992, Coenye, T. *et al.*, 2001).

As espécies do género *Burkholderia* são bactérias gram-negativas, têm a forma de bacilos e são ubíquas na natureza, ocupando uma variedade de nichos ecológicos (Coenye, T. e Vandamme, P. 2003). São bactérias frequentemente isoladas da água e do solo e particularmente abundantes na rizosfera, algumas conseguem manter uma relação de simbiose com algumas plantas, nomeadamente, por terem propriedades como as de fixar azoto, outras têm também um papel importante em biorremediação (Coenye, T. e Vandamme, P. 2003, Arora, P.K. e Jain, R.K. 2012).

A interacção de *Burkholderia* com outros organismos nem sempre é de simbiose. Muitas espécies são patogénicas para plantas, animais e humanos, o que deixa evidente a grande versatilidade e complexidade das interacções que este género é capaz de estabelecer (Coenye, T. e Vandamme, P. 2003, Bartpho, T. *et al.*, 2012). Nas últimas décadas tem emergido como patógeno oportunista, e desde então o interesse neste género de bactéria aumentou, e novas espécies foram descritas.

1.1.1 Complexo *Burkholderia cepacia*

Por volta dos anos 90, tornou-se evidente pelos métodos de identificação existentes que existia uma grande heterogeneidade dentro da espécie *Burkholderia cepacia*, o que tornava difícil a sua correcta identificação (Coenye, T. *et al.*, 2001), levando Vandamme e os seus colaboradores (Vandamme, P. *et*

al, 1997) a realizar um estudo taxonómico polifásico, no qual incluiu a análise dos ácidos gordos, hibridação DNA-DNA e DNA-rRNA, o que revelou que isolados de *B. cepacia* provenientes de amostras clínicas humanas como de doentes com Fibrose Quística (FQ), outras amostras clínicas humanas e do meio ambiente pertenciam a pelo menos cinco diferentes espécies genómicas ou genomovars (Ursing, J.B. et al, 1995), colectivamente referidos como o Complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) (Fig. 1.1) O termo genomovar foi então introduzido para denotar espécies fenotipicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (Vandamme, P. et al, 1997), partilhando um nível relativamente baixo de homologia DNA-DNA (30-60%) (Vandamme, P. et al, 1997). As espécies pertencentes a este Complexo partilham uma elevada semelhança na sequência genómica do rRNA 16s (> 97,5%), possuem genomas grandes (7,5-8,5 Mb), constituídos por múltiplas replicões que lhes provêm grandes capacidades metabólicas (Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011). O BCC começou por ser constituído por 5 espécies geneticamente relacionadas ou genomovares (*B. vietnamiensis*, *B. multivorans*, *B. cepacia* genomovares I, III, e IV) e hoje em dia compreende 17 espécies (*B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. arboris*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. diffusa*, *B. dolosa*, *B. latens*, *B. lata*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. pyrrocinia*, *B. seminalis*, *B. stabilis*, *B. ubonensis*, *B. vietnamiensis*) (Vandamme, P. et al, 1997, Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011, Lynch, K. H. e Dennis, J.J., 2012),

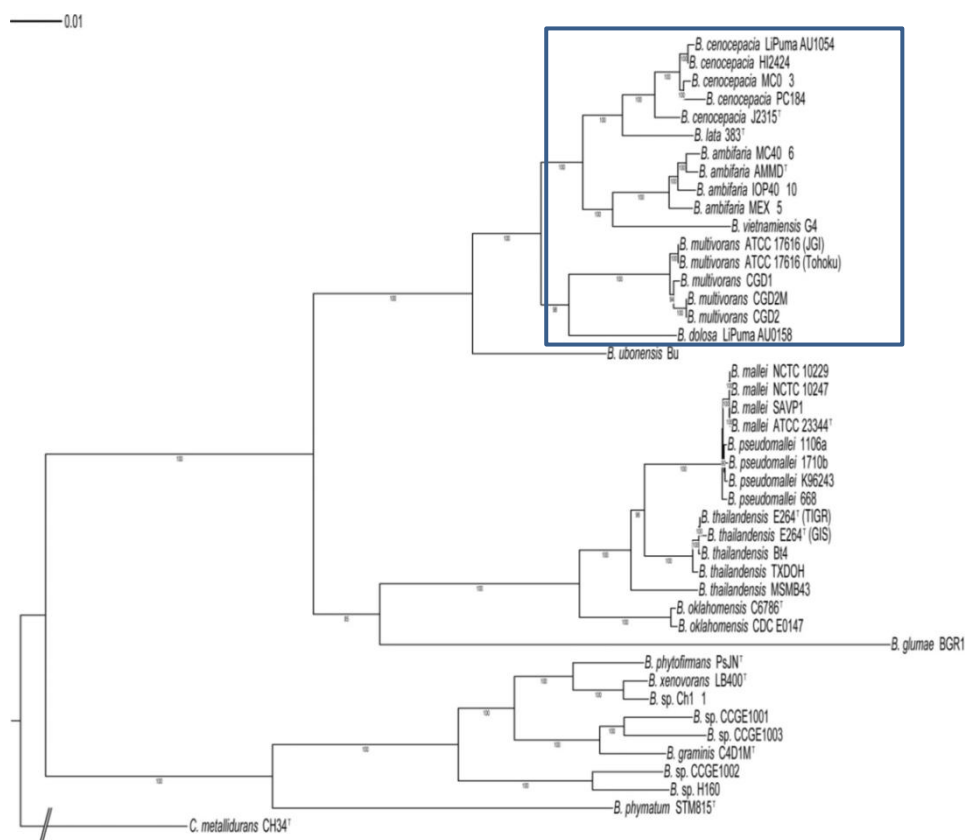


Figura 1.1 – Árvore filogenética do género *Burkholderia* – Parte do género *Burkholderia* em que são destacadas algumas espécies pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia* (adaptado de Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011)

1.1.2 Relevância clínica

Entre os anos 70 e 80 vários relatórios reportaram infecções de doentes com fibrose quística (FQ) com membros do BCC (ainda não descrito nessa altura). Em 1984 foi descrita, pela primeira vez, a prevalência destes microrganismos na colonização e infecção de doentes com FQ, conduzindo ao “síndrome da cepacia” – uma pneumonia necrotizante com septicemia que cerca de 20% dos doentes infectados com BCC desenvolve, que conduz invariavelmente à sua morte (Coenye, T. *et al.*, 2001). Mais tarde percebeu-se que havia transmissão de bactérias do BCC entre doentes, o que aumentava em muito o número de infectados. Verificou-se ainda que elementos deste Complexo também podiam infectar doentes imunocomprometidos, como por exemplo os doentes com doença granulomatosa crónica, nos quais causam também pneumonia com septicemia, normalmente letal (Coenye, T. *et al.*, 2001, Taylor, J. B., 2010).

Desde então este grupo de patógenos oportunistas tem sido cada vez mais estudado. As espécies ambientais do BCC são intrinsecamente resistentes a antibióticos, mas os isolados de doentes mostram-se resistentes a doses ainda maiores e a um maior número de antibióticos (Leitão, J. *et al.*, 2008). Além disso tem sido observado uma capacidade de adaptação ao longo da colonização, em resposta às diversas pressões que sofrem nas vias respiratórias dos doentes (Madreia, A. *et al.*, 2011, Coutinho, C. P. *et al.*, 2011a). Todos estes factores, juntamente com uma grande transmissibilidade destes microrganismos entre doentes, tornam a sua erradicação praticamente impossível. Adicionalmente, a maior redução na esperança média de vida dos doentes infectados com BCC tornou estes microrganismos especialmente temidos pelos doentes (Correia, S. *et al.* 2008, Mahenthiralingam, E. *et al.*, 2002, Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011, Coutinho, C. P. *et al.*, 2011b). Apesar de os mecanismos que possibilitam a colonização e a patogénese dos membros do BCC não estarem ainda plenamente esclarecidos, vários factores de virulência têm sido identificados, como é o caso de adesinas associadas a *pilus*, flagelo, lipopolissacárido (LPS, constituinte da parede das células das bactérias gram negativas) e outros exopolissacárideos (Saldías, M. S. *et al.*, 2009a, Sajjan, U. S. *et al.*, 2006), sistemas de secreção do tipo II, III, IV e VI (McKeon, S. A. *et al.* 2010a, Sajjan, U. S. *et al.*, 2008), sideróforos, catalases e superóxido dismutases, proteases, lípases (Sajjan, U. S. *et al.*, 2006) e sistema de “quorum sensing” (um sistema de resposta a estímulos, regulando a expressão de genes de acordo com a densidade populacional) (Sokol, P. A. *et al.* 2003). A distribuição dos factores de virulência nas diferentes espécies do Complexo tem sido investigada, verificando-se que existe diferenças na severidade da infecção de acordo com a(s) espécie(s) presentes.

A identificação rápida da espécie do BCC que infecta o doente é de extrema importância, e esforços estão a ser feitos no sentido de melhorar esse diagnóstico. Os métodos de identificação devem conseguir distinguir BCC de outras bactérias gram negativas, bem como, deverá conseguir distinguir qual a espécie dentro do Complexo. Normalmente são usados meios de crescimento selectivos, testes

bioquímicos, amplificação de genes como 16S rRNA, recA (Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011) e uma combinação de outros 7 genes conservados (“Multi Locus Sequence Typing”) para identificar mais precisamente a espécie (Baldwin, A. *et al*, 2005). Outros métodos têm sido usados, como MALDI-TOF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectroscopy”) e FT-IRS (“Fourier transform infrared spectroscopy”) (Vanlaere, E. *et al*, 2008, Coutinho, C. P. *et al*, 2009). Também podem ser usadas análises de todo o conteúdo celular de ácidos gordos, proteínas e análises do genoma inteiro (Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011). *B. cenocepacia* tem sido a espécie mais isolada de doentes com FQ e associada com o pior prognóstico dos doentes (De Soysa, A. *et al*. 2004, Coutinho, C. P. *et al.*, 2011b).

Alterações ao nível das vias aéreas e do sistema imune dos doentes também são condicionantes da sua susceptibilidade à colonização/infecção por diversos microrganismos, de entre os quais, os membros do BCC são dos mais temidos. De facto, enquanto alguns doentes apenas apresentam uma colonização transiente e/ou assintomática, para outros a infecção por bactérias deste Complexo chega mesmo a ser fatal com o desenvolvimento do síndrome da cepacia. Estes diferentes percursos clínicos ilustram bem a relevância da variabilidade individual e da capacidade de resposta do doente à infecção. Uma vez que o sistema imunitário se desenvolveu precisamente para responder a infecções e para proteção do hospedeiro é muito provável que as diferenças encontradas se relacionem com a capacidade do sistema imunitário de cada doente, bem como a eventuais mecanismos de escape imunológico desenvolvido por estas bactérias. Assim, é importante perceber-se o papel da resposta imunitária neste contexto (Taylor, J. B., 2010, Sajjan, U. S. *et al.*, 2006).

1.2 Sistema imunitário

O sistema imunitário compreende todos os órgãos, células e mecanismos de acção que têm como principal função proteger o corpo e manter a sua integridade funcional. Este complexo sistema é diverso nos seus constituintes, tolerante, dinâmico, adaptável e monitoriza não só o corpo mas a si mesmo de forma a garantir o seu bom funcionamento. Ao monitorizar o corpo ele reconhece potenciais ameaças ao organismo e elimina-as (Hofmeyr, S. A. e Forrest, S., 2000).

A função de reconhecimento é exclusiva deste sistema. Só ele tem a capacidade de discriminar entre o que é “próprio” do que é “estranho” e muitas vezes do que é “próprio alterado”. Depois, de forma mais ou menos específica, a ameaça, quer seja de algo “estranho” ou “próprio alterado”, é eliminada para garantir a sobrevivência do organismo, e pode ser memorizada para um melhor combate a ela numa futura ameaça à integridade do organismo. A resposta deste sistema para eliminar as ameaças divide-se entre resposta inata e adaptativa (Köhl, J. 2006).

1.2.1 Imunidade inata

A imunidade inata oferece a primeira linha de defesa contra agentes estranhos ao corpo (Fearon, D. T. e Locksley, R. M., 1996).

As barreiras físicas constituem um primeiro componente deste tipo de imunidade. A pele e a mucosa epitelial conferem protecção, não só por fisicamente impedirem a entrada de microrganismos (pela barreira física em si ou pelo movimento de cílios e fluidos nas cavidades nasais e vias respiratórias), mas também pelas substâncias químicas por eles produzidas (mucinas, lisozimas, entre outros) (Murphy, K., 2011). Quando estas barreiras são violadas, a resposta inata continua através de outros componentes humorais e celulares (Fig. 1.2). Como componentes humorais temos o exemplo das proteínas pertencentes à via do complemento, que se encontram em circulação no sangue sobre a forma inactiva. Na presença de infecção, interagem entre si com a finalidade de eliminar o agente infeccioso, quer promovendo a sua lise, quer facilitando a fagocitose, e induzindo a resposta inflamatória (Murphy, K., 2011).

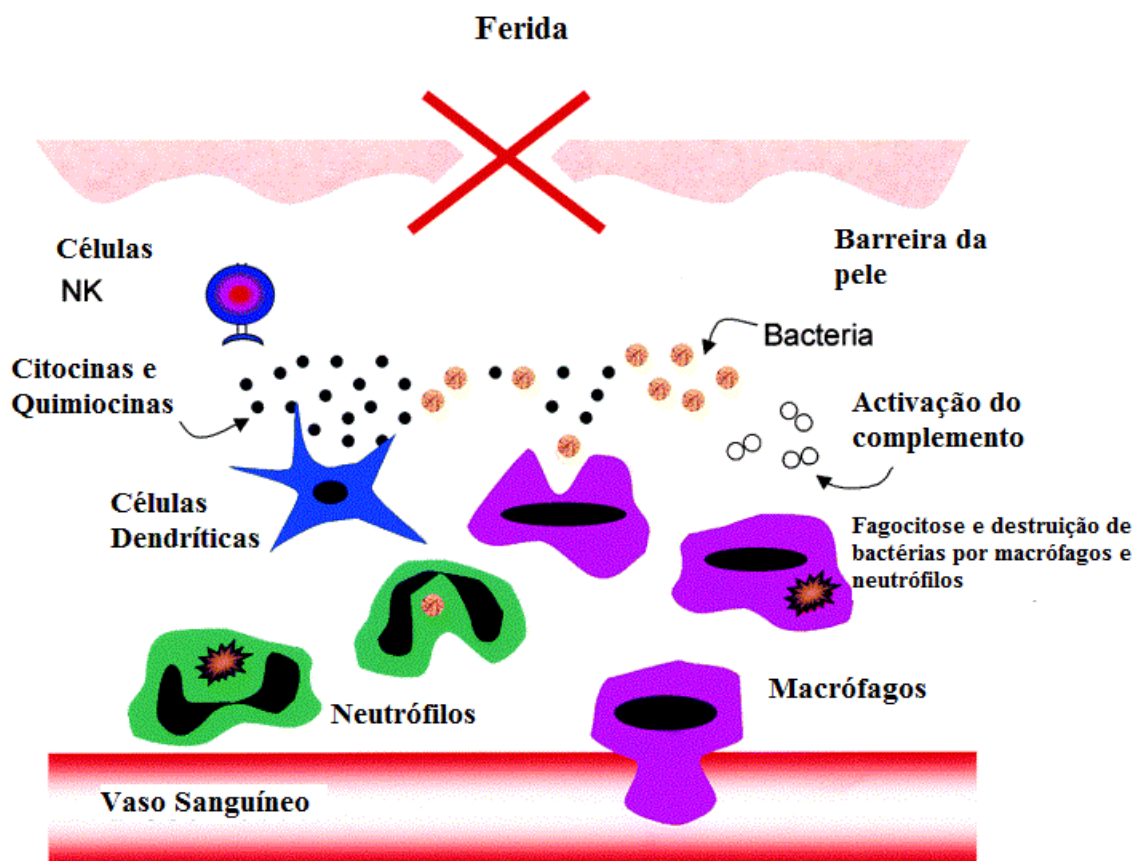


Figura 1.2 – Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta inata - A barreira física da pele, neste caso quebrada, as substâncias químicas produzidas para estimular a inflamação como citocinas e quimiocinas, o sistema do complemento e a fagocitose pelos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) (adaptado de Rabb, H., 2002)

Os componentes celulares deste tipo de imunidade são as células dendríticas, os macrófagos, os neutrófilos e as células NK (“natural killer”). Estas possuem receptores pertencentes a vários grupos proteicos que reconhecem padrões moleculares conservados associados a agentes patogénicos microbianos (PAMPs – Padrões moleculares associados a patogénicos). Estes receptores são conjuntamente chamados de PRR (“pattern recognition receptors”), e os padrões que reconhecem não se encontram no próprio organismo, portanto as respostas que desencadeiam devido à sua activação são sempre sinal da presença de agentes patogénicos (Vasta, G., R. *et al*, 2012).

A destruição dos patogénios pode ser efectuada pelos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs), através do processo de fagocitose. Este processo inicia-se pelo reconhecimento por parte dos fagócitos do agente infeccioso (directamente, pelo reconhecimento do agente infeccioso pelos receptores celulares, ou indirectamente, reconhecendo anticorpos ligados a esses agentes que assim facilitam a fagocitose), formam-se extensões de membrana dos fagócitos à sua volta devido a modificações do citoesqueleto, nomeadamente nos filamentos de actina e após a fusão dessas extensões membranares é formado um fagossoma, que maturado se torna um fagolisossoma, dentro do qual o patogénio será destruído, pela acção de hidrolases e de radicais livres de oxigénio (Fig. 1.2; Henneke, P. e Golenbock, D. T., 2004). Estas células estão envolvidas também no desencadeamento da resposta inflamatória, pela libertação de citocinas.

Os fagócitos por excelência são os macrófagos e neutrófilos, cuja acidificação lisossomal é grande, de forma a eliminar completamente as partículas fagocitadas. As DCs não estão tão directamente envolvidas na destruição de agentes infecciosos, mas a sua capacidade fagocítica está mais relacionada com a indução da imunidade adaptativa, migrando elas depois para os gânglios linfáticos para apresentar os antígenos. Visto a acidificação e consequente degradação fagolisossomal ser menor que as dos macrófagos e neutrófilos, pequenos péptidos antigénicos são conservados para poderem ser apresentados (Savina, A. e Amigorena, S., 2007), como será desenvolvido mais à frente na secção 1.2.3.

1.2.2 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa é mais específica, e pode ser chamada de antígeno-específica ou adquirida. Esta existe apenas nos vertebrados e é iniciada algumas horas após o início da resposta inata (Fearon, D. T. e Locksley, R. M., 1996, Murphy, K., 2011).

Enquanto que a imunidade inata apenas reconhece padrões comuns a todos os microrganismos e responde a todos da mesma forma, a imunidade adaptativa é diversa pois reconhece uma grande variedade de moléculas, específica pois reconhece moléculas diferentes em microrganismos distintos e

dirige a resposta para elas, e por fim permite o desenvolvimento de memória, o que capacita o sistema imunitário para responder mais rápida e vigorosamente aquando de uma nova infecção pelo mesmo agente (Clem, A. S., 2011). Este tipo de imunidade é composto por dois tipos de resposta: a humoral e a celular (Fig. 1.3).

A resposta humoral é mediada fundamentalmente por moléculas proteicas presentes no soro, os anticorpos ou imunoglobulinas, produzidos pelos linfócitos B, e destina-se essencialmente a combater agentes patogénicos extracelulares e toxinas. De facto, quando um linfócito B reconhece um antígeno, inicia um processo de expansão clonal, em que as células originadas irão dividir-se entre plasmócitos, produtores de anticorpos, e células de memória (Fig. 1.3). Os anticorpos, por sua vez, promovem diversos mecanismos efectores, como a neutralização do agente invasor e a fagocitose. (Clem, A. S., 2011).

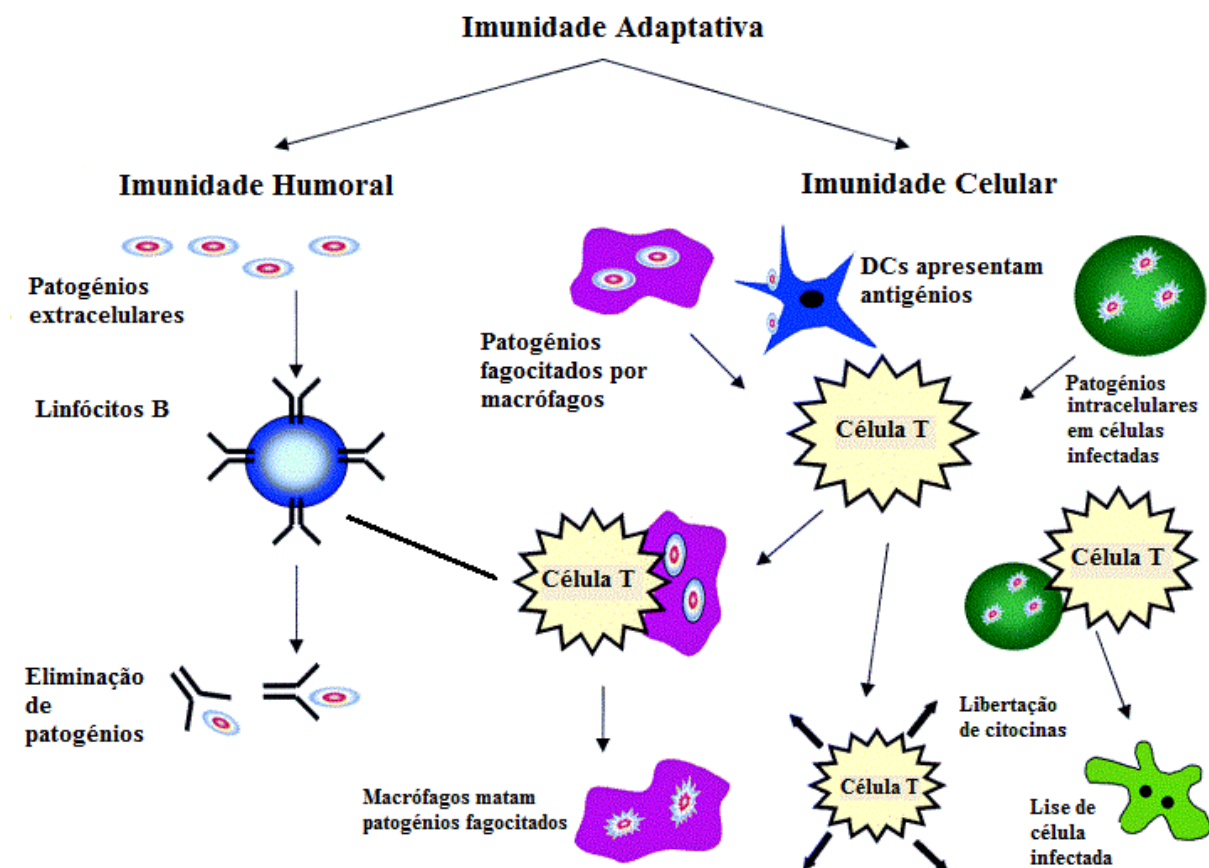


Figura 1.3 – Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta adaptativa - Resposta humoral e celular, iniciada por DCs ou macrófagos. As subpopulações de células T não se encontram diferenciadas neste esquema (adaptado de Eisen, M., 2010)

A resposta celular é mediada pelos linfócitos T. Este tipo de linfócitos não reconhece directamente os antígenos como o caso dos linfócitos B, sendo necessário para a sua activação e proliferação diferentes sinais. O primeiro sinal consiste no reconhecimento do péptido antigénico, que está ligado à

molécula do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) pelo receptor do linfócito T (TCR - Receptor de células T). No caso da molécula de MHC classe-II encontra-se apenas na superfície de alguns tipos de células imunes, designadas por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês “antigen-presenting cell”), nomeadamente, os linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas. O segundo sinal consiste na interação de membros da família de moléculas co-estimulatórias como os CD80 e CD86 (CD, do inglês “cluster of differentiation”) expressos por células como as DCs, com receptores CD28 ou CTLA-4 na superfície dos linfócitos T (Sharpe, A. H., 2009). Sinais adicionais são essenciais, como citocinas provenientes de células da resposta inata (Curtsinger, J. M. e Mescher, M. F., 2010).

Existem dois tipos principais de linfócitos T: os T citotóxicos (T_c) e os T auxiliares (T_h , do inglês “T helper”). Os linfócitos T_c , também designados $CD8^+$ (pela expressão da molécula CD8 na sua superfície) reconhecem antígenos intracelulares processados e apresentados à superfície da célula infectada, ligados a moléculas da proteína MHC da classe-I (MHC-I). As moléculas de MHC-I são expressas por todas as células nucleadas, e quando os antígenos intracelulares são reconhecidos pelos linfócitos T_c , e havendo co-estimulação e ambiente citocínico adequado, estes linfócitos exercem a sua toxicidade sobre a célula infectada, eliminando-a. Por outro lado, os linfócitos T_h , também designados por $CD4^+$ (pela expressão da molécula CD4 na sua superfície), reconhecem antígenos que foram endocitados a partir do meio extracelular, processados e apresentados pelas moléculas de MHC-II, presentes nas APCs (Clem, A. S., 2011). Estes linfócitos T_h quando activados secretam citocinas com um importante papel na determinação do tipo de resposta imunitária. Assim, dependendo das citocinas que segregam, dividem-se ainda maioritariamente em três subpopulações: T_{h1} , T_{h2} e T_{h17} . Os T_{h1} são essenciais na promoção da imunidade celular (activação de linfócitos T_c , macrófagos e outras células), enquanto que os T_{h2} são importantes na estimulação da imunidade humoral (activação de linfócitos B e produção de anticorpos) (Fig. 1.3). As T_{h17} são importantes para eliminar principalmente agentes microbianos e promovem bastante inflamação (Korn, T. et al, 2009).

Uma outra subpopulação de células T é a das T reguladores (T_{reg}). Estas células têm um papel importante na regulação da resposta imune, podendo suprimi-la, ajudando também na tolerância ao próprio (Sakaguchi, S. 2004).

1.2.3 Células Dendríticas (DCs)

As DCs constituem uma população leucocitária heterogénea, devido à sua origem celular diversa, localização anatómica, estado de maturação e função imunológica (Liu e Nussenzweig, 2010, Szatmari, I. e Nagy, L., 2008).

As DCs podem ser divididas em duas linhagens celulares: a linhagem mielóide e a linhagem linfóide (Fig. 1.4). As DCs originadas da linhagem mielóide incluem as DCs derivadas de monócitos, as células de Langerhans (ou DCs epiteliais) e intersticiais. Na linhagem linfóide incluem-se as DCs plasmocitóides (Noessner, E. *et al*, 2011).

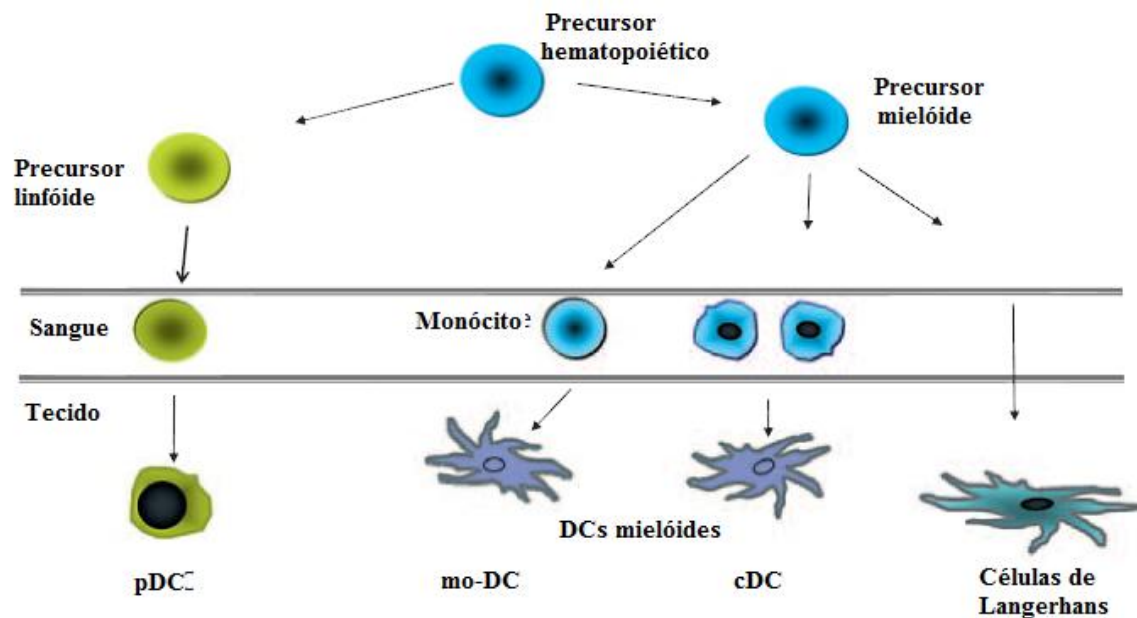


Figura 1.4 – Diferentes populações de DCs e seus precursores - O precursor hematopoiético, as duas principais linhagens celulares, a mielóide e linfóide, que originam as populações de DCs, plasmocitárias, derivadas de monócitos, convencionais ou intersticiais e células de Langerhans (adaptado de Noessner, E. *et al*, 2011)

A resposta adaptativa está dependente da apresentação antigénica, e sendo as DCs as mais potentes APCs, elas são uma importante ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Os seus precursores hematopoiéticos circulam no sangue periférico, penetrando posteriormente nos tecidos, onde originam as DCs imaturas (Fig. 1.5). Neste estado imaturo, as DCs encontram-se a “patrulhar” o microambiente em que se encontram e são caracterizadas por uma elevada capacidade de internalização e processamento de antígenos, e uma baixa expressão de moléculas de MHC-II à superfície e outras moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80, CD86 e CD83. Os antígenos que possam estar presentes são então internalizados por estas células através de processos onde se inclui a endocitose mediada por receptores, em que pequenas moléculas se ligam a receptores membranares; fagocitose que consiste na captura de microrganismos, ou fragmentos de células apoptóticas e necróticas, e que também envolve um reconhecimento por receptores da superfície celular; ou macropinocitose e neste caso não há um reconhecimento a nível de receptores de membrana mas apenas internalização de

grandes quantidades de fluido extracelular e solutos nele dissolvidos, com formação de grandes vesículas pinocíticas (Sabado R. L. e Bhardwaj N. 2010, Szatmari, I. e Nagy, L., 2008).

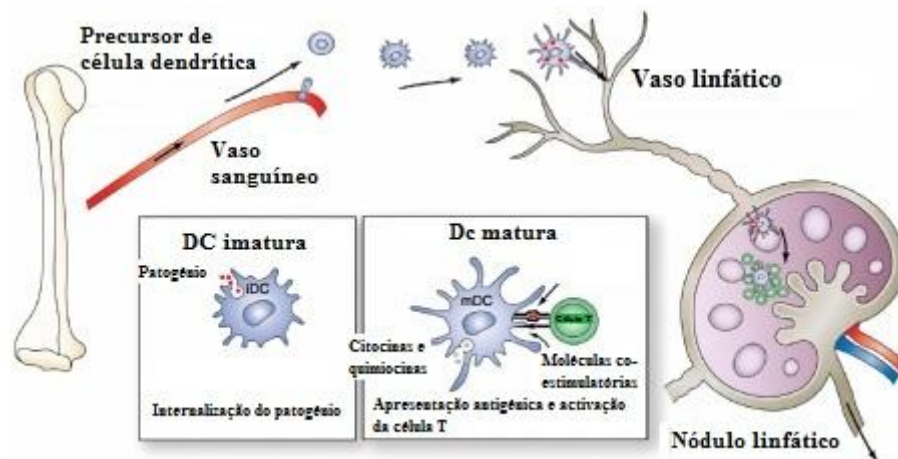


Figura 1.5 – Maturação das DCs - O precursor hematopoiético em circulação no sangue vai para um tecido, sendo então uma DC imatura, que internalizando um antígeno migra para um nódulo linfático, apresentando o antígeno processado a uma célula T, e secretando citocinas e quimiocinas. Dar-se-á início à resposta adaptativa (adaptado de Szatmari, I. e Nagy, L., 2008).

Após a internalização, os antígenos serão processados em pequenos péptidos, que se irão ligar a moléculas de MHC-II. Estes complexos são então exportados para a superfície celular. A internalização de antígenos bem como estímulos inflamatórios específicos determinam a passagem da fase imatura para a fase madura das DCs. Nesta fase, as DCs apresentam uma elevada expressão de MHC-II à superfície, juntamente com moléculas co-estimulatórias, e sua capacidade endocítica diminui acentuadamente. Ao mesmo tempo, a maturação leva a alterações a nível do citoesqueleto na DC, que perde estruturas de adesão e ganha mobilidade, para assim migrar dos tecidos periféricos para os nódulos linfáticos. Nos nódulos linfáticos, elas irão apresentar os antígenos aos linfócitos T, e assim estimular a resposta humoral e celular (Fig. 1.5). Aquando da maturação das DCs, estas também passam a secretar citocinas que determinarão a resposta imunitária resultante e quimiocinas para recrutar mais células para o local da infecção (Sabado R. L. e Bhardwaj N. 2010, Silva, Z. *et al*, 2011).

1.2.4 Ambiente pulmonar em doentes com FQ

A doença genética FQ foi descrita pela primeira vez em 1938, como uma doença genética grave de transmissão autossómica recessiva (Collins, F. S., 1992). Surge com frequência variável nos diversos grupos étnicos, verificando-se uma maior incidência na raça caucasiana, na qual se estima uma prevalência média de 0.737 doentes por 10,000 nos 27 países da União Europeia (Coutinho, C. P. *et al*, 2011b). É uma doença autossómica recessiva, letal. A FQ é causada por uma mutação no gene CFTR (“Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”), que codifica um transportador pertencente à superfamília ABC (“ATP-binding-cassete”). O CFTR funciona primariamente como um canal de Cl^- e visto ser expresso apicalmente em células epiteliais esta mutação tem um impacte bastante grande, afectando muitos sistemas de órgãos. Apesar disso, a principal causa de morbilidade e mortalidade nos doentes com FQ está associada com problemas respiratórios, devido à persistente infecção e inflamação das vias respiratórias por vários microorganismos, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e BCC. (Jacquot, J. *et al*, 2008, Buchanan, P. J. *et al*, 2009, Coenye, T. *et al.*, 2001).

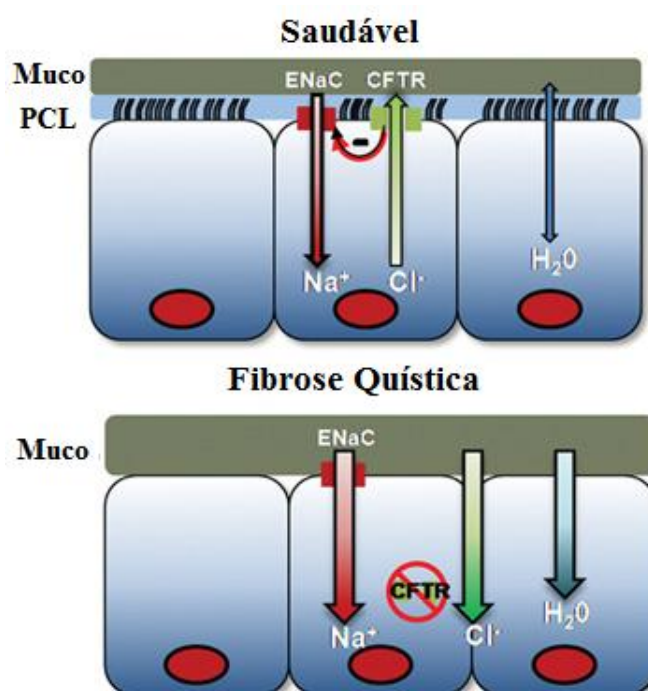


Figura 1.6 – Ambiente pulmonar alterado na FQ - Papel do gene “CF transmembrane conductance regulator” (CFTR) em regular o “airway surface liquid” (ASL), constituído pelo muco e pelo líquido periciliar (PCL), em indivíduos normais e em doentes com FQ (adaptado de Buchanan, P. J. *et al*, 2009)

As vias respiratórias estão cobertas por um líquido de superfície (“airway surface liquid” – ASL), que é constituído por duas partes, o líquido periciliar (PCL) e o muco. O PCL está em contacto directo com as células epiteliais e tem um papel importante em promover e manter o batimento dos cílios (Fig.

1.6). Este líquido mantém o ambiente com uma baixa viscosidade e separa o muco da superfície das células epiteliais. O muco, por sua vez, tem a função de remover os patógenos inalados, por aprisioná-los e destruí-los com as moléculas que o constituem e que têm actividade antimicrobiana, como por exemplo, a mucina e lisozima. Esta é uma importante barreira física e química da imunidade inata ao nível das vias respiratórias (Gómez, M. e Prince, A., 2007, Buchanan, P. J. *et al*, 2009).

Para que efectivamente o ASL consiga actuar na imunidade inata a baixa viscosidade tem que ser mantida, e para isso o ASL precisa manter-se hidratado. O balanço osmótico é mantido pelo transporte de iões Cl^- para fora das células epiteliais, e inibição da consequente entrada de Na^+ . O transportador CFTR expele cloro, e regula negativamente o transportador de sódio, ENaC (“epithelial Na^+ channel”). O resultado é a saída de água, mantendo hidratado o ASL (Fig. 1.6). Com o transportador CFTR mutado, o transporte de cloro para fora das células é bastante reduzido ou nenhum. Pelo contrário o cloro entra paracelularmente para acompanhar o movimento do sódio, pois terminando o controlo negativo sobre o transportador de sódio, ambos os iões entram nas células. Devido ao balanço osmótico a água entra também para as células epiteliais. Como consequência, a concentração de muco aumenta bastante, e este fica aderente às células epiteliais e há um achatamento dos cílios, não havendo uma remoção dos patógenos (Fig. 1.6). Esta adesão do muco coloca os patógenos em contacto directo com as células, promovendo a partir daí uma resposta proinflamatória (Buchanan, P. J. *et al*, 2009). Outras perturbações no sistema imune derivadas da mutação no gene CFTR têm sido documentadas, sendo a mais notada a fraca produção de radicais de oxigénio por parte dos fagócitos com vista a matar os patógenos fagocitados (Gómez, M. e Prince, A., 2007).

1.3 Introdução ao tema de tese

As infecções crónicas respiratórias constituem uma das manifestações mais graves do quadro clínico dos doentes de FQ, no qual as bactérias do BCC tem surgido como um patógeno oportunista temido para este tipo de doentes, dada a sua difícil se não mesmo impossível erradicação e pelo seu impacto no quadro clínico destes doentes e no seu prognóstico.

O BCC tem vindo a ter cada vez mais atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao perigo que representa para os doentes com FQ. Os mecanismos de infecção e invasão estão a ser cada vez mais estudados, e a sua versatilidade tem-se provado excepcional. Por outro lado, também se tem começado a estudar a sua interacção com o hospedeiro.

Em experiências com linhas celulares de macrófagos, está descrito que membros do BCC são mais internalizados que outros agentes patogénicos de doentes com FQ não pertencentes ao Complexo, como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (McKeon, S. *et al*, 2010b). Está também

descrito para macrófagos uma redução na sua capacidade de eliminação de membros do BCC fagocitados (Keith, K. E. *et al*, 2009, Lamothe, J., 2007). Esta redução deve-se provavelmente a uma reduzida acidificação dos fagolisossomas, sobretudo em *B.cenocepacia*, devido a atraso na fusão de lisossomas com os vacúolos contendo BCCs. Por outro lado, a associação do complexo enzimático da NADPH oxidase é mais demorado no caso de fagocitose com *B. cenocepacia*, facto que é agravado em macrófagos com o gene CFTR mutado. Estes resultados comparados com os resultados das mesmas experiências realizadas com *E.coli* indicam que é necessário que *B.cenocepacia* permaneça viva para que este atraso aconteça. (McKeon, S. *et al*, 2010b, Keith, K. E. *et al*, 2009, Lamothe, J., 2007). Como resultado, estes microrganismos sobrevivem dentro dos macrófagos e levam a que seja criada uma resistência da bactéria à destruição pelos radicais de oxigénio (Saldías, M. S. *et al.*, 2009a). Também pela análise das citocinas produzidas pelos macrófagos, encontra-se descrita uma elevada produção de citocinas proinflamatórias na presença de LPS, e das próprias bactérias, sendo que *B.cenocepacia* induz muito mais inflamação que *B.multivorans* (McKeon, S. *et al*, 2010b). *B.cenocepacia* provoca também morte celular em macrófagos, neutrófilos e DCs (, Keith, K. E. *et al*, 2009, MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008).

Especificamente quanto à interacção entre bactérias do BCC e as DCs, foi realizado, tal como referido anteriormente, um estudo por MacDonald e Speert de comparação entre *B.cenocepacia* e *B.multivorans*, no qual se verificou que *B.cenocepacia*, e não *B.multivorans* induz uma resposta inflamatória acentuada (comprovado pela expressão de citocinas proinflamatórias), inibe a maturação das DCs após a fagocitose (como se verificou por análise dos marcadores de maturação CD80 e CD86), potencialmente relacionado com uma menor acidificação lisossomal e induz mesmo a morte celular (necrose) das DCs (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008).

De um modo geral, estes estudos parecem demonstrar que há uma subversão da resposta imunitária por bactérias do BCC, sobretudo por *B.cenocepacia*, uma das espécies mais isoladas em doentes com FQ. Mas sendo a grande capacidade adaptativa de BCC uma característica que torna estas bactérias tão bem sucedidas na colonização e infecção das vias respiratórias, para se entender o que pode estar a acontecer nos pulmões dos doentes com FQ é necessário perceber melhor a resposta imune as BCC e os mecanismos inerentes ao escape imunológico.

Neste âmbito, para obter indicações sobre as estratégias adaptativas adoptadas por *B. cenocepacia* durante a infecção e colonização a longo prazo de um doente com FQ acompanhado no Centro de FQ do Hospital de Santa Maria, o grupo do Instituto Superior Técnico liderado pela Professora Isabel Sá-Correia levou a cabo um estudo fenotípico de 11 variantes clonais sequencialmente isoladas do mesmo doente com FQ (doente J), pelo período de 3 anos e meio até a sua morte pelo síndrome da cepacia. De maneira geral, durante a colonização a longo prazo, as variantes clonais estabelecem-se como resultado de adaptações genéticas que lhes permite sobreviver no ambiente pulmonar do doente.

Algumas alterações fenotípicas são encontradas, como a alteração na composição de ácidos gordos, diferente crescimento na ausência de ferro e diminuição na mobilidade, sendo que a alteração mais notada é a elevada resistência a antibióticos nos isolados após um período de tratamento agressivo (Coutinho, C. P. *et al*, 2011b).

Dada a importância da interacção com o hospedeiro pode questionar-se se a capacidade adaptativa de uma espécie ao ambiente pulmonar estará correlacionada com a evolução dos mecanismos de escape ao sistema imune do hospedeiro. Assim com o objectivo de contribuir para o esclarecimento desta questão, surge esta dissertação, na qual são estudados de forma comparativa 4 dos isolados clonais do mesmo doente J (indicados na Fig. 1.7), relativamente à sua interacção com vários aspectos do sistema imunitário. Foram escolhidos os isolados IST439 e IST4134 por serem o primeiro e o último, respectivamente, o isolado IST4113 por ter sido recolhido depois de intenso tratamento com antibióticos e ser o mais resistente, e o isolado IST4129 por ser um isolado intermédio que apresenta características diferentes dos restantes, nomeadamente baixa resistência a antibióticos.

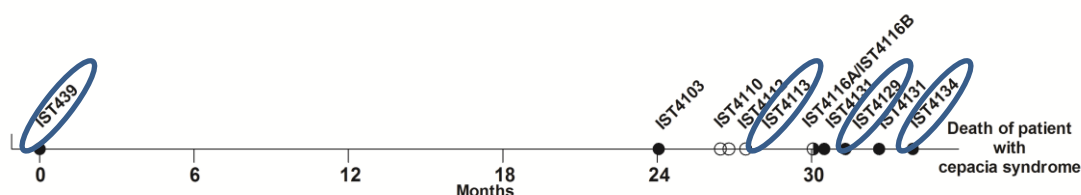


Figura 1.7 – Cronologia dos isolados clonais obtidos do doente J colonizado com *B.cenocepacia* - Em destaque os 4 isolados em estudo nesta dissertação (adaptado de Coutinho, C. P. *et al*, 2011b).

Nomeadamente pretende-se verificar se há diferenças entre os isolados ao nível de: internalização por DCs e macrófagos derivados de monócitos humanos, capacidade para induzir morte celular nas DCs e macrófagos, indução de maturação das DCs e no tipo e capacidade de produção de citocinas pelas DCs. Dada a experiência do grupo no estudo da funcionalidade das DCs humanas (Cabral, M. G. *et al*, 2010, Videira, P. A. *et al*, 2008), e atendendo à importância única destas células como elo entre a imunidade inata e adquirida, este trabalho acaba por se focar no estudo da resposta destas células. A capacidade de DCs obtidas de indivíduos saudáveis para internalizarem cada um dos isolados clonais, a indução de maturação, a viabilidade celular e o perfil de citocinas obtido após fagocitose dos isolados são apresentados nesta tese.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolados de *B. cenocepacia*, meio e condições de crescimento

Os quatro isolados de *B.cenocepacia* estudados neste trabalho (IST439, IST4113, IST4129 e IST4134) foram isolados de doentes de FQ acompanhados no Centro de FQ do Hospital de Santa Maria, em Lisboa, Portugal. Foram obtidos a partir de secreções respiratórias (expectoração) de um mesmo doente (doente J) cronicamente infectado, entre Janeiro de 1999 e Julho de 2002 e são considerados isolados clonais com base no seu perfil de “multi locus sequence typing” (MLST) (Coutinho, C. P. *et al* 2011b). As culturas foram sempre preservadas a -80°C em glicerol 1:1 (vol/vol) (Coutinho, C. P. *et al*, 2011b) e quando em uso os isolados são crescidos e mantidos em placas de meio Luria-Bertani (LB) sólido (Difco).

Para a realização dos ensaios, foi inicialmente efectuado um pré-inóculo, cultivando-se cada um dos isolados em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) broth (Difco), à temperatura de 37°C com uma agitação de 250 rpm, até que estes atingissem a fase estacionária. Posteriormente, ajustou-se a densidade óptica a 640 nm (OD_{640}), de cada isolado a $0,05 \pm 0,005$ e realizou-se um novo inóculo em 5 mL de de meio LB, em condições de crescimento idênticas às descritas para o pré-inóculo. Os isolados bacterianos foram então recolhidos a meio da sua curva exponencial de crescimento e diluídos para uma densidade óptica (OD_{640}) de $0,2 \pm 0,02$ em 0.9% NaCl. Por fim 50 μ L desta suspensão bacteriana foram plaqueados em placas de agar LB (Difco) e incubadas durante 24 horas na estufa a 37°C.

Optou-se por utilizar neste trabalho bactérias cultivadas sempre em meio sólido, pois de certa forma estas condições tentam mimetizar as condições de crescimento que estas bactérias podem encontrar no ambiente pulmonar dos doentes (Madeira, A. *et al.*, 2011).

Para uma mais fácil compreensão do texto e acompanhamento do raciocínio, os isolados serão referidos de acordo com a tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Denominação de cada isolado no decorrer da dissertação

Isolado	Denominação
IST439	I
IST4113	II
IST4129	III
IST4134	IV

2.2 Obtenção de DCs e macrófagos derivados de monócitos humanos

As DCs e macrófagos utilizados no decorrer desta tese foram derivados de monócitos humanos, obtidos a partir de concentrados leuco-plaquetários (“buffy coats”) de doadores saudáveis, fornecidos pelo Instituto Português do Sangue.

Primeiro, procedeu-se à separação das células mononucleares através de centrifugações em gradiente de densidade. Para isso, o concentrado leuco-plaquetário foi diluído em Tampão Fosfato Salino 1x (“Phosphate buffered saline”- PBS; ver Anexo I) numa proporção de 2:3 e centrifugado a 2500 rpm durante 10 min sem sistema de travagem, para remoção das plaquetas e eritrócitos. Após a centrifugação, o anel da interfase (concentrado leucocitário) foi removido e transferido para um novo tubo, onde foi diluído 3x em PBS 1x, sendo depois adicionado lentamente sobre a mistura Ficoll-Hypaque (Biochrom AG), numa proporção 5:3, e sujeito a uma centrifugação a 2500 rpm durante 20 min sem sistema de travagem. Esta mistura de Ficoll-Hypaque possui uma densidade superior à das células mononucleares e inferior aos glóbulos vermelhos e granulócitos, permitindo, assim, uma separação por diferença de densidades. Após a centrifugação obteve-se um anel das células mononucleares na interfase, entre o plasma na fase superior e os eritrócitos e granulócitos em Ficoll-Hypaque na fase inferior.

O anel resultante foi depois transferido para um tubo de vidro, ressuspensionado em PBS 1x e sujeito a duas centrifugações sucessivas a 4°C, a primeira a 1400 rpm durante 10 min e a segunda a 800 rpm durante 5 min, para remover os granulócitos restantes, plaquetas e resíduos de Ficoll-Hypaque. Seguidamente, o sedimento celular resultante foi ressuspensionado em 10 mL de PBS 1x, tendo-se retirado uma pequena amostra para determinar a densidade celular no contador hematológico, seguindo-se uma centrifugação a 1200 rpm durante 10 min também esta a 4°C. De acordo com a densidade celular obtida, ressuspenderam-se as células em 80 µL de tampão “Beads” frio (solução usada no protocolo de separação de células utilizando micro-esferas magnéticas; ver Anexo I) e 20 µL de micro-esferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por cada 3×10^7 células. Estas micro-esferas magnéticas anti- CD14 ligam-se apenas aos monócitos, uma vez que estes expressam na sua superfície o marcador CD14.

As células foram incubadas com as micro-esferas durante 15-20 min a 4° C, sendo de seguida lavadas com tampão “Beads” frio e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sedimento celular resultante foi ressuspensionado em 3 mL de tampão “Beads” frio. A suspensão celular foi passada por uma coluna de selecção positiva LS (Miltenyi Biotec) montada num MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec), previamente equilibrada com 3 mL de tampão “Beads” frio. O MidiMACS Separator exerce um campo magnético, promovendo a retenção na coluna dos monócitos ligados às esferas magnéticas anti-CD14. De seguida, a coluna foi lavada três vezes com 3 mL de tampão “Beads” frio sendo desprezada a fracção CD14 negativa. A fracção CD14 positiva retida na coluna foi recuperada por eluição com 5

mL de solução tampão “Beads”, por acção da pressão produzida com o auxílio do êmbolo, após desmontar a coluna do campo magnético. De seguida, após contagem dos monócitos obtidos, procedeu-se a nova centrifugação de 10 min a 1200 rpm. Os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura RPMI- 1640 (Sigma-Aldrich) completo (ou seja, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco/Invitrogen) e 1% de piruvato de sódio (Gibco/Invitrogen)) e 1000 U/mL de Interleucina-4 (IL-4) (R&D Systems) e de GM-CSF (“Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”) (R&D Systems). Os monócitos ressuspensos foram distribuídos em placas de 24 poços (Greiner Bio-one) numa densidade de 1×10^6 células/mL. As culturas foram mantidas durante seis dias numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% de CO₂, sendo que o meio de cultura foi renovado de dois em dois dias, retirando metade do volume de cada poço gentilmente (dado que os monócitos se depositam mas não são aderentes) e adicionando a mesma quantidade de meio de cultura fresco com IL-4 e GM-CSF nas quantidades descritas anteriormente. Ao fim dos seis dias de cultura, os monócitos originaram as DCs imaturas.

Para a obtenção de macrófagos todo o processo é igual, mas os monócitos são cultivados em meio de cultura contendo 30% de soro fetal bovino em vez dos 10% sem adição de citocinas. Nestas condições, os monócitos naturalmente se diferenciarão em macrófagos ao fim de 14 dias, tornando-se aderentes.

2.3 Técnicas

2.3.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar múltiplos parâmetros físicos de partículas ou células em suspensão, de forma individual dentro de populações heterogéneas. A análise de vários parâmetros para cada célula é conseguida pelo citómetro de fluxo com base num fluxo laminar que promove a passagem das células uma a uma, através de um feixe de luz. A passagem de células provoca, então, a dispersão dos fotões tanto na direcção longitudinal “Forward Scatter”- FSC), como na direcção transversal (“Side Scatter”- SSC). A intensidade da luz é, depois, quantificada por um detector e convertida em voltagem, sendo a magnitude do pulso de voltagem da dispersão longitudinal proporcional ao tamanho da célula e a dispersão transversal proporcional à complexidade e granularidade relativa da célula. Outro dos parâmetros informativos fornecido pelo citómetro corresponde à Intensidade da Fluorescência Média (Intensidade média de fluorescência - MFI). Esta técnica permite separar uma amostra celular em diferentes populações, com base nos parâmetros que se podem medir em cada partícula/célula analisada individualmente. O sistema de detecção mais comum em citometria usa moléculas fluorescentes que se ligam especificamente a partículas/células de interesse. Geralmente utilizam-se anticorpos monoclonais ou policlonais fluorescentes que

reconhecem receptores específicos nas células, ou corantes fluorescentes que se ligam ao material nuclear, membrana, ou outro constituinte celular. O MFI corresponde à estimativa da quantidade de anticorpo/composto fluorescente que a célula incorporou (Robinson, J. 2004).

Os dados resultantes são transferidos para um computador e representados graficamente. O citómetro de fluxo utilizado neste trabalho foi um FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson), composto de quatro filtros, capaz de interpretar até quatro fluorescências diferentes, fluorescência verde (FL-1), amarela (FL-2), laranja (FL-3) e vermelha (FL-4).

2.3.2 Reacção de polimerização em cadeia em tempo real quantitativo (RT-PCR)

A transcrição reversa combinada com a reacção de polimerização em cadeia em tempo real (“Real time PCR”- RT-PCR) é uma metodologia altamente sensível e precisa para analisar e quantificar a expressão de um determinado gene através do seu mRNA, uma vez que permite que os processos de amplificação e detecção sejam realizados numa única etapa, produzindo resultados de quantificação rápidos e fiáveis (Bustin, S. A., 2002).

Esta técnica distingue-se do PCR tradicional pela utilização de fluorocromos que, quando excitados emitem um sinal proporcional à quantidade de produto de PCR formado. Neste trabalho, a tecnologia utilizada foi a TaqMan, que consiste na utilização de sondas hidrolizáveis conjugadas a um fluorocromo quencher e a outro repórter. Enquanto a sonda está intacta, o fluorocromo quencher absorve a fluorescência do repórter. Durante a reacção de amplificação, a sonda é degradada pela actividade 5'-3' exonuclease da Taq polimerase, resultando na libertação de fluorescência do fluorocromo repórter, que é detectada pelo aparelho. Assim, em cada ciclo de PCR, a emissão de fluorescência vai aumentando exponencial e proporcionalmente ao produto formado (Velden et al., 2003, Bustin, S. A., 2002).

Neste trabalho, foi utilizado o método de quantificação relativa que se baseia na comparação da expressão entre um gene alvo e um gene de referência (controlo endógeno) (Videira, P. A. *et al*, 2009). A expressão relativa de cada gene foi normalizada em relação à expressão de um controlo endógeno e calculado pela fórmula adaptada $2^{-\Delta C_T} \times 1000$ em que C_T , ciclo limiar (“threshold cycle”), corresponde ao ciclo no qual é detectado o primeiro aumento significativo da fluorescência emitido pela sonda, e ΔC_T corresponde à variação entre o valor e C_T para a amplificação de um gene na amostra em estudo e o valor de C_T para a amplificação de um controlo endógeno. É, portanto, inferido o número de moléculas de mRNA do gene de interesse por 1000 moléculas do gene controlo.

É, portanto, sempre necessário controlos endógenos para normalizar a variação da expressão genética entre as várias amostras, visto que o material genético obtido de diferentes indivíduos varia ao nível da

quantidade e integridade de mRNA. Geralmente os genes que são expressos constitutivamente, como os genes que codificam para a β -actina e para a enzima desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH), são utilizados para fazer esta normalização (Bustin, S. A., 2002). Neste trabalho foi usado o gene da β -actina.

2.4 Avaliação da internalização de *B. cenocepacia*

2.4.1 Marcação dos isolados de *B. cenocepacia* com fluorescência

Para a análise da internalização dos isolados de *B.cenocepacia* neste trabalho, efectuou-se previamente a sua marcação com um composto fluorescente de modo a viabilizar a sua presença dentro das células. Usou-se o corante 4-clorometil benzoil amino tetrametil rodamina (CMTMR), da Invitrogen. Este corante atravessa livremente a membrana celular, e uma vez dentro da célula é sujeito a reacções envolvendo grupos tiol e a enzima glutathione-S-transferase no citoplasma, ficando ligado a proteínas e apresentando fluorescência, sendo que o excesso de reagente não conjugado volta a sair livremente pela membrana. O CMTMR torna-se impermeável à membrana celular, e mantém-se fluorescente até pelo menos 72 horas e até 4 divisões celulares (West, C. A. et al, 2001).

Assim, algumas unidades formadoras de colónias (CFU's) de cada bactéria (dos diferentes isolados) foram retiradas da placa de agar LB e suspendidas em 500 μ L de 0.9% NaCl, de forma a obter uma OD₆₄₀ de 2, à qual foram adicionados 2 μ L do corante CMTMR e posteriormente incubado durante 1 hora, no escuro, a 37°C e com uma agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, as células foram lavadas 3x em 0,9% NaCl, a 9000 rpm, durante 5 minutos, para retirar o excesso de corante. Para a realização dos ensaios seguintes, as células com o corante foram suspensas até obtenção de uma OD₆₄₀ de 1,5.

2.4.2 Ensaios de internalização de *B. cenocepacia* por DCs e macrófagos

Após o tempo de diferenciação em DCs ou macrófagos, estas células foram então incubados com os diferentes isolados de *B.cenocepacia*, previamente marcados com CMTMR, conforme descrito em 2.4.1.

Para tal, o meio de cultura das células foi retirado, e as células foram lavadas uma vez em PBS 1x, a 1200 rpm, durante 5 minutos. Após a lavagem as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 completo e a concentração celular determinada no contador hematológico. Os ensaios de internalização foram então realizados em 100 μ L de suspensão celular de DCs ou macrófagos com $0,5 \times 10^6$ células, aos quais foram adicionados 10 μ L da suspensão bacteriana (equivalente a $3,75 \times 10^9$

CFU). O tempo de incubação das células com as bactérias foi de 6 horas, excepto nos casos em que é indicado outro tempo, na estufa de 37°C, 5% CO₂. Como controlo negativo, o mesmo ensaio foi realizado com incubação a 4°C, dado que a essa temperatura não deverá ocorrer internalização (Werner, E., 2005).

No caso dos macrófagos, por serem aderentes e demorarem o seu tempo a aderir à placa, foram recolhidos, lavados e cultivados com a concentração celular desejada, numa placa de 24 poços, previamente na véspera do ensaio. As bactérias foram adicionadas no dia seguinte, e assim os macrófagos mantiveram-se aderentes, como nos tecidos.

Após a incubação com as bactérias, as células foram lavadas duas vezes, a 1200 rpm, durante 5 minutos, com tampão “Facs flow” (semelhante ao PBS), a fim de remover bactérias que não tenham sido internalizadas. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS 1x e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do programa Flowing Software 2.

Foi realizada também uma curva de cinética de internalização e uma de dose-resposta, ambas com DCs. As condições de realização destes ensaios foram as descritas acima. No caso da cinética de fagocitose, os tempos de internalização foram de 2, 4, 6, 8, 18, 20 e 24 horas. No caso da curva dose-resposta, as DCs foram incubadas com as bactérias durante 6 horas, e as OD₆₄₀ foram de 2, 1,5, 1, 0,5 e 0,25.

2.5 Avaliação do estado de maturação de DCs na presença de *B. cenocepacia*

O estado de maturação das DCs foi avaliado tendo em conta a expressão de moléculas tipicamente descritas como marcadores de maturação, nomeadamente as moléculas co-estimulatórias CD86 e CD80 e principalmente o MHC-II, através de anticorpos fluorescentes anti-CD86, anti-CD80 e anti-HLA-DR. Os anticorpos anti-HLA-DR reagem com os antígenos leucocitários humanos DR (Antígenos Leucocitários Humanos -HLA) que correspondem a uma classe de moléculas de MHC-II. Portanto quanto maior for o estado de maturação das DCs, maior será a expressão destas moléculas.

Simultaneamente e como controlos, à incubação das DCs com os isolados de *B. cenocepacia* durante 6 horas, também foram incubadas DCs nas mesmas condições mas na ausência de bactérias (como controlo negativo) ou na presença de uma estirpe de *E.coli* (K12). Esta incubação com *E. coli* foi realizada como controlo positivo, visto já ter esta estirpe sido estudada pelo grupo e tendo-se confirmado o aumento significativo da expressão dos marcadores de maturação nas DCs (dados não apresentados).

Após o período de incubação com as bactérias e das lavagens como descrito para os ensaios de internalização, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1x e incubadas 15 minutos, no escuro à temperatura ambiente, com 2,5 µL do anticorpo anti-HLA-DR marcado com APC (Alofocianina- APC, Biolegend), 3 µL do anticorpo anti-CD80 marcado com FITC (Fluoresceína isotiocianato - FITC, Biolegend) e 3 µL do anticorpo anti-CD86 marcado com PE (Ficoeritrina - PE, Biolegend). Depois do período de marcação as células foram lavadas uma vez, a 1200 rpm, durante 5 minutos com PBS 1x. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS 1x (ver Anexo I) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do programa Flowing Software 2.

2.6 Avaliação da morte celular de DCs e macrófagos na presença de *B.cenocepacia*

2.6.1 Determinação da morte celular por citometria de fluxo

Para se avaliar a morte celular por apoptose nas DCs após contacto com os 4 isolados de *B. cenocepacia* utilizou-se a proteína Anexina V e o corante 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A Anexina V é uma proteína que interage forte e especificamente com a fosfatidilserina (Fosfatidilserina - PS), um componente fosfolípido da membrana citoplasmática. Nos primeiros eventos de apoptose ocorre uma perda de assimetria da membrana plasmática, verificando-se a translocação da PS da camada interna da membrana para a camada externa da membrana, permitindo assim a ligação da Anexina V. A utilização da Anexina V conjugada com fluorescência constitui, portanto, um método para a detecção da apoptose precoce. O 7-AAD é um corante fluorescente que se liga selectivamente ao DNA, permitindo a discriminação das células mortas das células vivas, uma vez que, durante o processo apoptótico a membrana citoplasmática vai sendo progressivamente alterada, tornando-se permeável ao corante. Este corante permite identificar as células apoptóticas tardias e necróticas, uma vez que, no caso das células necróticas a membrana citoplasmática encontra-se danificada sendo permeável ao corante, já no caso das células apoptóticas precoces a integridade membranar permanece inalterada, sendo, por isso, impermeável ao corante. Assim, a Anexina V consegue identificar células apoptóticas num estado muito precoce, enquanto o 7-AAD só identifica células num estado mais tardio de morte celular (Dong, H. P. *et al*, 2009).

Tal como nos ensaios de internalização, o meio de cultura das células foi retirado, e as células foram lavadas uma vez em PBS 1x, a 1200 rpm, durante 5 minutos. Após as lavagens as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 completo e a concentração celular determinada. Depois, 100 µL de suspensão celular de DCs ou macrófagos com $0,5 \times 10^6$ células, foram cultivados na presença 10 µL das diferentes suspensões bacterianas (sem marcação com fluorescência) com o equivalente a $3,75 \times 10^9$ CFU. Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C, 5% CO₂, as células foram

lavadas com PBS 1x, 5 minutos a 1200 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 185 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x (BD 30 Biosciences). De seguida, as células foram marcadas com 5 µL de Anexina V-APC (BD Biosciences) e 10 µL de solução 7-AAD (Sigma-Aldrich) e incubadas durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após a marcação, foram adicionados 200 µL do tampão de ligação da Anexina V 1x em cada tubo e estes foram analisados por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do programa Paint-a-Gate 3.0.2 PPC (Becton Dickinson) e do programa Flowing Software 2.

2.6.2 Determinação da viabilidade celular por microscopia óptica

O uso de azul tripano para verificar a viabilidade celular tem a mesma base que o uso do corante 7-AAD, ou seja, é um corante de viabilidade. As células viáveis possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, sendo o azul tripano um deles. Células não viáveis começam a ter a membrana celular fragilizada e deixam de ser impermeáveis aos corantes. Neste caso, o corante é misturado com a suspensão celular e examinada visualmente através do microscópio óptico, de forma a perceber se as células (e/ou quantas células) excluem o corante ou ficam azuis (Strober, W., 2001).

Depois do período de incubação de 6 horas das DCs com os isolados bacterianos e das lavagens já descritas, retiraram-se 20 µL de suspensão celular aos quais se adicionaram 40 µL de azul tripano 2% (diluição 1:3), seguida de visualização ao microscópio e contagem das células vivas e mortas.

2.7 Avaliação da produção de citocinas pelas DCs na presença de *B.cenocepacia*

2.7.1 Extracção de RNA e transcrição reversa para DNA complementar (cDNA)

Foram realizados ensaios de internalização idênticos aos acima descritos (incubação das DCs com os isolados de *B. cenocepacia* durante 6 horas), mas em que bactérias não se encontravam marcadas com fluorescência, bem como um controlo só com DCs. No final da incubação, as células foram lavadas uma vez, a 1200 rpm, durante 5 minutos, com PBS 1x a fim de remover bactérias que não tenham sido internalizadas, o sobrenadante descartado e as células sedimentadas congeladas a -80°C para posterior utilização.

Após descongelamento dos sedimentos celulares, procedeu-se à extracção de RNA e à sua conversão para DNA complementar (cDNA). Para a extracção de RNA foi utilizado o sistema comercial GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma), tendo-se seguido as instruções e utilizado as soluções fornecidas pelo fabricante. As concentrações de RNA obtido foram determinadas com base na leitura da absorvância a 260nm (A_{260nm}) num espectrofotómetro UV- 1700 PharmaSpec

(Shimadzu, Duisburg, Alemanha), recorrendo à seguinte relação: uma unidade de A_{260} nm corresponde a 40 µg de RNA por mL. O estado de pureza das amostras foi analisado através da relação entre os valores das leituras a A_{260} nm e A_{280} nm (A_{260}/A_{280}), sendo que valores abaixo de 1,8 indicam contaminação com proteína ou álcool usado no procedimento experimental.

A reacção da conversão do RNA em cDNA foi efectuada com base na estratégia de oligonucleótidos iniciadores (“primers”) aleatórios que se hibridam a diversas regiões do RNA permitindo a sua posterior transcrição reversa por acção da transcriptase reversa. Neste procedimento, usou-se o sistema comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Efectuando-se uma mistura de 100 µL por reacção, contendo 10 µL de oligonucleótidos iniciadores aleatórios, 4 µL de nucleótidos livres, 5 µL de transcriptase reversa, 10 µL de solução tampão, 31 µL de água ultra pura e 40 µL das amostras de RNA.

2.7.2 PCR em tempo real (RT-PCR)

O PCR em tempo real foi realizado numa 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reacção de PCR foi realizada num volume de 10 µL, tendo sido utilizada a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada reacção de PCR em tempo real foi realizada em duplicado (uma réplica de cada ensaio). Assim, para cada reacção, adicionaram-se 5 µL de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 3 µL de cDNA. Seleccionou-se um conjunto de sondas TaqMan e de “primers” para os genes de interesse (Tabela 2.2) (Applied Biosystems), tendo-se pipetado 2 µL de cada uma destas misturas para uma microplaca de 96 poços (Fast Optical 96-Well Reaction) e, em seguida, 8 µL da mistura contendo o cDNA. Depois de selada, a placa foi centrifugada a 1200 rpm durante 5 min. As condições cíclicas térmicas aplicadas foram, respectivamente, um ciclo de 20 seg a 95° C para a activação da polimerase, seguido de 40 ciclos de 3 seg a 95° C para a desnaturação do DNA em cadeia dupla e por último um ciclo de 30 seg a 60° C para a hibridação dos “primers” e polimerização das novas cadeias de DNA.

Para normalizar o valor do sinal de cada amostra, de forma a que as variações de RNA entre as amostras resultem exclusivamente de uma variação biológica real, foi utilizado como controlo endógeno o gene constitutivo da β -actina. A análise dos valores de expressão genética dos genes testados foi efectuada aplicando-se um método de quantificação relativa ou $2^{-dCT} \times 1000$ (através da qual se obtém o número de moléculas de mRNA do gene da citocina em questão por 1000 moléculas do gene da β -actina) e assumindo que a eficiência da reacção de amplificação foi de aproximadamente 100%, de acordo com a validação dos ensaios realizada pelo fabricante.

Tabela 2.2 – Identificação do ensaio para cada um dos genes analisados

Nome do gene	Descrição	Identificação do ensaio*	Função
<i>IL 1B</i>	Interleucina 1, beta	Hs00174097_m1	Pro-inflamatória (Lasiglie, D. et al, 2011)
<i>IL 6</i>	Interleucina 6 (Interferon, beta 2)	Hs00174131_m1	Pro-inflamatória (Korn, T. et al, 2009)
<i>IL 10</i>	Interleucina 10 (CSIF, IL-10A)	Hs00174086_m1	Anti-inflamatória (Asadullah, K. et al, 2003)
<i>IL 12 (NKS2, p40)</i>	Interleucina 12B (“natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40”)	Hs00233688_m1	Pro-inflamatória (Trinchieri G., 2003)
<i>IL 23</i>	Interleucina 23, “alfa subunit p19	Hs00372329_m1	Pro-inflamatória (Korn, T. et al, 2009)
<i>TGF-β</i>	“Tranforming growth factor”, beta 1	Hs00171257_m1	Anti-inflamatória (Mantel, P. Y., 2011)
<i>TNF-α</i>	“Tumor necrosis factor (TNF superfamily member 2)”	Hs00174128_m1	Pro-inflamatória (Idriss, H.T. e Naismith, J.H., 2000)

* O prefixo “Hs” é a abreviatura de Homo sapiens, espécie para o qual o ensaio foi formulado. O sufixo “m1” indica um ensaio cuja sonda e oligonucleótidos iniciadores foram desenhados sobre uma junção exão-exão, não detectando DNA genómico.

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada pelo software GraphPad Prism 5 (Windows). O Teste de t-Student e ANOVA foram utilizados para analisar as diferenças estatísticas dos dados, considerando-se que valores de $p < 0,05$ são estatisticamente significativos (* significa que o valor p é inferior a 0,05; ** que o p é inferior a 0,01 e *** que o p é inferior a 0,0001).

3. Resultados

3.1 Estudo da internalização de isolados clonais de *B. cenocepacia* por DCs e macrófagos e dos seus efeitos na viabilidade destas células

3.1.1 Internalização dos isolados I e II por DCs e macrófagos

Numa primeira fase, como forma de optimização das condições de ensaio, o estudo de internalização de *B. cenocepacia* previamente marcadas com CMTMR, por DCs e macrófagos começou por ser realizados apenas em 2 dos isolados (I e II) em estudo. Os tempos de incubação nestes ensaios, com macrófagos bem como com as DCs, foram de 1 e 24 horas.

Análises de citometria de fluxo, revelaram que de um modo geral, com 1 hora de incubação, a maioria das células internalizou, e que o isolado II foi internalizado por mais células em relação ao isolado I.. No caso dos macrófagos, em média, $60,34\% \pm 11,310$ internalizaram o isolado I e $76,10\% \pm 5,759$ internalizaram o isolado II . No caso das DCs, em média, $77,57\% \pm 8,275$ internalizaram o isolado I e $86,30\% \pm 1,035$ internalizaram o isolado II. Comparando ambos os tipos de células, macrófagos e DCs, com uma hora de incubação, as DCs internalizaram ligeiramente mais os dois isolados, possuindo tal como os macrófagos maior capacidade fagocítica para o isolado II (Fig. 3.1).

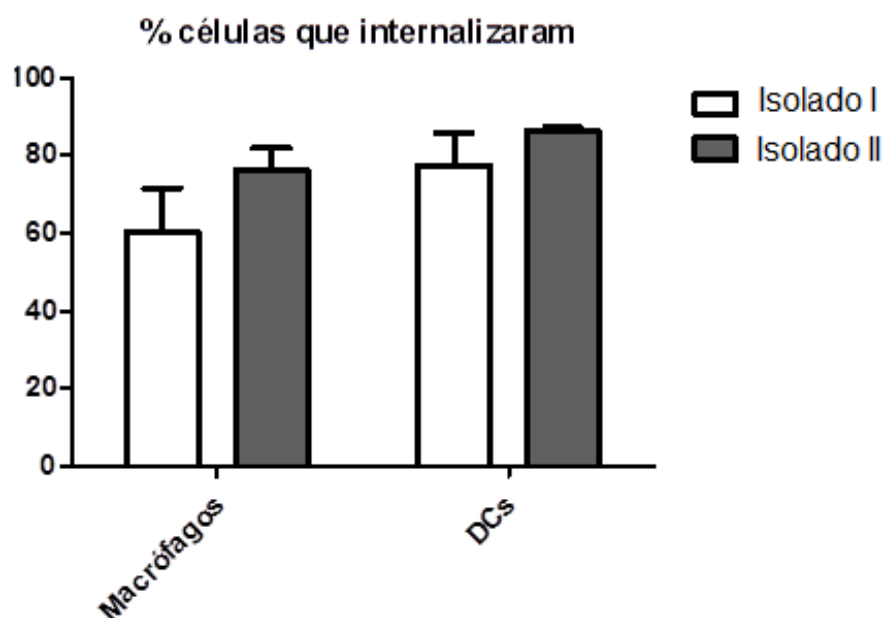


Figura 3.1 – Comparação entre macrófagos e DCs quanto à percentagem de células que internalizaram os isolados I e II de *B. cenocepacia* após 1 hora de incubação (n=3 para macrófagos e n=2 para DCs).

No entanto, apesar de a grande maioria das células ter internalizado as bactérias marcadas, ao fim de 1 hora de incubação, a quantidade de bactérias que foi internalizada neste tempo, determinada com base no valor de MFI (ver Anexo II), foi bastante reduzida. Especificamente, para os macrófagos, os valores de MFI normalizado (normalizados em relação ao controlo a 4 °C, são por isso uma razão/percentagem) foram, no caso do isolado I $0,26 \pm 0,136$ e para o isolado II $0,89 \pm 0,312$, o equivalente a dizer que, para o isolado I, houve um aumento em 26% da internalização em relação ao controlo negativo, ou seja, a incubação das células com cada um dos isolados a 4°C (controlo negativo), e no caso do isolado II houve um aumento em 89% da internalização em relação ao controlo negativo. Para as DCs, o isolado I apresentou o valor de MFI de $0,29 \pm 0,03$, representando um aumento de 29% da internalização em relação ao controlo negativo, e no caso do isolado II apresentou um valor de MFI de $1,35 \pm 0,218$, ou seja, um aumento de 135% da internalização em relação ao controlo negativo. Apesar do reduzido número de bactérias internalizadas, esta análise permite concluir que o isolado mais internalizado foi o II, em ambos os ensaios, com os macrófagos, tal como pelas DCs e que a sua internalização foi superior nas DCs (Fig. 3.2).

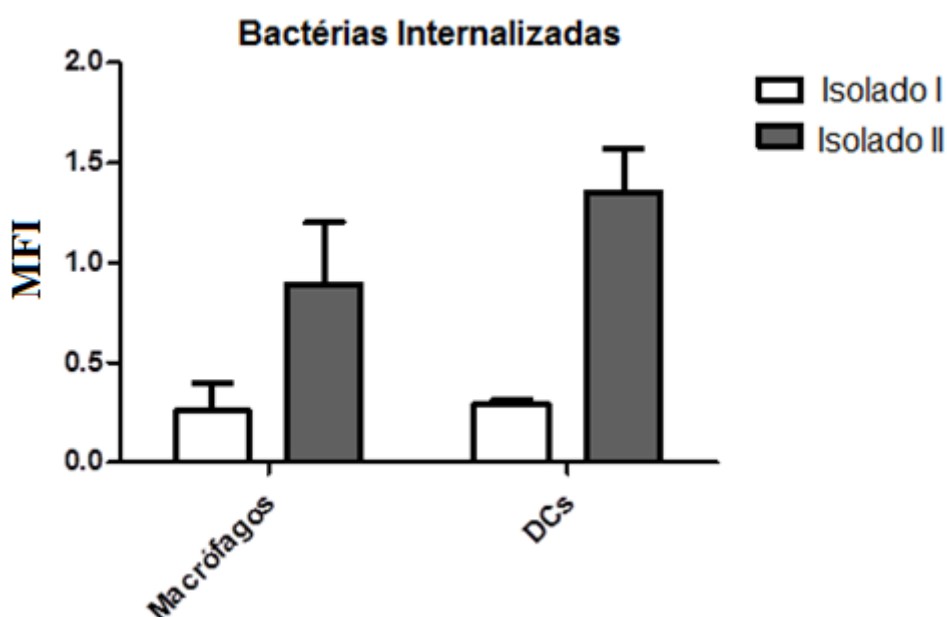


Figura 3.2 – Comparação entre macrófagos e DCs quanto à internalização dos isolados I e II de *B. cenocepacia* após 1 hora de incubação. A normalização dos valores de MFI foi realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C})$ (n=3 para os macrófagos e n=2 para as DCs)

Relativamente aos ensaios realizados durante 24 h, verificou-se que após este tempo de incubação a maioria das células internalizou os isolados em estudo e mais uma vez que as DCs internalizaram mais que os macrófagos (Fig. 3.3). No entanto, ao contrário do que se havia verificado no ensaio com 1h de incubação, ao fim de 24h de incubação, os macrófagos internalizaram menos o isolado II do que o I. De facto, o isolado I foi internalizado por $74,15\% \pm 7,883$ de células e o isolado II foi internalizado por $63,90\% \pm 5,038$ dos macrófagos. Já a percentagem de DCs que internalizou cada um dos isolados foi semelhante ($79,51\% \pm 3,835$ e $80,57\% \pm 1,705$).

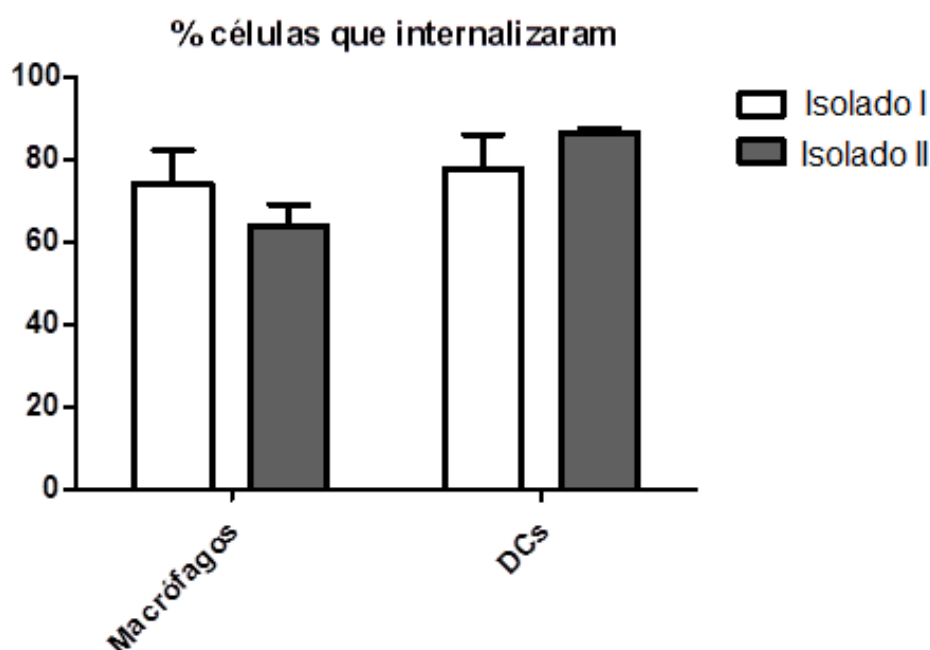


Figura 3.3 – Comparação entre macrófagos e DCs quanto à percentagem de células que internalizaram os isolados I e II de *B. cenocepacia* após 24 horas de incubação (n=3 para os macrófagos e n=2 para as DCs)

Em princípio esperava-se que ao fim de 24 horas de incubação, a quantidade de bactérias internalizadas fosse bastante superior do que ao fim de 1 hora, no entanto tal não se verificou. De facto observou-se que o isolado II manteve-se o mais internalizado pelas DCs, mas não pelos macrófagos e que foi menos internalizado do que no ensaio com 1 hora de incubação. A quantidade de bactérias internalizadas pelos macrófagos foi maior do que a quantidade de bactérias internalizada pelas DCs ao fim de 24 horas de incubação (Fig. 3.4). A elevada morte celular verificada ao fim das 24 horas de incubação poderá estar a influir nestes resultados, sendo eles artefactos. Para os macrófagos, os valores de MFI foram, no caso do isolado I $0,89 \pm 0,512$ e para o isolado II $0,68 \pm 0,266$, o equivalente a dizer que, para o isolado I, houve um aumento em 89% da internalização em relação ao controlo

negativo, ou seja, a incubação das células com cada um dos isolados a 4°C (controlo negativo), e no caso do isolado II houve um aumento em 68% da internalização em relação ao controlo negativo. Para as DCs, o isolado I apresentou o valor de MFI de $0,30 \pm 0,53$, representando um aumento de 30% da internalização em relação ao controlo negativo, e no caso do isolado II apresentou um valor de MFI de $0,74 \pm 0,358$, ou seja, um aumento de 74% da internalização em relação ao controlo negativo.

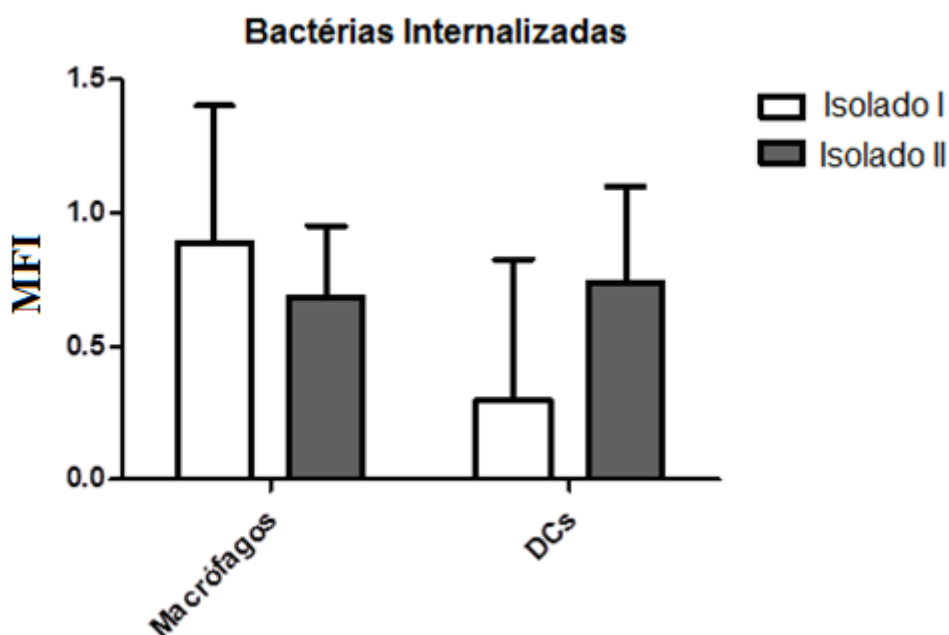


Figura 3.4 – Comparação entre macrófagos e DCs quanto à internalização dos isolados I e II de *B. cenocepacia* após 24 horas de incubação. A normalização dos valores de MFI foi realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI controlo } 4^{\circ}\text{C})$ ($n=3$ para os macrófagos e $n=2$ para as DCs)

3.1.2 Avaliação da morte celular de macrófagos e DCs na presença de 4 isolados clonais de *B. cenocepacia*

Dado a evidente morte celular das células incubadas durante 24 horas com os diferentes isolados clonais de *B. cenocepacia*, determinado por citometria de fluxo, estimou-se posteriormente a quantidade de células em apoptose induzida após contacto com estas bactérias. Os ensaios realizados permitiram distinguir a percentagem de células vivas da percentagem de células apoptóticas e necróticas.

Através da análise dos resultados de citometria de fluxo, observou-se que, no caso dos macrófagos, o isolado que causou uma maior diminuição na percentagem de células vivas foi o último isolado, IV. Os isolados que causaram a menor diminuição na percentagem de células vivas foram os isolados I e III. Em termos de morte celular, verificou-se que o mecanismo pelo qual as células morrem foi maioritariamente a apoptose, havendo uma percentagem baixa de células necróticas com todos os isolados. Especialmente com os isolados I e IV pareceu evidente que as células se encontravam na sua maioria na fase tardia da apoptose (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Resultados da avaliação da morte celular, por citometria de fluxo, de macrófagos incubados 24 horas com cada um dos isolados. Os valores representam percentagens de células (n=1, excepto nos ensaios assinalados com * que correspondem a uma média entre dois ensaios e para os quais se apresenta o valor do desvio padrão; para se verificar como a análise foi feita ver Anexo III)

Macrófagos	ISOLADOS				
	Sem bactérias*	I*	II*	III	IV
Células vivas	78,47±16,51	33,76±8,88	29,39±3,45	40,84	19,17
Células em fase inicial de apoptose	3,57±2,05	16,6±1,29	36,9±5,44	20,32	23,79
Células em fase final de apoptose	14,95±12,83	45,64±5,04	26,24±1,47	34,03	53,63
Células necróticas	3,02±1,64	4,01±2,55	7,45±0,5	4,81	3,41

No caso das DCs, a percentagem de células vivas resultante da incubação com cada um dos 4 isolados foi semelhante em todos os casos (Tabela 3.2). Tal como para os macrófagos, o mecanismo maioritário de morte celular foi a apoptose, encontrando-se a grande maioria das células numa fase inicial da apoptose, com todos os isolados.

Tabela 3.2 – Resultados da avaliação da morte celular, por citometria de fluxo, de DCs incubadas 24 horas com cada um dos isolados. Os valores representam percentagens de células (n=1)

DCs	ISOLADOS				
	Sem bactérias	I	II	III	IV
Células vivas	78,47	27,20	28,52	26,30	28,66
Células em fase inicial de apoptose	2,29	49,70	57,11	56,38	46,99
Células em fase final de apoptose	9,55	19,60	7,16	14,09	18,12
Células necróticas	9,69	3,49	7,21	3,23	6,23

3.1.3 Cinética de internalização e curva dose-resposta com DCs e o isolado II

Uma vez que os ensaios de internalização (de duração de 1h ou 24h) revelaram uma baixa eficiência de internalização e/ou uma elevada morte celular, tornou-se pertinente fazer uma curva de cinética de internalização com vista a esclarecer qual seria o tempo de incubação correspondentes ao máximo de internalização. Por outro lado, fez-se também uma curva dose-resposta, com suspensões dos isolados bacterianos ajustados a várias OD₆₄₀, para otimizar também este parâmetro. As curvas foram realizadas com o isolado II devido a ter sido o isolado com mais internalização nos ensaios anteriores

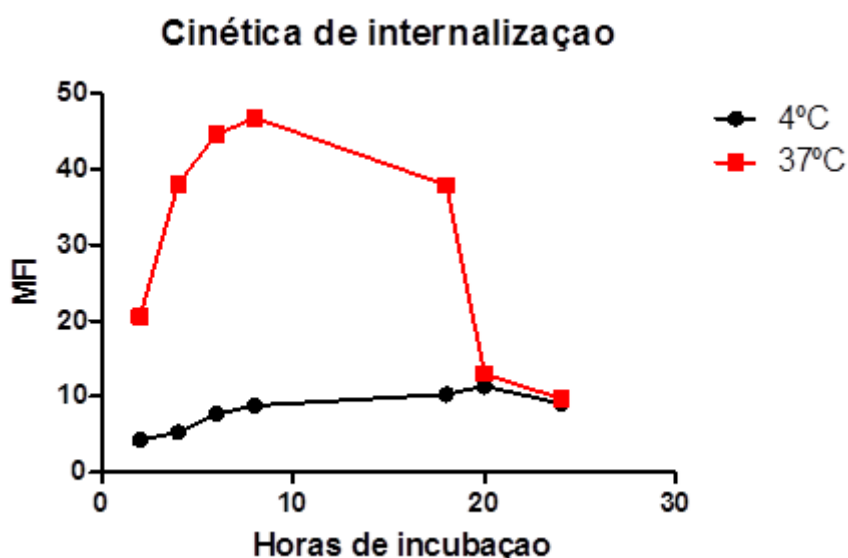


Figura 3.5 – Curva de cinética de internalização com DCs com o isolado II, por citometria de fluxo (n=1)

A partir da análise da curva de cinética de internalização verificou-se que até às 8 horas de incubação há um aumento da internalização (Fig. 3.5). A diferença de internalização entre as 6 e as 8 horas é mínima (valores de MFI: 44,55 e 46,75, respectivamente), e tendo em consideração que às 6 horas de incubação existe menos morte celular, esse foi o tempo escolhido para todos os restantes ensaios, dado ser o melhor compromisso.

As DCs foram incubadas com diferentes ODs₆₄₀ do isolado II (0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2), e da observação da curva (Fig. 3.6), o pico de internalização ocorreu com a OD₆₄₀ de 1,5 (valor de MFI 32,853).

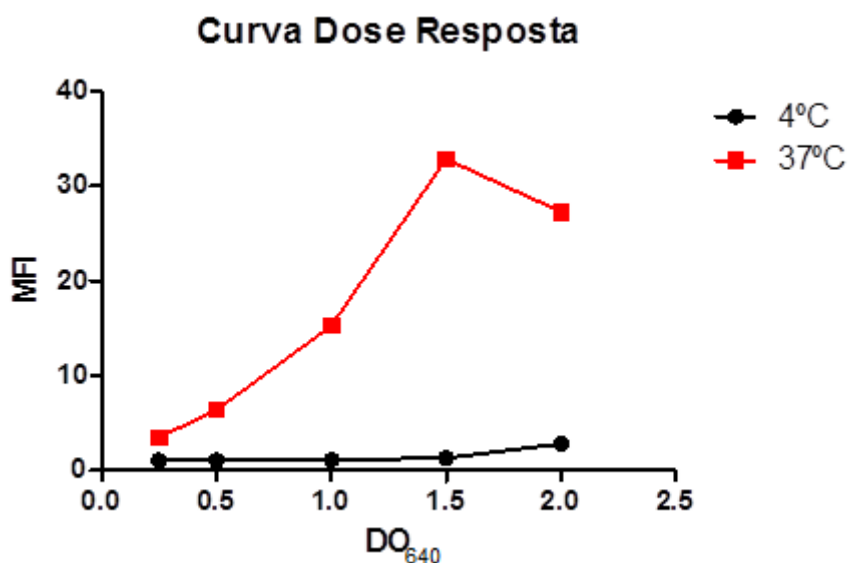


Figura 3.6 – Curva de cinética de internalização com DCs com o isolado II, por citometria de fluxo (n=1)

A partir desta fase do trabalho, optou-se também por focar o trabalho apenas nas DCs, daí que todos os ensaios que a seguir se apresentam foram realizados apenas com estas células.

3.1.4 Internalização dos isolados clonais de *B. cenocepacia* por DCs e verificação da viabilidade celular

Uma vez estabelecidos o tempo de incubação e a OD₆₄₀ (6h de tempo de incubação e OD₆₄₀ de 1,5), avaliou-se comparativamente a internalização dos 4 isolados de *B. cenocepacia* pelas DCs. Mais uma vez se verificou que quase a totalidade das células internalizou os isolados, não havendo diferenças apreciáveis entre isolados (Fig. 3.7). A percentagem das DCs que internalizaram o isolado I foi de 91,72% ± 3,551, 90,1% ± 2,768 internalizaram o isolado II, 88,21% ± 3,560 internalizaram o isolado III e 89,98% ± 3,844 internalizaram o isolado IV.

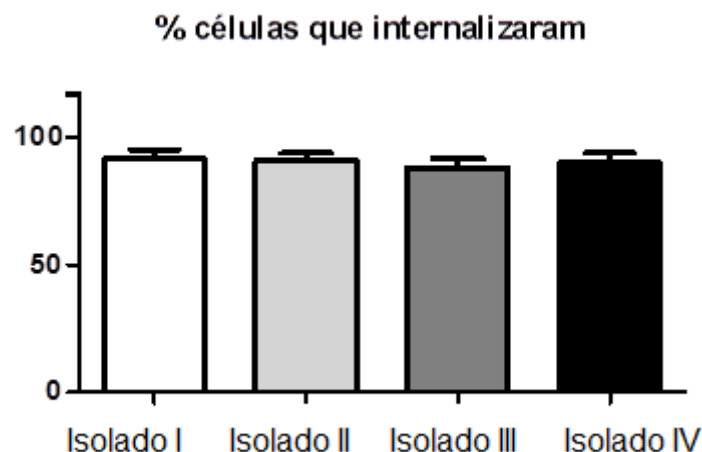


Figura 3.7 - Análise por citometria de fluxo da percentagem de DCs que internalizaram os isolados I, II, III e IV de *B. cenocepacia* após 6 horas de incubação (n=4)

Após as 6 horas de incubação, o isolado que apresentou a maior quantidade de bactérias internalizadas pelas DCs foi o isolado I, seguido do isolado III. O isolado menos internalizado foi o último isolado recolhido do doente, o IV (Fig. 3.8). Os valores de MFI foram de $4,67 \pm 1,664$ para o isolado I, $3,2 \pm 0,973$ para o isolado II, $3,94 \pm 0,903$ para o isolado III e $2,846 \pm 0,846$ para o isolado IV, o que significa que, para o isolado I houve um aumento em 467% de internalização, para o isolado II houve um aumento em 320% de internalização, para o isolado III houve um aumento em 394% e para o isolado IV houve um aumento em 284%, sempre em relação ao controlo negativo a 4°C). Observou-se que, contrariamente ao que foi observado no ensaio com 1 hora de internalização, o isolado I foi mais internalizado que o isolado II. De facto, ocorreu um evidente decréscimo na internalização desde o primeiro isolado, apesar de não ser uma diminuição estatisticamente significativa, com o isolado IV a ser o menos internalizado de todos.

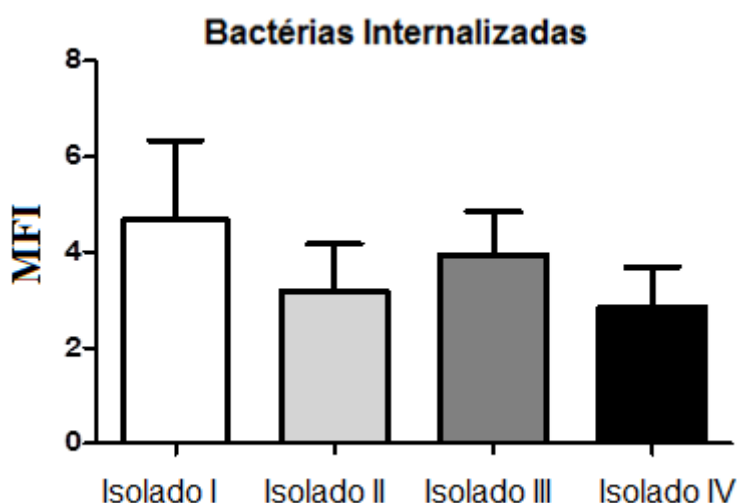


Figura 3.8 - Análise por citometria de fluxo da internalização dos isolados I, II, III e IV de *B. cenocepacia* por DCs após 6 horas de incubação (n=4). A normalização dos valores de MFI foi realizada da seguinte forma: $(\text{MFI } 37^{\circ}\text{C} - \text{MFI controle } 4^{\circ}\text{C}) / (\text{MFI controle } 4^{\circ}\text{C})$

Na sequência dos ensaios de internalização de 6 horas, foi também verificada a viabilidade celular das DCs por microscopia óptica (Tabela 3.3). Em relação ao controle (DCs cultivadas nas mesmas condições mas sem bactérias) as DCs sofrem uma diminuição na percentagem de células vivas mas muito ténue, sendo que no controlo a percentagem de células vivas está perto dos 90% e o valor mais baixo nas incubações com os isolados é de 80,66% (para o isolado III).

Tabela 3.3 – Resultados do ensaio de verificação da viabilidade celular de DCs incubadas 6 horas com cada um dos isolados, e sem incubação com bactérias – controlo negativo (n=2)

DCs	Sem bactérias	I	II	III	IV
Total de células	264	132	163	121,5	128
Total de células vivas	237	108	137	98	105,5
Percentagem de células vivas	89,77	81,82	84,05	80,66	82,42

3.2 Análise da expressão genética de citocinas a partir de DCs na presença de 4 isolados clonais de *B. cenocepacia*

A expressão das citocinas produzidas pelas DCs após serem expostas a cada um dos 4 isolados foi analisada a nível genético. Para tal teve-se em conta o número de moléculas de mRNA do gene da citocina em questão por 1000 moléculas do gene do controlo endógeno, β -actina. Foi analisada a expressão das citocinas IL 1 β , IL 23, IL 10, IL 12, IL 6, TGF- β e TNF- α . Para todos os ensaios existe um controlo negativo, ou seja, sem incubação com bactérias.

Embora não estatisticamente significativa, o isolado I induziu menor expressão de citocinas pelas DCs, em comparação com os outros isolados e para todas as citocinas. No caso das citocinas pro-inflamatórias, a quantidade relativa de mRNA das DCs do controlo em comparação com a das DCs incubadas com o isolado I foram sempre maiores, excepto para a citocina IL 1 β . Na citocina IL 6 o valor foi também maior, embora tenha sido muito próximo. Os isolados que provocaram a maior expressão de citocinas por parte das DCs foram os isolados II e IV. De um modo geral, o isolado IV foi o que promoveu a maior expressão de citocinas pro-inflamatórias por parte das DCs, excepto no caso da citocina IL 12. No caso da citocina IL 1 β os valores foram bastante próximos. A citocina pro-inflamatória menos produzida foi a IL 12 e as mais produzidas foram a IL 1 β e TNF- α (Fig. 3.10).

O perfil de expressão para as citocinas anti-inflamatórias é semelhante entre si, excepto no caso do primeiro isolado, que promove uma maior expressão de citocinas em relação ao controlo na citocina IL 10 e menor expressão no caso da citocina TGF- β . O isolado que provocou a maior expressão de citocinas foi o isolado II em ambas as citocinas anti-inflamatórias analisadas, seguido desta vez pelo isolado III. A quantidade relativa de expressão de TGF- β foi bastante superior à de IL 10 (Fig.3.9).

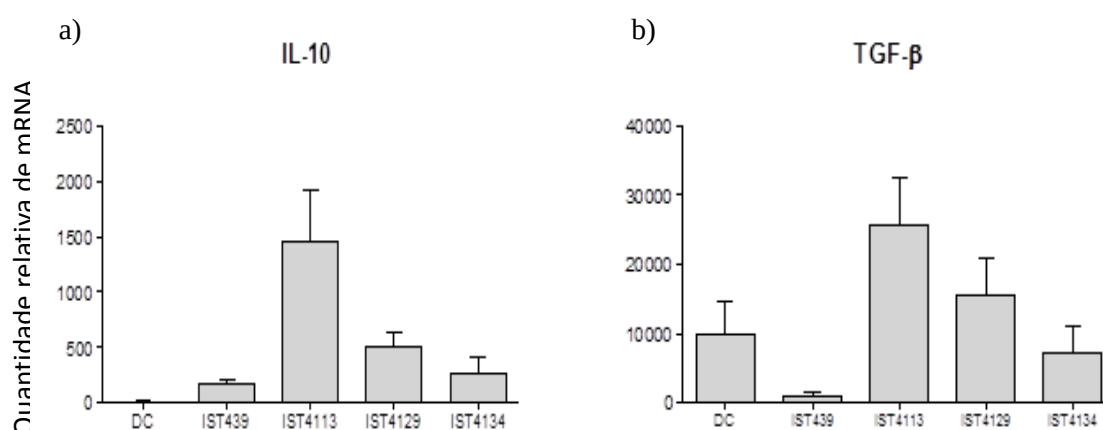


Figura 3.9 - Análise dos níveis de mRNA dos genes das citocinas IL 10 (a) e TGF- β (b) nas DCs sem incubação com bactérias (DCs) e incubadas com os isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134), durante 6 horas, por RT-PCR (n=3)

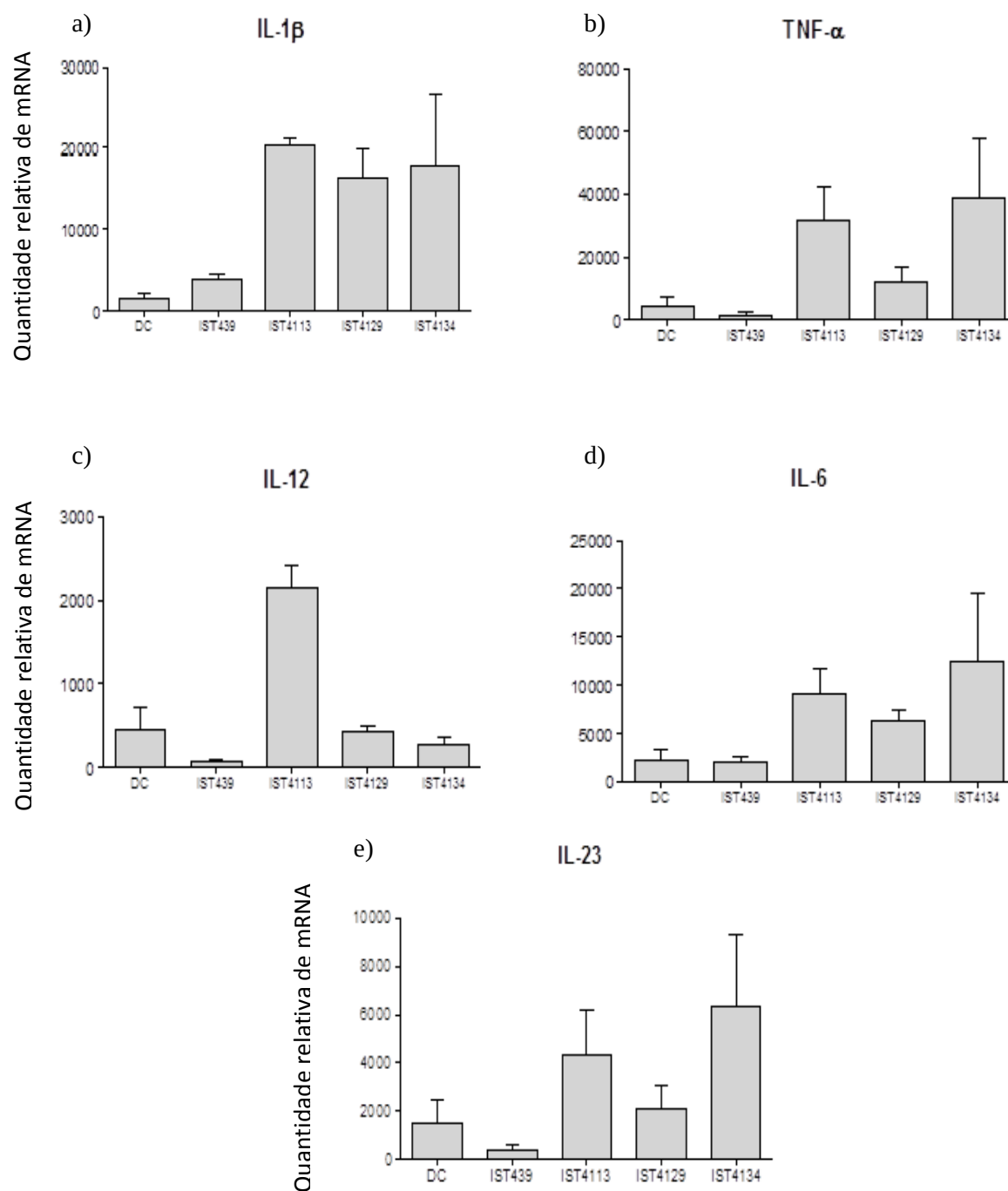


Figura 3.10 - Análise dos níveis de mRNA dos genes das citocinas IL 1 β (a), TNF- α (b), IL 12 (c), IL 6 (d) e IL 23 (e) nas DCs sem incubação com bactérias (DCs) e incubadas com os isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134) durante 6 horas, por RT-PCR (n=3)

3.3 Avaliação da influência de isolados clonais de *B. cenocepacia* na maturação das DCs

As DCs que internalizaram os isolados de *B. cenocepacia* ao fim do período de incubação de 6 horas foram analisadas relativamente à expressão das moléculas co-estimulatórias, o dímero CD80/CD86 e da molécula de HLA-DR. As DCs apresentam um nível basal de expressão destas moléculas na sua superfície celular, e o seu estado de maturação está associado à maior expressão das mesmas. Para verificar esse nível basal, realizou-se um controlo negativo de DCs incubadas na ausência de bactérias, e no caso da moléculas de HLA-DR, para haver termo de comparação, foi incluído um controlo positivo, a estirpe de *E.coli* K12, para a qual se sabe que a DC responde aumentando significativamente a expressão destas moléculas.

No caso das moléculas co-estimulatórias (Fig. 3.11), verifica-se que a expressão do por DCs incubadas com o primeiro e segundo isolado (I e II, respectivamente) aumenta um pouco em relação ao controlo negativo, e nos restantes isolados, apresenta uma ligeira diminuição relativamente ao controlo. Os valores de MFI para o CD80 foram de $14,52 \pm 0,185$ para o controlo, $15,98 \pm 1,41$ para o isolado I, $15,19 \pm 0,1$ para o isolado II, $14,12 \pm 0,165$ para o isolado III e $14,4 \pm 0,125$ para o isolado IV. Para o CD86 verifica-se que o primeiro isolado (I) não alterou praticamente a expressão de CD86, que existe uma diminuição no segundo isolado (II) e terceiro isolado (III). O último isolado (IV) é o que causa menor expressão de CD86. Visto que os valores de MFI para o CD86 pareciam indicar duas populações (uma com valores mais elevados de fluorescência) e por forma a tornar evidentes as diferenças referidas, e diminuindo o erro padrão associado, foi realizada uma análise aos valores mais positivos também (ver Anexo IV). Assim, os valores de MFI após a análise á população mais positiva para o CD86 foram $1770,03 \pm 73,855$ para o controlo, $1688,11 \pm 183,205$ para o isolado I, $1603,37 \pm 16,71$ para o isolado II, $1600,01 \pm 115,42$ para o isolado III e $1474,47 \pm 15,025$ para o isolado IV.

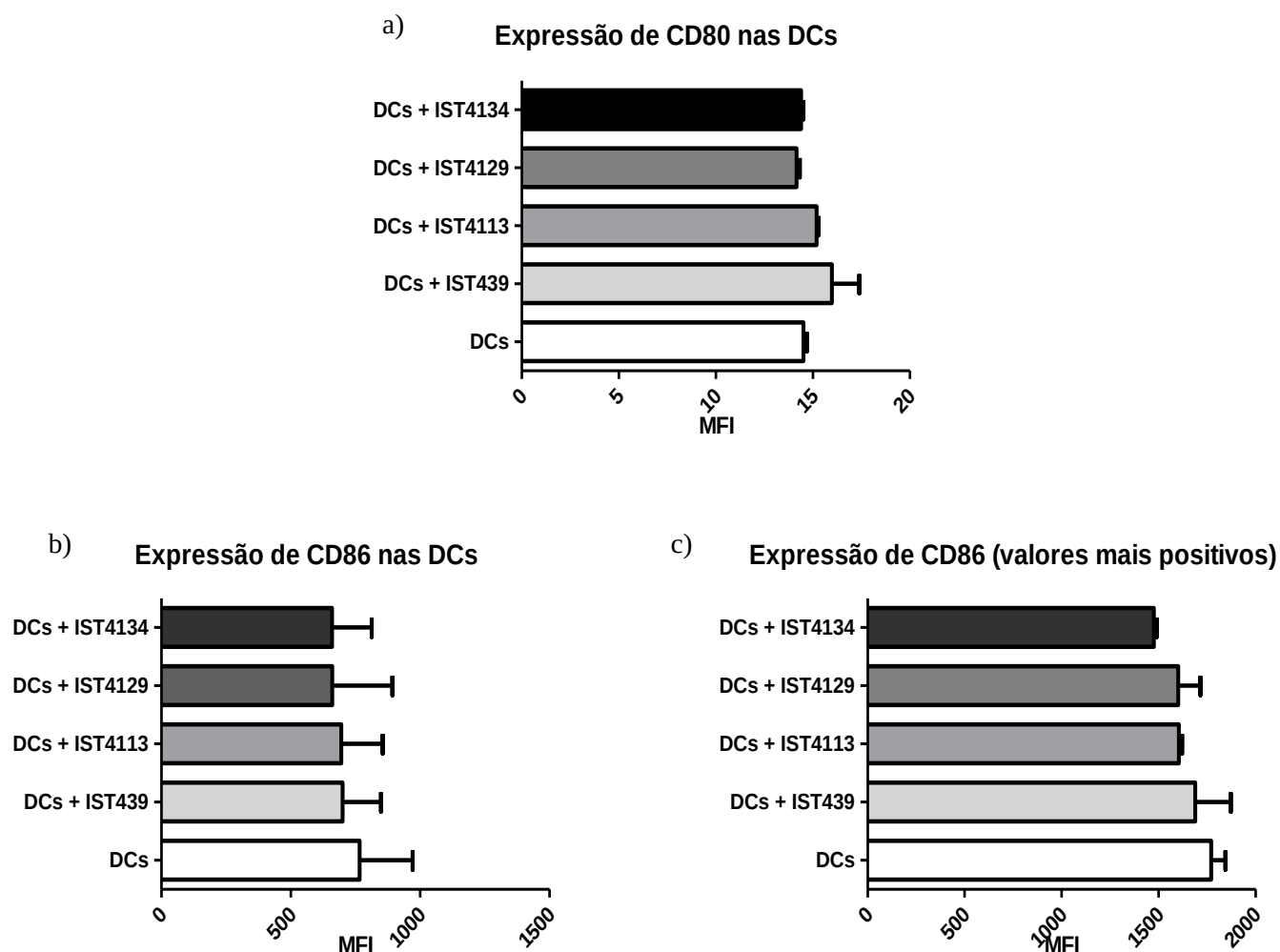


Figura 3.11 - Análise dos valores de MFI obtidos, resultantes da marcação com os anticorpos anti-CD80 (a) e anti-CD86 (b e c) de DCs sem bactérias e de DCs que estiveram em co-cultura com os isolados isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134), pelo período de 6 horas (n=2)

A diminuição na expressão da molécula de HLA-DR nas DCs incubadas com os 4 isolados em comparação com a expressão de HLA-DR nas DCs incubadas com o controlo positivo, por outro lado, mostrou ser estatisticamente significativa (Fig. 3.12). O isolado que causou menor expressão da molécula de HLA-DR foi o último, IV, seguido do segundo, II. O primeiro isolado praticamente mantém inalterada a expressão de HLA-DR verificada no controlo (como aconteceu para o CD86) e o isolado III leva a uma expressão um pouco maior que os isolados anterior e seguinte. Todos estes valores de expressão estão, no entanto, bastante abaixo do valor do controlo positivo. Os valores de MFI foram $255,82 \pm 72,554$ para o controlo negativo, $264,45 \pm 91,306$ para o isolado I, $189,36 \pm$

85,599 para o isolado II, $203,40 \pm 80,929$ para o isolado III, $167,42 \pm 64,454$ para o isolado IV e $434,57 \pm 93,79$ para o controlo positivo.

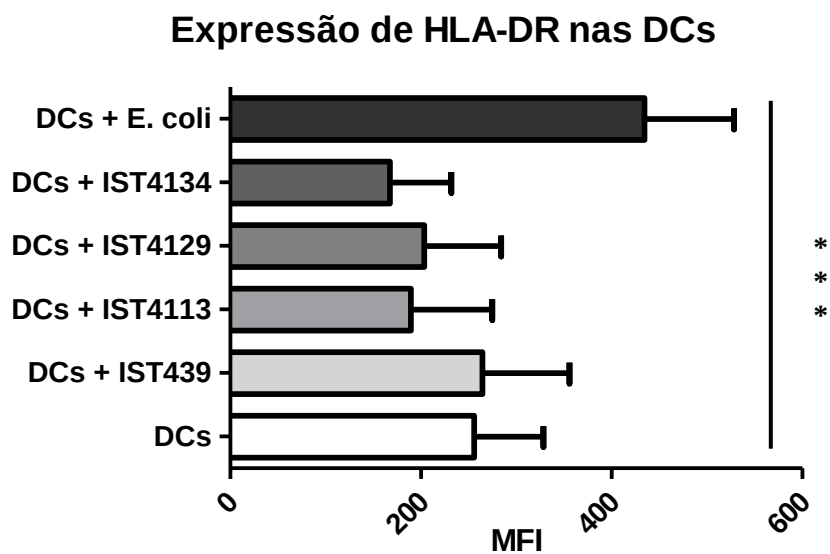


Figura 3.12 - Análise dos valores de MFI obtidos, resultantes da marcação com o anticorpo anti-HLA-DR de DCs sem bactérias e de DCs que estiveram em co-cultura com os isolados isolados I (IST439), II (IST4113), III (IST4129) e IV (IST4134) e *E.coli* K12, pelo período de 6 horas (n=3). Valor estatisticamente significativo: *** significa $p < 0,0001$

4. Discussão

Os doentes com FQ estão mais susceptíveis a infecções respiratórias, e as complicações que daí advêm são a causa de grande parte do agravamento da doença levando à morte precoce nestes doentes (Cunha, M. V. *et al*, 2007). Este facto levou a que os organismos que habitualmente causam infecção nas vias respiratórias se tornassem alvo de estudos, e mais recentemente a interacção entre hospedeiro e agente infeccioso tem ganho bastante atenção.

Torna-se imprescindível perceber como é que a resposta imunitária dos doentes de FQ pode estar alterada, no caso das infecções provocadas por estes microrganismos, nomeadamente ao nível dos elementos que fazem a ponte entre a resposta inata e a resposta adaptativa.

4.1 Isolados II e IV são menos internalizados pelas DCs, após 6 horas de incubação

A maioria dos estudos realizados sobre o escape imunológico do Complexo *B. cepacia* envolve macrófagos. Os estudos realizados no decorrer deste trabalho com macrófagos compreenderam apenas dois tempos de incubação, 1 e 24 horas. Pela primeira vez foi comparada a internalização de *B. cenocepacia* por macrófagos e DCs. É de salientar que, de um modo geral, as DCs internalizaram mais que os macrófagos. Toda a população de células incubada com as bactérias reconheceu-as e internalizou-as, apesar de a percentagem de macrófagos que internalizou ter sido um pouco menor que a percentagem de DCs. As diferenças, no entanto, foram mínimas, e talvez tenham-se devido simplesmente à mobilidade celular, sendo que as DCs não são aderentes, ao contrário dos macrófagos, e estando as bactérias vivas, a interacção com as DCs seria mais dinâmica (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008). Este é um importante factor a ter em conta na consideração dos resultados deste trabalho, visto terem sido sempre usadas bactérias vivas.

O isolado II foi o mais internalizado ao fim de 1 hora de incubação, em comparação com o isolado I, cenário que se altera ao fim de 6 horas, em que este isolado foi o menos internalizado juntamente com o isolado IV. Estes isolados menos internalizados são, também, os que apresentam características fenotípicas indicadoras de uma maior virulência para o hospedeiro, sendo que o isolado II é dos mais resistentes a antibióticos, tem mais capacidade de crescer em biofilme e na ausência de ferro e tem menor mobilidade (especialmente em comparação com o primeiro isolado, que tem valores menores para todos estes factores). O isolado IV apresenta um padrão semelhante ao do isolado II (Coutinho, C. P. *et al*, 2011b). Estudos recentes do grupo do Instituto Superior Técnico sobre o proteoma destes isolados estão a revelar que os isolados II e IV apresentam perfis de expressão proteica idênticos, sendo que o isolado II apresenta um perfil de expressão genética alterada em relação ao primeiro isolado e sendo a capacidade de invasão algo comum entre os isolados II e IV (importante especialmente para o último que terá sido o que causou o síndrome da cepacia). São semelhantes também os isolados I e III, com características fenotípicas indicadoras de uma menor virulência para o

hospedeiro (dados não apresentados). A comparação efectuada entre o proteoma dos dois primeiros isolados apenas corroborou a diferença observada de virulência entre os mesmos, em que o isolado II apresenta, por exemplo, uma menor expressão de alguns componentes do LPS (importante para evitar o reconhecimento pelo sistema imunitário), maior expressão de enzimas de síntese de nucleotídeos (mais activo transcripcionalmente). Por outro lado, é interessante que o isolado I tem uma maior expressão de duas enzimas envolvidas no metabolismo das poliaminas, que são moléculas envolvidas, entre outras coisas, no escape aos fagolisossomas (Madeira, A. *et al.*, 2011).

Nos estudos de internalização realizados neste trabalho não se efectuaram ensaios que permitissem distinguir entre internalização (a célula dendrítica ou o macrófago a reconhecerem e endocitarem a bactéria) de invasão (a bactéria a penetrar na célula dendrítica ou no macrófago). Pode ter ocorrido um destes fenómenos ou os dois. Visto que os isolados com maior capacidade invasiva são os menos internalizados, pode ser que tenha havido uma prevalência da internalização sobre a invasão. Em termos de escape imunológico faz sentido que tal aconteça, ou seja, que as bactérias mais virulentas e com maior capacidade de invasão invadam as células do epitélio apenas e evitem a internalização pelas células do sistema imunitário que as poderão destruir.

Provavelmente na primeira hora de incubação das DCs com as bactérias, as DCs tenham reconhecido e internalizado mais o isolado II, devido a este, em comparação com o isolado I, ser mais activo transcripcionalmente e, consequentemente, ter produzido mais factores de virulência e ter induzido, assim, uma maior inflamação (que de facto é comprovada às 6 horas de incubação, ver Resultados 3.2). O microambiente que poderá ter sido causado à partida por este isolado pode ter feito com que as DCs (e macrófagos) o reconhecessem primeiro e esse ser o motivo para no começo este ter sido o mais internalizado (Palucka, K. e Banchereau, J., 2002). Os dados de internalização após 24 horas de incubação foram menos claros de analisar devido à elevada morte celular verificada (ver Anexo III). O isolado 439 sofreu um aumento na sua internalização, por ambas as células, provavelmente por não ter tanta capacidade como o isolado 4113 para escapar à internalização, como será discutido à frente.

Após as 6 horas de incubação das DCs com as bactérias, existiu uma tendência na diminuição da internalização ao longo dos isolados, apesar de não significativa. Os isolados com o fenótipo indicador de maior virulência para o hospedeiro apresentaram a menor internalização por parte das DCs, e estas permaneceram viáveis na sua maioria ao fim desse período. O facto de as 6 horas serem o tempo de incubação óptimo e de a maioria das células estarem viáveis ao fim deste período poderá ser relevante tendo em conta um estudo realizado com macrófagos. Neste estudo, os macrófagos foram incubados com bactérias da espécie *B. cenocepacia* vivas e mostrou-se haver um atraso de 6 horas na associação do complexo NADPH oxidase com vacúolos contendo as bactérias internalizadas. Estes macrófagos produziram menos superóxido, sendo que este fenómeno pode ser o responsável pela ineficiente

eliminação destas bactérias, visto estas não serem eliminadas e permanecerem viáveis. Os macrófagos também permaneceram viáveis durante as 6 horas. (Lamothe, J. *et al*, 2007, Keith, K. E. *et al*, 2009).

A capacidade de evasão à internalização é uma característica bem documentada nas gram negativas. Por exemplo, *Yersinia enterocolitica* inibe a capacidade fagocítica das DCs através da injeção de proteínas efectoras no citoplasma da célula, pelo seu sistema de transporte, que interagem directamente com o citoesqueleto, nomeadamente com os filamentos de actina (Bedoui, S. *et al*, 2010). Um outro patogénio dos doentes de FQ e aparentado com o género *Burkholderia*, *Pseudomonas aeruginosa*, também consegue escapar à fagocitose através da superprodução de um exopolissacárido, conferindo-lhe um fenótipo mucóide, e através da perda de mobilidade conferida pelo flagelo (Cigana, C. *et al*, 2011, Amiel, E. *et al*, 2010). No caso da *B. cenocepacia*, o escape à internalização é conhecido, sobretudo no que diz respeito aos macrófagos. O seu LPS confere-lhe a capacidade de prevenir a fagocitose e está descrita a disrupção do citoesqueleto de actina através do seu sistema de transporte VI, impedindo assim, a fagocitose e a macropinocitose (Saldías, M. S. *et al*, 2009a, Flannagan, R. S. *et al*, 2011). Por outro lado, além de poder escapar à internalização, algumas espécies de *Burkholderia*, inclusive *B. cenocepacia* conseguem contornar a via endocítica pela qual seriam destruídas. Ao serem internalizadas mas não destruídas, podem assim ficar protegidas da terapia antimicrobiana e continuar a colonizar os pulmões dos doentes, levando, inevitavelmente, a uma maior e persistente inflamação dos tecidos com posterior destruição dos mesmos (Gong, L. *et al*, 2011, Ganesan, S. e Sajjan, U. S., 2012, Saldías, M. S. e Valvano, M. A., 2009b). À luz destas descobertas, tem sido sugerido que, tal como para outras bactérias, a internalização poderia ser um mecanismo de escape imunológico de *B.cenocepacia* (McKeon, S. *et al*, 2010b).

Estes estudos podem ajudar a explicar a tendência na diminuição da internalização verificada. Os isolados com o fenótipo de maior virulência possuem mais exopolissacárido e menos mobilidade que os restantes (sobretudo o primeiro), e como de comum à sua espécie, deverão possuir também os sistemas de transporte que permitem o escape através de proteínas injectadas no citoplasma das células. E tendo em conta o escape intracelular que estes microrganismos efectuem, poder-se-ia supor que é possível que o primeiro e o terceiro isolados, por não terem tantas defesas contra os fagócitos tenham sido internalizados, mas sobrevivido à morte intracelular, evoluindo depois para formas mais virulentas e capazes de evadir-se à internalização.

4.2 *B. cenocepacia* provoca morte celular em DCs e macrófagos essencialmente por apoptose

No decorrer deste trabalho, e sobretudo com os ensaios de internalização de 24 horas, verificou-se uma elevada morte celular, tanto em macrófagos como em DCs, que começou a ser estudada recorrendo aos marcadores de morte celular Anexina V e o corante 7-AAD.

Nos seus estudos com DCs, MacDonald e Speert verificaram, após um período de incubação com *B. cenocepacia* de 24 horas, a ocorrência de necrose. A incubação foi efectuada com bactérias vivas e ao fim das 24 horas bactérias foram encontradas associadas a células vivas e mortas. A incubação com bactérias mortas, sobrenadante do meio de crescimento das bactérias ou a espécie *B. multivorans* não provocou necrose (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008). Já havia sido comprovada necrose em neutrófilos, causada por *B. cenocepacia* viva e independente da activação de radicais de oxigénio para a sua destruição (Bylund, J. *et al*, 2005).

No entanto, os resultados desta parte do trabalho mostraram ter havido morte celular essencialmente por apoptose. Nos macrófagos encontra-se descrita a morte celular por apoptose provocada por *B. cenocepacia* (Kopp, B. T. *et al*, 2012). No caso de células epiteliais também está descrito morte celular por apoptose provocada por *B. cenocepacia*, sendo que o factor de virulência bacteriano responsável por essa morte foram os seus *pilus* (Cheung, K. J., 2007). Segundo os estudos de MacDonald e Speert, parece que o mecanismo causador de morte celular não passará por proteínas excretadas, visto que as incubações com apenas o sobrenadante do meio de crescimento das bactérias não resultaram em morte, levantando a hipótese de que talvez os factores usados para causar a morte (por exemplo, enzimas proteolíticas) sejam produzidos no microambiente do fagossoma e injectados no citoplasma das células hospedeira (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008). Em macrófagos e neutrófilos infectados com vários tipos de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma virens*, *Candida albicans* e algumas espécies de *Penicillium* spp, a apoptose é desencadeada através da inibição da formação do complexo NADPH oxidase, que, como já referido, *B. cenocepacia* também tem a capacidade de causar (Tsunawaki, S. *et al*, 2004, van Baarlen, P. *et al*, 2007). Gram negativas como *Yersinia* spp também causam apoptose em macrófagos infectados através da injeção de proteínas efectoras pelo seu sistema de transporte do tipo III (Zhou, H. *et al*, 2005).

Não foram encontradas, nos ensaios de morte celular realizados, diferenças significativas entre os isolados. Contudo, parece ter havido mais morte com o isolado II e IV pelo menos nos macrófagos, sendo que estes entraram em apoptose mais cedo quando incubados com estes isolados (fase tardia de apoptose às 24 horas). A percentagem de necrose foi bastante baixa em comparação com a de apoptose nos dois tipos de células e as DCs parecem ter levado mais tempo a entrar em apoptose do que os macrófagos, tendo em conta que estavam na fase inicial da apoptose. Qualquer um dos

mecanismos de indução da apoptose sugeridos poderá ser empregue por estes isolados, mas estes resultados carecem de repetição para uma maior consolidação das conclusões, pois a indução de apoptose poderá ser umas das formas de *B. cenocepacia* escapar ao sistema imunológico.

4.3 Expressão diferencial de citocinas pelas DCs dependente do isolado

O ambiente pulmonar nos doentes com FQ é caracterizado por uma permanente infecção das vias respiratórias juntamente com uma resposta inflamatória exacerbada. A produção de citocinas, mediadoras do processo inflamatório, é essencial à resposta imunitária, mas se não regulada torna-se prejudicial, levando a danos nos tecidos (Bruscia, E. M. *et al*, 2009, Janssen, W. J. e Henson, P. M., 2012).

A estimulação da expressão de citocinas, sejam elas pro ou anti-inflamatórias, está relacionada com o reconhecimento de estímulos pelas células do sistema imunitário. No caso das bactérias Gram negativas, e mesmo da *B. cenocepacia*, o principal causador da produção de citocinas inflamatórias é o LPS, apenas superado pela infecção com bactérias vivas (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008). A flagelina também é importante na produção de citocinas pro-inflamatórias. O receptor que reconhece o LPS é o TLR4 (“Toll like receptor” 4), nas DCs e macrófagos, a flagelina é maioritariamente reconhecida pelo TLR5, e ambos levam à activação de factores de transcrição que levam à expressão de citocinas pro-inflamatórias como a IL 1 β , IL 6, IL 12, IL 23 e TNF- α nas DCs (Kawai, T. e Akira, S., 2006, Blohmke, C. J. *et al*, 2008). As citocinas anti-inflamatórias são essencialmente produzidas de forma a regular a resposta imunitária iniciada por alguma agente, especialmente se esta se torna exagerada. A citocina IL 10, por exemplo, também pode ser produzida por estimulação de receptores TLR nas células mielóides (Redford, P. S. *et al*, 2011) e também contribui para ajudar os linfócitos B a produzir imunoglobulinas (Fietta, P. e Delsante, G., 2009). Por outro lado, o TGF- β é uma citocina pleiotrópica que está envolvida na regulação de inúmeros processos no nosso organismo, desde o desenvolvimento embrionário. É uma citocina maioritariamente regulatória e anti-inflamatória, expressa ubiquamente. Alterações pontuais no microambientes levam a alterações na sua abundância e indução de uma resposta (Mantel, P. Y., 2011).

A contribuição das células do sistema imunitário e das células do próprio epitélio para a extrema inflamação pulmonar observada nestes doentes tem sido bastante estudada, sendo que todas estas células contribuem para a inflamação. As células epiteliais reconhecem componentes bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia* pelos seus receptores TLR e expressam citocinas pro-inflamatórias (Blohmke, C. J. *et al*, 2008). Infiltrações de neutrófilos no tecido pulmonar são comuns, bem como a sua continuada e grande produção de citocinas pro-inflamatórias (Watt, A. P. *et al*, 2005, Bruscia, E. M. *et al*, 2009). A resposta provocada pelos macrófagos é também

essencialmente inflamatória e exagerada na presença de *B. cenocepacia* (Kopp, B. T. *et al*, 2012). Em macrófagos, a estimulação com *B. cenocepacia* com um LPS deficiente mostrou a contribuição deste elemento para a inflamação, sobretudo mediada pelo receptor TLR4, levando à produção de IL 1 β (Kotrange, S. *et al*, 2011). A expressão de IL 12 e IL 23 também está dependente deste receptor (sendo de notar que estas duas citocinas partilham uma subunidade, a p40). Quanto às células dendríticas, também foi descrita a produção elevada de citocinas pro-inflamatórias quando infectadas com *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, sendo que a primeira estimula uma maior produção de citocinas, o que é consistente com resultados anteriores que mostram que o LPS desta espécie promove uma maior inflamação (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008, McKeon, S. *et al*, 2010b, De Soysa, A. *et al*, 2004).

Nesta parte do trabalho os resultados obtidos vão portanto de encontro ao esperado, sobretudo quanto aos isolados II e IV, visto se tratarem da espécie *B. cenocepacia* e serem os com características de maior patogenicidade. Demonstrou-se que estes isolados provocam uma enorme expressão de citocinas pro-inflamatórias nas DCs. A diferença entre os valores de expressão de citocinas nas DCs não incubadas com bactérias e nas DCs incubadas com cada um dos isolados não se mostrou significativa, provavelmente devido ao erro associado. O erro associado a cada um dos ensaios deve-se primariamente à grande variabilidade intrínseca de indivíduo para indivíduo, fazendo que o tipo de resposta possa ser bastante diferente. Para combater este efeito mais ensaios deveriam ser realizados. Ainda assim, mostrou-se evidente a tendência para o isolado IV estimular a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, excepto no caso da citocina IL 12, que foi a menos produzida também das citocinas pro-inflamatórias. O primeiro isolado não apresentou valores acima dos valores de controlo para nenhuma das citocinas excepto as citocinas IL 1 β e IL 10 que induziu um pouco mais de expressão que no controlo, não tendo portanto grande capacidade de induzir uma resposta inflamatória ou supressora. O isolado mais semelhante ao primeiro, o isolado III, apresentou sempre valores superiores aos do primeiro isolado e aos do controlo. O segundo isolado induziu mais inflamação que o isolado anterior e seguinte, mas sempre menos que o isolado IV, excepto no caso da citocina IL 12 como já referido e no caso das citocinas anti-inflamatórias. Dada esta distribuição, é interessante um estudo recente com outra gram negativa, *Helicobacter pylori*, que relaciona a produção de citocinas inflamatórias por DCS (IL-12, TNF- α , IL-6 e IL 1 β) com os efeitos clínicos de cada estirpe no fenótipo clínico do hospedeiro (Andres, S. *et al*, 2011). Tendo em conta as alturas em que cada isolado em estudo foi recolhido, parece que uma correlação também pode ser traçada como foi no estudo com *H. pylori*, visto que de um modo geral, os isolados mais patogénicos são os que apresentam a maior estimulação de citocinas. É possível que estes isolados, sobretudo os isolados II e IV, por estarem mais activos em termos de produção de proteínas e factores de virulência, produzam elementos que estimulem ainda mais a resposta por parte das DCs. As citocinas IL 1 β , TNF- α e IL 6 (as citocinas pro-inflamatórias mais produzidas pelas DCs nestes ensaios) são citocinas que se sabe estarem

extremamente presentes na inflamação dos pulmões de doentes de FQ (Blohmke, C. J. *et al*, 2008). Estas foram as citocinas pro-inflamatórias expressas em maior quantidade pelas DCs incubadas com os isolados II e IV, sendo que destes o isolado IV foi o que induziu mais expressão, o que deixa perceber o estado deteriorado do pulmão do doente pouco antes da sua morte pelo síndrome da cepacia.

A expressão da citocina IL 12 leva a um tipo de resposta T_{H1} , e a expressão das citocinas IL 6, IL 23 e TGF- β são essenciais ao estabelecimento de uma resposta T_{H17} (ver Introdução 1.2.2). Ambas seriam adequadas ao combate de patógenos bacterianos (Korn, T. *et al*, 2009). É possível que esse seja o motivo de o TGF- β , apesar de ser uma citocina anti-inflamatória, ter sido tão expressa. A citocina IL 10 também se encontrou expressa, apesar de em menos quantidade que a TGF- β . Ainda que quando estimuladas com microrganismos patogénicos apresentem um fenótipo mais pró-inflamatório, as DCs muitas vezes também expressam esta citocina quando estimuladas com bactérias, pois de facto verificou-se isso com DCs estimuladas com outras gram negativas (Larsen, J. M. *et al*, 2012). Visto que a activação dos receptores TLR também levam à produção de IL 10, e estes reconhecem vários componentes bacterianos, a presença destes componentes pode levar à expressão de IL 10. Diferenças a nível da estrutura do LPS, sobretudo do lípido A, parecem determinantes da actividade biológica gerada e podem levar a uma maior estimulação dos dois tipos de resposta, pro e anti-inflamatória (Larsen, J. M. *et al*, 2012). Esta pode ser uma hipótese válida, visto que a importância do lípido A na estimulação de inflamação por *B. cenocepacia* encontra-se bem estabelecida (De Soysa, A. *et al*, 2004). Em macrófagos e em DCs também já foi verificada a produção de IL 10 simultaneamente à de citocinas pro-inflamatórias após co-cultura com *B. cenocepacia*, por isso, não é inesperado (Karlsson, H. *et al*, 2004, MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008, Kopp, B. T. *et al*, 2012).

Observou-se que os isolados menos internalizados de um modo geral são os que induzem maior expressão de citocinas pelas DCs. Este facto não é contraditório tendo em conta a variedade e receptores das DCs, sendo que uns têm função de maioritariamente promover a internalização e a via endocítica (Steinman, R. M. *et al*, 2003) e outros a especialmente a via de produção de citocinas (como os TLR) (Kawai, T. e Akira, S., 2006). É muito provável que, estando a bactéria viva, haja interacção com vários dos receptores e por isso diferentes vias sinalizadoras activadas, levando a que a mesma bactéria seja pouco internalizada mas promova muita produção de citocinas (Karlsson, H. *et al*, 2004).

Visto que o estudo efectuado analisou apenas expressão genética de citocinas induzida nas DCs por cada um dos isolados nada se pode concluir a respeito da libertação destes citocinas para o meio extracelular.

4.4 *B. cenocepacia* tem capacidade de modular a maturação das DCs

Nesta parte do trabalho foi analisada a indução de maturação das DCs após co-cultura com os 4 isolados de *Burkholderia cenocepacia* por 6 horas. Verificou-se que as DCs não apresentam aumento da expressão dos marcadores de maturação na presença de *Burkholderia cenocepacia*. No caso das moléculas co-estimulatórias não houve um aumento de expressão (tirando um ligeiro aumento no caso do CD80 e do isolado I). Quanto à expressão de HLA-DR, a diminuição foi significativa, observando-se que o primeiro isolado induziu um pouco mais de expressão em relação ao controlo, o isolado II reprimiu a expressão, o isolado III voltou a induzir um pouco mais de expressão, ainda assim menor que o controlo negativo e o último isolado foi o que reprimiu mais a expressão de HLA-DR. Este último isolado induziu pouco mais de um quarto da expressão de HLA-DR que o controlo positivo (*E.coli* K12), que elevou a expressão desta molécula para quase o dobro do controlo negativo.

Estes resultados vão de encontro ao único estudo realizado para determinar a maturação de DCs na presença de *B. cenocepacia*, que demonstrou que esta espécie não induz um aumento de expressão das moléculas co-estimulatórias CD 80 e CD 86, ao contrário de *B.multivorans* (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008). Este é, no entanto, o primeiro estudo que mostra a evolução dessa inibição em isolados do mesmo indivíduo e é também o primeiro que mostra os efeitos na molécula apresentadora dos antígenos (HLA-DR).

A disrupção da maturação da célula dendrítica tem como consequência o comprometimento da resposta adaptativa. A apresentação de antígenos bacterianos pelas DCs às células T é mediada pela molécula de MHC (HLA) I e II, e necessita das moléculas co-estimuladoras e da expressão de citocinas (Lanzavecchia, A. e Sallusto, F., 2001). Para combater a *B. cenocepacia* (um patógeno que pode adoptar um estilo de vida intracelular (MacDonald, K. L. e Speert, D. P., 2008)) normalmente o tipo de resposta imunológica mais indicada é a resposta celular (resposta do tipo T_{H1}) ou T_{H17} . No entanto, anticorpos anti- *B. cepacia* (resposta humoral, tipo T_{H2}) foram já detectados em doentes infectados, provavelmente pela interacção com outras células que também tem a capacidade de apresentar antígenos, como os macrófagos (Hendry, J. *et al*, 2000). Quer para um tipo de resposta, quer para outro, é necessária uma eficiente activação das células T. Neste trabalho, apesar das DCs incubadas com alguns dos isolados de *B. cenocepacia* conduzirem ao aumento da expressão das citocinas que estimulam esta activação das células T, a fraca expressão de moléculas HLA-DR (MHC-II), que pode indicar uma menor capacidade de apresentação, e a deficiente co-estimulação, podem comprometer seriamente a promoção da resposta T (Lichtenegger, F. S. *et al*, 2012), pelo que a quebra da maturação das DCs poderá ser de facto um ponto fulcral de escape imunológico destas bactérias. Estudos mais aprofundados no que diz respeito à activação das células T deverão ser realizados num futuro próximo para melhor esclarecer esta situação.

Os mecanismos de repressão da maturação das DCs encontram-se estudados para outras bactérias. Por exemplo, a já referida *Yersinia enterocolitica*, através da libertação de proteínas no citosol da células pelo seu sistema de transtope III leva à não maturação das DCs e subsequente baixa de proliferação de células T (Autenrieth, S. E. *et al*, 2010). Citotoxinas podem ser usadas como no caso também de *Helicobacter pylori*, cuja citotoxina VacA (“vacuolating cytotoxin”) estimula ou restaura a actividade do factor de transcrição E2F1, que é um supressor da maturação das DCs e se encontra inactivado após a exposição destas a LPS (Fang, F. *et al*, 2010, Kim, J. M. *et al*, 2011). Outro possível alvo de proteínas efectoras para diminuir a maturação das DCs é a via de produção de radicais de oxigénio, que se sabe que *B. cenocepacia* consegue retardar a produção desses radicais, e mesmo que a actividade enzimática esteja intacta, esta bactéria consegue escapar a esses radicais pelo seu exopolissacárido, em macrófagos e neutrófilos (Bylund, J. *et al*, 2006, Keith, K. E. *et al*, 2009), podendo estes dados indicar que ela permanece na DC sem ser degradada e os seus antígenos apresentados. Estas hipóteses necessitam de mais investigação, tanto dos mecanismos utilizados por esta bactéria ao escape à maturação, bem como do que acontece à resposta T.

4.5 Perspectivas futuras

Vários estudos têm sido realizados para tentar perceber a infecção e a resposta imunitária ao Complexo *B. cepacia*, mas pouco ainda se sabe. A maioria dos estudos envolve macrófagos, neutrófilos e as células epiteliais dos pulmões. Sobre a resposta adaptativa e o papel das DCs nela muito pouco foi estudado ainda, sendo que este trabalho vem juntar-se aos poucos estudos já realizados na tentativa de elucidar um pouco a esse respeito. Algumas hipóteses foram levantadas ao longo desta dissertação que carecem de estudos adicionais para as comprovar.

Algo importante a estudar para entender a evolução de isolado para isolado seria verificar se existem diferenças na viabilidade e multiplicação intracelular das bactérias (ou seja, após internalização pelas DCs). Por outro lado, os ensaios de morte celular deveriam ser consolidados e, após a verificação estatisticamente relevante do mecanismo preferencial de indução de morte celular, investigar que proteínas podem estar por trás da indução de morte, bem como a sua expressão diferencial entre isolados. É de realçar que o proteoma destes isolados encontra-se em estudo pelo grupo da Professora Isabel Sá-Correia, e portanto algumas das hipóteses levantadas sobre factores de virulência que impedem a maturação, que induzem a morte, que promovem o escape à internalização e que medeiam a resposta inflamatória podem vir a ser confirmadas. Seria interessante, também, confirmar se a expressão de citocinas se traduz em efectiva exocitose da citocina e em que quantidades, pois se existir alguma alteração a esse nível poderia ser por acção da bactéria, estando ela a interagir de forma ainda mais complexa com as vias de produção de citocinas.

Depois de obtidas respostas por parte do proteoma, mais poderá ser elucidado sobre os mecanismos que levam a cada um dos fenómenos observados, e como a bactéria foi evoluindo e se adaptando dessa forma ao ambiente pulmonar do hospedeiro. Estudos da resposta dos linfócitos T também seriam relevantes no sentido de perceber se de facto as DCs incubadas com *B. cenocepacia*, especialmente os isolados II e IV, apesar de estimularem a produção de citocinas, seriam de facto incapazes de activar uma resposta específica (T_h1 , T_h2 ou T_h17) devido à ineficiente apresentação antigénica, e co-estimulação, como sugerem os estudos de maturação.

4.6 Conclusões gerais

Este trabalho sugere que parte do sucesso na adaptação do Complexo *B. cepacia* ao ambiente pulmonar dos doentes de FQ e na infecção do mesmo passa também pela evolução nos mecanismos de escape imunológico desta bactéria, tendo sido o primeiro trabalho a abordar questões imunológicas em isolados clonais.

Focando a atenção na célula dendrítica, cuja resposta no âmbito da infecção por *B. cenocepacia* está muito pouco estudada, pode-se concluir que o isolado recolhido após uma intensa terapia antimicrobiana e o isolado recolhido antes da invasão e morte por síndrome da cepacia são os isolados que se distinguem pela maior afectação das funções das DCs. De facto, demonstrou-se que estes isolados são menos internalizados, estimulam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e maior supressão da sua maturação. Os nossos resultados sugerem ainda que a morte celular induzida por estas bactérias é provocada maioritariamente por apoptose. O primeiro isolado e um isolado intermédio entre os dois com mais características de patogenicidade, apesar de não induzirem propriamente maturação, a inibição da maturação causada é pouco relevante, induzem uma expressão de citocinas mais baixa que os restantes e são os mais internalizados. Estes factores poderão explicar as diferenças de patogenicidade entre os vários isolados clonais, através da subversão da resposta imune. Estes mecanismos de evasão imunitária poderão contribuir para uma melhor instalação da infecção, sendo que depois os mecanismos foram evoluindo de forma a evitar o seu reconhecimento e combate por parte química exterior (terapêutica) e por parte do próprio sistema imunitário.

5. Bibliografia

- Andres, S., Schmidt, H. M., Mitchell, H., Rhen, M., Maeurer, M., Engstrand, L. 2011. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61: 168-78
- Amiel, E., Lovewell, R. R., O'Toole, G. A., Hogan, D. A., Berwin, B. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression. *Infect Immun.* 78: 2937–2945
- Arora, P.K. e Jain, R.K. 2012. Metabolism of 2-Chloro-4-Nitrophenol in a Gram Negative Bacterium, *Burkholderia* sp. RKJ 800. *PLoS ONE* 7: e38676
- Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H. D. 2003. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. *Pharmacol. Rev.* 55: 241-269
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Thickett, K. M., Honeybourne, D., Maiden, M. C., Govan, J. R., Speert, D. P., Lipuma, J. J., Vandamme, P., Dowson, C. G. 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 43: 4665-73
- Bartpho, T., Wongsurawat, T., Wongratanacheewin, S., Talaat, A. M., Karoonuthaisiri, N., Sermswan, R. W. 2012. Genomic Islands as a Marker to Differentiate between Clinical and Environmental *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS ONE* 7: e37762
- Bedoui, S., Kupz, A., Wijburg, O. L., Walduck, A. K., Rescigno, M., Strugnell, R. A. 2010. Different Bacterial Pathogens, Different Strategies, Yet the Aim Is the Same: Evasion of Intestinal Dendritic Cell Recognition. *J Immunol* 184: 2237–2242
- Blohmke, C. J., Victor, R. E., Hirschfeld, A. F., Elias, I. M., Hancock, D. G., Lane, C. R., Davidson, A. G. F., Wilcox, P. G., Smith, K. D., Overhage, J., Hancock, R. E. W., Turvey, S. E. 2008. Innate Immunity Mediated by TLR5 as a Novel Antiinflammatory Target for Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Immunol* 180:7764-7773
- Bruscia, E. M, Zhang, P., Ferreira, E., Caputo, C., Emerson, J. W., Tuck, D., Krause, D. S., Egan, M. E. 2009. Macrophages Directly Contribute to the Exaggerated Inflammatory Response in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator -/- Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 40: 295–304
- Buchanan, P. J., Ernst, R. K., Elborn, J. S., Schock, B. 2009. Role of CFTR, *Pseudomonas aeruginosa* and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 863–867
- Burkholder, W.H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40: 115-117.

- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29: 23–39
- Bylund, J., Campsall, P.A., Ma, R.C., Conway, B.A., Speert, D.P. 2005. *Burkholderia cenocepacia* induces neutrophil necrosis in chronic granulomatous disease. *J Immunol* 174: 3562–3569
- Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., Speert, D.P. 2006. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 281: 2526-32
- Cabral, M. G., Piteira, A. R., Silva, Z., Ligeiro, D., Brossmer, R., Videira, P. A. 2010. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. *Immunol. Lett.* 131: 89–96
- Cheung, K. J., Jr, Li, G., Urban, T. A., Goldberg, J. B., Griffith, A., Lu, F., Burns, J. L. 2007. Pilus-mediated epithelial cell death in response to infection with *Burkholderia cenocepacia*. *Microbes Infect* 9: 829–837
- Cigana, C., Lorè, N. I., Bernardini, M. L., Bragonzi, A. 2011. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *J Biomed and Biotech* 2011: 1-10
- Clem, A. S. 2011. Fundamentals of Vaccine Immunology. *J Glob Infect Dis.* 3: 73–78.
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R.W., Lipuma, J.J. 2001. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427– 3436
- Coenye, T. e Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5: 719– 729
- Collins, F. S. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774-779
- Correia, S., Nascimento, C., Pereira, L., Cunha, M. V., Sá-Correia, I., Barreto, C. 2008. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port Pneumol* 14: 5–26
- Coutinho, C. P., Sá-Correia, I., Lopes, J. A. 2009. Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex from different species and ribopatterns. *Anal Bioanal Chem.* 394: 2161–2171
- Coutinho, C. P., Carvalho, C., Madeira, A., Pinto-de-Oliveira, A., Sá-Correia, I. 2011a. *Burkholderia cenocepacia* Phenotypic Clonal Variation during a 3.5-Year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient. *Infect Immun.* 79: 2950–2960

- Coutinho, C. P., Santos, S., Madeira, A., Mira, N. P., Moreira, A. S., Sá-Correia, I. 2011b. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. *FCIMB* 1: 12
- Cunha, M. V., Pinto-de-Oliveira, A., Meirinhos-Soares, L., Salgado, M. J., Melo-Cristino, J., Correia, S., Barreto, C., Sá-Correia, I. 2007. Exceptionally High Representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* Complex Isolates Recovered from the Major Portuguese Cystic Fibrosis Center. *J. Clin. Microbiol.* 45:1628-1633
- Curtsinger, J. M. e Mescher, M. F. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22: 333–340
- De Soysa, A., Ellis, C. D., Khan, C. M., Corris, P. A., Hormaeche, R. 2004. *Burkholderia cenocepacia* Lipopolysaccharide, Lipid A, and Proinflammatory Activity. *Am J Resp Critical Care Med* 170: 70–77
- Dong, H. P., Holth, A., Kleinberg, L., Ruud, M. G., Elstrand, M. B., Tropé, C. G., Davidson, B., Risberg, B. 2009. Evaluation of Cell Surface Expression of Phosphatidylserine in Ovarian Carcinoma Effusions Using the Annexin-V/7-AAD Assay. *Am J Clin Pathol* 132: 756-762
- Eisen, M. 2010. Qigong and the Immune System. *The Adaptive Immune System*. Part 13(b): 28
- Fang, F., Wang, Y., Li, R., Zhao, Y., Guo, Y., Jiang, M., Sun, J., Ma, Y., Ren, Z., Tian, Z, Wei, F., Yang, D., Xiao, W. 2010. Transcription factor E2F1 suppresses dendritic cell maturation. *J Immunol.* 184: 6084-91
- Fearon, D. T. e Locksley, R. M. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired Henneke immune response. *Science* 272: 50-54
- Fietta, P. e Delsante, G. 2009. The effector T helper cell triade. *Riv Biol.* 102: 61-74
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., Huynh, K. K., Plumb, J. D., Downey, G. P., Valvano, M. A., Grinstein, S. 2011. *Burkholderia cenocepacia* disrupts host cell actin cytoskeleton by inactivating Rac and Cdc42. *Cell Microbiol* 14: 239–254
- Ganesan, S. e Sajjan, U. S. 2012. Host evasion by *Burkholderia cenocepacia*. *Front Cell Infect Microbiol* 1: 25
- Gómez, M. e Prince, A. 2007. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7: 244–251

- Gong L., Cullinane M., Treerat P., Ramm G., Prescott M., Adler, B., Boyce, J. D., Devenish, R. J. 2011. The *Burkholderia pseudomallei* Type III Secretion System and BopA Are Required for Evasion of LC3-Associated Phagocytosis. *PLoS ONE* 6: e17852
- Hendry, J., Butler, S., Elborn, J. S., Govan, J. R., Nelson, J., Shale, D. J., Webb, A. K. 2000. Antibody response to *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis colonized with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect* 40: 164–170
- Henneke, P. e Golenbock, D. T. 2004. Phagocytosis, Innate Immunity, and Host–Pathogen Specificity. *J Exp Med* 199: 1-4
- Hofmeyr, S. A. e Forrest, S. 2000. Architecture for an Artificial Immune System. *Evolutionary Computation* 8: 443-473
- Idriss, H.T. e Naismith, J.H. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 50: 184-95.
- Jacquot, J., Tabary, O., Clement, A. 2008. Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8: 359–363
- Janssen, W. J. e Henson, P. M. 2012. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. *Toxicol Pathol* 40: 166-173
- Karlsson, H., Larsson, P., Wold, A. E., Rudin, A. 2004. Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells. *Infect. Immun.* 72: 2671-2678
- Kawai, T. e Akira, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Diff* 13: 816–825
- Keith, K. E., Hynes, D. W., Sholdice, J. E., Valvano, M. A. 2009. Delayed association of the NADPH oxidase complex with macrophage vacuoles containing the opportunistic pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Microbiol* 155: 1004–1015
- Kim, J. M., Kim, J. S., Yoo, D. Y., Ko, S. H., Kim, N., Kim, H., Kim, Y. J. 2011. Stimulation of dendritic cells with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin negatively regulates their maturation via the restoration of E2F1. *Clin Exp Immunol.* 166: 34-45
- Köhl, J. 2006. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol* 586: 71-94
- Kopp, B. T., Abdulrahman, B.A., Khweek, A.A., Kumar, S.B., Akhter, A., Montione, R., Tazi, M.F., Caution, K., McCoy, K., Amer, A.O. 2012. Exaggerated inflammatory responses mediated by

- Burkholderia cenocepacia in human macrophages derived from Cystic fibrosis patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 424: 221-7
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 485–517
- Kotrange, S., Kopp, B., Akhter, A., Abdelaziz, D., AbuKhweek, A., Caution, K., Abdulrahman, B., Wewers, M. D., McCoy, K., Marsh, C., Loutet, S. A., Ortega, X., Valvano, M. A., Amer, A. O. 2011. Burkholderia cenocepacia O polysaccharide chain contributes to caspase-1-dependent IL-1beta production in macrophages. *J. Leukoc.Biol.* 89: 481–488
- Lamothe, J., Huynh, K. K., Grinstein, S., Valvano, M. A. 2007. Intracellular survival of Burkholderia cenocepacia in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. *Cell Microbiol* 9: 40–53
- Lanzavecchia, A. e Sallusto, F. 2001. The instructive role of dendritic cells on Tcellresponses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immun* 13: 291–298
- Larsen, J. M., Steen-Jensen, D. B., Laursen, J. M., Søndergaard, J. N., Musavian, H. S., Butt, T. M., Brix, S. 2012. Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. *PLoS ONE* 7: e31976
- Lasiglie`, D., Traggiai, E., Federici, S., Alessio, M., Buoncompagni, A., Accogli, A., Chiesa, S., Penco, F., Martini, A., Gattorno, M. 2011 Role of IL-1 Beta in the Development of Human TH17 Cells: Lesson from NLPR3 Mutated Patients. *PLoS ONE* 6: e20014
- Leitão, J., Sousa, S., Cunha, M., Salgado, M., Melo-Cristino, J., Barreto, M. C., Sá-Correia, I. 2008. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of Burkholderia cepacia complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 1101–1111
- Lichtenegger, F. S., Mueller, K., Otte, B., Beck, B., Hiddemann, W., Schende, D. J., Subklewe, M. 2012. CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-Like Receptor-Induced Dendritic Cells. *PLoS ONE* 7: e44266
- Liu, K. e Nussenzweig, M. C. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immun Rev* 234: 45-54
- Lynch, K. H. e Dennis, J.J. 2012. Cangene gold medal award lecture - Genomic analysis and modification of Burkholderia cepacia complex bacteriophages. *Can J Microbiol.* 58: 221-35

- MacDonald, K. L. e Speert, D. P. 2008. Differential modulation of innate immune cell functions by the *Burkholderia cepacia* complex: *Burkholderia cenocepacia* but not *Burkholderia multivorans* disrupts maturation and induces necrosis in human dendritic cells. *Cell Microbiol* 10: 2138–2149
- Madeira, A., Santos, P. M., Coutinho, C. P., Pinto-de-Oliveira, A., Sá-Correia, I. 2011. Quantitative proteomics (2-D DIGE) reveals molecular strategies employed by *Burkholderia cenocepacia* to adapt to the airways of cystic fibrosis patients under antimicrobial therapy. *Proteomics* 11: 1313–1328
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Vandamme, P. 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 51: 533-8.
- Mantel, P. Y., Schmidt-Weber, C. B. 2011. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol.* 677: 303-38.
- Mckee, S. A., Nguyen, D. T., Viteri, D. F., Zlosnik, J. E. A., Sokol, P. A. 2010a. Functional Quorum Sensing Systems are Maintained during Chronic *Burkholderia cepacia* Complex Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis* 203: 383–392
- Mckee, S. A., McClean, S., Callaghan, M. 2010b. Macrophage responses to CF pathogens: JNK MAP kinase signaling by *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharide. *Immunol Med Microbiol* 60: 36–43
- Murphy, K. 2011. Innate Immunity: The First Lines of Defense. *In* Janeway's Immunobiology.. 8^a ed., pp 37-7, Garland Science, New York
- Palucka, K. e Banchereau, J. 2002. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14: 420–431
- Rabb, H. 2002. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: Implications for the kidney. *Kidney Int* 61: 1935–1946
- Redford, P. S., Murray, P. J., O'Garra, A. 2011. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol.* 4: 261-70
- Robinson, J. 2004. Flow Cytometry. *In* Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (G. L. Bowlin; G. Wnek), pp. 630-640, Informa Healthcare
- Sabado R. L., Bhardwaj N. 2010. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy.* 2: 37-56

- Sajjan, U. S., Yang, J. H., Hershenon, M. B., LiPuma, J. J. 2006. Intracellular trafficking and replication of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Microbiol* 8: 1456–1466
- Sajjan, U. S., Carmody, L. A., Gonzalez, C. F., LiPuma, J. J. 2008. A Type IV Secretion System Contributes to Intracellular Survival and Replication of *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* 76: 5447–5455
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562
- Saldías, M. S., Ortega, X., Valvano, M. A. 2009a. *Burkholderia cenocepacia* O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *J Med Microbiol* 58: 1542–1548
- Saldías, M. S. e Valvano, M. A. 2009b. Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiol* 155: 2809–2817
- Savina, A. e Amigorena, S. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219: 143–156
- Sharpe, A. H. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229: 5–11
- Silva, Z., Konstantopoulos, K., Videira, P. A. 2011. The role of Sugars in Dendritic Cell Trafficking. *Ann Biomed Eng.* 40: 777-89
- Sokol, P. A., Sajjan, U. S., Visser, M. B., Gingues, S., Forstner, J., Kooi, C. 2003. The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiol* 149: 3649–3658
- Steinman, R. M., Hawiger, D., Nussenzweig, M. C. 2003. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711
- Strober, W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protocols Immunol.* 21:A.3B.1–A.3B.2
- Szatmari, I. e Nagy, L. 2008. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *The EMBO Journal* 27: 2353–2362
- Taylor, J. B., Hogue, L. A., LiPuma, J.J., Walter, M. J., Brody, S. L., Cannon, C. L. 2010. Entry of *Burkholderia* organisms into respiratory epithelium: CFTR, microfilament and microtubule dependence. *J Cystic Fibro* 9: 36–43.

- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3: 133-46
- Tsunawaki, S., Yoshida, L. S., Nishida, S., Kobayashi, T., Shimoyama, T. 2004. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun.* 72: 3373–3382
- Ursing, J.B., Rossello-Mora, R.A., Garcia-Valdes, E., Lalucat, J. (1995) A pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 604
- van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., Thomma, B. 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol Rev.* 31: 239-77
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J. R. W. 1997. Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1188-1200
- Vandamme, P. e Dawyndt, P. 2011. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 34: 87– 95
- van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. e van Dongen, J.J. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 17:1013-34
- Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W., Erhard, M., Sutton, H., Dare, D., Devreese, B., Samyn, B., Vandamme, P. (2008) Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J Microbiol Meth* 75: 279–286.
- Vasta, G. R., Ahmed, H., Nita-Lazar, M., Banerjee, A., Pasek, M., Shridhar, S., Guha, P., Fernández-Robledo, J. A. 2012. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front Immunol.* 3: 199
- Videira, P. A., Amado, I. F., Crespo, H. J., Alguero, M. C., Dall'Olio, F., Cabral, M. G., Trindade, H. 2008. Surface alpha 2–3- and alpha 2–6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj. J.* 25: 259–268

- Videira, P. A., Calais, F. M., Correia, M., Ligeiro, D., Crespo, H. J., Calais, F., Trindade, H. 2009. Efficacy of bacille Calmette-Guérin immunotherapy predicted by expression of antigen-presenting molecules and chemokines. *Urology*. 74: 944-950
- Watt, A. P., Courtney, J., Moore, J., Ennis, E., Elborn, J. S. 2005. Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax* 60: 659–664
- Werner, E. 2005. Integrin Clustering Drives Phagocytosis Coupled to Collagenase 1 Induction Through RhoA GTPase and Superoxide Production. *Antiox & Redox Sign.* 7: 318-326
- West, C. A., He, C., Su, M., Swanson, S. J., Mentzer, S. J. 2001. Aldehyde Fixation of Thiol- reactive Fluorescent Cytoplasmic Probes for Tracking Cell Migration. *J Histochem Cytochem* 49: 511-517
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36: 1251-1275
- Zhou, H., Monack, D. M., Kayagaki, N., Wertz, I., Yin, J., Wolf, B., Dixit, V.M. 2005. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappaB activation. *J Exp Med* 202: 1327–1332

Anexos

Anexo I

Constituição de soluções utilizadas neste trabalho

- Solução-tampão de fosfatos (PBS 1x):

Solução contendo 1.47mM KH_2PO_4 , 4.29mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137mM NaCl e 2.68mM KCl (pH=7,3) em água destilada.

- Tampão “beads” frio utilizado na separação de monócitos:

Solução com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA numa solução-tampão de PBS 1x

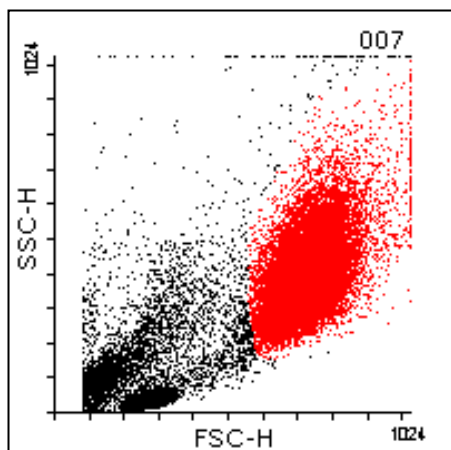
- Solução paraformaldeído 2%

Solução contendo 2g de paraformaldeído em 100 mL de solução-tampão de PBS 1x

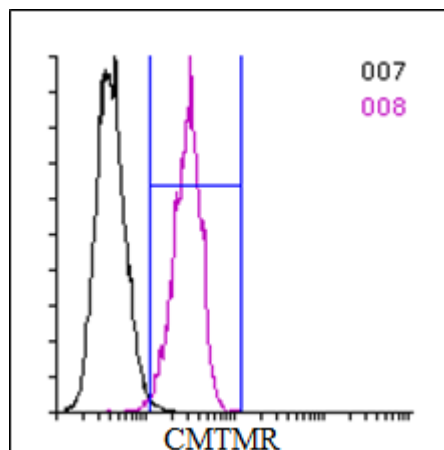
Anexo II

Exemplo de uma análise de resultados de um ensaio de internalização obtidos por citometria de fluxo

a)



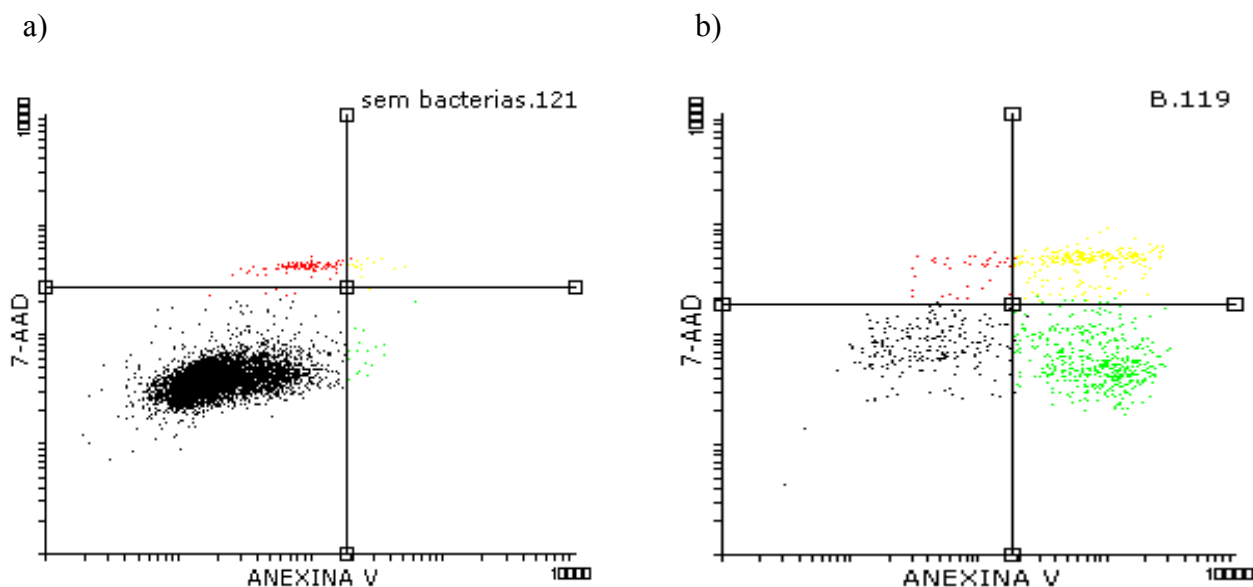
b)



Dot Plot (a) e histograma (b) resultantes da aquisição, por citometria de fluxo, de uma amostra de co-cultura de DCs com o isolado II (previamente marcado com CMTMR), durante 6 horas, a 4°C (preto) e a 37°C (rosa). O MFI correspondente ao ensaio a 4°C foi 4,44 e para o ensaio a 37°C foi de 30,91. A barra azul (b) delimita as células que internalizaram a 37°C mas não a 4°C, para daí se retirar a percentagem de células que internalizou neste ensaio, que foi de 98,78%. Este histograma (b) é resultante ds sobreposição dos histogramas a 4°C e a 37°C obtidos a partir do Dot Plots deste ensaio, nos quais apenas se selecionaram as células vivas para análise do MFI (a, vermelho, dot plot do ensaio a 4°C).

Anexo III

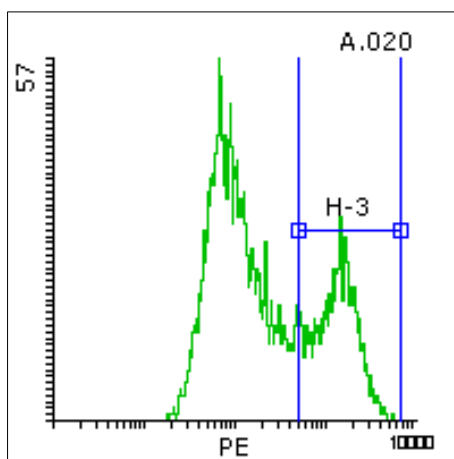
Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de apoptose obtidos por citometria de fluxo



Dot Plots resultantes da aquisição, por citometria de fluxo, de uma amostra de macrófagos sem incubação com bactérias (a) e de macrófagos incubados com o isolado II (b) durante 24 horas a 37°C e após marcação com Anexina-V e 7-AAD. A preto – células vivas (a: 97,94%; b: 22,79); a verde – células numa fase inicial da apoptose (a: 0,32%; b: 48,32%); a amarelo – células numa fase tardia da apoptose (a: 0,24%; b: 25,11%); a vermelho – células necróticas (a: 1,50%; b: 3,78%).

Anexo IV

Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de maturação obtidos por citometria de fluxo



Histograma resultante da aquisição, por citometria de fluxo, de uma amostra de co-cultura de DCs incubadas com o isolado I, durante 6 horas a 37°C e após marcação com o anti-corpo anti-CD86. O valor de MFI total foi 551,96. Contudo, como se pode ver no histograma, existem duas populações de células, umas que marcaram mais com o anti-corpo do que outras, e portanto foi feita a análise dessa população com valores mais positivos também (barra azul), cujo MFI neste caso foi 1504,90. Este histograma foi resultante, também, de um dot plot a partir do qual se seleccionou apenas as células vivas (conforme ilustrado no Anexo II).