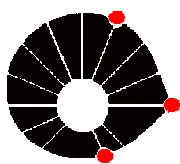


Rebeca Passarelli Mantovani

**Citotoxina produzida por *Achromobacter*
xylosoxidans isolados de pacientes com
fibrose cística induz a produção de citocinas
pró inflamatórias.**

CAMPINAS

2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**Citotoxina produzida por *Achromobacter*
xylosoxidans isolados de pacientes com fibrose
cística induz a produção de citocinas
pró inflamatórias.**

Rebeca Passarelli Mantovani

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, Sob orientação do Prof. Dr. Tomomasa Yano

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M319c Mantovani, Rebeca Passarelli, 1982 -
Citotoxina produzida por *Achromobacter xylosoxidans* isolados de pacientes com fibrose cística induz a produção de citocinas pró inflamatórias. / Rebeca Passarelli Mantovani. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Tomomasa Yano
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fatores de virulência. 2. Biofilme. 3. Citotoxina.
4. Interleucina. I. Yano, Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Cytotoxin produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis induces the production of inflammatory cytokines

Palavra-chave em inglês:

Virulence factors

Biofilm

Cytotoxin

Interleukin

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Tomomasa Yano [Orientador]

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Marcia Guimarães da Silva

Data da defesa: 30-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Rebeca Passarelli Mantovani

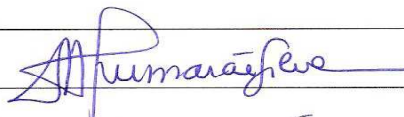
Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Membros:

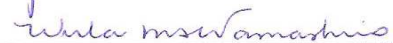
1. Prof. Dr. Tomomasa Yano



2. Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva



3. Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2011

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me amparado e protegido todos os dias de minha vida, dando-me toda a direção.

Aos meus pais por me darem todo o seu amor, por me ensinarem valores cristãos e estarem do meu lado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pelos ensinamentos, correções, dedicação e toda a orientação durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Emilio Levy pelo apoio a este trabalho.

Ao Dr. Luciano Moura Martins, meu amigo que sempre se mostrou disponível para orientações técnicas durante a realização deste trabalho.

À minha amiga Camila Marcondes, Dr. Márcia Guimarães e Dra. Wirla M.S. C Tamashiro por toda a ajuda metodológica e técnica para que este trabalho fosse realizado.

À minha amiga Annelize Zambon Barbosa Aragão por toda ajuda e incentivo durante este trabalho.

Aos amigos de laboratório Rogério, Cátia, Luciana, Robert, Natália e Mayara por todos os momentos que passamos juntos de alegrias e incentivos uns para com os outros.

Às queridas Ana Stella Menegon Degrossoli e Sandra Martins por toda a ajuda e carinho.

A todas as minhas amigas e amigos que torceram para que este trabalho se realizasse e eu cumprisse

mais esta meta de minha vida.

Às minhas colegas de Artur Nogueira, por todo o carinho recebido.

A toda família Passarelli e Mantovani, por rezarem por mim e desejarem sempre o melhor para minha vida.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por ter dado suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

“Os sonhos renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de raro valor. Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades”

Augusto Cury

RESUMO

Fibrose cística (FC) é uma doença genética, autossômica recessiva, caracterizada por anormalidade no transporte eletrolítico. *Achromobacter xylosoxidans* é um bacilo Gram-negativo, não-fermentador e nos últimos anos tem sido encontrado em pacientes com FC, levando à doença pulmonar crônica. Neste estudo foram analisadas 17 amostras de *A.xylosoxidans*, isoladas de pacientes do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP-SP. Os isolados foram analisados quanto as suas propriedades de virulência: atividade hemolítica, presença de hemaglutinação, atividade enzimática (caseinase, esterase, lecitina e hidrolise de elastina), adesão em célula, formação de biofilme e produção de atividade citotóxica. As amostras produziram hemolisinas, hemaglutininas e atividades enzimáticas. Catorze amostras de *A.xylosoxidans* (78%) formaram biofilme em microplacas, o que sugere o seu potencial em formar biofilme em cateteres e sondas. Entretanto essas bactérias não aderiram em células de pulmão NCI-H292 nas condições utilizadas. Os sobrenadantes de cultura de *A.xylosoxidans* apresentaram atividade citotóxica termoestável sobre célula NCI-H292, induzindo a formação de vacúolos, perda de contato celular, condensação da cromatina, núcleos picnóticos e morte celular. Foi verificado que a atividade citotóxica foi mantida mesmo após o tratamento dos sobrenadantes com polimixina B, sugerindo não ser uma endotoxina. Ensaios de ELISA demonstraram significativa produção de IL-6 e IL-8 pelas células NCI-H292 após 24 horas de incubação com a fração >50kDa do sobrenadante de cultura da bactéria. Os resultados sugerem que o fator citotóxico produzido por *A. xylosoxidans* apresenta um importante papel na virulência, o qual provavelmente está associado à inflamação pulmonar crônica em pacientes com FC, levando a danos teciduais e declínio da função pulmonar.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is a genetic disease, autosomal recessive, characterized by abnormal electrolyte transport. *Achromobacter xylosoxidans* is a Gram-negative non-fermenter and in recent years has been found in CF patients, leading to chronic lung disease. These studies were analyzed 17 samples of *A.xylosoxidans* isolated from patients in the Cystic Fibrosis Clinic, HC UNICAMP-SP. The isolates were analyzed for their virulence properties, such as haemolytic activity, the presence of hemagglutination, enzyme activity (caseinase, esterase, lecithin and hydrolysis of elastin), cell adhesion, biofilm formation and production of cytotoxic activity. The presence of hemolysins, hemagglutinins and enzymatic activities were not detected. Fourteen samples (78%) of *A.xylosoxidans* formed biofilms in microplates, suggesting the ability of bacteria to form biofilms on catheters and probes, but there was no adhesion in NCI-H292 cell lung. The culture supernatants of *A.xylosoxidans* isolated produced a heatstable cytotoxic factor in NCI-H292 cells, inducing the formation of vacuoles, loss of cell contact, chromatin condensation, pyknotic nuclei and cell death. ELISA assays to verify the release of IL-6 and IL-8, showed great production of these proinflammatory cytokines by NCI-H292 cells after 24 hours of incubation with the fraction > 50 kDa of culture supernatant of bacteria. It was also verified that the cytotoxic activity was maintained even after treatment with polymyxin B, suggesting may be not an endotoxin. Therefore, this cytotoxic factor produced by *A. xylosoxidans* may represent an important virulence factor, which is probably associated with chronic pulmonary inflammation in CF patients, leading to tissue damage and decline in lung function, decreasing the survival of these patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

FC	Fibrose Cística
CFTR	Canal Regulador de Condutância Transmembrana
Bcc	Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i>
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Vero	Célula de rim de macaco verde africano
HeLa	Célula de carcinoma de útero humano
HEp-2	Célula de carcinoma de laringe humana
LPS	Lipopolissacarídeo
PBS	Tampão Fosfato Salina
TSB	Caldo triptico de soja
TSA	Ágar triptico de soja
BHI	Infusão cérebro coração
MH	Meio Muller Hinton
LB	Meio Luria Bertani
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SN	Sobrenadante decultura
16-HBE	Células epiteliais brônquicas humanas
HE	Hematoxilina-eosina
AZ	Azul de Toluidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência na formação de biofilme entre as amostras de <i>A.xylosoxidans</i> isoladas de pacientes com FC.....	36
Figura 2. Alterações morfológicas induzidas nas células NCI-H292 pelas diferentes frações do sobrenadante de cultura de <i>A.xylosoxidans</i>.....	38
Figura 3. Aspectos morfológicos induzidos nas células NCI-H292 pelo sobrenadante de cultura de <i>A. xylosoxidans</i>, utilizando corantes Hematoxilina-eosina e Azul de Toluidina.....	40
Figura 4. Resultado da atividade citotóxica sob o efeito da Polimixina B conduzida sobre células NCI-H292 com sobrenadantes da cultura de <i>A. xylosoxidans</i>.....	41
Figura 5. Produção de IL-6 pelas células NCI-H292 seguidas de estimulação por sobrenadantes e frações citotóxicas produzidas por <i>A.xylosoxidans</i>.....	43
Figura 6. Produção de IL-8 pelas células NCI-H292 seguidas de estimulação por sobrenadantes e frações citotóxicas produzidas por <i>A.xylosoxidans</i>.....	44

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Objetivos Gerais.....	20
2.1. Objetivos Específicos.....	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Amostras bacterianas.....	23
3.2. Crescimento bacteriano.....	23
3.3. Detecção da atividade hemolítica.....	23
3.3.1. Atividade hemolítica em placas de Ágar sangue.....	23
3.3.2. Atividade hemolítica em microplacas.....	24
3.4. Teste de Hemaglutinação.....	24
3.5. Atividade proteolítica.....	25
3.5.1. Caseinase.....	25
3.5.2. Esterase.....	25
3.5.3. Lecitinase.....	26
3.5.4. Elastase.....	26
3.6. Formação de biofilme <i>in vitro</i>.....	27
3.7. Preparo das culturas celulares.....	27
3.8. Teste de adesão.....	28
3.9. Obtenção de sobrenadante de cultura de <i>A.xylosoxidans</i>.....	29
3.10. Teste de citotoxicidade.....	29
3.10.1. Termoestabilidade.....	30

3.10.2. Determinação da fração citotóxica às células NCI-H292.....	30
3.11. Ensaio para o estudo das alterações celulares.....	31
3.11.1. Azul de Toluidina.....	32
3.11.2. Hematoxilina-eosina.....	31
3.12. Inativação de endotoxina por polimixina B.....	32
3.13. Detecção de citocinas pró-inflamatórias.....	32
3.13.1. Análise estatística.....	33
4. Resultados.....	34
4.1. Atividade hemolítica, Teste de hemaglutinação e Atividade enzimática.....	35
4.2. Formação de biofilme in vitro.....	35
4.3. Adesão em células.....	36
4.4. Ensaio de citotoxicidade.....	36
4.5. Termoestabilidade.....	37
4.6. Determinação da fração citotóxica às células NCI-H292.....	37
4.7. Ensaio do estudo das alterações celulares.....	38
4.8. Inativação de endotoxina por polimixina B.....	41
4.9. Detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8).....	42
5. Discussão.....	45
6. Conclusões.....	51
7. Referências Bibliográficas.....	53
8. Anexos.....	65

1. INTRODUÇÃO

Fibrose cística é uma doença genética autossômica recessiva, comum em caucasianos (1, 2), causada por mutações em um gene no braço longo do cromossomo 7, que codifica uma glicoproteína de 175 kD, o canal regulador de condutância transmembrana (CFTR). A CFTR atua como um canal de cloro regulado por adenosina mono fosfato na membrana apical das células epiteliais (3). Esta proteína é defeituosa, ausente ou mal localizada na FC, alterando o transporte de sal e água das células epiteliais das vias aéreas e das glândulas exócrinas, levando a concentração anormal de íons nas secreções das glândulas serosas (4), cujas conseqüências são: insuficiência pancreática, concentração elevada de cloreto de sódio no suor, esterilidade em homens causado pelo bloqueio e posterior obliteração do canal deferente e doença pulmonar obstrutiva crônica (5). A doença pulmonar é responsável pela maior morbidade e mortalidade em FC (3).

Nos pulmões, ocorre o espessamento das secreções, dificultando o movimento mucociliar. O processo histopatológico no pulmão de FC é centrado em torno das vias aéreas e, eventualmente, se espalha envolvendo a submucosa da parede das vias aéreas, em contraste, os alvéolos são relativamente poupados. O primeiro achado histopatológico é geralmente observado por volta dos quatro meses de idade, e se caracteriza pela dilatação dos ductos das glândulas da submucosa nas vias aéreas (6). Também ocorrem alterações no revestimento epitelial, desnudação, perda dos cílios e metaplasia escamosa (7), resultando na colonização persistente de microrganismos, com episódios intermitentes de infecções debilitantes e fatais (1,8,9).

Até 80% dos pacientes adultos com Fibrose Cística sofrem de infecções crônicas pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa*, mas um número crescente de outros

microrganismos Gram-negativos são capazes de causar as mesmas infecções crônicas nesses pacientes (10,11). *Burkholderia cepacia complex (Bcc)*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pandoraea spp*, *Aspergillus spp*, micobactérias não-tuberculosas e vírus respiratórios têm sido detectadas nos últimos anos (12,13). Muitos desses microrganismos estão associados com manifestações clínicas, como formação de biofilme e alteração da resposta imune inata local, com alteração da produção de citocinas, permitindo que as cepas permaneçam no pulmão. (12,13).

Outra nova causa de infecção pulmonar crônica é o *Achromobacter xylosoxidans*, apesar de ser um patógeno incomum em pulmão sua incidência está aumentando em FC (14).

A bactéria *A. xylosoxidans* é um bacilo Gram-negativo, não-fermentador sacarolítico capaz de utilizar a glicose e a xilose, oxidase e catalase positiva, lactose negativa e amplamente distribuída no ambiente natural. Sua posição taxonômica foi considerada incerta durante décadas; o gênero foi nomeado *Achromobacter*, em seguida, *Alcaligenes*, e depois novamente *Achromobacter* (1). Apesar de pertencer à microbiota humana, pode causar infecções oportunistas, levando a uma variedade de infecções, incluindo bacteremia, pneumonia, meningite e peritonite, particularmente em imunodeprimidos e pacientes com doenças oportunistas (15).

Na experiência dinamarquesa, o *A. xylosoxidans* é uma bactéria multiresistente, com poucas opções terapêuticas e que apesar de tratamento agressivo, rapidamente pode evoluir para infecção crônica, detectados pela subida dos títulos de anticorpos, logo após poucas culturas positivas. A maioria dos pacientes que apresenta rápida deterioração da função pulmonar e piora clínica após a aquisição de infecção crônica pelo *A. xylosoxidans*

apresenta infecção crônica por *P. aeruginosa* concomitante, dificultando a interpretação do real papel do *A. xylosoxidans* (11).

Estudos recentes têm indicado que pacientes com FC infectados com *A. xylosoxidans* podem ter uma rápida diminuição da função pulmonar quando comparados com pacientes com FC sem esta infecção (11).

Porém os mecanismos envolvidos na patogênese de infecções por *A. xylosoxidans* não foram elucidados, bem como alguns fatores de virulência, como hemolisina, citotoxinas, hemaglutininas e enzimas (conhecidas por destruir componentes celulares, como membranas de lipoproteínas, muco e imunoglobulinas) (16).

Hemolisina (HLY) e substâncias de agregação (Agg ou AS) são encontradas em muitas espécies de organismos Gram-negativos (17). As hemolisinas são substâncias com ação citolítica que formam poros na membrana celular, aumentando a pressão osmótica e conseqüentemente levando a lise da célula. Hemaglutininas ou lecitinas podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade de aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (18,19).

As enzimas proteolíticas podem contribuir para a quebra das barreiras físicas do hospedeiro e aumento da proliferação bacteriana, chegando a interferir nos mecanismos de defesa imune do hospedeiro (20). Numerosos estudos têm mostrado que proteases ou elastases liberadas pelas bactérias são componentes de suas toxinas. Injeção de protease e elastase de *P. aeruginosa* na pele de certos animais, induziram lesões hemorrágicas em alguns minutos e dentro de 24 horas essas lesões tornam-se necróticas (20).

Sabe-se que a habilidade de bactérias aderirem e colonizarem as superfícies de células do hospedeiro é um passo essencial para o início de uma infecção (21) assim

como para formação de biofilme. Chiu et al, (22) e Woods et al (23) demonstraram a habilidade de *P.aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* aderirem em células de pulmão *in vitro* e *in vivo* de pacientes com FC.

O biofilme bacteriano é uma comunidade de microrganismos que adere a uma superfície, encaixada dentro de uma matriz de polissacarídeo extracelular (24). As células bacterianas dentro do biofilme se comunicam por um processo chamado “quorum-sensing”, a fim de coordenar a formação do biofilme. Há evidências de que se formam biofilmes bacterianos nos pulmões de pacientes com FC (25,26), levando a uma maior resistência aos antibióticos (27).

A capacidade de formar biofilme por *A. xylosoxidans* e *B.cepacia* foi verificada em estudo feito por Hansen et al (28); a presença de biofilmes em escarro de pacientes infectados por essas bactérias poderia explicar o insucesso de erradicação destas infecções crônicas por antibióticos. Infecção crônica similar por *P. aeruginosa* também foi verificada. A presença de biofilme agravou o processo inflamatório, provavelmente pela mediação de complexos imunes, levando a danos no tecido desses pacientes (29), uma vez que a produção de anticorpos contra componentes do biofilme, como alginato, LPS, elastase e protease alcalina pode levar à formação de imuno complexos (30).

Inflamação crônica no pulmão é a grande responsável pela morbidade em FC. Em particular o acúmulo de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8, resultando em danos em tecidos pulmonares (31).

IL-6 é uma citocina pleiotrófica α - helicoidal de 22-28 kDa, fosforilada e glicosilada (32,33). É expressa por uma variedade de células normais e células linfóides e não linfóides transformadas. A produção de IL-6 é regulada por sinais numerosos tais

como mitógenos ou estimulação antigênica, lipopolissacarídeos, ionóforos de cálcio, outras citocinas e vírus. IL-4, IL-10 e IL-13 inibem a expressão de IL-6 em monócitos. Níveis elevados de IL-6 foram observados em muitas condições patológicas, incluindo infecções bacterianas e virais, trauma, doenças auto-imunes, inflamações e neoplasias (34,35).

IL-8 é um potente fator quimiotático e fator de ativação de neutrófilos, presente em grandes concentrações nas vias aéreas de pacientes com FC. É uma citocina inflamatória produzida por muitas células (incluindo monócitos / macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos, astrócitos e condrócitos) em resposta a estímulos pró-inflamatórios como a IL-1, TNF, LPS e vírus. Sua função é, em parte, atrair neutrófilos para o local da inflamação e ativá-los (36,37).

A.xylosoxidans pode causar um nível de inflamação semelhante à pacientes com FC cronicamente infectados com *P.aeruginosa* (28).

As células epiteliais das vias aéreas que normalmente expressam o CFTR conduzem diretamente a respostas inflamatórias. Defeitos na CFTR estão associados com aumento na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (5,14).

Elevadas concentrações de IL-6 estimulam as células B a produzir imunoglobulinas, e podem contribuir para uma hipergamaglobulinemia vista em muitos pacientes com FC (33).

Grandes concentrações de IL-8 atraem numerosos neutrófilos nas vias aéreas de FC. Estes neutrófilos são as células efectoras primárias responsáveis pelas manifestações patológicas da doença no pulmão de FC. Neutrófilos liberam grandes concentrações de proteases (principalmente elastase), outros mediadores que provocam mais inflamação, e

radicais de oxigênio. Devido ao movimento ciliar prejudicado, a viscosidade do muco aumenta os neutrófilos não são removidos, aumentando mais ainda o muco e atraindo mais neutrófilos. Essa resposta inflamatória desregulada leva a um ciclo vicioso, promovendo obstrução do lúmen, e causando destruição das células das vias aéreas (38,39).

Existem relatos relacionados a produção de citotoxinas por bactérias isoladas de pacientes com FC, como *P. aeruginosa*, a qual produz uma toxina A, uma proteína termoestável, com peso molecular de 66 kDa, citotóxica para cultura de células eucarióticas e letal para várias espécies de mamíferos (40,41). *Stenotrophomonas maltophilia* também apresentou atividade citotóxica em células vero, HeLa e HEp-2 (42). Um estudo feito por Palfreymann et al (43) usando célula epitelial de pulmão humano, verificou que o sobrenadante de cultura de *B. cepacia* estimulava a liberação de IL-8, e esta atividade era termolábil e não foi inibida pela adição de polimixina B, portanto não estava relacionada à LPS. O LPS de muitas bactérias Gram-negativas como *A.xylosoxidans* induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 por células pulmonares (44).

Devido ao aumento de *A.xylosoxidans* em culturas de escarro dos pacientes não ser acompanhado de dados publicados sobre os fatores de virulência desta bactéria, neste trabalho, fornecemos evidências de que alguns fatores de virulências produzidos por esta bactéria podem contribuir para a patogênese nos pulmões de pacientes com FC e colaborar com a diminuição da função pulmonar.

Objetivos

OBJETIVOS GERAIS:

O presente estudo teve por objetivo estudar propriedades de virulência em *Achromobacter xylosoxidans* isolados de pacientes com fibrose cística (HC/UNICAMP) e seu papel na inflamação, para relacionar com o mecanismo da doença

2.1. Objetivos específicos.

- a) Detecção de atividade hemolítica e de hemaglutinação de *A.xylosoxidans*;
- b) Detecção de atividades proteolíticas *A.xylosoxidans*;
- c) Detecção de adesão a superfície celular e formação de biofilme em superfície inerte;
- d) Detecção de atividade citotóxica;
- e) Verificação da produção de Interleucinas em células de pulmão tratadas com o sobrenadante;
- f) Pesquisa de atividade endotóxica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas neste estudo 17 cepas de *Achromobacter xylosoxidans*, isoladas de pacientes com FC do Ambulatório de Fibrose Cística da Unicamp/Brasil, no período de 01/03/2007 a 31/01/2009, e uma cepa padrão LMG 1863 (utilizada como controle para todos os ensaios), todas gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Emilio Levy, do Departamento de Patologia Clínica, HC/UNICAMP, Campinas, São Paulo. As amostras foram previamente identificadas por série bioquímica e análise de gênero por PCR.

3.2 Crescimento bacteriano

Todas as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo TSB 37°C, sob agitação a 100rpm (Incubatorshaker, Newbrunschwick Scientific, EUA) por 24 horas.

3.3 Detecção da atividade hemolítica

3.3.1 Atividade hemolítica em placas de Ágar sangue

As amostras de *A.xylosoxidans* crescidas em TSB foram semeadas por estria superficial e em profundidade em placas de Agar Sangue (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) com sangue desfibrinado de carneiro e humano, lavados e não lavados com PBS 0,05M pH 7,4, numa concentração de 5% e incubados a 37°C por até 96 horas, segundo a metodologia de Barnes et al (45). A presença ou ausência de halos de hemólise ao redor ou sob as colônias foram analisados.

3.3.2 Atividade hemolítica em microplacas de poliestireno

Para avaliar a presença de hemolisina na bactéria e em seu sobrenadante no ensaio em microplacas de poliestireno usou-se a metodologia proposta por Monfort e Baleux (46). Brevemente a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000rpm (microcentrífuga 1-14, Sigma, Alemanha), por 15 minutos, o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi lavado três vezes e então ressuspendido em 10mM PBS. Alíquotas de 100µL do sobrenadante de cultura e 100µL da suspensão bacteriana (3×10^8 bacteria / mL) foram diluídas em PBS (10mM), sucessivamente na razão 2, e aplicadas sobre alíquotas de 100µL de suspensão de eritrócitos humano e de carneiro, a 1%, no mesmo tampão. O título (recíproca da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias) foi determinado visualmente após 60 minutos de incubação em banho-maria a 37°C ou a 4°C, após 18h. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 33400) como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.4 Teste de Hemaglutinação

A cultura bacteriana (item 3.2) foi centrifugada a 10.000 rpm (microcentrífuga Minispin Plus, Eppendorf, EUA), por 15 minutos e o sedimento bacteriano de *A. xylosoxidans* foi suspenso em solução de PBS 5 mM, pH 7,4 para uma concentração final de 10^9 bactéria / mL. Uma alíquota desta suspensão (50 µL) foi adicionada com igual volume (2% v/v) de eritrócitos de carneiro e humano e as placas foram incubadas a 37 ° C por 1 hora. Cepa de *Escherichia coli* ORN 115 foi utilizada como controle positivo.

3.5 Atividade proteolítica

Todas as amostras de *A. xylosoxidans* foram usadas para examinar a produção de enzimas extracelulares. Os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram previamente cultivadas por 24 horas em caldo TSB a 37 ° C com agitação a 100 rpm (Incubator shaker, Newbrunschwick Scientific, EUA).

3.5.1 Caseinase

Este ensaio é baseado na capacidade da bactéria hidrolisar a proteína caseína.

Os isolados foram inoculados em Mueller-Hinton ágar (Merck), com 0,3% de caseína (Sigma) e incubadas a 37°C, por até 48 horas. Hidrólise da caseína foi visualizada através da aplicação de 30% de ácido tricloroacético na superfície do ágar. Um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano foi considerado como reação positiva (47). Cepas de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controles positivos e negativos, respectivamente.

3.5.2 Esterase

A esterase é capaz de hidrolisar os ésteres em ácido e álcool.

Alíquotas de 100 ul do crescimento bacteriano de *A. xylosoxidans* foram inoculadas em Ágar TSB (Difco Laboratories) suplementado com 1% de Tween-80 a 37 ° C, por até 48 horas. A presença da atividade de esterase foi verificada por meio de formação de halos brancos em torno da colônia bacteriana (16).

3.5.3 Lecitinase

A lecitinase é capaz de hidrolisar a lecitina, um importante constituinte das membranas celulares.

O ensaio da lecitinase realizado adicionando-se 50% de gema de ovo em relação ao meio Agar base utilizada. Dez mililitros de gema de ovo (50%) foi adicionado a 90 mL de TSA estéril, para 100 µl da cultura de *A. xylosoxidans*. *Bacillus cereus* foi utilizado como controle negativo e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C, por até 48 horas. Cepas produtoras de lecitinase produzem zona opaca ao redor do inóculo (48).

3.5.4 Elastase

A elastase é uma enzima da classe das proteases, que quebram as proteínas, como elastina, uma fibra elástica que juntamente com o colágeno determina a propriedade mecânica do tecido (49).

Placas com Ágar nutriente (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e elastina (Sigma) foram preparados como descrito por Rust et al (50). Cultura de crescimento de *A.xylosoxidans* foram inoculadas por uma única gota sobre o Ágar nutriente com elastina e incubados a 37 ° C por 24 a 48 horas. A atividade de elastase foi visualizada pelos halos de degradação da elastina em torno do crescimento bacteriano. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo e *E.coli* ATCC 26922 como controle negativo.

3.6 Formação de biofilme *in vitro*

Para avaliar a formação de biofilme de *A.xylosoxidans* utilizou-se a metodologia proposta por Wakimoto et al (51) com algumas modificações. Foram inoculados 5 µL de crescimentos bacterianos (3×10^8 bacteria/mL) obtidos em caldos TSB, BH, MH e LB a 37°C por 24 horas (diferentes meios foram utilizados para avaliar o melhor meio de crescimento para a formação de um biofilme mais forte) sob agitação a 100rpm (Incubator shaker, Newbrunschwick Scientific, USA), em microplaca de poliestireno de 96 poços (TPP, Suíça) contendo 200 µL de meio RPMI1640 (Nutricell, Brasil). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Completado o tempo, as bactérias não aderidas em placa foram removidas e 200 µL de cristal violeta (0,5%) foram adicionados em todos os poços das placas, que foram deixadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados com água destilada e 200 µL de etanol 95% foram adicionados em cada poço. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 570nm (OD_{570}), e a formação de biofilme foi considerada positiva quando $OD_{570} \geq 0,1$, pela medida da absorbância comparada com o branco. Foi utilizada como controle positivo a amostra *E.coli* enteroagregativa O42.

3.7 Preparo das culturas celulares

As células NCI-H292, adquiridas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, da coleção americana de cultura de células - American Type Culture Collection foram cultivadas em garrafas de cultura de células (TPP, Suíça) contendo meio RPMI 1640 (Nutricell, Brasil), suplementado com 10% SFB (Nutricell, Brasil), sem adição de antibióticos. As garrafas foram incubadas em estufa (Jouan CO₂ Incubator, França) em

atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, por 48 horas, para formação do tapete celular. Em seguida o meio das garrafas foi descartado e as células foram removidas com a adição de tripsina-EDTA (Nutricell, Brasil) e em seguida ressuspendidas em RPMI 1640 (Nutricell, Brasil), para um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/mL para distribuição em placas de 96 poços (0,1mL em cada poço) e 4×10^5 células/mL para distribuição em placas de 24 poços (1mL em cada poço).

As placas foram incubadas em estufa (Jouan CO₂ Incubator, França) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, por 24 a 48 horas (até total formação do tapete celular).

3.8 Teste de adesão

Para o preparo dos inóculos foram semeadas as amostras de *A.xylosoxidans* em tubos 20mL de meio TSB (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), por 24 horas a 37°C, sob agitação (100rpm) (New Brunswick Scientific Co.). Em seguida 1mL de cada suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min (microcentrífuga 1-14, Sigma, Alemanha). Os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” foram, ressuspendidos em 1mL de PBS estéril, por três vezes, para eliminar as possíveis toxinas produzidas pelas bactérias e foram padronizados os inóculos finais (cultura bacteriana) de acordo com o tubo 1 da escala de MacFarland (3×10^8 bactérias/mL).

Para o ensaio de aderência em célula NCH-H292 a metodologia usada foi à proposta por *Scaletsky et al* (52) com algumas modificações. As células foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro, contendo 1mL de meio RPMI 1640 (Nutricell, Brasil) com 10% de SFB, para um número estimado de 4×10^5 células/mL e incubadas por 48 horas a 37 ° C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após a formação da

monocamada celular, as lamínulas foram lavadas, três vezes em PBS estéril e em cada poço foi adicionado 900µL de meio com 2% de SFB e um inóculo de 100µL das culturas bacterianas foram adicionadas nos poços da placa, durante um período de 6 horas de incubação.

Após a incubação da placa por 6 horas a 37 ° C (período de multiplicação), as lamínulas foram então lavadas três vezes em PBS, e as células foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas por 5 minutos com May-Grunwald e 20 min com Giemsa. As lamínulas coradas foram lavadas em água, secas, montadas em lâminas de vidro e examinadas sob microscópio óptico de luz (400× e 1.000×). Os testes foram realizados em triplicatas e utilizados os controles de *E.coli*: 17-2 (adesão agregativa), E2348/69 (adesão localizada), O8 TR 302/4 (adesão difusa).

3.9 Obtenção de sobrenadante de cultura de *A.xylooxidans*

Amostras de *A.xylooxidans* foram cultivadas em 20 mL de TSB (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), por 24 horas a 37°C, sob agitação (100rpm) (New Brunswick Scientific Co.). Em seguida a cultura bacteriana foi centrifugada (Bechman, EUA) a 10.000 rpm por 15 minutos, para obtenção dos sobrenadantes de cultura. Os sobrenadantes foram filtrados através de membranas de 0,22 µm (Millipore, EUA).

3.10 Teste de Citotoxicidade

Os sobrenadantes de cultura das cepas de *A.xylooxidans* foram aplicados em cultura de células NCI-H292 ($2,5 \times 10^5$ células / mL), cultivadas em placas de 96 poços

e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, com diluições recíprocas em razão 2 (53).

As alterações morfológicas foram observadas ao microscópio invertido (Nikon instruments, Japão) durante 48 horas.

3.10.1 Termoestabilidade

Para determinar a termoestabilidade, os sobrenadantes de cultura bacteriana foram aquecidos 100 ° C por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. As atividades citotóxicas nas células NCI-H292 foram analisadas ao microscópio invertido (Nikon instruments, Japão) até 48 horas.

3.10.2 Determinação da fração citotóxica

Dentre todas as amostras de *A. xylosoxidans*, a amostra A31 foi selecionada para a determinação da massa molecular aproximada do fator citotóxico presente nos sobrenadantes cultivados. O sobrenadante da bactéria foi submetido à ultrafiltração (Sistema de filtração Amicon, Michigam, EUA) em membranas de XM-300 e XM-50, para testar as frações citotóxicas maior que 300 kDa , entre 300kDa-50kDa e menor que 50 kDa, em seguida essas frações foram filtradas através de membrana de 0,22µm (Millipore, Brasil) e incubadas com células NCI-H292 para o ensaio de citotoxicidade (54). TSB foi utilizado como controle negativo.

3.11 Estudo das alterações celulares

Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 24 poços com lamínulas de vidro. O sobrenadante da amostra A31 foi aplicado às células NCI-H292 em diferentes períodos de tempo, 24, 40 e 48 horas, em duplicata. Em seguida as lamínulas foram lavadas com solução de PBS, fixadas por 1 hora com solução de formaldeído 10% (v/v) e lavadas com água destilada para retirar o excesso da solução fixadora (55). Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo.

3.11.1 Azul de Toluidina (AZ)

As células fixadas em lamínulas foram coradas com 0,25 % (w /v) de azul de toluidina (pH 4,0) por 15 minutos, e lavadas mais uma vez com água destilada. Após a secagem ao ar livre, as lamínulas foram diafanizadas em xilol e montadas em lâminas usando Entellan (Merck) e observadas em microscópio de luz (Zeiss, Alemanha), para a verificação da alteração nuclear da célula.

3.11.2 Hematoxilina – eosina (HE)

Para a coloração das células fixadas em lamínulas foi utilizado Hematoxilina de Harris por 2-3 minutos, então lavadas com água destilada e mergulhadas em álcool ácido 0,3%. Em seguida, foi feita coloração com Eosina por aproximadamente 12 segundos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, desidratadas, limpas e montadas sobre lâminas, usando Entellan (Merck) e observadas em microscópio de luz (Zeiss, Alemanha).

3.12 Inativação de endotoxina por polimixina B

Ensaio da polimixina B usado para eliminar a atividade endotóxica foi realizado utilizando a técnica descrita por Cooperstock (10). Polimixina B é um decapeptídeo catiônico cíclico, que contém grupos lipofílicos e lipofóbicos e age sobre a parede celular de bactérias Gram-negativas (56) inibindo a atividade endotóxica (10).

Os sobrenadantes da cepa A31 foram aquecidos a 100 ° C por 15 minutos e incubados a 37 ° C por 20 minutos com polimixina B (INLAB[®]) em diferentes concentrações (0,1, 10, 20 e 40µg/mL) e testado em células NCI-H292. Todas as amostras foram testadas em triplicata, incluindo células com polimixina B e células sem tratamento, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.13 Detecção de citocinas pró - inflamatórias

Após a determinação da massa molecular aproximado da fração citotóxica do sobrenadante da cepa A31, as células NCI-H292 foram cultivadas em placas de 24 poços (4×10^5 células/ mL), por 24 horas a 37 ° C em 5% CO₂ e incubadas com sobrenadantes da cultura (tratados ou não com polimixina B) e com as frações >50 kDa e <50kDa por 24 horas. Após o período de incubação os sobrenadantes das células foram retiradas, filtrados com membrana de 0.22µm e congelados a -20°C com coquetel de inibidores de protease (Sigma [®]), antes do ensaio ELISA. Os níveis de produção de IL-6 e IL-8 em sobrenadantes foram determinados por ELISA (DuoSet, RD Systems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.13.1 Análise estatística

Os dados relativos à produção de citocinas em culturas de células estimuladas com a fração citotóxica de *A. xylosoxidans*, tratadas ou não com polimixina B foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett's de comparações múltiplas. O software empregado nas análises foi o Sigma Stat (Jandel Corporation) e o nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade hemolítica, Teste de hemaglutinação e Atividade enzimática

Nenhuma das cepas de *A. xylosoxidans* apresentou atividade hemolítica (α -hemólise ou β -hemólise) em relação aos eritrócitos utilizados no ensaio. Também não aglutinaram os eritrócitos testados e, além disso, a capacidade bacteriana para produzir enzimas proteolíticas não foi observada nas 17 amostras nos ensaios realizados.

4.2 Formação de biofilme *in vitro*

A formação de biofilme *in vitro* foi observada através da coloração com cristal violeta. Em todos os meios utilizados foram observados que 78% das amostras de *A. xylosoxidans*, incluindo a cepa padrão LMG 1863 formaram biofilmes em microplacas de poliestireno. Porém formação de biofilmes mais intensos foram observados em isolados cultivados em meio BHI e TSB (Fig 1).

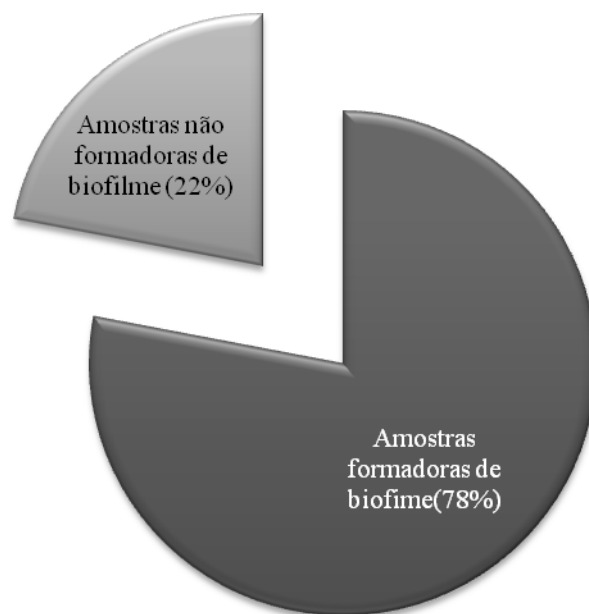


Figura 1. Frequência na formação de biofilme entre as amostras de *A. xylosoxidans* isoladas de pacientes com FC.

4.3 Adesão em células

Nenhum dos isolados de *A. xylosoxidans* aderiram às células NCI-H292.

4.4 Ensaio de citotoxicidade

O sobrenadante filtrado de cultura de todas as estudadas de *A. xylosoxidans*, incluindo a cepa padrão LMG 1863 causaram arredondamento e alterações na

membrana das células observadas em microscópio invertido (Nikon instruments, Japão) durante o período de 24 a 48 horas. Sendo o maior efeito visualizado em 48 horas.

4.5 Termostabilidade

O ensaio de termostabilidade demonstrou que a atividade citotóxica na célula NCI-H292 não foi reduzida após os sobrenadantes das culturas de bactérias serem aquecidos a 100°C por 15 minutos.

4.6 Determinação da fração citotóxica às células NCI-H292

A amostra A31 foi escolhida para determinar a massa molecular aproximada desta citotoxina. Frações do ultrafiltrado, > 300 kD entre 300KDa-50KDa, e < 50 kDa e controles foram inoculadas na célula. A fração citotóxica que mostrou atividade na célula NCI-H292, com alterações morfológicas foi entre 300KDa-50KDa, visualizadas por microscópio invertido (Nikon instruments, Japão) no período de 24 a 48 horas e fotografadas. Mostrando efeito mais acentuado em 48 horas de incubação, onde observou-se arredondamento celular, com destruição gradual da monocamada celular. (Fig2).

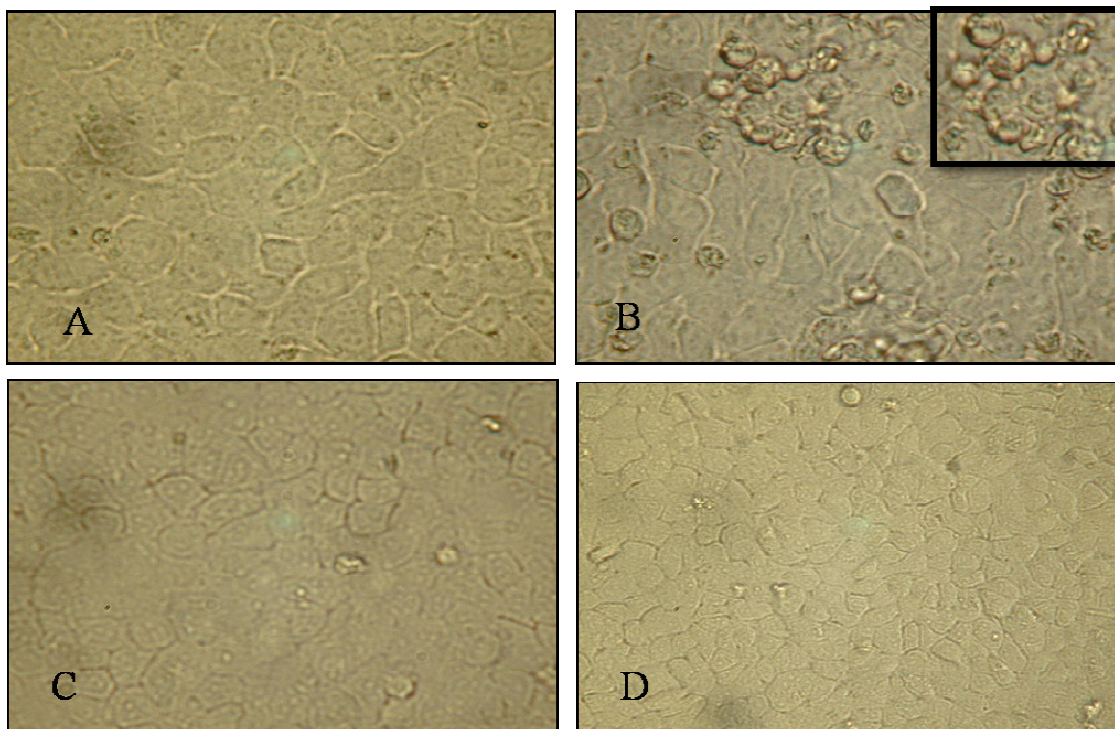


Figura 2- Alterações morfológicas em células NCI-H292 induzidas pelas diferentes frações do sobrenadante ultrafiltrado de cultura de *A.xylosoxidans*, após 48 horas de inoculação em aumento de 400x. (A)- controle de células NCI-H292 sem tratamento; (B)- Células NCI-292 tratadas com a fração do ultrafiltrado entre 300 kDa- 50 kDa; (C)- Células NCI-292 tratadas com a fração do sobrenadante menor que 50 kDa; (D) Células tratadas com a fração do sobrenadante maior que 300 kDa.

4.7 Ensaio do estudo das alterações celulares

Os ensaios com os corantes Hematoxilina-eosina e Azul de Toluidina foram utilizados para visualizar as alterações morfológicas e nucleares em células de pulmão NCI-H292, após a aplicação do sobrenadante ultrafiltrado da cultura bacteriana A31.

Como podemos observar na Figura 3 a coloração de HE e TB evidenciou o efeito do sobrenadante ultrafiltrado de cultura da amostra A31, sobre as células NCI-H292.

Na Figura 3, observa-se que até 24 horas após a inoculação, as células mostraram poucas mudanças em sua morfologia. Efeitos citotóxicos exacerbados foram observados em 40 horas e 48 horas. O tratamento das células NCI-H292 após 40 horas de incubação levou a perda de junções e contatos celulares, apresentou anéis pericromáticos, núcleos uniformes, corpos nucleares com condensação da cromatina, que pôde ser observado devido à afinidade do corante azul de toluidina a substâncias ácidas, como os ácidos nucléicos. Após 48 horas de incubação, foi observada a presença de grandes vacúolos em grande número de células, apresentando grande número de vesículas, perda de contatos celulares, condensação da cromatina e núcleos picnóticos, o que indica morte celular. A Hematoxilina é um corante básico, portanto, se liga a estruturas celulares que tenham afinidade por substâncias ácidas, a verificação de uma coloração mais forte após 48 horas permite sugerir que houve uma acidificação no citoplasma.

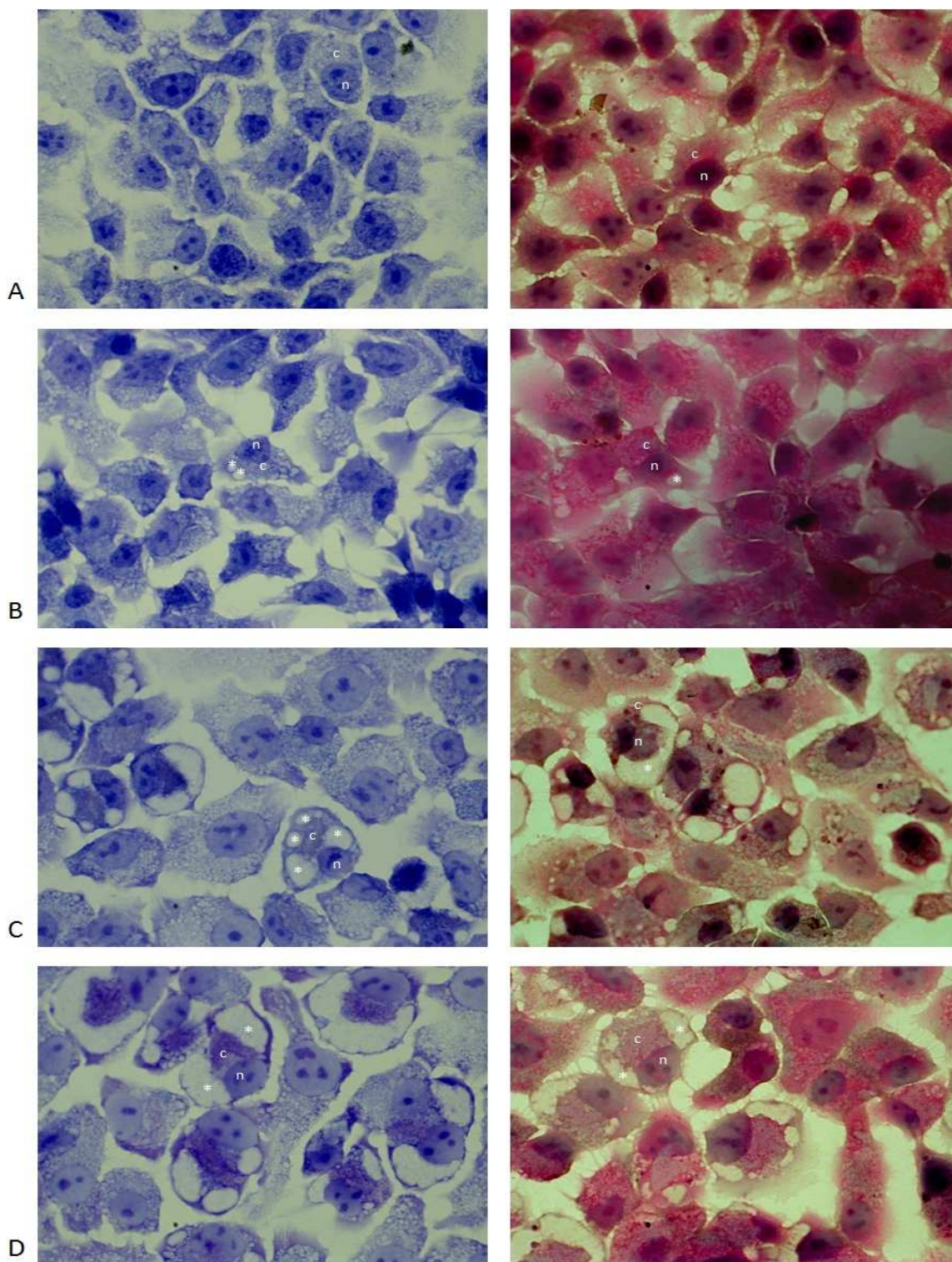


Figura 3- Aparência morfológica das células de pulmão NCI-H292 coradas com Hematoxilina- eosina e Azul de Toluidina, após tratamento com sobrenadante de cultura

de *A.xylosoxidans* por 24h, 40h e 48h, aumento de 1000x. As figuras a esquerda são de coloração de Azul de Toluidina e a direita de Hematoxilina- eosina. (A)- Controle de células em tratamento. (B), (C) e (D)- Células tratadas com sobrenadante de cultura de *A.xylosoxidans* após 24h, 40h e 48h de incubação, respectivamente. Legendas: n (núcleo); c (citoplasma); asterisco indica vacúolos.

4.8 Inativação de endotoxina por polimixina B

A atividade citotóxica do sobrenadante de cultura da amostra A31, observada por microscópio invertido (Nikon instruments, Japão) entre 24 horas a 48 horas, não foi inibida pela atividade da polimixina B em suas diferentes concentrações, sugerindo que a atividade citotóxica do sobrenadante de *A.xylosoxidans* não é uma endotoxina.

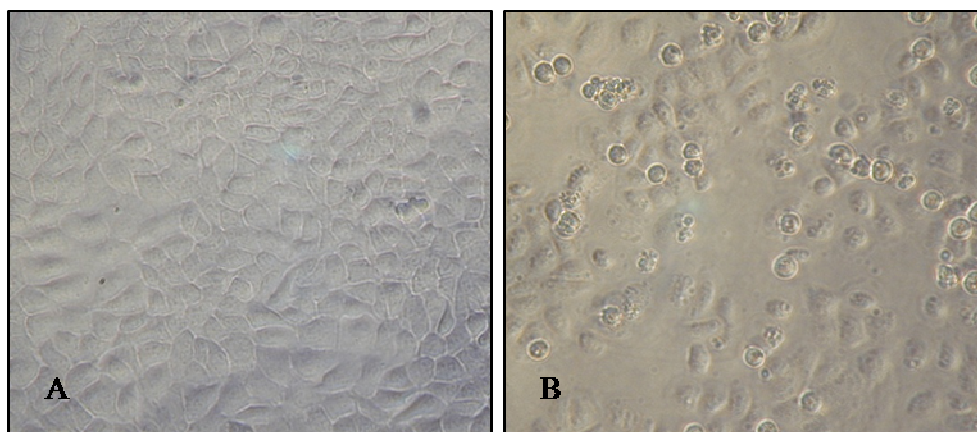


Figura 4-Atividade citotóxica do sobrenadante de cultura da amostra A31 sob o efeito de Polimixina B, em células NCI-H292. (A)- controle de células NCI-H292 sem tratamento, 48 horas; (B)- Células NCI-292 tratadas com sobrenadante de *A.xylosoxidans* com polimixina B (40µg), 48 horas.

4.9 Detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8)

A fração citotóxica (> 50 kDa) do sobrenadante da cepa A31 de *A.xylosoxidans*, estimulou a produção e liberação de IL-6 e IL-8 pelas células de pulmão NCI-H292, determinado pelo ensaio de ELISA(DuoSet, RD Systems, EUA).

Secreção de IL-6 após estimulação com sobrenadante da amostra em célula de pulmão, por 24 horas, apresentou uma mediana de 180,62 pg/mL, 5,6 vezes mais do que o controle negativo (células com TSB), a fração >50 kDa apresentou uma mediana de 281,58 pg/mL, 8,8 vezes mais que o controle negativo (células com TSB), e o sobrenadante de cultura da cepa com polimixina apresentou uma mediana de 136 pg/ml, 7,6 vezes mais quando comparado com o controle negativo (células) com polimixina B (40µg/mL). Liberação de IL-8 pela ação do sobrenadante de cultura da amostra, por 24 horas apresentou uma mediana de 3374,18 pg/mL, 4,6 vezes mais que o controle negativo (células com TSB), a fração >50kDa, apresentou uma mediana de 3739,85 pg/mL, 5 vezes mais que o controle negativo (células com TSB) e o sobrenadante de cultura da cepa com polimixina B (40µg/mL) apresentou uma mediana de 3897,50 pg/mL, 2,8 vezes mais quando comparado com o controle negativo (células) com polimixina B (Fig 4). O sobrenadante de cultura de *A.xylosoxidans* tratado com polimixina B, mostrou pouca ou nenhuma redução na liberação de interleucinas em células de pulmão NCI-H292. As células tratadas (sobrenadante, sobrenadante com polimixina B e fração do sobrenadante >50 kDa) mostraram diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle (células com TSB). O meio TSB não influenciou na liberação de IL quando comparado com o controle celular, não havendo diferença significativa ($P>0,05$).

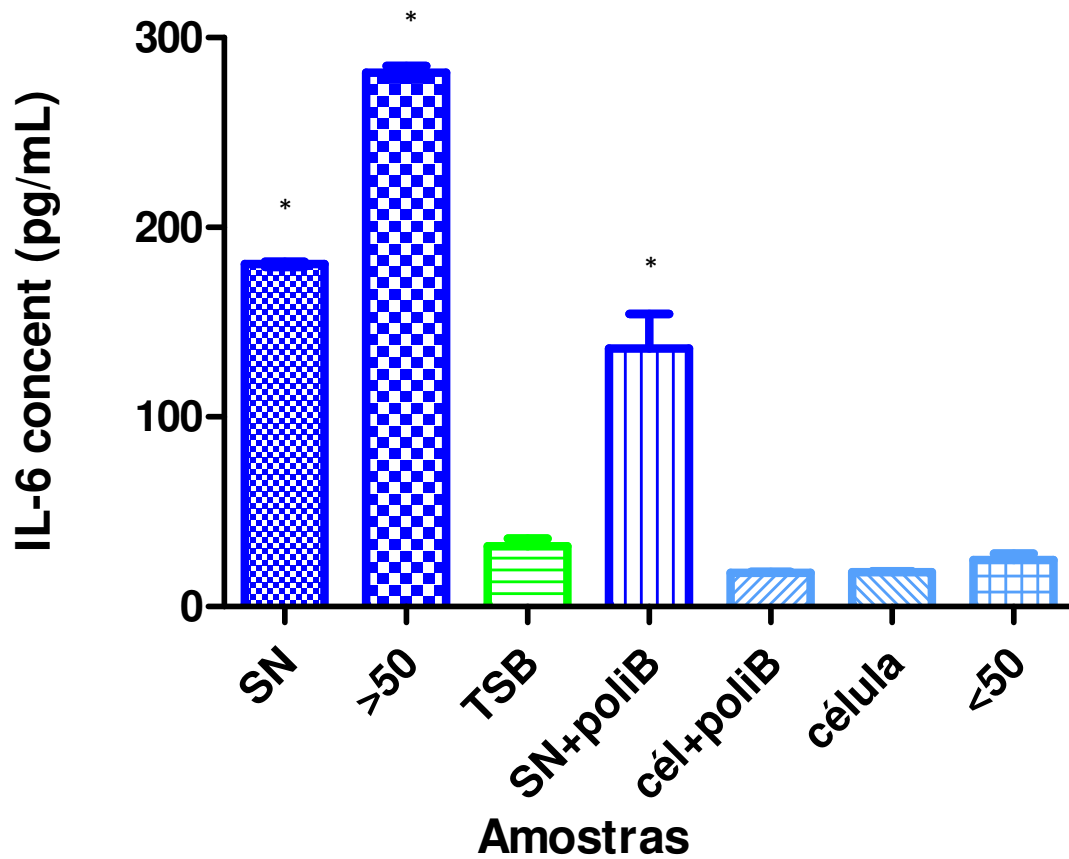


Figura 5. Produção de Interleucina 6 (IL-6) pelas células NCI-H292 seguidas de estimulação por sobrenadantes e frações citotóxicas produzidas por *A.xylosoxidans*, ou com meio, ou polimixina B, como controles. Concentrações de citocinas foram mensuradas por ELISA e os resultados foram expressados em mediana $\pm$ DP de dois ensaios independentes realizados em duplicata. *P < 0.05

SN= Sobrenadante da amostra; poli B= 40 μ g/mL de polimixina B.

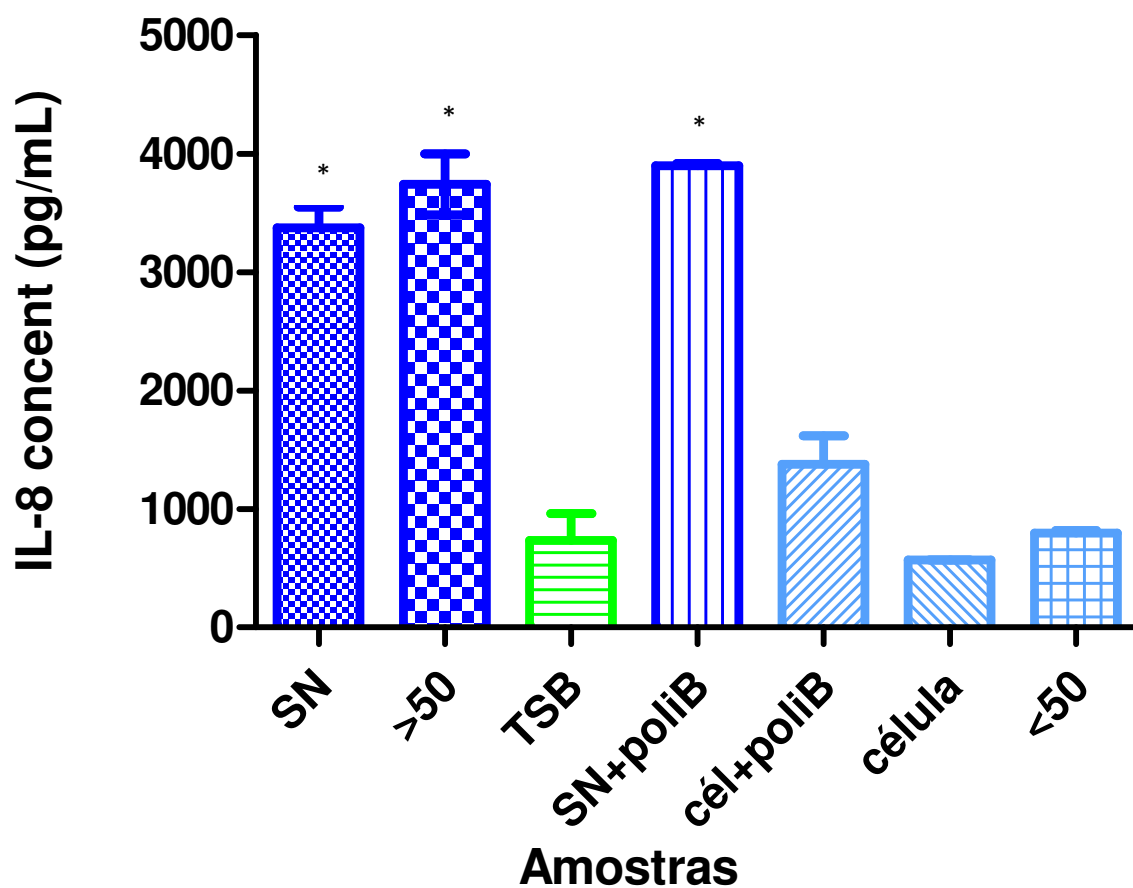


Figura 6. Produção de Interleucina 8 (IL-8) pelas células NCI-H292 seguidas de estimulação por sobrenadantes e frações citotóxicas produzidas por *A.xylosoxidans*, ou com meio, ou polimixina B, como controles. Concentrações de citocinas foram mensuradas por ELISA e os resultados foram expressados em mediana $\pm$ DP de dois ensaios independentes realizados em duplicata. *P < 0.05

SN= Sobrenadante da amostra; poli B= 40 μ g/mL de polimixina B.

5 DISCUSSÃO

Recentemente, tem sido relatado o aumento de colonização por *A. xylosoxidans* nos Centros e Ambulatórios de FC, o que chama atenção para uma nova infecção crônica emergente que afeta um número crescente de pacientes, podendo levar a uma influência negativa no curso clínico da doença.

Algumas bactérias como *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* (ambas com significado clínico para FC) (42, 54) e *E.coli*, produzem hemolisinas, que alteram as funções das células endoteliais e aumentam a mortalidade de indivíduos infectados (57). No entanto nossos resultados mostraram que entre as amostras de *A.xylosoxidans* estudadas não houve qualquer atividade hemolítica (microplacas de poliestireno e placas de Ágar sangue) nem hemaglutinante (eritrócitos humanos e de carneiro), corroborando com este estudo, não foram relatados atividade hemaglutinante ou hemolítica entre espécies de *A. xylosoxidans* na literatura.

Proteases são secretadas por muitas bactérias patogênicas humanas, incluindo *S.maltophilia* (58) e *P. aeruginosa* (59), mas deve ser destacado que as cepas de *A.xylosoxidans* obtidas nesse estudo não produzem essas enzimas.

A. xylosoxidans tem potencial de tornar-se um importante nosocomial como *P. aeruginosa*, por possuir uma alta resistência a vários antibióticos (11).

O aumento da resistência à antibióticos tem sido relacionado com a formação de biofilmes como em *B. cepacea* e *P. aeruginosa*, como mostrado por Caraher et al (13). Foi relatado que pelo menos 65% das doenças relacionadas a bactérias, principalmente doenças bacterianas crônicas infecciosas, como a FC, bronqueolite difusa, endocardite,

periodontite, otite média, entre outras, estão diretamente associadas à formação de biofilme (13).

Em 2010, Hansen et al (28) detectaram a formação de biofilmes por *A. xylosoxidans* e Bcc em escarro de pacientes com FC. Os dados do presente estudo mostraram que 78% das amostras de *A. xylosoxidans* têm capacidade de formar biofilme em placas de poliestireno, sugerindo que esta bactéria teria a capacidade de formar biofilme em superfícies similares, tais como catéteres, sondas e próteses. Por outro lado, essas amostras não aderiram às células de pulmão NCI-H292.

De fato, a formação de biofilme em cateteres venosos centrais (CVC) por *A. xylosoxidans*, de pacientes com câncer, foram observados num estudo realizado por Kim et al (60), através de microscopia de varredura, para caracterizar os mecanismos pelos quais esta bactéria pode infectar a corrente sanguínea de pacientes imunocomprometidos com CVC.

Sobrenadantes de cultura das 17 cepas de *A. xylosoxidans* expressaram um fator citotóxico, termoestável, levando a um ligeiro arredondamento das células NCI-H292, após 48h de observação, apresentando alterações seguidas por descolamento da membrana .

Associado a esses resultados, os ensaios com os corantes Azul de Toluidina e Hematoxilina- eosina foram utilizados para a visualização do núcleo e citoplasma sob a ação tóxica dos sobrenadantes sobre as células. Os efeitos mais acentuados foram observados em 40 e 48 horas de incubação quando houve perda de junções e contatos celulares, formação de anéis pericromáticos e corpos nucleares com condensação da cromatina. Interessantemente, após 48 horas de incubação, foi observada a presença de

grandes vacúolos na maioria das células, bem como o aumento do número de vesículas. Efeitos semelhantes foram observados pela toxina produzida por *Serratia marcescens* em células de ovário de hamster, utilizando a coloração de Azul de Toluidina (61). Martins et al (62) analisou também o efeito de vacualização em células Vero, pela toxina produzida por *Aeromonas veronii* biotipo *sóbria* utilizando os corantes Azul de Toluidina e Hematoxilina-eosina, observando efeito análogo a toxina de *A. xylosoxidans*, com exceção à alteração nuclear, a qual foi verificada somente no presente estudo.

Esses dados mostram que o fator citotóxico pode levar a danos nas células-alvo, contribuindo para o declínio da função pulmonar, o que poderia explicar casos como o relatado por pacientes estudados por Romano et al (63), mostrando o declínio da função pulmonar e rápida deterioração do estado clínico após a aquisição da infecção crônica por *A. xylosoxidans*, levando à morte em menos de cinco anos.

Para analisar o peso molecular da citotoxina produzida por *A. xylosoxidans* (cepa A31), o sobrenadante de cultura da bactéria foi submetido a ultrafiltração com membranas XM300 e XM50. Em uma análise geral, observamos que o fator de atividade citotóxica foi encontrada entre 300kDa - 50 kDa, e além disso, trata-se de uma citotoxina termoestável.

A fração que está relacionada com as maiores concentrações de liberação de interleucinas (IL-6 e IL-8) em células NCI-H292 foi a fração maior que 50 kDa, indicando que o fator citotóxico é o mesmo que induz a liberação dessas citocinas.

O estudo realizado por Palfreyman et al (43) com sobrenadantes de cultura de *B. cepacea*, mostrou que mesmo depois de aquecidos, cerca de 15% desses sobrenadantes

não perderam sua capacidade de induzir liberação de IL-8 em células de pulmão A549. No entanto, foi constatado em nosso estudo que a fração citotóxica de todas as amostras analisadas de *A. xylosoxidans* foram termoestáveis. Massion et al (65), revelaram que o sobrenadante de *P. aeruginosa* também induziu a produção e liberação de IL-8 por células epiteliais primárias, 16-HBE e monócitos, mesmo após o aquecimento, e a fração que estimulou a liberação de IL foi de aproximadamente 1kDa, diferente dos dados obtidos para o fator citotóxico de *A. xylosoxidans* do presente trabalho.

Também foi observado um aumento na liberação de IL-6 e IL-8 no escarro de pacientes com FC, contendo *P. aeruginosa* e *B. cepacea* (43,66), o que leva a uma amplificação adicional da resposta inflamatória nos pulmões. Hansen et al (28) avaliaram a resposta inflamatória de *A. xylosoxidans* comparando as concentrações de citocinas pró-inflamatórias no soro, no ar condensado liberado (EBC) e no escarro de pacientes cronicamente infectados com *P. aeruginosa*, *Bcc* e *A. xylosoxidans*, pacientes com FC sem infecção crônica, infecções causadas por microrganismos Gram-negativos e controles saudáveis. Em seus resultados observaram maiores concentrações de IL-6 em pacientes cronicamente infectados quando comparados aos pacientes não infectados e controles saudáveis, mostrando uma liberação no soro de 39,2 pg/mL, todavia não especificando se esta liberação de interleucina era provocada pelas bactérias ou por seus produtos.

Por outro lado, este estudo, prova que o sobrenadante de cultura (fração >50kDa) da bactéria induz liberação de IL-6 e IL-8 pelas células NCI-H292. As concentrações de IL-6 produzidas e liberadas pelas células NCI-H292, foram até 281pg/mL, 7 vezes mais que as concentrações de IL-6 encontradas no soro de pacientes no estudo feito por

Hansen *et al* (28). Nossos resultados apontam para a ação de um fator citotóxico de *A. xylosoxidans*, elucidando sua capacidade de induzir liberação de altos níveis de IL-6 e IL-8 nas células de pulmão humano, levando a uma resposta inflamatória exacerbada, pois estas citocinas são potentes recrutadores de linfócitos e neutrófilos, estimulando o influxo de grandes números de neutrófilos para as vias aéreas (14). Estes neutrófilos são as principais células efetoras, responsáveis pelas manifestações patológicas de doença pulmonar da FC (5,14). A inflamação é um processo vital e necessário para conter a infecção, mas na FC há um aumento desregulado do processo inflamatório normal, já no início do curso da doença (66).

Um estudo realizado por Hutchison *et al* (67) quantificou a capacidade inflamatória do lipopolissacarídeo (LPS), de oito espécies de microrganismos Gram-negativos, entre eles *A. xylosoxidans*, e o resultado obtido revelou que o LPS de *A. xylosoxidans* também induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF). Como o LPS é termoestável e com massa molecular entre 10kDa e 118KDa (39,68) foi avaliado se atividade citotóxica do exoproducto produzido por *A. xylosoxidans* poderia ser atribuída à ação do LPS. A ação da polimixina-B não inibiu a atividade citotóxica do sobrenadante da cultura bacteriana, não sendo observada diminuição das alterações celulares e da liberação de interleucinas, em comparação com o controle positivo. Esses resultados sugerem que esta citotoxina não se trata de uma endotoxina. Com base nos dados obtidos, acredita-se que seja necessário purificar este fator citotóxico, visando um melhor entendimento do processo inflamatório e declínio da função pulmonar nos pacientes com FC.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos observou-se que:

1- Nenhuma das amostras estudadas apresentou atividade hemolítica e enzimática, assim como capacidade de hemaglutinação e adesão em célula NCI-H292.

2- *A. xylosoxidans* apresentou capacidade de formar biofilme *in vitro*.

3- Todos os sobrenadantes de cultura das amostras estudadas apresentaram atividade citotóxica, termoestáveis, com capacidade de induzir alterações em células pulmonares NCI-H292, com formação de vacúolos no citoplasma e morte celular.

4- A amostra A31 produziu um fator citotóxico maior que 50 kDa que estimulou a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) pelas células NCI-H292, as quais estão envolvidas no processo inflamatório observado em pacientes com FC.

5- O fator citotóxico estudado não está relacionado com atividade de endotoxina (LPS).

Considerando os itens 1, 2, 3, 4 e 5 , concluo que *A. xylosoxidans* pode ser considerado um importante patógeno em pacientes com FC, por estarem envolvidos no processo inflamatório no pulmão desses pacientes.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yabuuchi E, Kawamura Y, Kosako Y, Ezaki T. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. Nov., and *Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans* (Ruger and Tan) comb. Microbiol Immunol. 1998 Nov; 42:429-438.
2. Tsui LC. Molecular genetics of cystic fibrosis. Pathol Biol. 1991; 39: 571-575.
3. Davis PB, Drumm ML, Konstan MW. State of the art: cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 154: 1229-1256.
4. De Rose V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. Eur Respir J .2002; 19: 333-340
5. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168:918-951.
6. Sturgess J, Imrie J. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. Am J Pathol 1982; 106:303-311.

7. Bedrossian, CWM, Greenberg, SD, Singer, DB, Hansen, JJ, Rosenberg, HS. The lung in cystic fibrosis. *Hum. Pathol.* 1976 Mar;7(2):195-204.
8. Bye, M. R, Ewig JM, Quittell LM. Cystic fibrosis. *Lung.* 1994; 172:251-270.
9. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:194-222.
10. Cooperstock MS. Inactivation of Endotoxin By Polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984 Oct;6: 422-425.
11. Hansen C, Pressler T, Høiby N, Gormsen M. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. *J Cyst Fibros.* 2006; 5:245-51.
12. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):158-63.
13. Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia complex* organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26, 213-216.

14. Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy Immunol. 2002; 23:5-27.
15. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F. Bacteremia and respiratory involvement by *Alcaligenes xylosoxidans* in patients infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16:933-93.
16. Edberg SC, Gallo P, Kontnick C. Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled water cooler, and tap water. Microb Ecol Health Dis. 1996; 9:67-77.
17. Coburn PS, Hancock LE, Booth MC, Gilmore M. A novel means of selfprotection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* citolysin. Infection and Immunity. 1999;67:.3339-3347.
18. Lis H, Sharon N. The biochemistry of plant lectins. Annu Rev Biochem.1973; 42: 541-574.
19. Askar A. Faba beans (*Vicia faba* L.) and their role in the human diet. Food and Nutrition Bulletin, 1986;8:15-24.
20. Kucera M, Lysenko O. The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. V. Isolation and properties of the proteinases toxic for larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. Folia Microbiol. 1968; 13:288-294.

21. Johnson JR., O'Bryan TT, Kuskowski M, Maslow JN. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun.* 2011; 69:5363-5374.
22. Chiu CH, Wong S, Hancock REW, Speert DP. Adherence of *Burkholderia cepacia* to respiratory tract epithelial cells and inhibition with dextrans. *Microbiology* 2001;147: 2651-2658.
23. Woods DE, Strauss DC, Johanson, JWG, Berry VK, and Bass JA. Role of pili in adherence to buccal epithelial cells. *Infect Immun.*1980; 29:1146-1151.
24. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284:1318-1322
25. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1980 May;28(2):546-556
26. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR., Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 2000; 407:762-764

27. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002 Jul; 292(2):107-13.
28. Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Høiby N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2010; 9(1):51-58
29. Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR., Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 2009;44: 547-558.
30. Hoiby N, Doring G, Schiøtz PO. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis. *Acta. Paediatr. Scand Suppl.* 1986; 301: 33-54.
31. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:918-951.
32. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine.* 2008 March; 14(3): 109-119.
33. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones S. Interleukin-6 Biology is Coordinated by Membrane-Bound and Soluble Receptors: Role in Inflammation and Cancer. *J Leuk Biol.*

2006; 80:227-236.

34. Hirano T. Interleukin-6. In: A Thomson, Editor. The Cytokine Handbook, Academic Press, London. 1994. 145-168.

35. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annu Rev Immunol.1990; 8:253-78.

36. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercrine' cytokine family. Annu Rev Immunol. 1991; 9:617-648.

37. Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. Advances in Immunology. 1997; 66:101-195.

38. Duggan JM, Goldstein SJ, Chenoweth CE, Kauffman CA, Bradley SF. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. Clin Infect Dis. 1996; 23:569-576.

39. Ribi E, Anacker RL, Brown R, Haskins WT, Malmgren B, Milner KC, Rudbach JA. Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. J Bacteriol. 1966 Nov; 92: 1493-509.

40. Callahan LT III. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. Infect Immun. 1974; 9:113-118.
41. Pavlovski OR, Gordon FB. J Infect. Dis. 1972, 126:613-621.
42. Figueiredo PMS, Furumura MT, Santos AM, Sousa ACT, Kota DJ, Levy CE, Yano T. Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. Lett Appl Microbiol. 2006; 43: 443-449.
43. Palfreyman RW, Watson ML, Eden C, Smith AW. Induction of Biologically Active Interleukin-8 from Lung Epithelial Cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Products Infect Immun. 1997;65: 617-622.
44. Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JR. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 27:73-77.
45. Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB. Colibacillosis In: SAIF YM. Disease of poultry. Ames: Iowa State University Press. 2003;631-656.
46. Monfort P, Baleux B. Haemolysin occurrence among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* strains isolated from different aquatic ecosystems. Res Microbiol. 1991; 42: 95-102.

47. Archimbaud C., Shanka N., Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonn F, Joly B.: In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. Res Microbiol. 2002; 153: 75-80.
48. Nord CE, Wadstrom T and Wretling B. Characterization of three *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species by extracellular enzymes and haemolysins. Med Microbiol Immunol. 1975; 161: 79-87.
49. Bieth JG. The elastase. J Soc Biol. 2001;195(2):173-179.
50. Rust L, Messing CR, Iglewski BH. Elastase Assays. Methods Enzymol. 1994; 235: 561-562.
51. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. Am J Trop. Med Hyg. 2004; 71:687-690.
52. Scaletsky ICA, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun. 1984; 2:89-92.
53. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev. 1987; 51:206-220.

54. Johnson MK and Marrazzo DB. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1980 Set;29(3): 1028-1033.
55. Klipstein FA, Engert RF. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. Infect Immun. 1976; 13:1307-14.
56. Mello ML, Vidal B. Práticas em Biologia Celular. Rio de Janeiro: Edgard Blucher; 1980. p.71.
57. Weinstein, L. Polymyxin B. In L. Goodman and A. Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Macmillan, New York. 1970; 1287-1290.
58. Suttrop N, Flöer B, Schnittler H, Seeger W and Bhakdi S Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. Infect Immun. 1990; 58:3796-3801.
59. Garcia DO, Timenetsky J, Martinez MB, Francisco W, Sinto SI, Yanaguita RM. Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. Braz J Microbiol. 2002; 33:1643-54.
60. Nicas TI, Iglewski BH. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol. 1985; 31:387-392.

61. Kim MJ, Bancroft E, Donlan RM, Mascola L. *Alcaligenes xylosoxidans* Bloodstream Infections in Outpatient Oncology Office. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7): 1046-1052.
62. Carbonell GV, Falcon R, Yamada AT, Fonseca BA, Yano T. Morphological and intracellular alterations induced by *Serratia marcescens* cytotoxin. *Research in Microbiology*. 2004; 155:25-30.
63. Martins LM, Catani CF, Falc RM, Carbonell GV, Azzoni AA, Yano T. Induction of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* vacuolating cytotoxic factor. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007; 49(2):197-204.
64. Romano L, Bellodi S, Lugani F, Manno G. *Alcaligenes* as a pathogen in airways chronic infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2003; 5:412–413.
65. Massion PP, Inoue H, Richman-Eisenstat J, Grunberger D, Jorens PG, Housset B, Pittet JF, Wiener-Kronish JP, Nadel JA. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J Clin Invest*. 1994; Jan;93(1):26-32.
66. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan M W, Hilliard K A, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:2111-2118

67. Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JR. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 27:73-77.

68. McIntire FC, Barlow G, Sievert H, Finley R, Yoo A. Studies on a Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. Heterogeneity and Mechanism of Reversible Inactivation by Sodium Deoxycholate. Biochemistry. 1969; 8:4063-4067.

8 ANEXOS

Figura 1- Teste de Elastase, (A) Cepa A31, ausência de halo de degradação; (B) Controle positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853, presença de halo de degradação.

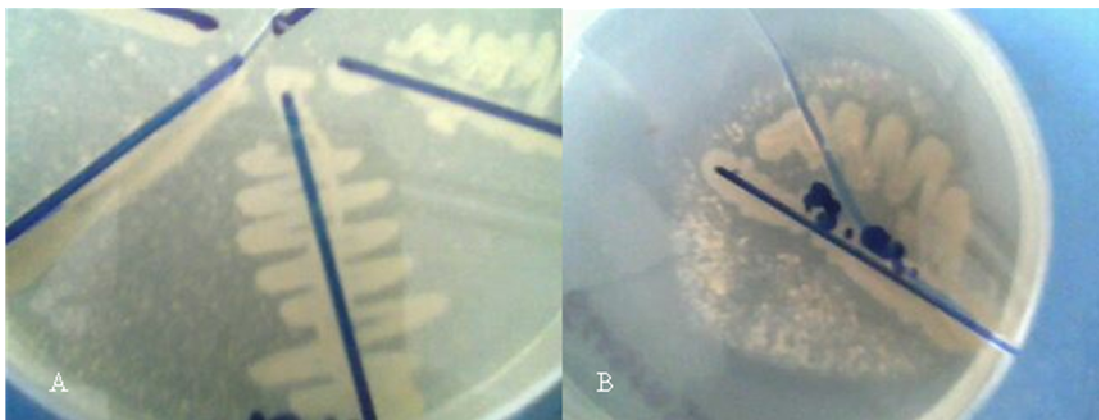


Figura 2- Teste de Esterase (A) Controle positivo, *P. aeruginosa*, formação de halo ao redor do crescimento bacteriano e controle negativo, *E. coli*, ausência de halo ao redor do crescimento bacteriano; (B) Amostras de *A. xylosoxidans*, negativas para esterase.

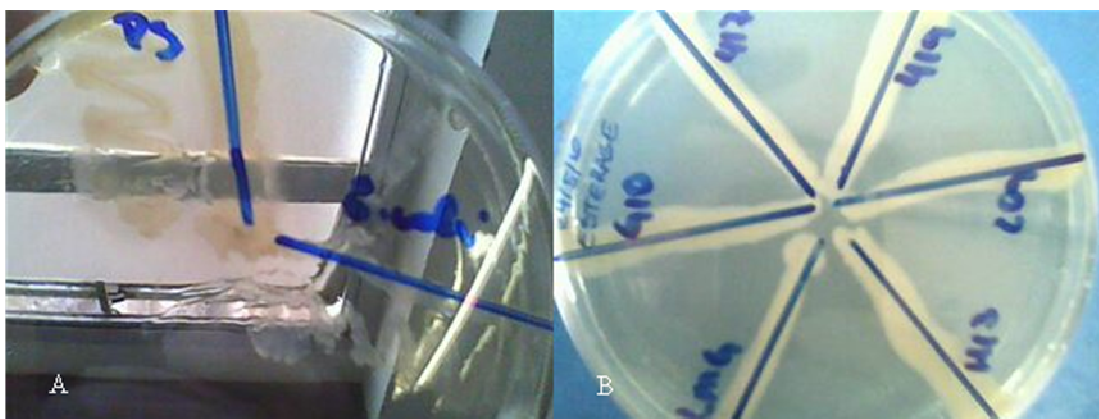


Figura 3 - Teste de Lecitinase (A) Controle positivo, *P. aeruginosa*, formação de halo ao redor do crescimento bacteriano e controle negativo, *E.coli*, ausência de halo ao redor do crescimento bacteriano,; (B) Amostras de *A.xylosoxidans*, negativas para lecitinase.

