

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Clarissa Campbell Menezes

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ NA INFLAMAÇÃO
PULMONAR INDUZIDA PELO COMPONENTE DE *QUORUM SENSING* DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA 3-OXO DODECANOIL HOMOSERINA LACTONA.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Adriana Ribeiro Silva

RIO DE JANEIRO

2011

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

M543

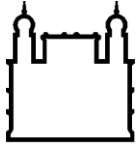
Menezes, Clarissa Campbell.

Estudo do envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na inflamação pulmonar induzida pelo componente de *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* 3-Oxo Dodecanoil Homoserina Lactona. / Clarissa Campbell Menezes. – Rio de Janeiro, 2011.
xviii, 115 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.
Bibliografia: f. 90-97

1. PPAR gama. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Pneumonia. I.
Título.

CDD 571.9457



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Clarissa Campbell Menezes

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ NA INFLAMAÇÃO
PULMONAR INDUZIDA PELO COMPONENTE DE *QUORUM SENSING* DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA 3-OXO DODECANOIL HOMOSERINA LACTONA.

ORIENTADORA : Dra. Adriana Ribeiro Silva

Aprovada em: 19/08/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Clarissa Menezes Maya Monteiro (**Presidente**)
Prof. Dr. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho
Prof. Dr. Magda Fráguas Serra (Revisora e suplente)
Prof. Dr. Cecília Jacques de Almeida (Suplente)

Rio de Janeiro, 19 de agosto de 2011

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, chefiado pelo Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Algo só é impossível até que alguém duvide
e acabe provando o contrário.”*

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido o privilégio de trabalhar com o que gosto, guiando minha vocação para a pesquisa e encaminhando meu futuro sempre da melhor maneira possível.

À minha mãe, Edmeia, exemplo de superação e dedicação, por nunca ter poupado esforços para nos dar a melhor educação ao seu alcance, sempre incentivando o aprendizado com seus dons de professora e oferecendo todo o suporte para que pudéssemos correr atrás dos nossos sonhos.

A meu pai, Humberto, por me dar o dom da vida e a transmitir o gene responsável pelo comportamento compulsivo de tentar entender como as coisas funcionam, mesmo que para isso elas tenham que ser decompostas em partes menores que jamais voltarão a ser funcionais.

À minha irmã, Daniele, por incentivar minhas idéias inovadoras e me orientar com seu tino para negócios, sempre oferecendo um par de ouvidos não muito acurados para escutar minhas dúvidas. E por me dar sobrinhos lindos!

Aos meus sobrinhos, Ana Clara e Henrique, por me ensinarem a equilibrar momentos de trabalho e diversão e pelas perguntas inesperadas que me fazem ter novamente a sensação de que o mundo é fantástico e que vale a pena ser cientista!

Ao pai dos meus sobrinhos, Luiz Guilherme Trechau, por seu carinho e excelente companhia durante todo esse tempo, incentivando meu aprendizado com livros, microscópios, kits de química, visitas a museus e o que mais aparecesse pela frente.

Ao Victor Bornstein, meu companheiro, por me lançar nesta grande aventura para a qual estou seguindo. Mesmo preferindo os linfócitos e nunca lembrando o nome completo da molécula com que eu trabalho (!), sua consultoria científica foi muito importante para o desenvolvimento deste projeto. Seu apoio e carinho constantes tornam você co-autor dessa dissertação.

Às minhas amigas de infância, Priscila Lopes e Hortência Alves, por nunca desistirem de estar comigo mesmo quando isso significava encontrar sua amiga ausente fedendo a camundongo e mal-humorada depois do milésimo experimento mal-sucedido.

Aos meus amigos de faculdade, Kassia Leone, Vinicius Vieira, Dianne Torres, Anderson Leite, Fabrício Belgrano, Vera Ruffato e Agatha Bonaiuti, pelos momentos de diversão garantida por piadas nerds e por nunca esquecerem de mim durante todo esse tempo de afastamento.

Ao Dr. Hugo Castro, por ter me acolhido no Laboratório de Imunofarmacologia, apostando no meu potencial e provendo sempre o necessário para o meu desenvolvimento científico.

À Dra. Patricia Bozza, por ser um grande exemplo para as mulheres na pesquisa, por sua ajuda em todos os momentos e pelas contribuições científicas essenciais.

À minha orientadora, Dra. Adriana Ribeiro, por acolher minhas idéias e moldá-las à realidade, me proporcionando total apoio e contribuindo sempre com sua experiência acadêmica durante todos esses anos de convivência.

À futura doutora Bárbara D'Alegria, amiga querida e minha primeira mentora de bancada, por me ajudar a dar meus primeiros passos sozinha e por continuar a incentivar (mesmo que de longe) meu desenvolvimento científico e pessoal, sempre com alegria (sem trocadilhos) e carinho. Saudades!

À Dra. Liliane Rosa Alves, amiga fiel, mãe dedicada e profissional ímpar, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais, pelo carinho e compreensão durante todos esses anos. Também sinto muito sua falta!

À Rose Branco, exemplo maior de eficiência, por sempre auxiliar aqueles que buscam sua ajuda com problemas acadêmicos ou pessoais, organizando momentos felizes no laboratório e sendo sempre carinhosa e prestativa com todos.

Às jovens pesquisadoras do grupo sepse, Dra. Rachel Novaes, Dra. Danielle Oliveira, Dra. Joana D'Ávila, Dra. Patricia Reis e Dra. Adriana Abreu, por demonstrarem que profissionalismo não é incompatível com alegria e diversão, comprovando que respeitabilidade e eficiência podem andar lado a lado com integração e companheirismo.

Aos demais pesquisadores do grupo Sepse, Dr. Fernando Bozza, Dr. Cassiano Gonçalves e André Japiassú, por suas contribuições científicas através da integração entre ciência básica e pesquisa clínica.

Aos demais companheiros do grupo Sepse, especialmente Rodrigo Amâncio, Mariana Teixeira, Silvio Caetano e Pedro Braga, pelos muitos momentos de diversão no dia-a-dia e pela colaboração.

Ao Dr. Válber Frutuoso e a todo o grupo de Produtos Naturais, especialmente Alessandra Mendonça, Diogo Dibo, Cristiane Zanon, Andrea Surrage, Julliana Azeredo, Nathalia Costa, Jaime Ribeiro, Monica Farah e Laryssa Ribeiro pelo grande exemplo de trabalho em grupo, além de seu bom-humor e alegria contagiantes.

A todo o grupo de Corpúsculos Lipídicos, especialmente Raphael Molinaro, Patricia Elaine, Giselle Lima, Narayana Fazolini, Natália Roque, Eugênio Hottz, Roberta Xavier e Beatriz Guerreiro, pela amizade, pelos momentos de descontração, pela colaboração e por sempre organizarem os programas mais divertidos fora do laboratório, como o *Imunofar on Ice!*

À minha homônima, Dra. Clarissa Menezes Maya-Monteiro, pesquisadora exemplar, pela sua preocupação e carinho durante todo esse tempo e por estar sempre presente na bancada, ensinando – e testando - os alunos (seus ou não!).

Ao Edson Assis, amigo querido, contador de piadas ruins, companheiro de *junk food*, confidente, mentor espiritual de ELISAs, e pessoa maravilhosa, pela ajuda nas tentativas infrutíferas de organizar a mixórdia.

À Cláudia Valéria, que veio da porta de frente direto para nossos corações e se transformou numa grande amiga, por toda a sua ajuda e carinho, e pela nossas conversas quase sempre pouco sérias!

À Flora Magno, a única cientista bailarina que conheço, por fazer crescer nossa amizade e cumplicidade com seu jeito meigo, sempre nos alegrando com suas brincadeiras e comentários espirituosos!

À Isabel Matos, por ser minha companhia constante no laboratório, vivenciando comigo todos os momentos mais críticos da vida acadêmica, partilhando alegrias e frustrações, conversando sobre experimentos, divagando sobre o presente e o futuro, refreando nossos instintos de comer porcarias, enfim sendo uma grande amiga!

À Isaclaudia Azevedo, por ser o guru da biologia molecular, por partilhar seu TOC por simetria e organização comigo, por ser uma amiga muito fofa e carinhosa e principalmente por me deixar brincar de boneca fazendo penteados no seu cabelo durante momentos inevitáveis de tédio!

Ao André Costa, pela sua lealdade, gentileza e dedicação que nos aproximaram e tornaram-nos bons amigos!

A todos os demais membros do Laboratório de Imunofarmacologia, por fazerem deste lugar um verdadeiro lar para mim durante esses cinco anos e meio.

A todos que trabalham no pavilhão Ozório de Almeida, por contribuírem para que alunos e pesquisadores tenham a estrutura e o suporte necessários para desenvolverem seus trabalhos.

À revisora, Dra. Magda Fráguas Serra e demais membros da banca pela sua colaboração valiosa.

A todos que trabalham na pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, ao Instituto Oswaldo Cruz e às agências de fomento por me propiciarem a oportunidade de concluir esta etapa acadêmica com total proveito numa instituição de excelência.

Lista de abreviaturas

ADRP	<i>Adipocyte Differentiation Related Protein</i> , Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
ADP	<i>Adenosine Diphosphate</i> , Difosfato de Adenosina
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> , Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALI	<i>Acute Lung Injury</i> , Injúria Pulmonar Aguda
AP-1	<i>Activator Protein-1</i> , Proteína Ativadora 1
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA)
ATS	<i>American Thoracic Society</i> , Sociedade Torácica Americana
AzPC	<i>1-hexadecyl-2-azelaoyl glycerophosphocholine</i> , Hexadecil azeloil fosfatidilcolina
BAL	<i>Broncho-Alveolar Lavage</i> , Lavado Bronco-Alveolar
BCA	<i>Bicinconic Acid</i> , Ácido Bicincônico
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Albumina de Soro Bovino
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> , Adenosina Monofosfato
CAP	<i>Community Acquired Pneumonia</i> , Pneumonia Adquirida na Comunidade
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i> , Síndrome da Resposta Antiinflamatória Compensatória
CBP	<i>cAMP-Response Element-Binding Protein (CREB)/CREB-Binding Protein</i> , Proteína Ligadora de CREB (Proteína Ligadora do Elemento de Resposta ao cAMP)
CC	Quimiocinas com motivo C-C
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Grupamento de Diferenciação
CDC	<i>Center for Disease Control and prevention</i> , Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> , Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística
CGD	<i>Chronic Granulomatous Disease</i> , Doença Granulomatosa Crônica
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> , Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
COX	Ciclooxigenase

cPLA2	<i>Cytosolic Phospholipase A2</i> , fosfolipase A2 citosólica
C4 HSL	N- butiril <i>L</i> - homoserina lactona
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i> , 4'-6-Diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil Sulfóxido de Sódio
EDTA	<i>Diaminoethanetetraacetic Acid</i> , Ácido etilendiamino tetra -acético
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i> , Ensaio Imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i> , Quinase Regulada por sinal Extracelular
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> , Trifosfato de Guanosina
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> , Lipoproteínas de Alta Densidade
JNK	<i>c-Jun -amino-terminal kinase</i> , Quinase c-Jun- amino terminal
KC	<i>Keratinocyte-derived Chemokine</i> , Quimiocina derivada de Queratinócitos
LT	Leucotrieno
LDL	<i>Light Density Lipoprotein</i> , Lipoproteína de Baixa Densidade
LO	Lipoxigenase
LPS	<i>Lipopolyssacharide</i> , Lipolissacarídeo
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i> , Proteína Ativada por Mitógeno
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> , Proteína Quimiotática para Monócitos 1
MOD	<i>Multiple Organ Dysfunction</i> , Falência Múltipla dos Órgãos
MRSA	<i>Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> , Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-Fosfato
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> , Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i> , Fator nuclear κB
NLRs	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain/NOD-like receptors</i> , Receptores Semelhantes ao Domínio de Oligomerização pela Ligação de Nucleotídeos
NNIS	<i>American National Nosocomial Infection Surveillance System</i> , Sistema Nacional Americano de Vigilância em Infecções Nosocomiais
3-oxo C12 HSL	N- 3-oxo dodecanoil <i>L</i> - homoserina lactona
PBS	<i>Phosphate- buffered Saline</i> , Solução Salina Tamponada por Fosfato

PG	Prostaglandina
15dPGJ ₂	15 deoxi -2,14 prostaglandina J2
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> , Fosfatidilinositol-3-Quinase
PKC	<i>Protein Kinase C</i> , proteína quinase C
PON	Paraoxonase
PPARs	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors</i> , Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo
PPRE	<i>PPARγ Responsive Element</i> , Elemento Responsivo ao PPAR
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i> , Sinal tipo Quinolona de <i>Pseudomonas</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> , Receptores de Reconhecimento de Padrão
PSA	Persulfato de amônio
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> , Fluoreto de Polivinilideno
RLR	<i>Rig I like receptors</i> , Receptores Semelhantes a Rig I
RXR	Receptor X de Retinóides
SCR1	<i>Steroid Receptor Co-activator 1</i> , Co-ativador 1 do Receptor de Esteróide
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , Lauril Sulfato de Sódio
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> , Erro Padrão da Média
SIRS	<i>Severe Inflammatory Response Syndrome</i> , Síndrome de Resposta Inflamatória Severa
STAT-1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i> , Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1
TBS	<i>Tris- buffered Saline</i> , Solução Salina Tamponada por Tris
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> , Fator transformador de crescimento beta
TIP47	<i>47 kDa Terminal Interaction Protein</i> , Proteína de Interação de porção Terminal de 47 kDa
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> , Receptores Semelhantes ao Toll
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i> , 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina TNF- α
TZDs	Tiazolidinedionas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VAP	<i>Ventilator-Associated Pneumonia</i> , Pneumonia Associada à Ventilação mecânica

Lista de figuras

Figura 1.1. Dano tecidual na injúria pulmonar aguda.	6
Figura 1.2. Aspecto dos corpúsculos lipídicos em células mononucleares fixadas e/ou coradas por diferentes metodologias	8
Figura 1.3. Patógenos nosocomiais	11
Figura 1.4. Comparação entre o número de sistemas de efluxos de drogas previstos com bases no seqüenciamento do DNA genômico de <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	14
Figura 1.5. Fatores de virulência de <i>P.aeruginosa</i>	16
Figura 1.6. Etapas da formação de biofilme	17
Figura 1.7. Regulação da expressão gênica bacteriana através da sinalização intercelular dependente da densidade populacional (<i>Quorum Sensing</i>)	21
Figura 1.8. Participação dos fatores de virulência em diversas etapas da fisiopatologia das infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 1.9. Estrutura geral de moléculas envolvidas na comunicação bacteriana de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 1.10. Diferentes mecanismos pelos quais o receptor nuclear PPAR γ é capaz de modular a transcrição gênica	29
Figura 4.1. Curva dose-resposta com 3-oxo C12 HSL	47
Figura 4.2. Análise da celularidade de amostras de sangue periférico e lavado bronco-alveolar (BAL) de camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL	49
Figura 4.3. Avaliação da atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL	50
Figura 4.4. Avaliação da formação de edema pulmonar em camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL	51
Figura 4.5. Caracterização dos mediadores solúveis envolvidos na resposta	54

inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL

- Figura 4.6.** Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos em células presentes no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL 56
- Figura 4.7.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a migração de células no modelo de inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. 58
- Figura 4.8.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL 59
- Figura 4.9.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL 60
- Figura 4.10.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória causada por 3-oxo C12 HSL 62
- Figura 4.11.** Efeitos da rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a inflamação induzida por 3-oxo C12 HSL 65
- Figura 4.12.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a modulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL 67
- Figura 4.13.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a modulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL 69
- Figura 4.14.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a migração de células no modelo de inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL 70
- Figura 4.15.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL 72
- Figura 4.16.** Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL 73

Figura 4.17. Efeitos da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a inflamação induzida por 3-oxo C12 HSL	76
Figura 4.18. Efeito da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre os níveis de citocinas e quimiocinas presentes no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL	77
Figura 5.1. Resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL	88

Lista de tabelas

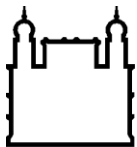
Tabela 1.1 Produtos secretados pelos macrófagos e suas funções	3
Tabela 1.2. Hidrólise do componente de <i>quorum sensing</i> de <i>P. aeruginosa</i> 3-oxo C12 HSL por diferentes amostras biológicas	26

Índice

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1.Introdução	1
1.1.Pneumonia	1
1.1.1.Inflamação pulmonar	1
1.1.2.Epidemiologia e etiologia	9
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3. <i>Quorum sensing</i>	19
1.4.Paraoxonases	24
1.5.PPAR γ	26
2. Objetivos	30
3. Material e métodos	32
3.1. Animais	32
3.2.Drogas e soluções	32
3.3.Indução de inflamação pulmonar pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL	40
3.4.Determinação de parâmetros celulares no modelo de inflamação pulmonar induzida por instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL	40
3.5.Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos	41
3.6.Coleta de tecido pulmonar para ensaios de Mieloperoxidase e Western Blotting	41
3.7.Ensaio de atividade mieloperoxidase	42
3.8.Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicincônico (<i>Bicinchonic Acid</i> , BCA, Pierce	42
3.9.Western Blotting	43

3.10. Dosagem de leucotrieno B ₄ (LTB ₄) através do Kit de Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Immunoassay</i> , EIA) monoclonal (Cayman Chemical)	44
3.11. Dosagem de citocinas através do Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA)	44
3.12. Análise estatística	45
4. Resultados	46
4.1. Caracterização da inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL	46
4.1.1. Análise dose-resposta da inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL	46
4.1.2. Análise da celularidade do sangue e do lavado bronco-alveolar de camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL	48
4.1.3. Determinação de atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL	50
4.1.4. Avaliação da formação de edema pulmonar na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL	51
4.1.5. Análise de mediadores solúveis presentes na resposta inflamatória induzida pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL	52
4.1.6. Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL	55
4.2. Investigação sobre o papel do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL	57
4.2.1. Efeito do tratamento com o agonista de PPAR rosiglitazona (0,5mg/kg) sobre a migração celular causada por 3-oxo C12 HSL	57
4.2.2. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL	59
4.2.3. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre o edema pulmonar em animais desafiados com 3-oxo C12 HSL	60
4.2.4. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória pulmonar causada por 3-	61

oxo C12 HSL	
4.2.5.Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL	63
4.2.6.Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre expressão de paraoxonase no tecido pulmonar durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL	66
4.2.7.Modulação da expressão de paraoxonase pelo tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL	68
4.2.8.Efeito do tratamento com o agonista de PPAR rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a migração celular causada por 3-oxo C12 HSL	70
4.2.9.Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL	72
4.2.10.Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em animais desafiados com 3-oxo C12 HSL	73
4.2.11.Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL	74
4.2.12.Análise do efeito da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre os níveis de CCL2/MCP-1 presentes durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL	77
5. Discussão	78
6. Conclusões	87
6.1. Resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL	89
6.2. Efeitos do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona na resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL	89
7. Referências bibliográficas	91



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

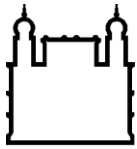
ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA PELO COMPONENTE DE QUORUM SENSING DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA 3-OXO DODECANOIL HOMOSERINA LACTONA.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clarissa Campbell Menezes

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (PA) é um dos principais agentes etiológicos de pneumonias nosocomiais, cujo tratamento é dificultado por sua resistência a antibióticos e pela secreção de fatores de virulência. Novas alternativas para o tratamento destas infecções incluem manipular o sistema de comunicação bacteriano conhecido como *quorum sensing* (QS), reduzindo a expressão destes fatores de virulência e prevenindo seus efeitos deletérios em células e sistemas eucariotos. Os efeitos do componente de QS de PA 3-oxo dodecanoil homoserina lactona (3-oxo C12 HSL) nos pulmões não são conhecidos; portanto, a primeira etapa de nosso trabalho consistiu na caracterização dos efeitos desta molécula no ambiente pulmonar. Para isso, camundongos swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL por via intratraqueal tiveram amostras de sangue, lavado bronco-alveolar (BAL) e tecido pulmonar e coletadas seis horas após o procedimento. Nossos resultados demonstram que inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL se caracteriza pela migração de células mononucleares e neutrófilos para o espaço alveolar, níveis elevados de atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar e formação de edema. A resposta inflamatória causada por 3-oxo C12 HSL não alterou os níveis de TNF- α , MIF, IL-10 e IL-12 no tempo analisado. Foram observados aumentos nos níveis de IL-6, CCL2/MCP-1, CXCL1/KC e LTB₄ no BAL de animais desafiados, sendo o aumento deste eicosanóide acompanhado por uma indução de corpúsculos lipídicos. Evidências *in vitro* relatam o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ nos efeitos pró-inflamatórios atribuídos a 3-oxo C12 HSL; portanto, decidimos estudar os efeitos do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona no modelo de inflamação pulmonar causado por este componente de QS. Nós observamos que o tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) uma hora após o estímulo diminuiu a formação de corpúsculos lipídicos e de edema pulmonar, causando também uma redução na migração de células mononucleares e neutrófilos e uma menor atividade mieloperoxidase no pulmão dos animais tratados. A redução da migração de células mononucleares parece estar associada à uma redução dos níveis de CCL2/MCP-1, enquanto o decréscimo nos neutrófilos parece envolver a modulação de CXCL1/KC. A instilação com 3-oxo C12 HSL diminuiu a expressão da enzima paraoxonase (PON) no tecido pulmonar, fenômeno que não foi revertido pelo tratamento com rosiglitazona nesta dose. Estudos demonstram que o PPAR γ está envolvido na expressão de PON e que a superexpressão desta enzima é capaz de proteger animais da mortalidade por PA em função de sua atividade lactonase; por este motivo, decidimos testar uma dose maior de rosiglitazona (5 mg/kg) para alcançar mais um benefício nesta proposta terapêutica. O tratamento com rosiglitazona nesta dose foi capaz de reverter a redução da expressão de paraoxonase causada por 3-oxo C12 HSL, diminuindo a formação de edema, a migração de neutrófilos e os níveis de atividade mieloperoxidase no pulmão de animais desafiados. O número de células mononucleares recuperado no BAL de animais estimulados e tratados com a droga não foi reduzido, bem como os níveis de CCL2/MCP-1. De fato, a droga por si só causou um aumento de CCL2/MCP-1 que parece ter contribuído para a indução de corpúsculos lipídicos observada. Devido ao envolvimento de macrófagos e da quimiocina CCL2/MCP-1 no processo de eliminação bacteriana, estudos em modelos de pneumonia por PA precisam ser conduzidos para melhor avaliar esta dose de rosiglitazona e validar esta droga como uma estratégia terapêutica no combate à esta bactéria.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA PELO COMPONENTE DE QUORUM SENSING DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 3-OXO DODECANOIL HOMOSERINA LACTONA.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clarissa Campbell Menezes

Pseudomonas aeruginosa (PA) is a major pathogen involved in nosocomial pneumonia. These infections are difficult to manage due bacterial antibiotic resistance and secretion of virulence factors; therefore, current approaches to treat PA infections now focus on manipulating the bacteria communication system known as *quorum sensing* in order to reduce the production of those virulence factors and mitigate their deleterious effects to the host. Since there are no reports about the effects of the PA main *quorum sensing* component 3-oxo dodecanoyl homoserine lactone (3-oxo C12 HSL) in the lung the first step of our work consisted in investigating the host pulmonary response to this molecule in a mouse model. In order to do so, swiss mice submitted to intratracheal instillation with 3-oxo C12 HSL had blood, BAL and lung tissue samples collected six hours after the procedure. Our results show that the inflammatory response elicited by 3-oxo C12 HSL is characterized by the migration of both mononuclear cells and neutrophils to the alveolar space, together with high levels of myeloperoxidase activity in lung tissue and development of pulmonary edema. We found that the levels of TNF- α , MIF, IL-10 and IL-12 were not altered, while there was a significant increase in IL-6 CCL2/MCP-1 and CXCL1/KC in BAL. The increase in LTB4 levels in the BAL of defied animal was accompanied by an induction of lipid bodies. *In vitro* evidences report the involvement of the nuclear receptor PPAR γ in the inflammatory events ascribed to 3-oxo C12 HSL; therefore, we decided to study the effects of PPAR γ agonist rosiglitazone in the pulmonary inflammation caused by this *quorum sensing* component. We observed that rosiglitazone administration (0,5 mg/kg) one hour after stimulation was able to reduce the formation of lipid bodies and pulmonary edema, besides decreasing the migration of mononuclear cells, neutrophils and myeloperoxidase activity in the lung of defied animals. This reduction in the migration of mononuclear cells seems to be due to a decrease in the levels of CCL2/MCP-1, while the impairment in neutrophil migration seems to involve the modulation of CXCL1/KC. 3-oxo C12 HSL instillation also decreased paraoxonase (PON) expression in lung tissue, which was not reverted by rosiglitazone treatment at this dose. Since it was reported that PPAR γ is able to regulate PON expression and that the overexpression of this enzyme seems to protect animals from PA mortality due its lactonase activity we searched to modulate this enzyme with a higher dose of rosiglitazone (5 mg/kg) in order to achieve this extra benefit in our proposal. We observed that this dose was able to revert the decrease in PON expression caused by 3-oxo C12 HSL, reducing the pulmonary edema, neutrophil migration and myeloperoxidase activity in defied animals. There was no reduction in the number of mononuclear cells recovered from the BAL of stimulated animals, which was also observed for CCL2/MCP-1 levels. In fact, the drug itself at his dose caused an increase in CCL2/MCP-1 that possibly accounted for the induction of lipid bodies. Because macrophages and CCL2/MCP-1 have a crucial role in the clearance of bacteria, this dose of rosiglitazone has to be tested in a PA pneumonia model so the effects observed in our investigation can be validate rosiglitazone as an therapeutic approach to the treatment of these infections.

1. Introdução

1.1 Pneumonias

1.1.1 Inflamação pulmonar

Os pulmões constituem a maior superfície epitelial não-queratinizada do corpo humano em contato com o ambiente externo. Tanto as vias aéreas superiores quanto as inferiores estão continuamente expostas a uma miríade de partículas presentes no ar atmosférico, cujo volume de inalação diário chega a 10.000 L. Dentre os materiais comumente inalados constam poeira, gases tóxicos e microorganismos, todos potencialmente danosos para o hospedeiro (1). Sendo assim, as vias aéreas são dotadas de um complexo de defesa variado, visando a manutenção da homeostase desses sítios. Esse sistema de defesa altamente integrado inclui componentes celulares, como macrófagos, neutrófilos e outros leucócitos, componentes humorais diversos, incluindo anticorpos e fatores bactericidas não-específicos, e um aparato mucociliar traqueobrônquico responsável pela remoção mecânica de partículas (2).

A produção de secreções brônquicas e seu transporte contínuo das vias aéreas periféricas até a orofaringe representam um mecanismo importante de defesa não-imune do hospedeiro. Condições em que o transporte ciliar é prejudicado ou ainda alterações na viscosidade do muco (como as observadas em grande parte dos pacientes acometidos pela doença pulmonar obstrutiva crônica ou pela fibrose cística) tornam o hospedeiro suscetível às infecções pulmonares crônicas (1).

A secreção brônquica é composta em grande parte por água e muco, um polímero do polissacarídeo mucina (3), que lhe garante propriedades viscoelásticas. Além disso, o fluido que recobre os alvéolos normalmente contém proteínas dotadas de funções homeostáticas, antioxidantes ou imunes, como surfactantes, transferrina, e imunoglobulina A e G, respectivamente (4). Os surfactantes possuem uma composição 90% lipídica e 10% protéica, sendo sua porção protéica representada por uma das quatro diferentes proteínas (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D). Devido a sua natureza anfipática, os surfactantes atuam como redutores da tensão superficial da água, facilitando as trocas gasosas e estabilizando as estruturas alveolares durante a respiração. Além de suas propriedades biofísicas, as moléculas SP-A e SP-D (também conhecidas como colectinas pulmonares) apresentam capacidade de se ligar a patógenos e danificar-lhes as membranas celulares, além de promover a

fagocitose microbiana e a ativação ou desativação da resposta inflamatória por macrófagos alveolares (5).

De maneira geral, os macrófagos representam a maior parte dos fagócitos encontrados constitutivamente nas vias aéreas inferiores, compondo 85% da população de células residentes recuperadas no lavado bronco-alveolar (BAL) (6). Além dos macrófagos alveolares, a população de macrófagos pulmonares inclui ainda macrófagos de vias aéreas, macrófagos intersticiais e macrófagos intravasculares, formando um agrupamento heterogêneo de células (7). Em condições fisiológicas, os macrófagos pulmonares protegem o órgão contra partículas, debris celulares e microorganismos frequentemente encontrados no ar sem iniciar uma resposta inflamatória potencialmente danosa ao tecido; porém, quando desafiados por agentes virulentos, os macrófagos atuam como a primeira linha de defesa, recrutando outros componentes inflamatórios do sistema imunitário e participando efetivamente da destruição microbiana (2).

O reconhecimento do patógeno é a primeira etapa da resposta imune inata nos pulmões, sendo primariamente exercido por Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) membranares ou citosólicos. Os receptores de superfície abrangem alguns receptores semelhantes ao Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*), os receptores para manose, os receptores *scavenger* e outros receptores diversos, enquanto os sensores citosólicos incluem principalmente os receptores semelhantes ao domínio de oligomerização pela ligação de nucleotídeos (NLRs, do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain/NOD-like receptors*) e receptores semelhantes a Rig I (RLRs, do inglês *Rig I like receptors*) (8).

A ativação dos receptores mencionados induz à fagocitose, levando à eliminação de grande parte dos microorganismos inalados. Porém, quando a carga microbiana é excessiva ou a função dos macrófagos se encontra prejudicada, as bactérias podem proliferar no meio extracelular apresentando uma taxa de replicação que excede sua taxa de remoção. Ainda que um pequeno número de microorganismos ou mesmo bactérias não patogênicas possam ser eliminados sem deflagrar uma resposta inflamatória, uma grande carga microbiana ou a presença de bactérias virulentas induzirão uma sinalização diferenciada, acarretando o estabelecimento de um quadro inflamatório. Um resumo dos produtos liberados por macrófagos alveolares ativados pode ser encontrado na tabela 1.1.

Tabela 1- Produtos secretados pelos macrófagos e suas funções

Molécula	Função
Enzimas	
Arginase	Degradação de arginina
Catepsina B	Antimicrobiano (intracelular)
Lisozima	Antimicrobiano (intracelular)
Hidrolases ácidas	Degradação de debris (intracelular)
Convertase da angiotensina	Ativador de angiotensina
Metaloproteinases de matriz	Degradação de proteínas de matriz
Elastase	Degradação de elastina (extracelular)
Colagenase	Degradação de colágeno (extracelular)
Peroxidase	Geração de peróxido de hidrogênio
Superóxido dismutase	Conversão de superóxido em H ₂ O ₂ e H ₂ O
Inibidores teciduais de metaloproteinases	Inibição de metaloproteinases de matriz
Espécies oxidantes	
Superóxido	Antimicrobiano (intracelular); dano extracelular (?)
Peróxido de hidrogênio	Antimicrobiano (intracelular); dano extracelular (?)
Óxido nítrico	Antimicrobiano (intracelular); dano extracelular (?)
Radical hidroxila	Antimicrobiano (intracelular); dano extracelular (?)
Peroxinitrito	Antimicrobiano (intracelular); dano extracelular (?)
Mediadores lipídicos	
Leucotrieno B4	Atrator/ativador de neutrófilos
Leucotrieno C4	Broncoconstrição
Fator de ativação plaquetária (PAF)	Tônus vascular, broncoconstrição
Prostaglandina E2	Antiinflamatório
Citocinas	
Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)	Ativação de linfócitos, caquexia, morte
Interleucina 1- β (IL-1 β)	Ativação de linfócitos
Interleucina 6 (IL-6)	Pró-inflamatório
Interleucina 12 (IL-12)	Ativação de células Th1
Interleucina 15 (IL-15)	Ativação de células Th1 e células NK
Interleucina 18 (IL-18)	Ativação de células Th1
Fator de crescimento de fibroblasto (FGF)	Promotor de crescimento de fibroblasto
Fator transformador de crescimento β (TGF- β)	Induz síntese de colágeno, inibidor de macrófagos
Quimiocinas	
Interleucina 8 (IL-8; CXCL8)	Atrator/ativador de neutrófilos
Proteína quimioatratora de macrófago (MCP-1; CCL2)	Atrator/ativador de macrófagos, células Th1 e NK
Proteína 10 induzível por interferon gama (IP-10; CXCL10)	Atrator/ativador de células Th1 e células NK
RANTES (MCP-2; CCL5)	Atrator de monócitos
Proteína inflamatória de macrófago 1 (MIP-1 α ; CCL3)	Atrator de monócitos/macrófagos

Modificado de Davis & Poynter, *The Encyclopedia of Respiratory Medicine* [3].

Os neutrófilos são as células do sistema imunitário mais precocemente recrutadas para o sítio de injúria ou inflamação. Após sua ativação, os neutrófilos se tornam capazes de egressar da vasculatura e migrar pelo interstício até o espaço alveolar (9). A infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar é observada nos capilares, contrastando com a transmigração venosa observada em outros órgãos (10). Em função dessa particularidade, a migração de neutrófilos para o espaço alveolar é facilitada, uma vez que o baixo calibre dos vasos capilares favorece as interações entre estas células e o endotélio (11).

A presença de neutrófilos no sítio infectado inicialmente é favorável pela alta capacidade fagocítica/microbicida dessas células, que acompanhada de estratégias microbicidas adicionais constitui um mecanismo central para a eliminação de várias classes de patógenos. Parte do potencial microbicida dos neutrófilos lhes é conferido pelas proteínas presentes nos seus quatro tipos de grânulos: grânulos primários (também conhecidos como azurofílicos), grânulos secundários (também chamados específicos), grânulos terciários (compostos por gelatinase) e vesículas secretórias. O conteúdo desses grânulos é sintetizado em diferentes estágios da mielopoiese, sendo direcionado especificamente para cada subtipo de vesícula (12). Essa especificidade permite que a liberação de moléculas efetoras se dê de maneira regulada, uma vez que tipos distintos de grânulos apresentam propensões variadas em relação à sua liberação. As vesículas secretórias apresentam um conteúdo rico em receptores de membrana e são mobilizadas logo após o contato inicial entre o neutrófilo e o endotélio. Esse evento é sucedido pela liberação do conteúdo dos grânulos terciários durante a migração transendotelial, permitindo a degradação da matriz extracelular necessária para que a célula migre em direção ao foco inflamatório. Uma vez instalados no tecido afetado, os neutrófilos liberam o conteúdo de seus grânulos restantes, basicamente constituídos por proteases e polipeptídeos antimicrobianos (13).

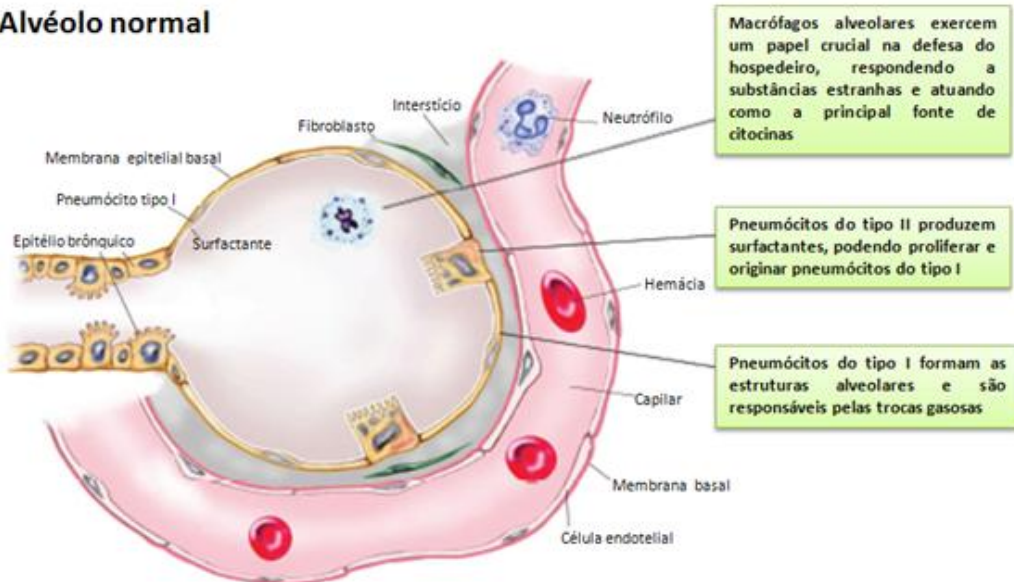
Além da atividade microbicida conferida pelo conteúdo específico de seus grânulos e pela fagocitose e destruição microbiana intracelular através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) os neutrófilos apresentam ainda outro mecanismo relevante para a eliminação de patógenos. Esse mecanismo consiste na formação de redes de cromatina capazes de reter patógenos extracelulares e eliminar os mesmos pela ação de proteínas granulares de neutrófilos ali fixadas, tais como elastases, catepsina G, lactoferrina, gelatinase e mieloperoxidase (14). Já foi demonstrado que a formação dessas redes

denominadas NETs (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) depende da ativação de NADPH oxidase e da indução de um novo mecanismo de morte celular denominado Etose (em referência à *Extracellular traps*) (15). A deficiência na atividade NADPH oxidase resulta num fenótipo particularmente sensível às infecções microbianas, decorrendo na chamada doença granulomatosa crônica (CGD, do inglês *Chronic Granulomatous Disease*)(16). Sendo assim, a atividade da enzima NADPH oxidase se mostra extremamente importante para a eliminação adequada de microorganismos, seja pela formação intracelular de espécies oxidantes ou pela extrusão de NETs (16).

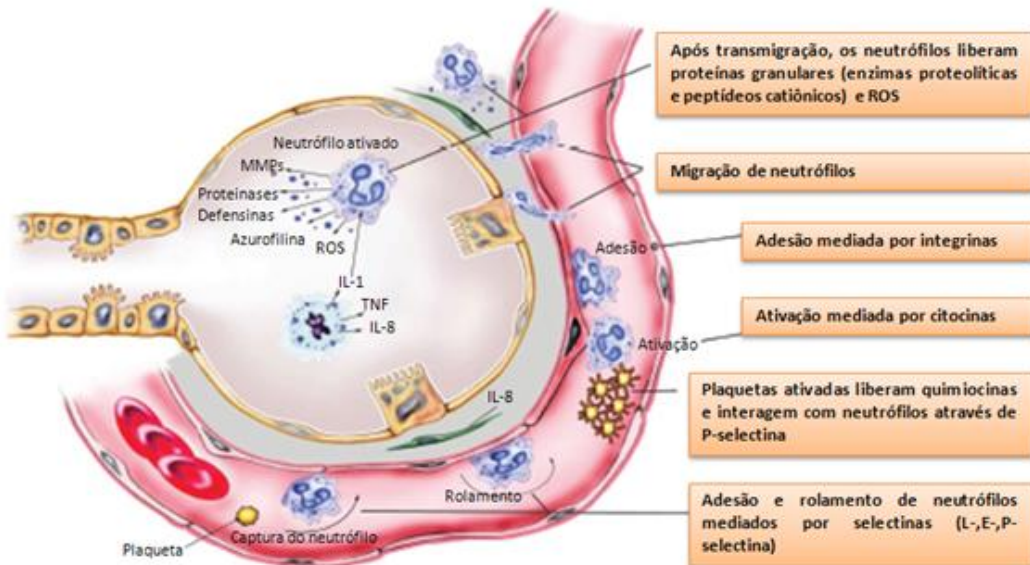
Paradoxalmente, apesar de seu importante papel na resolução de infecções microbianas os neutrófilos podem exercer uma função deletéria em algumas condições patológicas. Um exemplo desse papel dual dos neutrófilos é observado nos indivíduos que apresentam injúria pulmonar aguda (ALI, do inglês *Acute Lung Injury*) ou são acometidos pela síndrome da angústia respiratória do adulto, SARA (ARDS, do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrom*). Nestas patologias de origens variadas, o intenso influxo de neutrófilos para os pulmões está associado ao dano tecidual causado pela liberação do conteúdo dos grânulos das células polimorfonucleares e produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (17). Os principais eventos envolvidos na geração de dano tecidual durante a injúria pulmonar aguda se encontram ilustrados na figura 1.1.

Alterações na barreira alvéolo-capilar promovidas pela resposta inflamatória permitem o extravasamento de líquido rico em proteína, o que leva a uma redução importante da capacidade de oxigenação. Nesse sentido, a presença de neutrófilos também pode contribuir para a formação de edema pulmonar. Em quadros inflamatórios onde o insulto é capaz de induzir a migração de neutrófilos para o espaço alveolar foi observado que proteínas presentes nos grânulos dessas células, como catepsina G, elastase (18) e principalmente a proteína catiônica azurocidina (19) (20) (também conhecida como CAP37 ou HBP) alteram a permeabilidade local e contribuem de forma importante para a geração de edema.

A. Alvéolo normal



B. Recrutamento de neutrófilos para o pulmão



C. Dano tecidual na injúria pulmonar aguda

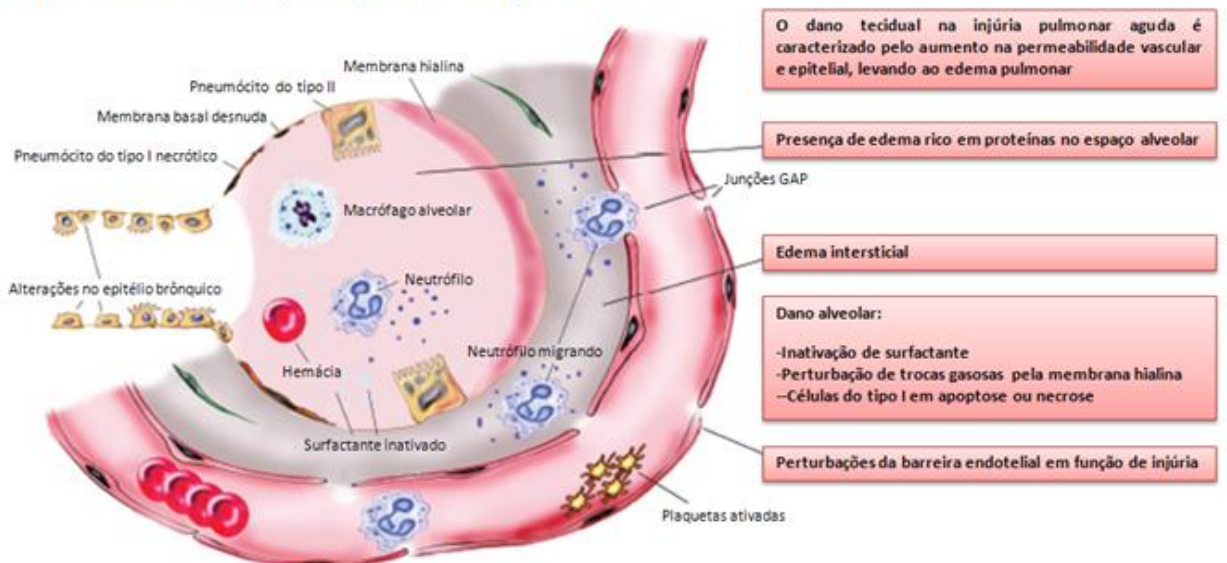


Figura 1.1. Dano tecidual na injúria pulmonar aguda. Adaptado de Grommes & Soehnleint (9).

Diversos estímulos diretamente relacionados a microorganismos ou liberados durante a resposta inflamatória foram descritos como capazes de modular a biogênese de corpúsculos lipídicos (21). Por muito tempo, acreditou-se que estas organelas constituíam depósitos inertes de gordura, servindo como sítios para o transporte intracelular de lipídios. Enquanto alguns tipos celulares (como hepatócitos e adipócitos) apresentam corpúsculos em abundância, outras células (como leucócitos) apresentam baixos níveis basais de corpúsculos, que podem ser regulados em número, tamanho e conteúdo frente a uma variedade de estímulos (22). Sendo assim, os corpúsculos se destacam como sítios intracelulares dinâmicos cuja gênese não se deve a um mero acúmulo de ácidos graxos, mas sim a um processo altamente regulado e que depende do estímulo e tipo celular (23).

Os corpúsculos lipídicos são organelas esféricas de eletrodensidade variável envoltas por uma monocamada composta por fosfolipídios, ácidos graxos, diacilglicerol e colesterol livre (24). Seu conteúdo é constituído basicamente por triacilglicerol e ésteres de colesterol, além de apresentar uma composição protéica variável (22, 25, 26). Em função de sua natureza predominantemente lipídica, os corpúsculos não podem ser visualizados pelas colorações de rotina, uma vez que os alcoóis utilizados na etapa de fixação removem os componentes lipídicos celulares. Por esse motivo, a evidenciação de corpúsculos deve ser feita através da coloração com tetróxido de ósmio, Oil Red-O ou marcação com a sonda fluorescente Bodipy após uma etapa de fixação em formalina. Também pode ser realizada a marcação de componentes protéicos característicos, como as moléculas da família PAT (Perilipina, Adipofilina ou proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos/ADRP e a Proteína de interação de porção terminal de 47 kDa/TIP47), envolvidas no estoque e metabolismo de lipídios (27). Além desse papel, essas proteínas também parecem estar diretamente envolvidas na organização estrutural e biogênese de corpúsculos (28-31). O aspecto dos corpúsculos marcados por diferentes colorações encontra-se ilustrado na figura 1.2.

Em função da sua biogênese altamente regulada em leucócitos, tem sido proposto que o aumento do número de corpúsculos lipídicos nessas células poderia resultar num incremento na produção de eicosanóides (32). De fato, já foi observado que os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos constituem sítios intracelulares de araquidonato esterificado tanto em lipídios neutros quanto em diferentes classes de fosfolipídios (32-36). Considerando que os corpúsculos apresentam enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico (AA), incluindo

fosfolipase A2 citosólica (cPLA2, do inglês *cytosolic Phospholipase A2*) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês Mitogen-Activated Protein Kinase) (36-38), o araquidonato livre pode, desta forma, ter acesso a enzimas formadoras de eicosanóides presentes nessas organelas, como a 5-lipoxigenase (5-LO) e ciclooxigenase (COX) (39, 40).

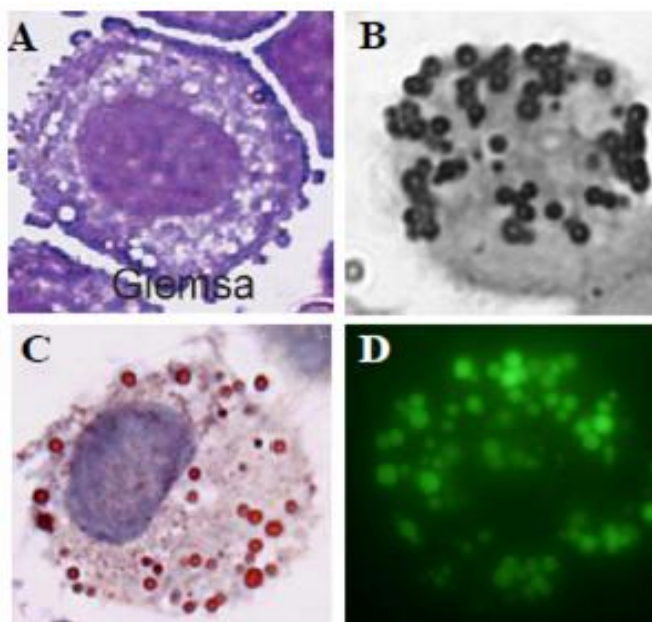


Figura 1.2. Aspecto dos corpúsculos lipídicos em células mononucleares fixadas e/ou coradas por diferentes metodologias. (A) Sem a fixação adequada forma-se uma imagem negativa (aspecto esponjoso) na célula em função da remoção do conteúdo lipídico pela presença de alcoóis, como observado na coloração por May Grunwald - Giemsa. Com fixação apropriada (formaldeído 3,7%), os corpúsculos lipídicos podem ser evidenciados por diversas colorações, como tetróxido de ósmio (B), Oil Red-O (C) e Bodipy (D). Adaptado de Pacheco e colaboradores (41).

Corroborando com o papel dos corpúsculos na liberação de mediadores lipídicos foi relatada uma correlação positiva entre a biogênese dessas organelas e o aumento da produção de eicosanóides derivados das enzimas lipoxigenase (LO) e COX, como LTB₄ e PGE₂ (39, 40, 42). Por fim, a evidência mais impactante sobre o papel dos corpúsculos na compartimentalização da síntese de mediadores lipídicos foi fornecida pela técnica *EicosaCell* (43, 44), desenvolvida por colaboradores do laboratório de Imunofarmacologia. Essa técnica permite a fixação de mediadores como LTC₄, LTB₄ e PGE₂ nos seus locais de síntese, tornando possível rastrear os corpúsculos como locais de síntese de eicosanóides (41, 44, 45).

1.1.2 Epidemiologia e etiologia

A Organização Mundial da Saúde define pneumonia como uma inflamação aguda do trato respiratório inferior e atribui a essa patologia a principal causa isolada de mortalidade infantil no mundo todo, levando ao óbito 1,6 milhões de crianças por ano (mais do que a mortalidade combinada de AIDS, malária e tuberculose). Crianças e idosos são particularmente suscetíveis à pneumonia (46), embora pacientes imunossuprimidos por causas diversas também representem uma população de risco (47-49).

As pneumonias podem ser causadas por vírus, fungos e bactérias, apresentando variações nos quadros patológicos. Em função disso, essas afecções pulmonares são habitualmente classificadas entre pneumonias adquiridas na comunidade (*Community Acquired Pneumonia*, CAP) e pneumonias nosocomiais, acarretando uma discriminação nos critérios de diagnóstico, tratamento e prognóstico (50).

A pneumonia adquirida na comunidade é uma das mais importantes causas de morte relacionada a doenças infecciosas em países desenvolvidos, apresentando uma mortalidade de 10% (50) e associando-se a um alto custo econômico (51). A CAP apresenta uma incidência de 3-40 casos em cada mil habitantes por ano (sendo esta incidência ampliada com o aumento da idade), proporcionando uma taxa de hospitalização variando entre 40% e 60% e requerendo internações em unidades de tratamento intensivo (UTI) em 10% dos casos (50). O principal microorganismo implicado na CAP é o *Streptococcus pneumoniae* (50) acompanhado pela alta incidência de *Mycoplasma pneumoniae* em pneumonias de baixa gravidade (52). Outros agentes etiológicos incluem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), causador de pneumonia necrosante (53), microorganismos do táxon *Enterobacteriaceae* (1,3%) e *Pseudomonas aeruginosa* (0,4%)(54).

As complicações pulmonares permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. O desenvolvimento de infiltrados pulmonares representa uma situação com risco de morte para esses pacientes, requerendo diagnóstico precoce e tratamento específico (48). Em indivíduos soropositivos, as infecções do trato respiratório inferior por bactérias piogênicas prevalecem nos diferentes estágios de imunossupressão, sendo que nos estágios avançados *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* e *S. aureus* representam os

principais agentes etiológicos da CAP (25%, 9% e 10%, respectivamente) e pneumonia nosocomial nesses pacientes (47).

Apesar dos transplantes de órgãos sólidos e de células-tronco representarem a melhor alternativa terapêutica para várias doenças incuráveis, a terapia com drogas imunossupressoras insere os pacientes transplantados como integrantes da população de risco para as doenças pulmonares infecciosas. A pneumonia bacteriana se apresenta como a principal causa de mortalidade em todos os transplantes, sendo ocasionada em tempos iniciais por patógenos nosocomiais comuns e em tempos mais tardios por patógenos causadores de infecções comunitárias (49).

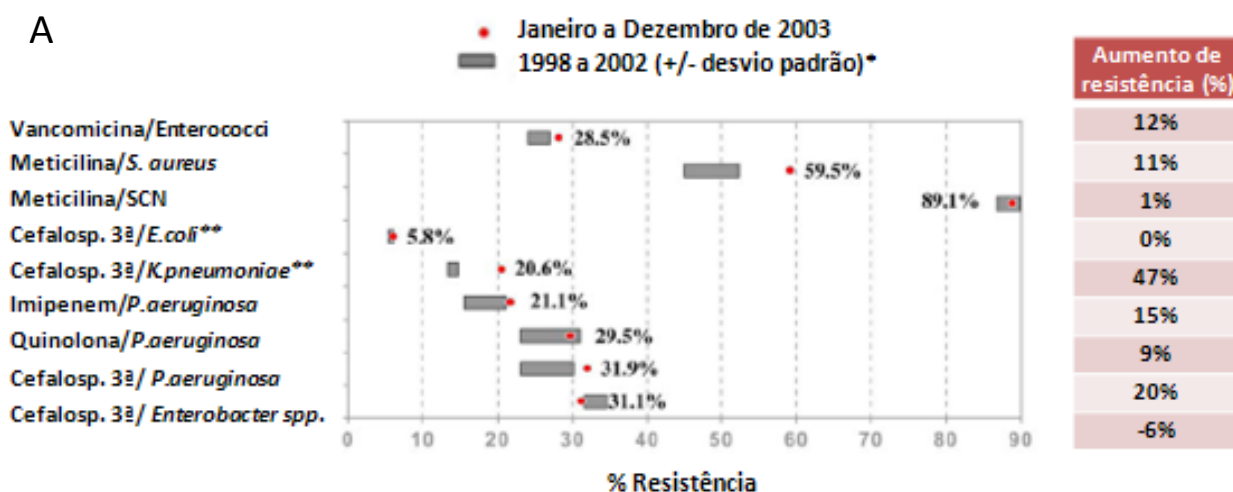
Os pacientes que sobrevivem a episódios de sepse também representam um grupo suscetível a pneumonias. O quadro de sepse é caracterizado por uma síndrome de resposta inflamatória severa (SIRS, do inglês *Severe Inflammatory Response Syndrome*), definida como uma reação inflamatória generalizada em resposta a traumas, queimaduras ou infecções (55). A resposta sistêmica à infecção é marcada por uma tempestade de citocinas, acarretando um desarranjo hemodinâmico e metabólico que pode resultar em choque séptico, falência múltipla dos órgãos (MOD, do inglês *Multiple Organ Dysfunction*) e morte (56). Após a resposta pró-inflamatória inicial segue-se um período de ausência de resposta imune chamado síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*) (57). Essa síndrome parece causar alterações epigenéticas duradouras que levam o paciente a um estado de imunossupressão prolongado (58), reduzindo em até 8 anos sua expectativa de vida (59) em função de uma susceptibilidade maior a infecções causadas por patógenos classicamente descritos como nosocomiais ou oportunistas, como *Aspergillus fumigatus* e *P. aeruginosa* (60, 61).

De acordo com a Sociedade Torácica Americana (ATS, do inglês *American Thoracic Society*) as pneumonias nosocomiais (também chamadas pneumonias adquiridas em hospital ou pneumonias associadas aos cuidados médicos) podem ser definidas como pneumonias que se manifestam após 48 horas de admissão hospitalar, sem um período de incubação prévio ao momento de admissão. As pneumonias nosocomiais são o segundo tipo de infecção nosocomial mais comum e aumentam significativamente o custo hospitalar e o tempo de internação. A ATS divide os quadros de pneumonia nosocomial entre aqueles de estabelecimento precoce (até 4 dias de hospitalização) e tardio (após 5 dias de hospitalização),

sendo o prognóstico dessa última piorado pela sua associação com organismos multi-resistentes, especialmente bactérias (figura 1.3.A).

Bacilos aeróbicos gram-negativos são os principais patógenos associados a pneumonias nosocomiais, sendo a fisiopatologia dessas infecções diretamente relacionada aos efeitos deletérios destes organismos no tecido pulmonar infectado. Os microorganismos mais comumente associados a pneumonias nosocomiais são *P. aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp.*, *S. aureus* (especialmente MRSA), *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (62).

Um tipo específico de pneumonia nosocomial é a pneumonia associada à ventilação mecânica (VAP, do inglês *Ventilator-Associated Pneumonia*), resultando numa mortalidade de 30% (50). Essa patologia afeta indivíduos internados em unidade de tratamento intensivo (UTI) por motivos diversos, como trauma, cirurgias ou queimaduras (63), todos apresentando em comum a necessidade de ventilação mecânica. Em 2004, o Sistema Nacional Americano de Vigilância em Infecções Nosocomiais (NNIS, do inglês *American National Nosocomial Infection Surveillance System*) do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Center for Disease Control and prevention*) reportou que o bacilo *P.aeruginosa* é a bactéria gram-negativa mais frequentemente implicada nesta patologia, apresentando uma alta taxa de resistência a antibióticos que contribui para sua persistência nos quadros de infecções nosocomiais (64). A terapia com antibióticos desprovidos de efeito contra *Pseudomonas* pode torná-la o microorganismo predominante na microbiota pulmonar (65), o que acarreta um risco maior de desenvolvimento de infecções desta etiologia em pacientes que necessitem de ventilação mecânica ou apresentem uma baixa resposta imunológica (figura 1.3.B).



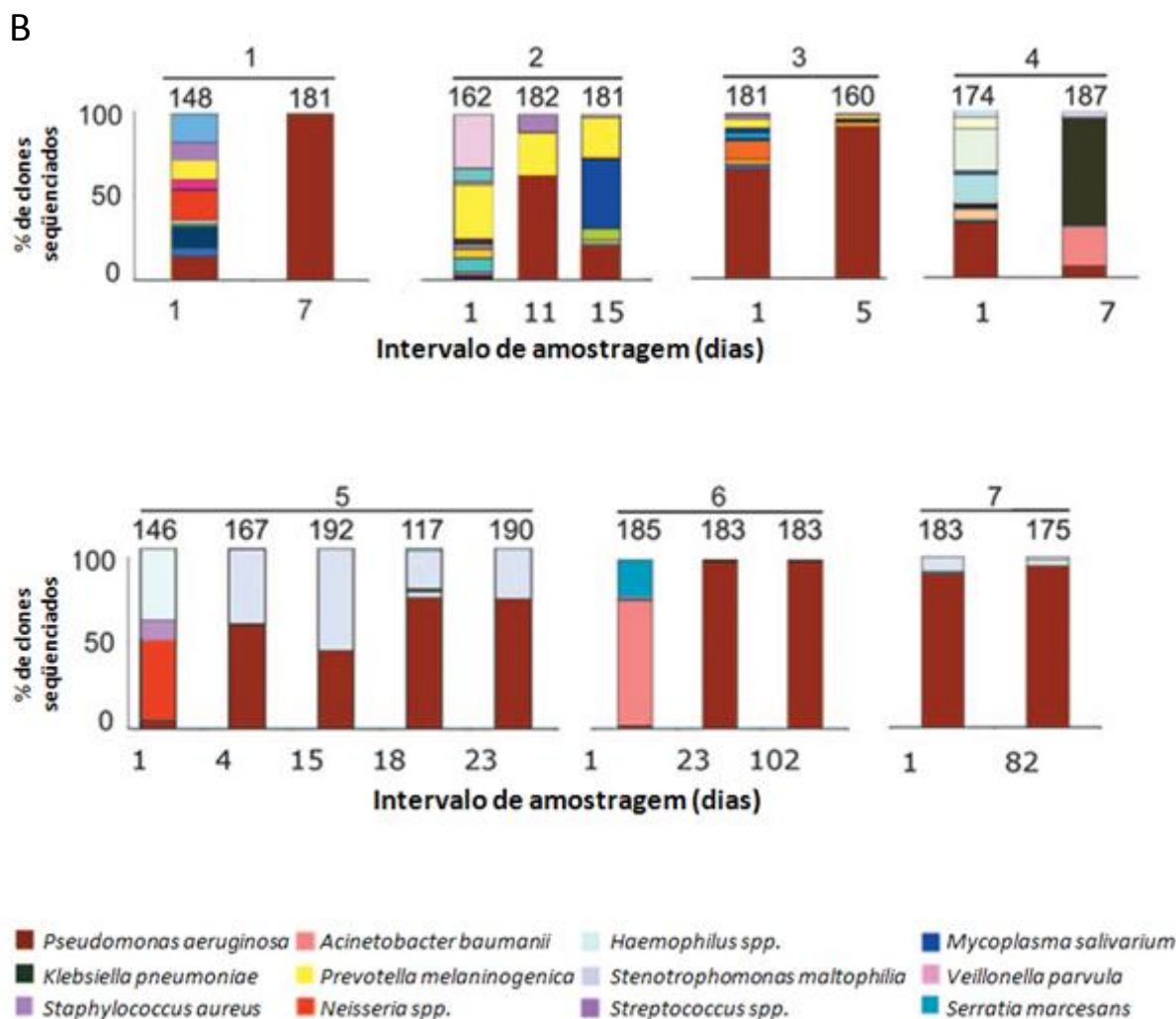


Figura 1.3. Patógenos nosocomiais. (A) Patógenos resistentes a antibióticos associados a pacientes de UTI afetados por infecções nosocomiais, comparação entre as taxas de resistência observadas entre jan-dez 2003 com as analisadas entre 1998 e 2002. SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativo; Cefalosp. 3^a: Cefalosporina de 3^a geração; Quinolona: resistência a ciprofoxacina ou ofloxacina. *Percentual (%) de aumento da taxa de resistência do ano em questão (Janeiro-Dezembro 2003) comparado com a taxa média de resistência dos 5 anos anteriores (1998-2002) **Resistência para *E. coli* ou *K. pneumoniae* é determinada como a taxa de não-suscetibilidade destes microorganismos a Cefalosp. de 3^a ou aztreonam. Modificado do relatório de 2004 da NNIS (63). **(B) Evolução da população bacteriana recuperada em aspirados de pacientes submetidos à ventilação mecânica.** Pacientes 1 a 5 fizeram uso de antibióticos durante um curto período e pacientes 6 e 7 foram medicados por períodos mais prolongados. As drogas utilizadas não possuíam atividade específica contra *P. aeruginosa*. Modificado de Flanagan e colaboradores (65).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A descrição do gênero *Pseudomonas* foi feita no fim do século XIX por Migula, professor do Instituto Karklsruhe na Alemanha. Seu breve relato sobre o gênero se referia a esses microorganismos como “Células com órgãos unipolares de motilidade” e incluía algumas observações errôneas sobre a capacidade de esporulação deste organismo. Apesar da etimologia do nome *Pseudomonas* ter sido interpretada durante muitos anos como derivativa do grego “*Pseudo*”, falso, e “*monas*”, unidade, atualmente hipotetiza-se que a verdadeira origem dessa palavra venha da semelhança entre a morfologia unipolar dessa bactéria com o protozoário nanoflagelado *Monas*.

Os pseudomônades são classificados como saprófitos ambientais pertencentes ao domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*. Dentre as diversas espécies compreendidas no gênero, a *P. aeruginosa* é uma das mais investigadas devido ao seu potencial fitopatogênico e sua capacidade de causar infecções importantes em humanos (66). O nome específico, *aeruginosa*, fora proposto anteriormente em função da cor das colônias crescidas num determinado meio por sua semelhança com a cor do azinhavre, sendo antes empregado associado ao nome *Bacterium* para se referir ao microorganismo isolado de amostras de pus verde em 1882 (67). Após a descrição do gênero *Pseudomonas*, Migula adicionou o nome *aeruginosa* para denominar essa espécie (68).

P. aeruginosa é um bacilo gram-negativo aeróbico com requerimentos nutricionais mínimos, permitindo uma ampla distribuição ecológica. *P. aeruginosa* é naturalmente encontrada no solo, em ambientes úmidos e em habitats marinhos costeiros, bem como em tecidos animais e vegetais (69). Seu genoma de 5 a 7 Mb é um dos maiores genomas bacterianos, indicando que sua evolução seguiu o rumo contrário da maioria dos parasitas (altamente adaptados para um nicho limitado) preservando elementos necessários para a sobrevivência nos mais variados ambientes (70).

A comparação do genoma de *P. aeruginosa* contra o de outros microorganismos revela um grande número de sistemas de efluxos de drogas (figura 1.4.). A emergência desse microorganismo como um dos principais patógenos oportunistas durante o século passado parece ser uma consequência de sua resistência a antibióticos e desinfetantes ativos contra outras bactérias presentes no

ambiente (70). Atualmente, *P. aeruginosa* é o segundo principal agente etiológico de pneumonias nosocomiais (17%), sendo a bactéria gram-negativa portadora de sistemas de múltipla resistência a drogas (MDR, do inglês *Multiple Drug Resistance system*) mais frequentemente implicada nesse tipo de infecção (67).

P. aeruginosa também surge como a terceira causa de infecções urinárias (7%), o quarto microorganismo mais frequente em infecções de lesões cirúrgicas (8%), o sétimo patógeno mais frequentemente isolado na corrente sanguínea (2%) e o quinto isolado mais comum de todos os sítios de infecção. Por fim, essa bactéria representa uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística, cujo defeito genético no canal iônico CFTR (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) torna o muco espesso e de difícil eliminação, levando à broncoectasia e suscetibilidade às infecções desse gênero (71). Tais infecções são impossíveis de serem erradicadas em função da resistência natural da bactéria a antibióticos, levando em última instância à falência pulmonar e morte do paciente (70).

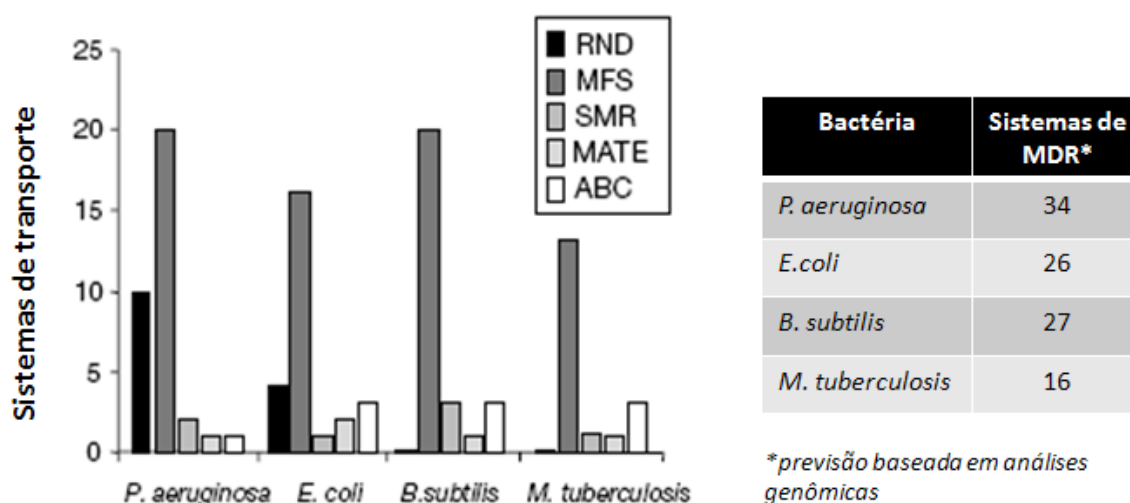


Figura 1.4. Comparação entre o número de sistemas de efluxos de drogas previstos com base no sequenciamento do DNA genômico de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*. Cinco tipos de sistemas de resistência à múltiplas drogas foram analisados: RND (do inglês *Resistance/ Nodulation/ cell Division family*); MFS (do inglês *Major Facilitator Superfamily*); SMR (do inglês *Small Multidrug Resistance family*); MATE (do inglês *Multidrug And Toxic compound Extrusion family*) e ABC (do inglês *ATP-Binding Cassette family*). Extraído de Stover e colaboradores [44].

O espectro de antibióticos tradicionais com atividade anti-pseudomonas inclui os aminoglicosídeos, ticarcillina, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima, aztreonam, carbapenêmicos (exceto ertapenem), ciprofloxacina e levofloxacina. Estudos apontam que cepas variadas de *P. aeruginosa* são propensas a apresentar resistência a alguns desses antibióticos. Por esse motivo, há uma grande mobilização para o desenvolvimento de novos antibióticos, dos quais se destacam doripenem, biapenem, tompenem, ceftobiprole, e sitofloxacina (67). Concomitantemente, o uso de drogas anteriormente descartadas pela sua toxicidade tem sido reavaliado. Um exemplo é o retorno do tratamento com colistina (polimixina E) sozinha ou combinada (72). Polimixinas são peptídeos cíclicos positivamente carregados que atuam como detergentes, rompendo a integridade da célula bacteriana. Devido ao seu mecanismo de ação, essas drogas estão menos propensas ao desenvolvimento de resistência cruzada por não se assemelharem a outros antibióticos, porém seu uso é limitado por apresentarem altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade (73).

Além da resistência múltipla a drogas, *P. aeruginosa* apresenta diversos fatores de virulência que dificultam o manejo de pacientes infectados. Esses fatores de virulência compreendem tanto moléculas associadas à parede bacteriana como moléculas solúveis. No primeiro grupo são inclusas moléculas responsáveis pela adesão bacteriana às superfícies (como flagelo, pilli e outras adesinas), o alginato (componente polissacarídico do biofilme), o lipolissacarídeo (LPS) e o sistema de secreção do tipo III. Fatores de virulência solúveis incluem proteases, hemolisinas, exotoxina A, exoS, exoU e piocianina, dentre outros (figura 1.5.)(74).

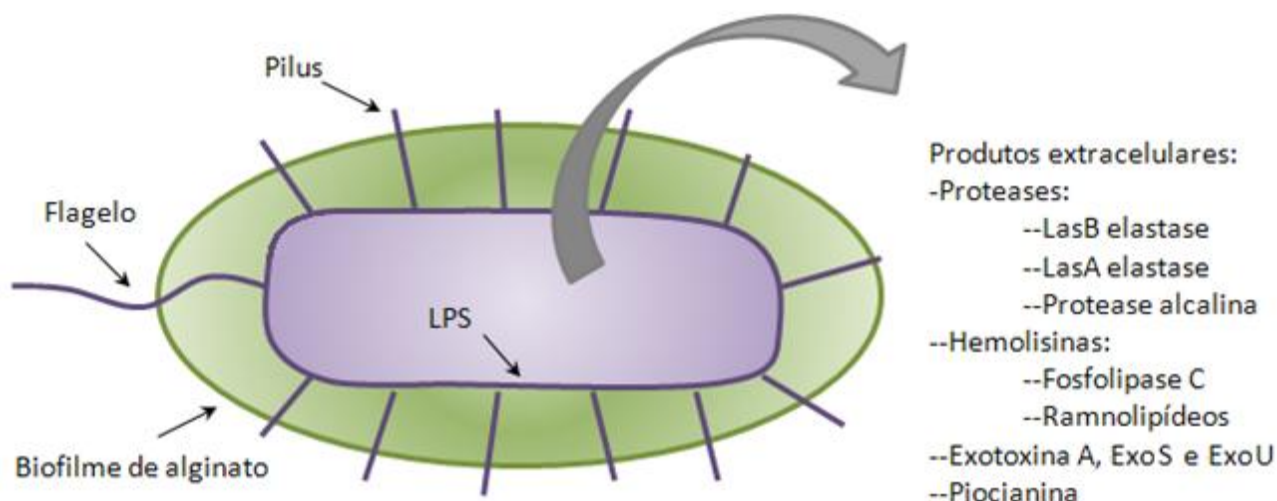


Figura 1.5. Fatores de virulência de *P.aeruginosa*. Modificado de van Delden & Iglewski (74).

O flagelo bacteriano é a principal estrutura responsável pelo movimento quimiotático do microorganismo no ambiente. Em *P. aeruginosa*, o flagelo é essencial para a etapa inicial de colonização do trato respiratório inferior, atuando juntamente com as moléculas de adesão durante o processo de aderência aos tecidos do hospedeiro (64). Os pilli e as fímbrias são numerosas estruturas espalhadas pela superfície da bactéria, permitindo a aderência às superfícies e conferindo à bactéria uma movimentação limitada (64). Além de seus papéis clássicos na adesão e movimentação bacteriana, tanto o flagelo como os pilli do tipo IV são importantes para a formação de biofilme em *P. aeruginosa* (75), contribuindo para a secreção desse outro fator de virulência.

Os biofilmes são comunidades de células envoltas por uma matriz extracelular polissacarídica contendo proteínas, ácidos nucleicos e debris celulares, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (76). Acredita-se que o crescimento em biofilmes ofereça uma série de vantagens à bactéria quando comparado ao crescimento plactônico ou livre-natante. A presença de alginato impede diretamente a fagocitose de *P. aeruginosa*, prevenindo também a ligação de opsoninas e a atividade de antibióticos (77, 78). Além disso, o alginato exerce um efeito *scavenger* sobre espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células fagocíticas, reduzindo sua capacidade microbicida (79). A presença de cepas mucóides em pacientes com fibrose cística está relacionada a um pior prognóstico (80), uma vez que a secreção de alginato protege a bactéria dos principais mecanismos de eliminação microbiana.

O estabelecimento de um biofilme ocorre em etapas organizadas (figura 1.6.), sendo a conversão do fenótipo livre-natante para o fenótipo mucóide definida por diversos fatores ambientais (76). Um fator conhecido é a presença de espécies reativas de oxigênio, que mesmo em baixas concentrações (mimetizando sua produção por neutrófilos e sua moderada liberação para o meio extracelular no hospedeiro) são capazes de levar a essa mudança fenotípica em *P. aeruginosa* (81).

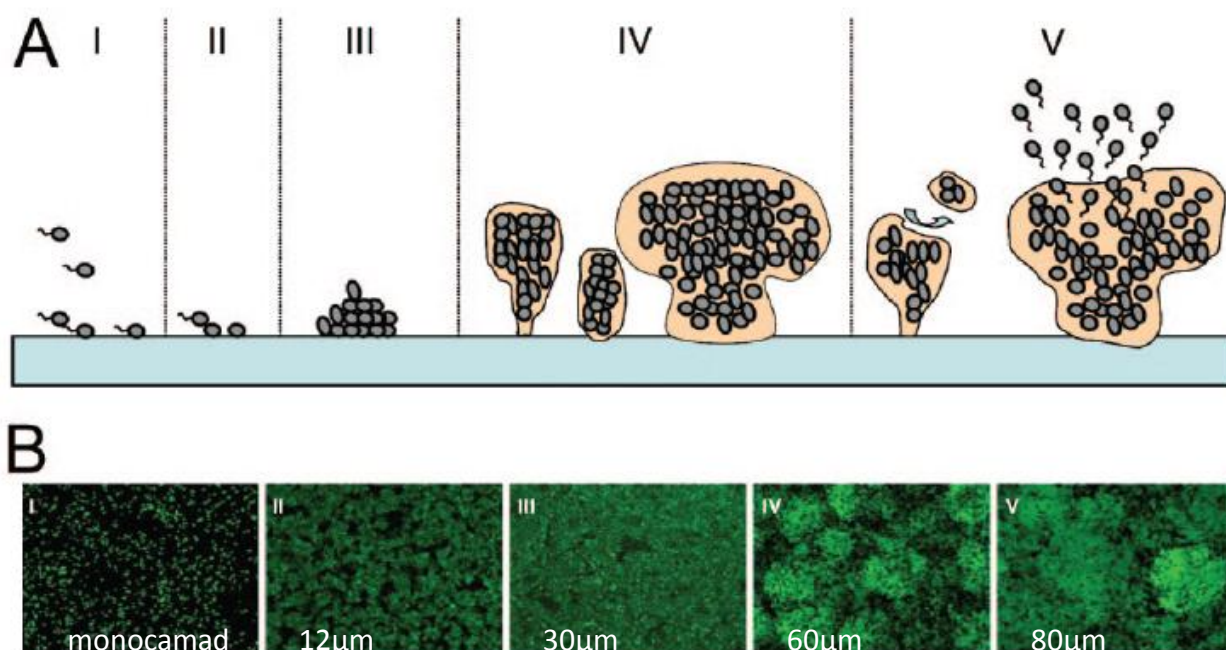


Figura 1.6. Etapas da formação de biofilme. (A) (I) Bactérias no estado plactônico são inaladas e aderem-se à superfície da mucosa do hospedeiro (II), onde proliferam em pequenas colônias (III). Estas colônias evoluem para estruturas em forma de cogumelo e uma matriz de alginato passa a envolver as células (IV), que se encontram metabolicamente menos ativas. Porções do biofilme podem se romper ocasionalmente liberando bactérias livre-natantes no sítio de infecção. **(B) Biofilme visualizado por microscopia confocal de fluorescência.** A utilização de bactérias marcadas permite a demonstração dos estágios descritos em (A). Adaptado de Wagner & Iglewski (76).

O lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa* apresenta uma menor toxicidade quando comparado a outros lipopolissacarídeos (82) (como os derivados de *E. coli*) em função de alterações em sua estrutura. O lipídio A é a fração lipídica dos lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, e representa a porção da molécula responsável por sua atividade endotóxica. Classicamente, observa-se que em *P. aeruginosa*, o lipídio A é penta-acilado, enquanto lipopolissacarídeos mais tóxicos

presentes em outras bactérias apresentam uma estrutura hexa-acilada (82). Apesar disso, o lipídio A de isolados clínicos frequentemente apresenta uma estrutura hexa-acilada. Ademais, o comprimento dos ácidos graxos encontrados no lipídio A de *Pseudomonas* é menor (10 a 12 carbonos), o que também pode estar relacionado à redução de sua toxicidade direta (83). Em contrapartida, o LPS de *P. aeruginosa* possui o potencial de gerar uma resposta inflamatória sustentada nas vias aéreas do hospedeiro, uma vez que essa endotoxina específica demonstrou uma maior capacidade de estimular células epiteliais do trato respiratório a liberarem moléculas quimiotáticas para neutrófilos quando comparada ao LPS de outras bactérias (83).

Além da virulência decorrente da presença de sua endotoxina, *P. aeruginosa* conta com um arsenal de exotoxinas que podem ser inoculadas em células do hospedeiro por um sistema de secreção do tipo III. Essa estratégia de direcionamento parece ser vantajosa porque permite que a bactéria gaste menos energia com a síntese de efetores, que podem alcançar a célula-alvo mais facilmente pela projeção bacteriana.

Os 36 genes que codificam os componentes desse sistema se encontram organizados em 5 operons agrupados e seis genes avulsos, tendo sido identificados em 75-90% dos isolados clínicos. Sua organização compreende 5 grupos de moléculas, divididas em reguladores, complexo-agulha, aparato de translocação, chaperonas e efetores.

Uma vez em contato com o hospedeiro, as proteínas reguladoras bacterianas (ExsA, ExsC, ExsD e ExsE) dão início à síntese das moléculas relacionadas ao sistema de secreção do tipo III. O complexo-agulha é uma estrutura composta por uma base de múltiplos anéis associada a um filamento semelhante a uma agulha, permitindo a passagem de moléculas diretamente do interior da bactéria para o citoplasma da célula do hospedeiro. No ponto de contato com a célula do hospedeiro, o aparato de translocação (composto pelas proteínas PopB, PopD e PcrV) mantém um poro que permite a passagem dos efetores, alterando, também, a permeabilidade da célula-alvo. A estabilidade das moléculas efetoras é mantida por chaperonas, como SprS (que liga a ExoS e ExoT) e SpcU (que se liga a ExoU). Por fim, quatro exotoxinas podem ser inoculadas na célula do hospedeiro, determinando o fenótipo da infecção (prevalência de necrose, apoptose ou lise celular).

A exotoxina S possui dois domínios funcionais, sendo um domínio dotado de atividade ADP-ribosil transferase e o outro domínio capaz de ativar GTPases (84). Esses mesmos domínios são compartilhados pela exotoxina T, cuja atividade é

semelhante à observada para ExoS (64). Os efeitos danosos da ExoS na célula eucariota são mediados por alterações no citoesqueleto, interferência no sistema de transporte intracelular e inibição da síntese de DNA, acarretando morte celular por apoptose (64). ExoY possui um domínio adenilil-ciclase, levando ao aumento intracelular de cAMP. Este mediador sinaliza para alterações no citoesqueleto da célula-alvo, contribuindo para o aumento da permeabilidade pulmonar e inibição da fagocitose bacteriana pelo hospedeiro (85). Por fim, ExoU aparece como o efetor mais tóxico, possuindo atividade fosfolipase. Seus efeitos consistem na lise de fagócitos pela ruptura membranar e na necrose do epitélio pulmonar, permitindo a disseminação de *P. aeruginosa* pela circulação sanguínea (85). Além disso, suas propriedades pró-trombóticas podem contribuir para a coagulação intravascular disseminada (CID), observada em pacientes sépticos infectados por cepas produtoras de ExoU (86). *P. aeruginosa* é ainda capaz de produzir exotoxina A, uma potente toxina que é secretada diretamente para o ambiente. A exotoxina A consiste numa cadeia polipeptídica única, cujo efeito citopático se dá pela inibição da síntese protéica nas células do hospedeiro.

Outras moléculas secretadas por *P. aeruginosa* contribuem para a evasão de mecanismos imunes de eliminação bacteriana. Tanto elastases quanto proteases alcalinas são capazes de inativar imunoglobulinas, componentes do sistema complemento e alterar a resposta imune pela clivagem de citocinas (87). Sideróforos, como a piocianina, degradam junções intercelulares e reduzem o batimento ciliar, dificultando a eliminação de muco (87). Além desses efeitos, evidências demonstram que a piocianina induz estresse oxidativo em células de epitélio pulmonar (88), o que pode contribuir para deflagrar a conversão do fenótipo livre-natante para o fenótipo mucóide.

1.3 *Quorum sensing*

Durante um longo período acreditou-se que as bactérias viviam como células individuais, cujas atividades principais consistiam na busca por nutrientes e na proliferação. A descoberta da existência de um sistema de comunicação entre bactérias criou a percepção de que esses microorganismos são capazes de atividades coordenadas que antes eram creditadas somente a organismos multicelulares (89). Esse fenômeno denominado *quorum sensing* (QS) foi primeiramente observado em *Vibrio fischeri*, uma bactéria bioluminescente encontrada no fotóforo de uma espécie de lula com quem esse microorganismo mantém uma relação simbiótica. Experimentos *in vitro* consistindo na inoculação de uma alíquota de cultura exponencial de *V. fischeri* num meio novo demonstraram que a bioluminescência era perdida, embora o crescimento exponencial continuasse inalterado. Como a inoculação das bactérias num meio condicionado (onde bactérias foram removidas após a bioluminescência ter sido promovida) restaurava a capacidade das bactérias de produzir luz rapidamente (90), foi levantada a hipótese de que as próprias bactérias secretavam uma molécula indutora capaz de induzir esse fenômeno de modo dependente da densidade populacional (91). Essa hipótese foi comprovada por Eberhard, em 1972 (92) e posteriormente o fenômeno de regulação gênica dependente da densidade populacional foi detectado em diversas espécies de bactérias (figura 1.7.).

O *quorum sensing* utiliza compostos semelhantes a hormônios para regular a expressão gênica dos microorganismos. Essas pequenas moléculas nomeadas autoindutores coordenam o comportamento bacteriano de acordo com a densidade populacional e frequentemente contribuem para a patogenicidade do microorganismo em questão (89). Em bactérias gram-positivas, a sinalização frequentemente ocorre por meio de peptídeos cíclicos modificados pós-traducionalmente, enquanto em bactérias gram-negativas as moléculas relacionadas ao QS são em geral acil-homoserina lactonas (93).

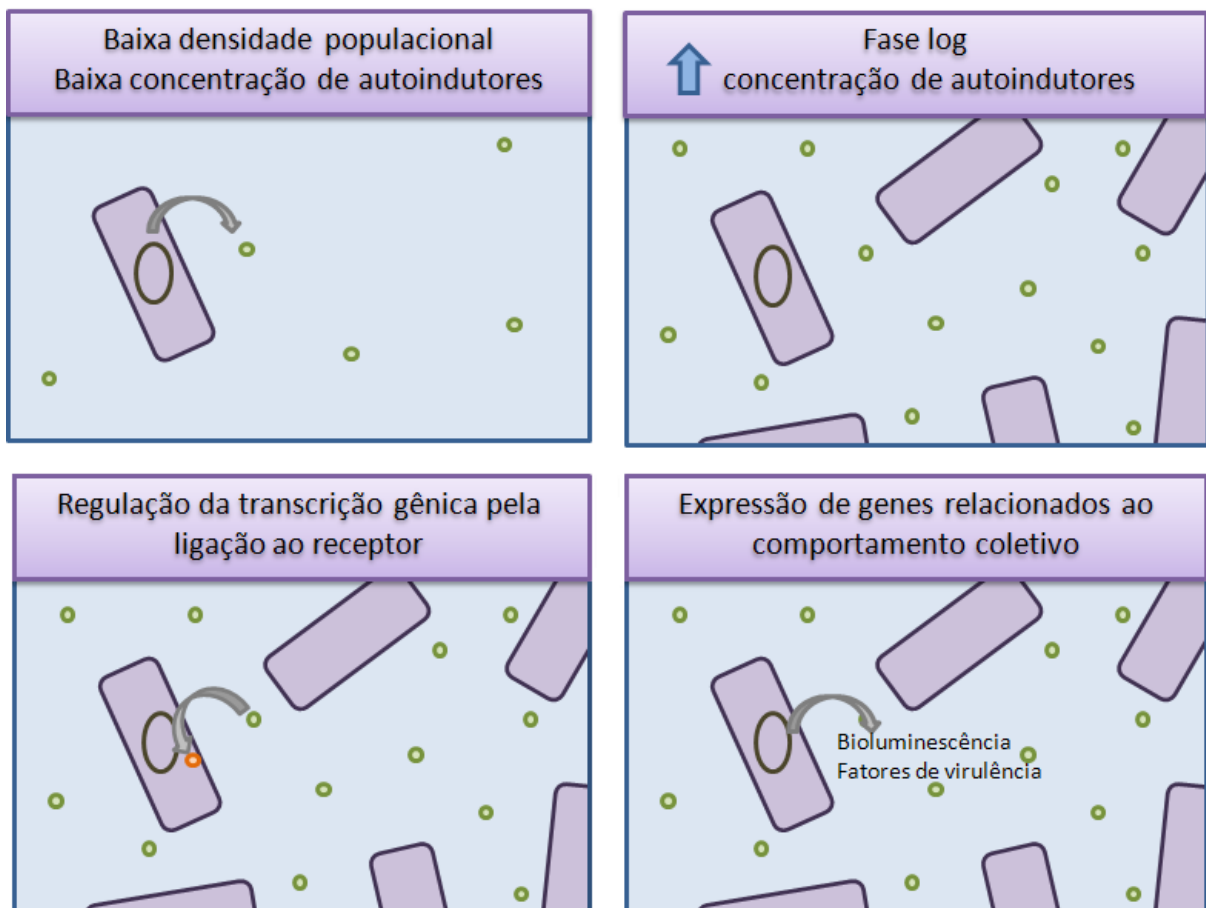


Figura 1.7. Regulação da expressão gênica bacteriana através da sinalização intercelular dependente da densidade populacional (*quorum sensing*). Quando inoculada num meio fresco, as bactérias se encontram em concentrações de autoindutores (verde) insuficientes para induzir uma resposta. À medida em que as bactérias proliferam, os níveis de autoindutores aumentam proporcionalmente até atingir uma concentração capaz de induzir a transcrição de genes-alvo pela ativação de seu receptor intracelular. A regulação desses genes resulta num fenótipo associado ao comportamento coletivo.

Pelo seu papel no controle da expressão de fatores de virulência, o QS atualmente é alvo do desenvolvimento de terapias alternativas. Intervenções oportunas na regulação neste sistema de sinalização podem reduzir a expressão de toxinas induzidas por esse mecanismo ou ativar prematuramente a produção de fatores de virulência de modo a "denunciar" para o hospedeiro a presença de uma população ainda pequena de bactérias. Ademais, interferências na comunicação bacteriana podem tornar estes organismos mais sensíveis a mecanismos microbicidas naturais ou artificiais, destacando essa estratégia como um possível mecanismo singular de prevenção, supressão ou tratamento de doenças infecciosas

(94). O papel dos fatores de virulência durante as diferentes etapas da fisiopatologia das infecções por *P. aeruginosa* se encontra ilustrado na figura 1.8.

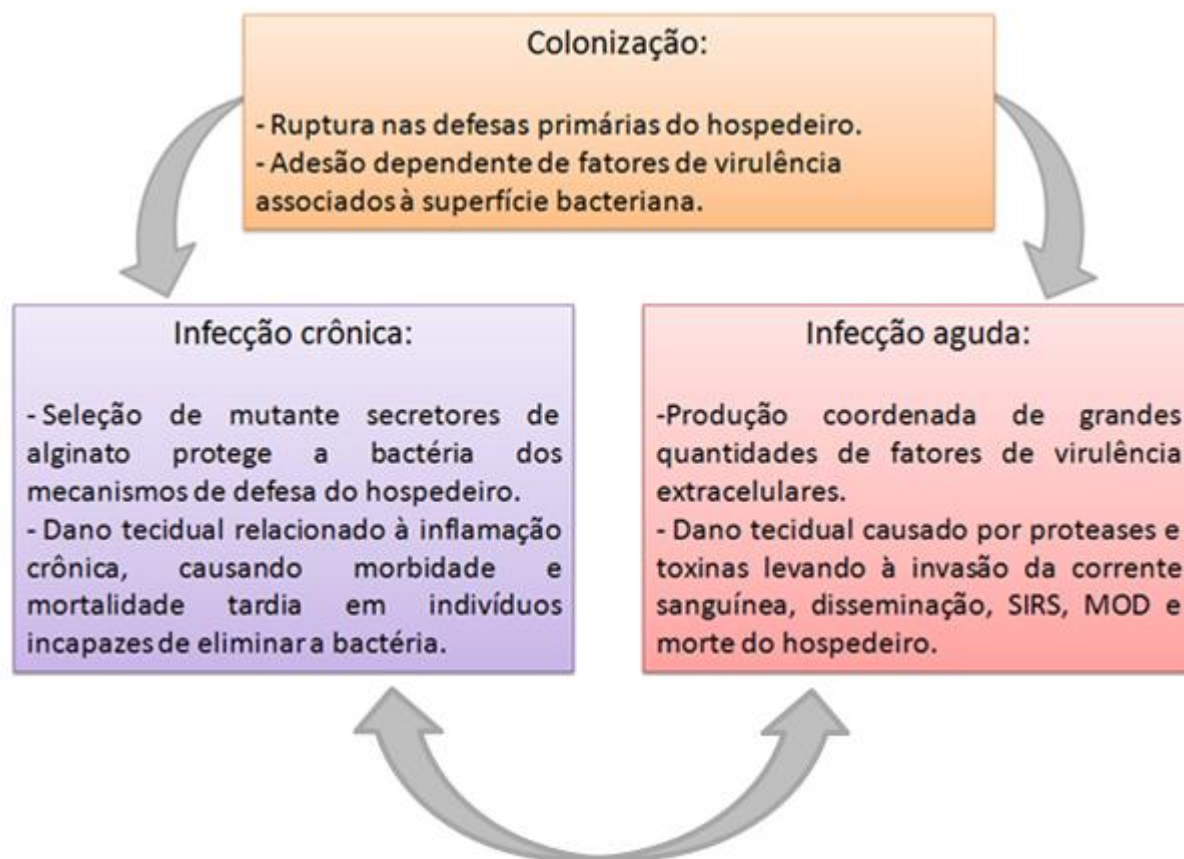


Figura 1.8. Participação dos fatores de virulência em diversas etapas da fisiopatologia das infecções por *P. aeruginosa*. A expressão das moléculas requeridas em cada uma dessas etapas pode ser regulada por *quorum sensing*, destacando a importância da busca de novas estratégias terapêuticas visando a modulação desse sistema de comunicação bacteriano. Adaptado de Van Delden & Iglewski (74).

Uma vantagem dessa estratégia sobre o desenvolvimento de drogas bactericidas ou bacteriostáticas é a redução ou retardamento do surgimento de cepas resistentes, uma vez que a ação terapêutica não afeta diretamente a sobrevivência da bactéria, e sim sua patogenicidade em relação ao hospedeiro (95). Isso se mostra especialmente atraente no caso de microorganismos para os quais as opções de tratamento são limitadas em função do surgimento de resistência às múltiplas drogas, como *P. aeruginosa*. Já foi demonstrado que a presença de moléculas de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* aumenta o número de bactérias resistentes a múltiplas drogas *in vitro* (96). Além disso, modelos animais comprovam que cepas de *P. aeruginosa* deficientes para autoindutores apresentam sua

habilidade de colonização reduzida, sendo esse fenômeno refletido numa redução do quadro de pneumonia e num menor número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperado no BAL de camundongos desafiados (97). Por fim, cepas de *P. aeruginosa* portadoras de mutações que afetam seu sistema de comunicação apresentam sua capacidade de formação de biofilmes prejudicada (98), corroborando com a importância do *quorum sensing* na regulação da expressão de moléculas associadas às diversas etapas da patologia causada por essa bactéria. Sendo assim, o bloqueio na sinalização intercelular em *Pseudomonas* surge como uma possível estratégia terapêutica para pacientes acometidos por infecções aguda ou crônicas, podendo também atuar profilaticamente em indivíduos diagnosticados com fibrose cística ou ainda nos pacientes imunossuprimidos, intubados, cateterizados e queimados.

Atualmente são conhecidos três sistemas de sinalização em *P. aeruginosa*, cujos principais componentes são apresentados na figura 1.9. O primeiro sistema a ser descrito se baseia na sinalização LasR/LasI. O produto do gene LasR é um fator de transcrição ativado pelo produto do gene LasI, que codifica a enzima responsável pela síntese do autoindutor *N*- 3-oxo dodecanoil *L*- homoserina lactona (3-oxo C12 HSL). Esse sistema regula a expressão de diversos genes relacionados à virulência, como *lasB*, *lasA*, *aprA*, *toxA* e a própria expressão de *lasI*, criando uma alça positiva (89). O segundo sistema descrito envolve a sinalização via RhlR/RhlI. Nesse sistema, a molécula indutora *N*- butiril *L*- homoserina lactona (C4 HSL) controla a expressão de RhlAB (ramnolipídeos), piocianina, entre outros. Apesar de não haver uma sobreposição significativa na regulação dos genes controlados por esses dois sistemas, existe uma hierarquia na qual o sistema Las parece estar no topo, uma vez que 3-oxo C12 HSL é capaz de controlar a expressão tanto de *rhlR* como de *rhlI* (89). O terceiro sistema é conhecido como PQS (do inglês *Pseudomonas Quinolone Signal*) e depende da sinalização via PqsR/*pqsABCDE*. A sinalização por 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona também ativa genes de virulência, como *lasB*, possuindo, portanto, importância na fisiopatologia das infecções por *P.aeruginosa* (99).

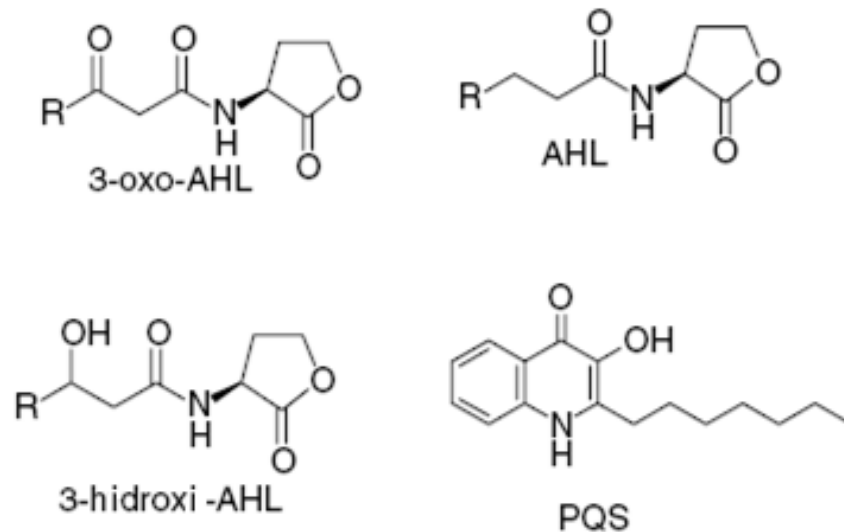


Figura 1.9. Estrutura geral de moléculas envolvidas na comunicação bacteriana de *P. aeruginosa*. AHL, acil homoserina lactona; PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal. Adaptado de Williams e colaboradores (93).

Além de coordenar o comportamento bacteriano, sabe-se atualmente que moléculas envolvidas no *quorum sensing* podem gerar respostas biológicas em células eucariotas. Dentre diversos outros efeitos imunomodulatórios, já foi reportado que 3-oxo C12 HSL é capaz de induzir a expressão de IL-6, IL-8 e COX-2 em linhagens de pneumócitos do tipo II e fibroblastos humanos e murinos (100, 101). Também foi demonstrado que 3-oxo C12 HSL por si só é capaz de induzir a migração de neutrófilos para a pele de animais desafiados com injeções subcutâneas, sugerindo que essa molécula pode ter um papel importante na fisiopatologia das pneumonias causadas por *P. aeruginosa* através da sua contribuição para o recrutamento de neutrófilos.

No sentido contrário, hormônios encontrados no hospedeiro também podem regular o comportamento da microbiota, estabelecendo um novo conceito denominado *interkingdom signaling*, ou sinalização entre reinos. Estudos mostram que hormônios presentes no trato gastrointestinal, como a epinefrina, são interceptados pelos receptores para autoindutores de *E. coli* e agem na regulação da expressão gênica desses microorganismos (102). Sendo assim, a captação desse sinal pode permitir que a bactéria ajuste seu fenótipo às condições fisiológicas de um hospedeiro em particular, incrementando suas vantagens adaptativas de maneira customizada.

1.4 Paraoxonases

Apesar de representar um campo promissor para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, a busca por moléculas capazes de bloquear a sinalização bacteriana não impede os efeitos deletérios diretos dos autoindutores sobre as células do hospedeiro. Estudos recentes relatam que células humanas de epitélio traqueal possuem a capacidade de degradar ativamente acil-homoserina lactonas (103), em especial a 3-oxo C12 HSL, representando um possível mecanismo inato de defesa das células mamíferas contra os efeitos danosos dessas moléculas.

Paraoxonases são uma família de esterases cálcio-dependentes composta pelas isoformas PON1, PON2 e PON3 (104). Em humanos, PON1 e PON3 são principalmente sintetizadas no fígado, de onde são secretadas associadas às lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoproteins*) (105). PON2 não se encontra presente no soro, mas é expressa em diversos tipos celulares (106).

As paraoxonases hidrolisam uma grande variedade de ésteres, incluindo fosfotriésteres, arilesteres e lactonas, possuindo especificidades sobrepostas, porém distintas (107). Embora a função fisiológica e os substratos naturais para essas enzimas não estejam bem determinados, acumulam-se evidências de que a atividade lactonase de PON representa sua função natural (107, 108). Essa atividade é compartilhada por todas as três isoformas, sendo a atividade lactonase de PON2 a mais significativa, seguida pela atividade de PON1 e depois PON3 (figura 1.10.). De fato, o componente de *quorum sensing* de *Pseudomonas* 3-oxo C12 HSL consiste no melhor substrato para PON2 identificado até o momento (109). De acordo com essas observações, PON2 parece ser a enzima mais importante para a degradação de 3-oxo C12 HSL por células epiteliais do trato respiratório, uma vez que lisados de células deficientes para PON2 apresentaram uma atividade lactonase reduzida em relação a esse substrato (110).

Tabela 2- Taxa de hidrólise de 3-oxo C12 HSL por diferentes amostras biológicas.

Amostra	Taxa*
Soro humano**	260 +/- 6
Soro murino	569 +/-17
Homogenato de pulmão murino	2.1 +/- 0.1
Homogenato de fígado murino	6.5 +/-0.4
Lisado de células HepG2	5.1 +/-0.1
Lisado de células EA.hy 926	2.5 +/-0.1

Tabela 1.2. Hidrólise do componente de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* 3-oxo C12 HSL por diferentes amostras biológicas. *A taxa de hidrólise é definida como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ para amostras de soro e $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para as demais amostras. **As medidas realizadas com soro humano correspondem ao *pool* de amostras de três indivíduos. Extraído de Teiber e colaboradores (109).

Sendo assim, a modulação da expressão de paraoxonase representa uma estratégia interessante no desenvolvimento de novas terapias contra infecções causadas por *P. aeruginosa*, uma vez que a degradação do principal componente de *quorum sensing* desta bactéria (3-oxo C12 HSL) pode prevenir a expressão de fatores de virulência e impedir os efeitos imunomoduladores negativos no hospedeiro. Além da degradação de 3-oxo C12 HSL, há evidências de que PON2 é capaz de reverter o estresse oxidativo causado pela piocianina (111), acrescentando outro benefício à expressão desta enzima durante infecções por *P. aeruginosa*.

Para validar esta hipótese, estudos recentes realizados em *Drosophila melanogaster* foram conduzidos, sendo esse modelo escolhido pelo fato de *Drosophila* não expressar nenhuma isoforma de paraoxonase, além de ser um organismo geneticamente maleável. Estas investigações permitiram concluir que a expressão transgênica de PON1 é capaz de proteger os animais da mortalidade causada pela infecção com *P. aeruginosa* através de sua atividade lactonase (112).

A modulação da expressão e atividade lactonase de PON2 foi demonstrada em macrófagos através do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona ou com sumo de *Punica granatum* (romã) *in vitro*. Essa modulação parece ser decorrente da presença de polifenóis neste extrato vegetal, capazes de ativar o receptor nuclear PPAR γ (113).

1.5 PPAR γ

Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de fatores transcricionais que, após ativação por seus ligantes, regulam diversos aspectos relacionados à reprodução, desenvolvimento, homeostasia e funções imunes (114). A superfamília dos receptores nucleares inclui receptores para hormônios esteroidais, como estrogênio e glicocorticóides; receptores para ligantes não-esteroidais, como hormônios da tireóide e o ácido retinóico, e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo, conhecidos como PPARs (do inglês *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*).

Os PPARs foram descritos em 1990 em função de seu papel central na proliferação de peroxissomos. Atualmente, diversas outras funções têm sido atribuídas a esses receptores, tais como regulação do metabolismo de lipídios e lipoproteínas, controle de glicemia e participação nos processos inflamatórios. A ativação dos PPARs pode influenciar a proliferação celular (115), a diferenciação celular (116) e o processo de apoptose (117), estando também implicada na fisiopatologia da aterosclerose, obesidade, diabetes e resposta imune (118-121). Até o momento, foram identificados três subtipos de PPARs: alfa (NR1C1), beta ou delta (NUC2/NR1C2) e gama (NR1C3) (122). Cada receptor possui um domínio conservado de ligação ao DNA e uma região C-terminal característica (123).

O PPAR γ é o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo mais estudado dentre os três subtipos existentes devido a sua implicação no controle do metabolismo da glicose. Foi demonstrado que as tiazolidinedionas (TZDs) como a rosiglitazona e a ciglitazona aumentam a ação da insulina por meio da ativação do PPAR γ através do controle da expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e de lipídios exercido por este receptor (124).

Além das drogas agonistas pertencentes à classe das TZDs e de seu antagonista sintético GW9662, diversos outros ligantes de PPAR γ já foram caracterizados. A maioria dos ligantes naturais de PPAR γ são ácidos graxos e seus derivados, dos quais se destacam uma fração da LDL oxidada chamada Hexadecil azeloil fosfatidilcolina (AzPC) (125), o ácido lisofosfatídico liberado por plaquetas ativadas (126) e durante o processo de oxidação da LDL (127) e a 15 deoxi -2,14 prostaglandina J2 (15dPGJ₂), metabólito derivado da PGD₂ sintetizada pela enzima ciclooxigenase-2. Esses ligantes endógenos demonstram o importante papel que o

receptor nuclear PPAR γ desempenha nos processos inflamatórios, representando uma via integrativa entre metabolismo e inflamação.

O PPAR γ é capaz de regular a transcrição gênica através de diferentes mecanismos. A regulação direta da transcrição gênica mediada por PPAR γ se inicia com sua ativação através de ligantes lipídicos, o que causa alterações conformacionais na molécula e permite que a mesma se dimerize com outro receptor nuclear, o receptor de ácido 9-cis-retinóico (receptor X de retinóides; RXR). Esse complexo recruta outras moléculas co-ativadoras e se torna capaz de se ligar à região promotora de genes responsivos, chamada PPRE (do inglês *PPAR γ Responsive Element*), promovendo a transcrição de diversas proteínas, tais como CD36. O PPAR γ também é capaz de transreprimir certos genes de modo independente de sua ligação direta com o DNA. Esse efeito é particularmente importante na inibição de genes pró-inflamatórios, havendo três possíveis mecanismos implicados. O primeiro deles envolve a ligação do heterodímero ativado PPAR γ /RXR com moléculas co-ativadoras necessárias para a ação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de proteínas pró-inflamatórias, tais como CBP (do inglês *CREB-binding protein*) e SCR1 (do inglês *Steroid Receptor Co-activator 1*), necessários para a atividade de AP-1 (do inglês *Activator Protein-1*), STAT-1 (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) e NF- κ B (do inglês *Nuclear Factor- κ B*). O segundo mecanismo pelo qual o complexo PPAR γ /RXR inibe indiretamente a transcrição gênica se dá através de sua ligação direta com outros fatores de transcrição; esse fenômeno de interação direta é observado entre PPAR γ e as subunidades p50 e p65 de NF- κ B em macrófagos de camundongos. O terceiro mecanismo pelo qual o PPAR γ é capaz de transreprimir genes se dá através de sua interação com MAPK. Este mecanismo foi postulado uma vez que animais heterozigotos deficientes em PPAR γ apresentam uma diminuição nos níveis de fosforilação de JNK (*c-Jun -amino-terminal kinase*) e p-38 quando expostos a estímulos específicos. Assim, a ativação subsequente de outros fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória seria bloqueada pela ausência de fosforilação dessas moléculas, conforme revisado por Zingarelli & Cook em (128). Os principais mecanismos pelos quais o receptor nuclear PPAR γ modula a transcrição gênica se encontram representados na figura 1.10.

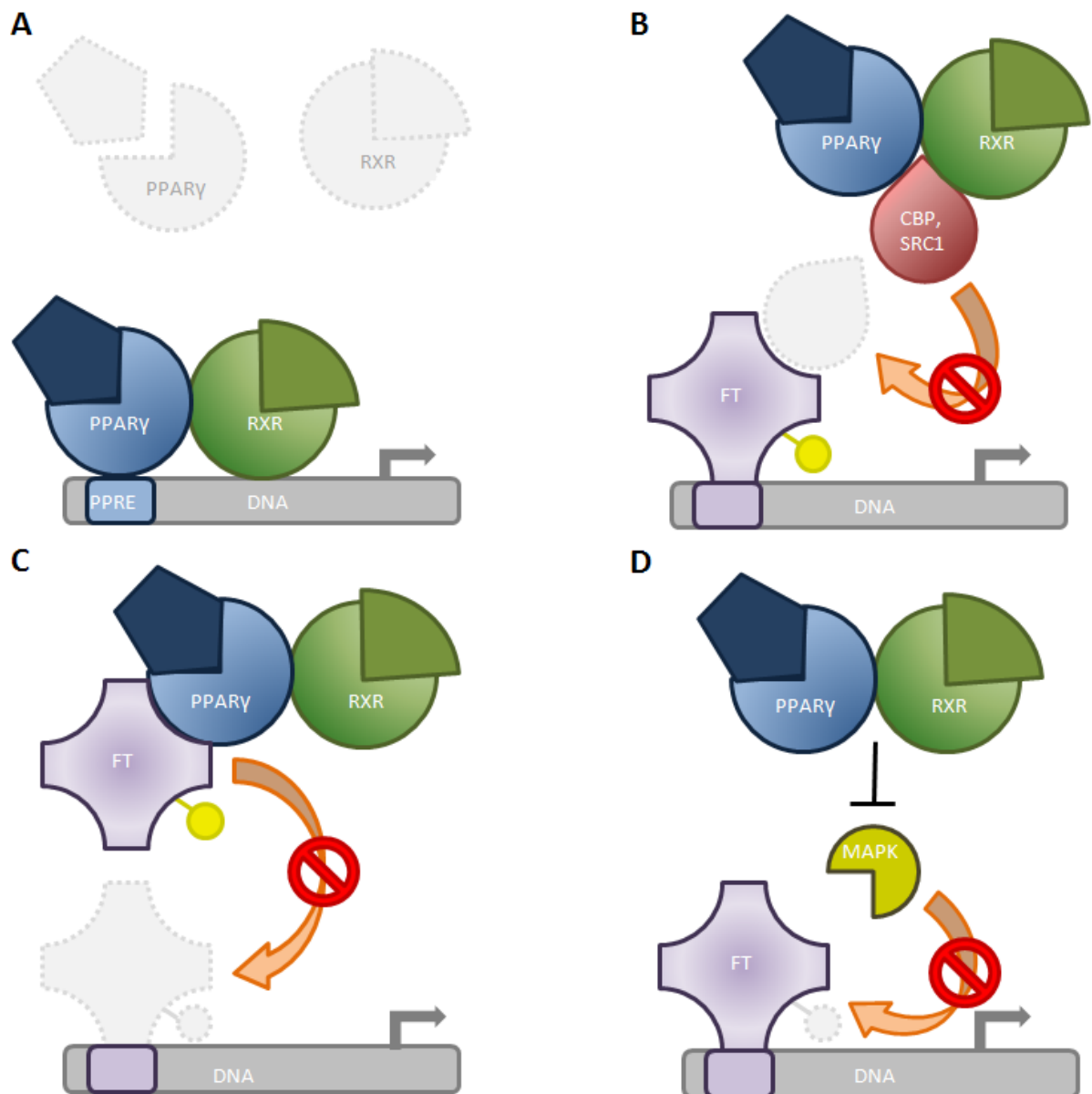


Figura 1.10. Diferentes mecanismos pelos quais o receptor nuclear PPAR γ é capaz de modular a transcrição gênica. (A) Ao encontrar um ligante, o receptor nuclear PPAR γ se dimeriza com RXR e pode se ligar a promotores que possuam PPRE e promover a transcrição de genes-alvo. O complexo PPAR γ /RXR pode seqüestrar co-ativadores (CBP, SRC1) necessários para a atividade de outros fatores de transcrição (FT) (B) ou ainda interagir com subunidades dos próprios fatores de transcrição (C), impedindo a expressão de genes ativados por eles. O complexo PPAR γ /RXR pode ainda impedir a atividade de MAP quinases, bloqueando a fosforilação e consequente ativação de outros fatores de transcrição (D).

Os ligantes de PPAR γ representam drogas promissoras para o tratamento de desordens inflamatórias. Presentemente, múltiplas evidências de melhora em parâmetros inflamatórios surgem a partir de estudos avaliando situações diversas. O tratamento com agonistas de PPAR γ apresentou efeitos anti-inflamatórios em investigações sobre artrite, sepse, asma e doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD, do inglês *Chronic Obstrutive Pulmonary Disease*) (129-132), além de reduzir a migração de neutrófilos em um modelo de instilação pulmonar com LPS (129). Apesar de algumas drogas terem sido retiradas do mercado por apresentarem toxicidade (principalmente hepática, como no caso da troglitazona (133)), grandes esforços são atualmente direcionados para o desenho de novas drogas capazes de modular a atividade do receptor nuclear PPAR γ sem causar toxicidade ao paciente.

Devido ao seu papel central na homeostase, a modulação do receptor nuclear PPAR γ apresenta não somente um potencial terapêutico em inúmeras condições patológicas como também se coloca como um potencial alvo para a subversão da resposta imune do hospedeiro. Foi demonstrado que a infecção experimental por *M. bovis* (BCG) é capaz de favorecer a desativação de macrófagos (e, portanto, favorecer sua persistência dentro dessas células) pela indução de PGE₂ através da modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos via PPAR γ (134). Além disso, o componente de *quorum sensing* de *P.aeruginosa* 3-oxo C12 HSL é capaz de induzir a expressão de moléculas associadas aos processos inflamatórios (IL-6, IL-8 e COX-2) via PPAR γ em células de linhagem de epitélio pulmonar e fibroblastos (101).

Estas evidências indicam que o estudo do papel desse receptor em patologias de diversas etiologias pode contribuir significativamente para a compreensão integrada dos fenômenos envolvidos nessas condições e colaborar com o desenvolvimento racional de novas terapias (128). Sendo assim, nosso trabalho visou estudar o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. Dessa forma, nossas investigações sobre o tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona na reversão dos efeitos pró-inflamatórios de 3-oxo C12 HSL podem colaborar para o surgimento de novas terapias no combate às infecções por *P.aeruginosa*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar induzida pelo componente de *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* 3-oxo dodecanoil homoserina lactona (3-oxo C12 HSL).

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a resposta inflamatória causada pela instilação intratraqueal de 3-oxo C12 HSL, analisando a migração celular, avaliando a formação de edema e quantificando os níveis de citocinas e mediadores lipídicos recuperados no lavado bronco-alveolar (BAL);

- ✓ Analisar os efeitos do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona sobre os parâmetros inflamatórios avaliados durante a resposta induzida por 3-oxo C12 HSL;

- ✓ Verificar o efeito da instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos nas células recuperadas no BAL de animais desafiados, avaliando também o efeito do tratamento com rosiglitazona neste fenômeno;

- ✓ Investigar a regulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL, verificando o papel do agonista de PPAR γ nesta regulação.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Camundongos Swiss Webster machos pesando entre 20 e 30 g foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida até o momento do uso, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais foram tratados com vermífugo acrescido à água de beber (mebendazol, 20 mg/L de água) durante três dias, sendo utilizados até uma semana após o procedimento. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, FIOCRUZ), protocolo LW 36/10.

3.2 Drogas e soluções

Preparo de 3-oxo dodecanoil homoserina lactona (Cayman Chemical)

Alíquotas de estoque de 3-oxo C12 HSL (Cayman Chemical) a 50mM preparadas em DMSO estéril foram armazenadas a -20°C. Para o preparo das doses experimentais, as alíquotas de 3-oxo C12 HSL foram descongeladas e sonicadas a 37°C durante 15 minutos. A diluição das doses experimentais foi realizada na cabine de biossegurança em salina estéril apirogênica (Sanobiol).

Preparo de Rosiglitazona (Cayman Chemical)

Alíquotas de Rosiglitazona preparadas em DMSO estéril foram armazenadas a -20°C. Para o preparo das doses de tratamento, as alíquotas de Rosiglitazona foram descongeladas e diluídas em salina estéril apirogênica, sendo então sonicadas durante 20 minutos a 37°C e utilizadas imediatamente após este procedimento. A manipulação da droga foi realizada dentro da cabine de biossegurança para manutenção de sua esterilidade.

Preparo de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH = 7,4

PBS 10x:

- Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich) 1,6g
- NaCl (Merck) 80g
- KH_2PO_4 (Sigma Aldrich) 2g
- KCl (Merck) 2g
- Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 1L

Os sais foram dissolvidos em água MilliQ num volume de aproximadamente 800 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro (Jenway) até alcançar 7,4 e o volume restante foi completado com água MilliQ .

PBS 1x:

- PBS 10x 100mL
- Água MilliQ 900mL

Líquido de Turk

- Ácido acético glacial (Química) 10mL
- Cristal violeta (Sigma Aldrich) 50mg
- Água MilliQ q.s.p. 500mL

Conjunto Panótico Rápido (Laborclin)

Constituído por Panótico rápido nº1 (solução de triarilmetano a 0,1%), Panótico rápido nº2 (solução de xantenos a 0,1%) e Panótico rápido nº3 (solução de tiazinas a 0,1%).

Preparo de soluções para Western Blotting

Persulfato de amônio (PSA) a 10%:

- Persulfato de amônio (Merck) 1 g
- Água MilliQ (Millipore) q.s.p.10 mL

Foram congeladas alíquotas de uso único, utilizadas em até 4 semanas após o preparo.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%:

- Dodecil sulfato de sódio (Sigma Aldrich) 10 g
- Água MilliQ q.s.p. 100 mL

Tampão de lise para Western Blotting

- Tris (Merck) 1M pH=8,0 100 μ L
- NaCl (Merck) 5M 300 μ L
- Triton® -X 100 (Sigma Aldrich) 10% 1mL
- Água MilliQ 7,6mL

Para cada 10mL de tampão foi acrescentado um tablete de Complete ® (Roche) contendo inibidores de proteases. O tampão foi armazenado a -20°C sob a forma de alíquotas de 1mL para uso único.

Tampão de amostra 6x:

- Solução de Tris HCl (Merck) 0.5 M pH 6,8 1500 μ L
- SDS 10% 2400 μ L
- Glicerol (Invitrogen) 1200 μ L
- B- mercaptoetanol (Sigma Aldrich) 600 μ L
- Azul de Bromofenol (Sigma Aldrich) para colorir.

Tampão para o gel de resolução (pH 8,8):

- Tris base (Merck) 54,45 g
- Água MilliQ q.s.p. 300 mL

O reagente foi dissolvido em água MilliQ num volume de aproximadamente 200 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro até alcançar 8,8 e o volume restante foi completado com água MilliQ.

Gel de resolução (2 géis de 1,5 mm a 9 % de acrilamida):

- Acrilamida-Bis (BioRad) 4,7 mL
- Tampão para o gel de resolução 1,9 mL
- PSA 10% 115,5µL
- SDS 10% 158 µL
- Água MilliQ 8,12 mL

Foram acrescentados 7 µL de TEMED (Sigma Aldrich) à solução imediatamente antes de seu uso.

Tampão para o gel de empilhamento (pH 6,8):

- Tris (Merck) 30 g
- Água MilliQ q.s.p. 500 mL

O reagente foi dissolvido em água MilliQ num volume de aproximadamente 400 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro até alcançar 6,8 e o volume restante foi completado com água MilliQ.

Gel de empilhamento (2 géis de 1,5mm a 9 % de acrilamida):

- Acrilamida- Bis (BioRad) 875 µL
- Tampão para o gel de empilhamento 1,75 mL
- PSA 10% 52,5 µL

- SDS 10% 70 μ L
- Água MilliQ 4 mL

Foram acrescentados 6 μ L de TEMED (Sigma Aldrich) à solução imediatamente antes de seu uso.

Tampão de corrida 10x:

- Tris base (Merck) 30 g
- Glicina (ICN Biomedicals) 144 g
- SDS (Sigma Aldrich) 10 g
- Água MilliQ q.s.p. 1 L

Tampão de corrida 1x:

- Tampão de corrida 10x 100mL
- Água MilliQ 900mL

Tampão de transferência 10x:

- Tris base (Merck) 30,3 g
- Glicina (ICN Biomedicals) 144 g
- Água MilliQ q.s.p. 1 L

Tampão de transferência 1x :

- Tampão de transferência 10x 100mL
- Metanol (Merck) 200mL
- Água MilliQ 700mL

Solução salina tamponada por Tris (TBS) pH = 7,4

TBS 10x

- Tris HCl (Merck) 28 g
- Tris base (Merck) 2,5 g
- NaCl (Merck) 87,6 g
- Água MilliQ q.s.p. 1 L

TBS 1x

- TBS 10x 100mL
- Água MilliQ 900mL

TBS/ Tween®

- TBS 1X 1000mL
- Tween® 20 (Sigma Aldrich) 500 µL

Tampão de bloqueio (leite em pó a 5 %)

- Leite em pó (Molico) 1g
- TBS/Tween® 20 mL

Preparo de soluções para o ensaio de mieloperoxidase

Solução de homogeneização:

- PBS EDTA 5 µM 100mL
- Brometo de cetildimetil amônio (Sigma) 0,5g

Solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL):

- o-dianisidina (Sigma Aldrich) 1 tablete de 10mg
- Água MilliQ 14,7mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

Solução de peróxido de hidrogênio (0,006%):

- Peróxido de hidrogênio 30% (Merck) 1 µL
- Água MilliQ 5mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

Soluções para Ensaio Imunoenzimático

Tampão para EIA:

- Tampão para EIA Concentrado 1 frasco
- Água MilliQ 90 mL

Tampão de Lavagem:

- Tampão de Lavagem Concentrado 1 frasco (5mL)
- Água MilliQ (Millipore) 2 L
- Tween® 20 (Sigma Aldrich) 1 mL

Reagente de Ellman's:

- Reagente de Ellman's liofilizado (300 det.) 1 frasco
- Água MilliQ 20mL

Por não ser estável, este reagente foi preparado imediatamente antes de seu uso, devendo permanecer protegido da luz.

Soluções para ELISA

Tampão de lavagem:

- PBS 1x 1L
- Tween® 20 500µL

Tampão de bloqueio:

- PBS 1x 100mL
- BSA (Sigma Aldrich) 1g

Tampão de bloqueio + Tween® 20 :

- PBS 1x 100mL
- BSA 1g
- Tween® 20 50 µL

Streptavidina-peroxidase:

- Streptavidina-peroxidase (R&D) 25 µL
- Tampão de bloqueio+ Tween® 20 5mL

A solução foi preparada imediatamente antes de seu uso.

Solução de parada (H₂SO₄ 0,4N):

- H₂SO₄ (Merck) 10,65mL
- Água MilliQ q.s.p. 1L

3.3 Indução de inflamação pulmonar pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL

Camundongos Swiss Webster machos pesando entre 20 e 30 g foram anestesiados através da inalação de isoflurano (Cristália). Após assepsia local com álcool etílico a 70%, foi feita uma incisão medial longitudinal de aproximadamente 1 cm na pele posterior ao mento do animal. Os lobos da glândula tireóide foram afastados gentilmente com uma tesoura de ponta redonda e a traquéia foi elevada pela colocação de uma pinça curva em sua região posterior. A instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL foi feita através da injeção de 30 μ L do estímulo com uma seringa de 300 μ L (BD). A sutura da pele foi feita com nylon 4-0 (Brasuture) e a recuperação dos animais após o procedimento foi acompanhada durante uma hora. Animais instilados com salina estéril + DMSO na mesma concentração empregada no estímulo foram utilizados como controles negativos. Nos experimentos envolvendo o tratamento com o agonista de PPAR γ Rosiglitazona a droga foi administrada por via intravenosa uma hora após o estímulo intratraqueal com 3-oxo C12 HSL. Para isso, os animais foram levemente anestesiados através da inalação de isoflurano e tiveram 100 μ L do tratamento injetados pelo plexo ocular. Animais tratados com salina + veículo (DMSO) foram utilizados como controle negativo.

3.4 Determinação de parâmetros celulares no modelo de inflamação pulmonar induzida por instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL

Seis horas após o estímulo com 3-oxo C12 HSL, foram coletadas amostras de sangue periférico pela veia caudal dos camundongos. Para isso, foi feito um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda dos animais, permitindo a coleta de 5 μ L de sangue para contagem total de leucócitos e de aproximadamente 10 μ L para a confecção de um esfregaço para análise diferencial. Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia pela inalação de isoflurano e procedeu-se a coleta de amostras de BAL. Após a exposição da traquéia conforme descrito anteriormente os animais tiveram os músculos adjacentes seccionados. Em seguida, foi aberto um pequeno orifício na região proeminente da cartilagem traqueal para a inserção de uma cânula acoplada a uma agulha de 21G (BD). O lavado broncoalveolar foi obtido pela infusão da metade do volume de uma seringa de 1mL repleta

de PBS seguida pela aspiração do conteúdo, sendo este procedimento repetido por 3 vezes.

Para a quantificação de leucócitos totais as amostras de sangue e BAL foram diluídas em líquido de Turk (380x e 20x, respectivamente) e as células foram contadas na câmara de Neubauer (Neubauer Improved) através de visualização ao microscópio óptico (Olympus) nos aumentos de 10x ou 40x. Para a análise diferencial, 150 µL de BAL foram rodados a 400 RPM por 5 minutos em citocentrífuga (Cytospin). Lâminas de citocentrifugados de BAL e esfregaços de sangue foram coradas pelo Panótico rápido, permanecendo imersas por três minutos em cada um dos reagentes. A análise diferencial foi realizada pela observação das lâminas coradas no aumento de 100x.

Sobrenadantes de BAL gerados pela rotação a 2.000 RPM em centrífuga para microtubos (Eppendorf) foram armazenados a -20°C para análises posteriores.

3.5 Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos

Citocentrifugados confeccionados com 150 µL de amostras de BAL de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona ou veículo foram fixados em formalina 3,7% por no mínimo 20 minutos. Após rinsagem com água destilada para remoção da formalina, a marcação de corpúsculos lipídicos foi feita pela incubação com a sonda Bodipy (Invitrogen) na diluição de 500x durante 15 minutos, seguida por 3 rinsagens com água destilada para eliminação do excesso da sonda. A montagem das lâminas foi feita com o meio Vectashield contendo DAPI (Vector) para evidenciar o material nuclear. A visualização das imagens foi feita no microscópio (Olympus) e a captura foi realizada no programa AnalysisGetIt.

3.6 Coleta de tecido pulmonar para ensaios de Mieloperoxidase e Western Blotting

Animais desafiados com 3-oxo C12 HSL foram submetidos à inalação com isoflurano 6 horas após o estímulo. Após parada respiratória total, a cavidade torácica dos animais foi aberta e a aurícula esquerda foi seccionada. Um sistema de perfusão contendo um escalpe acoplado a um frasco de solução salina com gotejador pendurado em local elevado foi posicionado no ventrículo esquerdo. Após perfusão com aproximadamente 50 mL de solução salina, foram coletadas amostras

de tecido pulmonar para ensaio de atividade Mieloperoxidase e Western Blotting. Para o primeiro, as amostras de tecido foram imersas em nitrogênio líquido e em seguida foram armazenadas a -86°C até o momento do ensaio. As amostras de tecido para Western Blotting foram cortadas em pequenos fragmentos, sendo em seguida maceradas no gelo com homogeneizador de tecidos (UltraStirrer) e armazenadas a -20°C até o momento de análise.

3.7 Ensaio de atividade mieloperoxidase

Após descongelado, o tecido pulmonar foi pesado e homogeneizado em solução de homogeneização (100 µL de solução para cada 5 mg de tecido) no gelo. O homogenato foi centrifugado a 4000 RPM por 15 minutos a 4°C e em seguida o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 12000 RPM por 15 minutos a 4°C. Em placas de fundo chato (Falcon) foram adicionados 50 µL de solução de homogeneização + 50 µL de sobrenadante do homogenato + 50 µL de solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL), sendo realizada a duplicata de cada amostra. A placa foi então incubada a 37°C na leitora de placas (Spectramax L190) por 15 minutos e em seguida foram adicionados 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio (0,006%). Após mais 10 minutos de incubação a 37°C determinou-se a densidade óptica no comprimento de onda de 460 nm.

3.8 Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicincônico (*Bicinconic Acid*, BCA, Pierce)

O Reagente de trabalho foi preparado juntando-se 50 partes de Reagente BCA **A** e uma parte de Reagente BCA **B**. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Dez microlitros das amostras de sobrenadante de BAL ou de homogenato de tecido pulmonar em tampão de lise para Western Blotting (100x diluído em PBS) foram adicionadas aos poços contendo 70 µL de Reagente de trabalho. A placa de fundo em U (Nunc) foi incubada na estufa (Labline) a 37°C por 30 minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

3.9 Western Blotting

O gel separador foi preparado e aplicado entre as placas que compõem o sistema de suporte (BioRad). Álcool isopropílico (Merck) foi adicionado entre as placas para evitar o contato do gel com o ar e acelerar o processo de polimerização. Após a solidificação do gel, o isopropanol foi removido e as placas foram rinsadas com água MilliQ. Depois da secagem com papel de filtro, o gel de empilhamento foi aplicado sobre o gel separador e o pente foi colocado entre as placas.

Após a polimerização do gel de empilhamento, as placas foram transferidas para a cuba de eletroforese (BioRad), à qual se adicionou tampão de corrida suficiente para cobrir totalmente o gel. Um volume de lisado diluído em tampão de amostra correspondente a 80 µg de proteínas totais foi aplicado em cada poço. Aplicou-se também o padrão peso molecular Rainbow™ (Amersham). A cuba foi então conectada a uma fonte (BioRad) programada para fornecer 120 Volts durante uma hora.

Após o tempo de corrida, o gel foi removido das placas e a parte correspondente ao gel de empilhamento foi descartada. O restante do gel foi imerso em tampão de transferência. Uma membrana de PVDF (BioRad) foi cortada no tamanho do gel separador e ativada por cinco minutos em metanol (Merck). Em seguida, a membrana e os filtros de papel foram encharcados com tampão de transferência e colocados no aparelho de transferência trans-blot semi-dry (BioRad) formando um sistema composto por filtro de papel, membrana de PVDF, gel separador e filtro de papel, de baixo para cima. O aparelho foi então conectado a uma fonte (BioRad) programada para fornecer 12V por uma hora e meia.

Ao término da transferência, a membrana foi retirada do aparelho e incubada em cerca de 20mL de tampão de bloqueio por duas horas no agitador (Labline). Em seguida, a membrana foi lavada 4 x por cinco minutos com TBS Tween® e incubada por uma hora e meia sob agitação com IgG monoclonal de coelho anti-paroxonase 1-3 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) diluída 400x em TBS/ Tween®. Posteriormente, a membrana foi lavada 4 x por cinco minutos com TBS/Tween® e incubada por uma hora e meia com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase (Vector) diluído 15.000x. Em seguida, a membrana foi lavada 4 x por cinco minutos com TBS sem Tween® e imersa numa solução composta por partes iguais de *SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution* (Pierce) e *SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution* (Pierce) por cinco minutos. Após esse

período, o excesso de solução foi removido e a membrana foi encerrada em um cassete contendo um filme (Kodak) fotossensível para revelação. O controle de carregamento foi feito pela detecção da expressão de β -tubulina através da incubação da membrana com IgG monoclonal de coelho anti- β -tubulina (9F3, Cell Signaling) diluído 5.000x seguida pela incubação com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase (Vector) diluído 15.000x.

3.10 Dosagem de leucotrieno B₄ (LTB₄) através do Kit de Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Immunoassay*, EIA) monoclonal (Cayman Chemical)

Os padrões foram preparados em tampão para EIA, com suas concentrações variando de 1 ng/mL a 16,25 pg/mL. Em cada poço da placa revestida com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo foram pipetados os seguintes valores:

	Tampão EIA	Padrão/amostra	Rastreador	Anticorpo
Branco	50 μ L	-	50 μ L	50 μ L
Padrões/amostras	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L

A placa foi incubada por 18 horas a 4°C. Depois desse período, esvaziou-se a placa e rinsou-se a mesma com Tampão de Lavagem. Adicionou-se 200 μ L do Reagente de Ellman's a cada poço. Incubou-se a placa no escuro por cerca de uma hora e em seguida realizou-se a leitura na leitora de placas (Spectramax L190) a 412 nm. Este ensaio é baseado na competição entre o eicosanóide e o seu conjugado com acetilcolinesterase (AChE), também conhecido como rastreador. Como a concentração de rastreador é conhecida e constante e a concentração do mediador inflamatório em questão varia, a quantidade de rastreador capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal é inversamente proporcional à concentração de eicosanóide nos poços analisados.

3.11 Dosagem de citocinas através do Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)

Placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50 μ L/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 4x com tampão de lavagem

(100µL/poço) e incubadas por 1 hora com a solução de bloqueio (50µL/poço) a temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio+ Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50µL/poço). Após nova incubação overnight a 4°C as placas foram lavadas 6x com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio+ Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8x com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (*TMB, Sigma Aldrich*), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas.

Citocina	Anticorpo de captura	Curva de citocina recombinante	Anticorpo de detecção
IL-6 (R&D, dual set)	2µg/mL	(1000pg/mL-15,6pg/mL)	0,2µg/mL
IL-10 (R&D, dual set)	2µg/mL	(2000pg/mL- 31,3pg/mL)	0,2µg/mL
IL-12(R&D, dual set)	4µg/mL	(2500pg/mL- 39,1pg/mL)	0,4µg/mL
TNF (R&D, dual set)	1µg/mL	(2000pg/mL- 31,3pg/mL)	0,25µg/mL
MIF* (R&D, dual set)	2µg/mL	(2000pg/mL- 31,3 pg/mL)	0,1µg/mL
CCL2/MCP-1 (R&D, dual set)	0,2µg/mL	(500pg/mL- 7,8pg/mL)	0,05µg/mL
CXCL1/KC (R&D, dual set)	2µg/mL	(1000pg/mL- 15,6pg/mL)	0,2µg/mL

* Anticorpos desenvolvidos para ensaios com amostras de humanos. Apresentam reatividade cruzada com amostras de camundongo.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo teste *T* de Student (*one tail*) no software *GraphPad prism* versão 5. Os dados quantitativos são mostrados como média + erro padrão da média (*SEM*) e o nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL

4.1.1. Análise dose-resposta da inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL

Estudos demonstram que o principal componente de *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* 3-oxo C12 HSL é essencial para a fisiopatologia das pneumonias causadas por essa bactéria, regulando a expressão de fatores de virulência relacionados à colonização, permanência e disseminação no hospedeiro (97). Embora os efeitos das moléculas envolvidas na comunicação bacteriana sobre a regulação gênica desses procariotos sejam intensamente investigados, poucos trabalhos visando caracterizar seus efeitos em células e sistemas eucariotos foram até então conduzidos. Evidências sobre o potencial pró-inflamatório de 3-oxo C12 HSL *in vivo* foram relatadas em modelos de injeção subcutânea em camundongos, no qual se observou a migração de neutrófilos pela análise histológica do infiltrado inflamatório (97). Apesar desses dados, ainda não foram caracterizados os efeitos da 3-oxo C12 HSL sobre as células do hospedeiro no ambiente pulmonar, que sobressai como um dos principais sítios acometidos pelas infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Para criarmos um modelo onde pudéssemos estudar os efeitos dessa molécula e posteriormente investigar o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar, realizamos inicialmente uma curva dose-resposta para escolhermos uma dose de trabalho. Animais Swiss foram submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL nas doses de 0,05, 0,5 e 5 nmol/animal. Seis horas após o procedimento cirúrgico foi quantificado o número de neutrófilos no lavado bronco-alveolar, escolhido como parâmetro para caracterizar a inflamação induzida por 3-oxo C12 HSL com base no estudo de Smith e colaboradores (97).

Foi possível observar que as doses de 0,5 e 5 nmol/animal se mostraram capazes de aumentar o número de neutrófilos recuperados no BAL quando comparadas ao grupo salina, enquanto a menor dose (0,05 nmol/animal) não apresentou nenhum efeito (figura 4.1). Como não foi detectada uma diferença estatística entre as doses de 0,5 e 5 nmol/animal a menor dose foi escolhida para a execução dos experimentos posteriores.

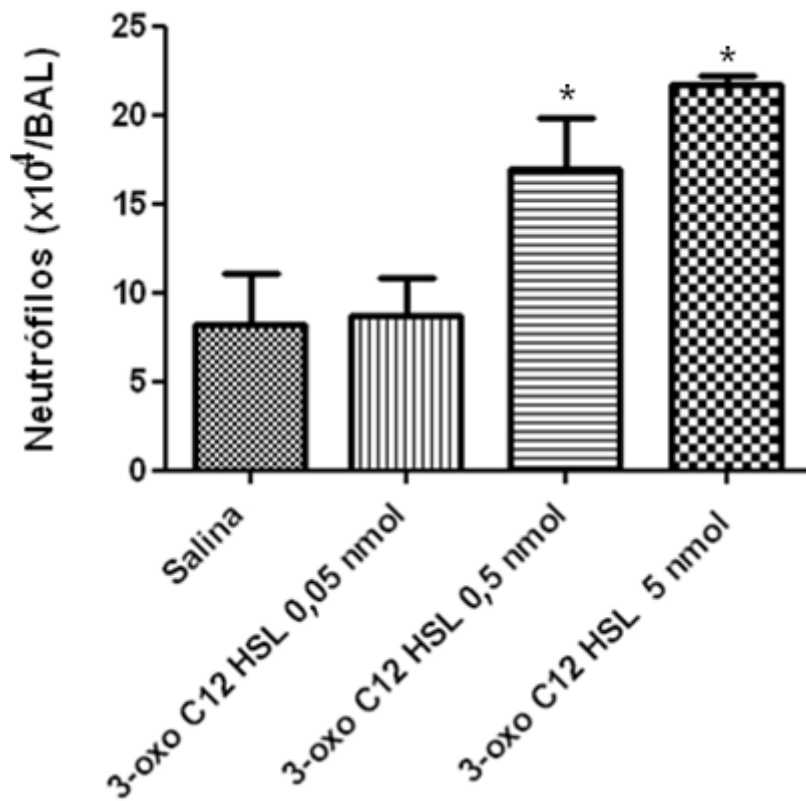


Figura 4.1. Curva dose-resposta com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss foram submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,05, 0,5 e 5 nmol/animal) e tiveram amostras de BAL recolhidas 6 horas após o estímulo para análise do conteúdo de neutrófilos. Dados representados como média + erro padrão da média ($5 \leq n \leq 6$). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.1.2. Análise da celularidade do sangue e do lavado bronco-alveolar de camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL

Uma vez padronizado o modelo de migração de neutrófilos para o pulmão induzido por 3-oxo C12 HSL, decidimos investigar seus efeitos quantitativos e qualitativos sobre a população de células presentes em amostras de sangue ou recuperadas no *BAL*. Para isso, camundongos Swiss foram instilados com 3-oxo C12 e seis horas após o estímulo foram recolhidas amostras de sangue e lavado bronco-alveolar para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. Como indicado nas figuras 4.2.A, 4.2.B e 4.2.C, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros celulares de amostras de sangue periférico. Já a análise das amostras de *BAL* revelou um aumento no número de leucócitos totais (4.2.D) para o qual contribuíram uma maior migração de células mononucleares (4.2.E) e polimorfonucleares (4.2.F).

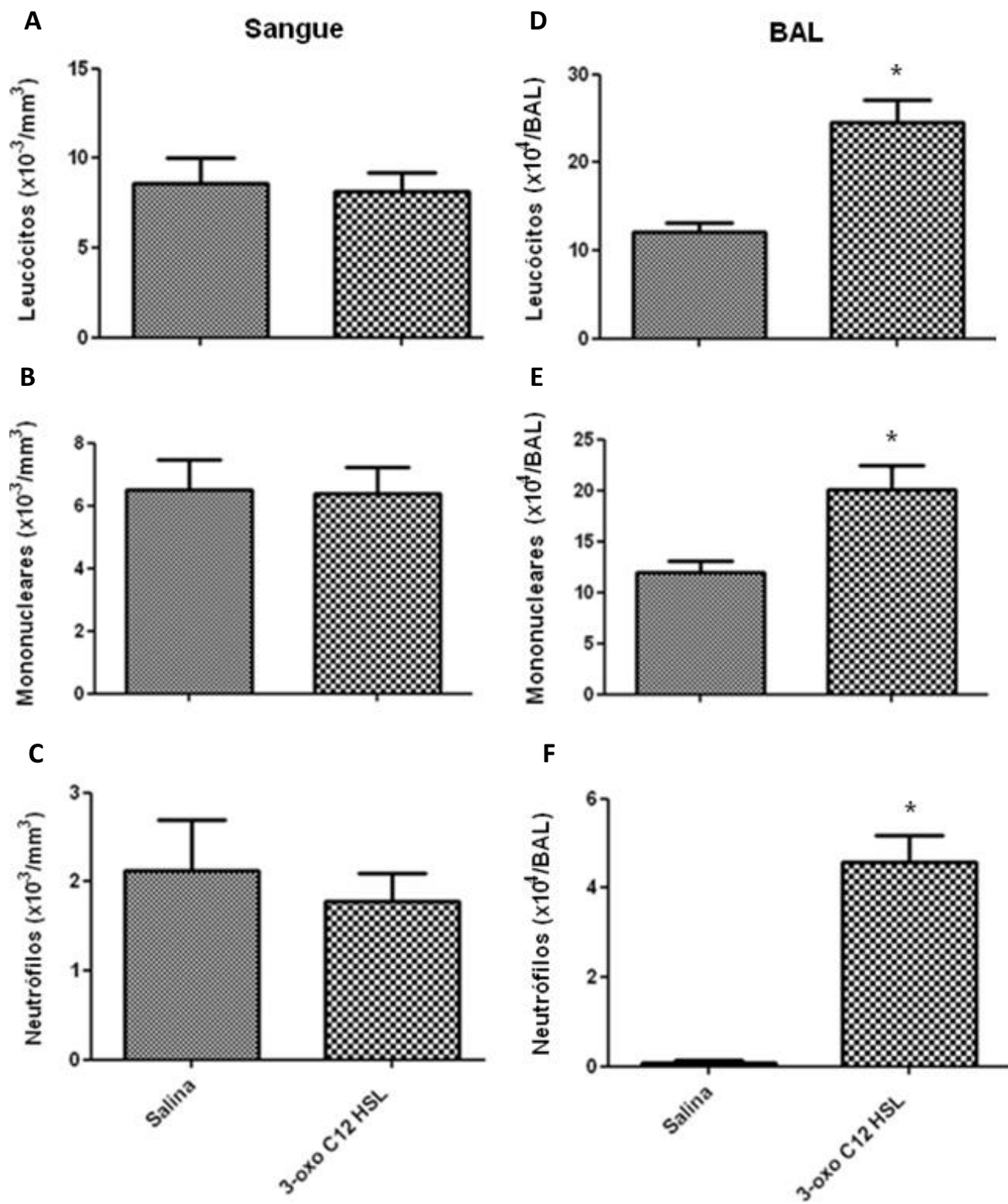


Figura 4.2. Análise da celularidade de amostras de sangue periférico e lavado bronco-alveolar (BAL) de camundongos Swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) tiveram amostras de sangue periférico (A, B e C) e BAL (D, E e F) coletadas seis horas após para análise de celularidade. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n= 6). Figura representativa de 3 experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.1.3. Determinação de atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL

A participação dos neutrófilos na injúria tecidual presente em diversos modelos de inflamação pulmonar é bem estabelecida na literatura. A injúria tecidual pode ocorrer em função da atividade de enzimas características dos neutrófilos, como elastases e mieloperoxidase, sendo essa última uma enzima importante na geração de espécies oxidantes potentes. Por esses motivos, decidimos caracterizar a atividade dessa enzima no tecido pulmonar durante a resposta inflamatória induzida pela instilação com 3-oxo C12 HSL. O ensaio de mieloperoxidase revelou que a 3-oxo C12 HSL é capaz de causar neutrofilia no tecido pulmonar (figura 4.3), sendo este resultado consonante em relação os dados obtidos pela análise de celularidade do BAL mostrados anteriormente.

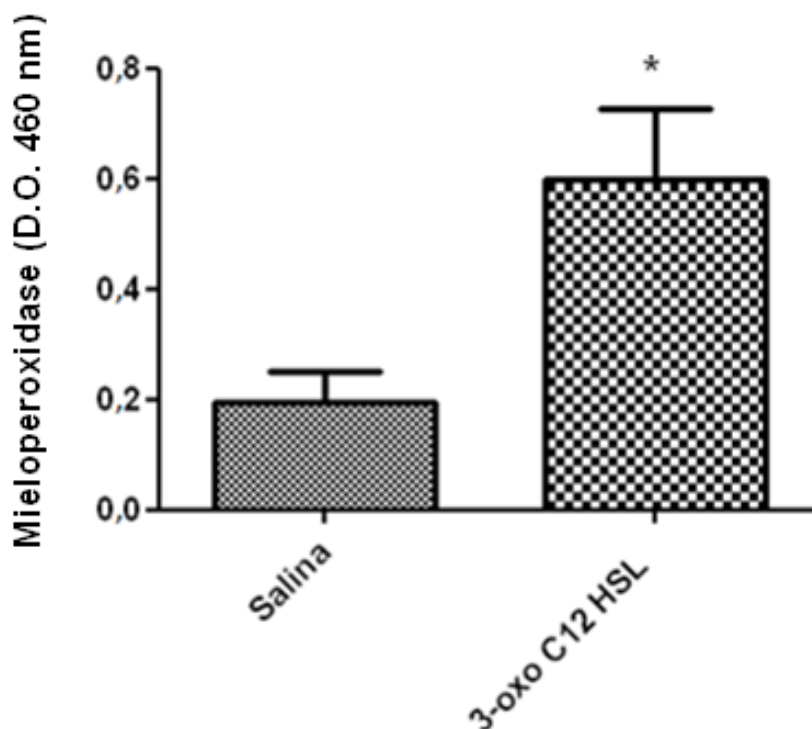


Figura 4.3. Avaliação da atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos Swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) tiveram amostras de tecido pulmonar coletadas seis horas após para o ensaio de mieloperoxidase. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n= 6). Figura representativa de 3 experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.1.4. Avaliação da formação de edema pulmonar na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL

Para avaliar a formação de edema pulmonar na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL, amostras de lavado bronco-alveolar de camundongos Swiss estimulados através de instilação intratraqueal tiveram seu teor de proteínas totais determinado pelo método do ácido bicínico (BCA). Foi possível observar que o estímulo com 3-oxo C12 HSL demonstrou uma capacidade de induzir um aumento na quantidade de proteínas presentes no BAL, sugerindo um papel para esse componente de quorum sensing na formação do edema pulmonar induzido durante as infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

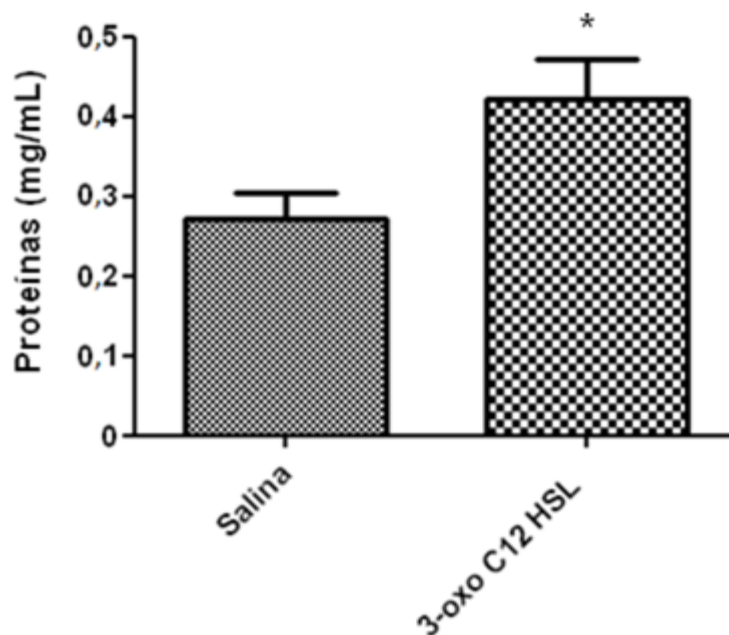
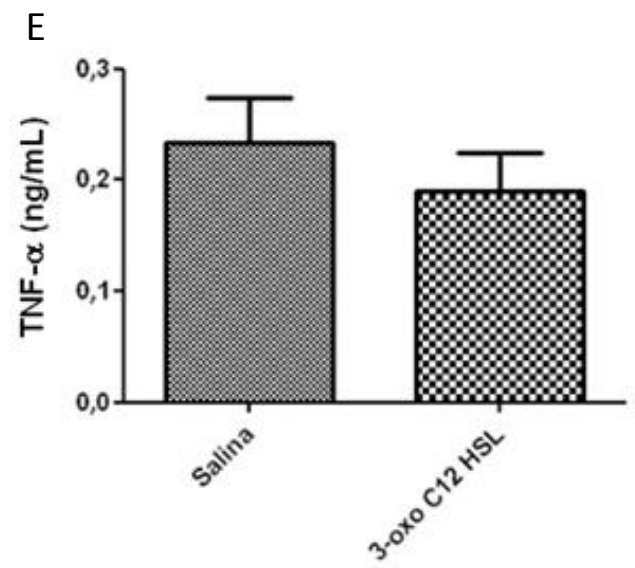
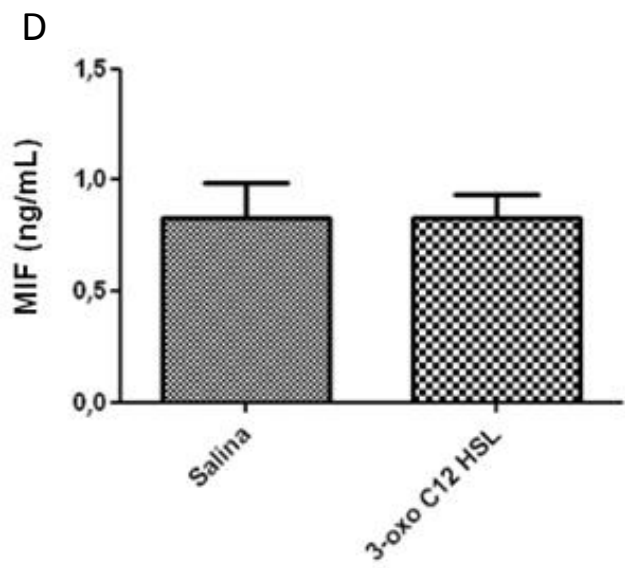
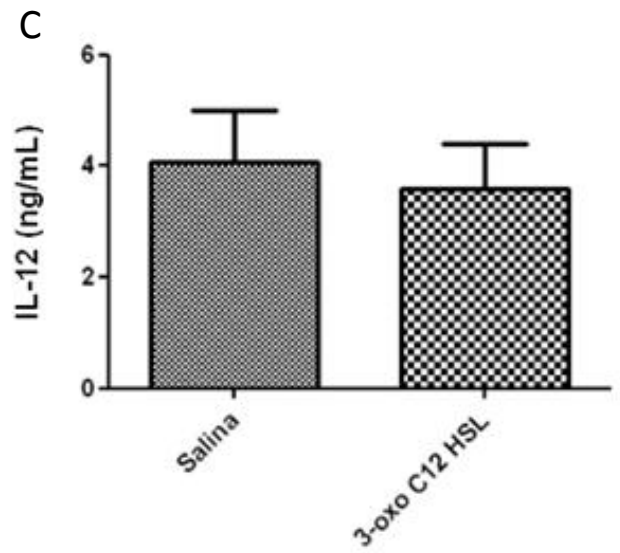
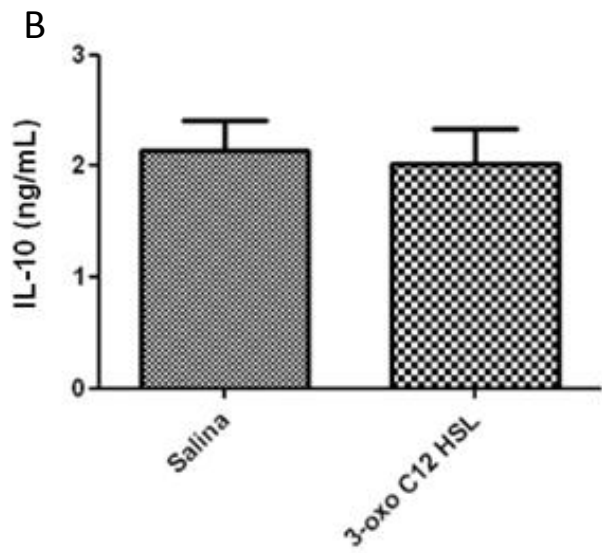
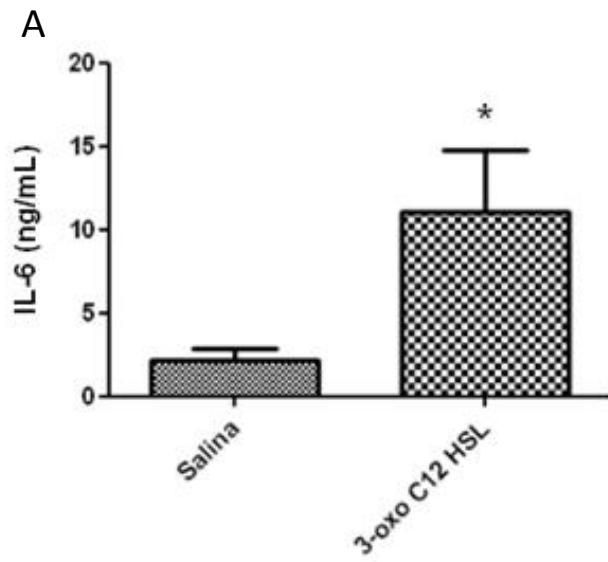


Figura 4.4. Avaliação da formação de edema pulmonar em camundongos Swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) tiveram amostras de BAL coletadas seis horas após. A determinação do edema pulmonar foi feita pela quantificação do teor de proteínas totais presentes no sobrenadante. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n=14). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.1.5. Análise de mediadores solúveis presentes na resposta inflamatória induzida pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL

Para compreender os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória causada pela instilação intratraqueal de 3-oxo C12 HSL foram investigados os mediadores solúveis que poderiam estar participando desse processo. Nos sobrenadantes de BAL foram determinados os níveis das citocinas interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), *Macrophage migration Inhibitory Factor* ou Fator Inibidor da migração de Macrófago (MIF), *Tumor Necrosis Factor alpha* ou Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e das quimiocinas *Monocyte Chemotactic Protein -1* ou Proteína Químioatraente de Monócitos-1 (CCL2/MCP-1) e *Keratinocyte-derived Chemokine* ou Quimiocina derivada de Queratinócitos (CXCL1/KC) pelo método de ELISA e do eicosanóide leucotrieno B₄ (LTB₄) através de EIA.

Os resultados revelaram que dentre as citocinas analisadas somente a interleucina 6 (figura 4.5.A) teve seus níveis significativamente aumentados pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL. Já dentre as quimiocinas analisadas foi possível observar um aumento nos níveis de CXCL2/MCP-1 (figura 4.5.F) e CXCL1/KC (figura 4.5.G) no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Por fim, nossa análise detectou um aumento no níveis de leucotrieno B₄ (figura 4.5.H) nos lavados de animais desafiados, indicando um papel para esses mediadores na resposta inflamatória causada por 3-oxo C12 HSL.



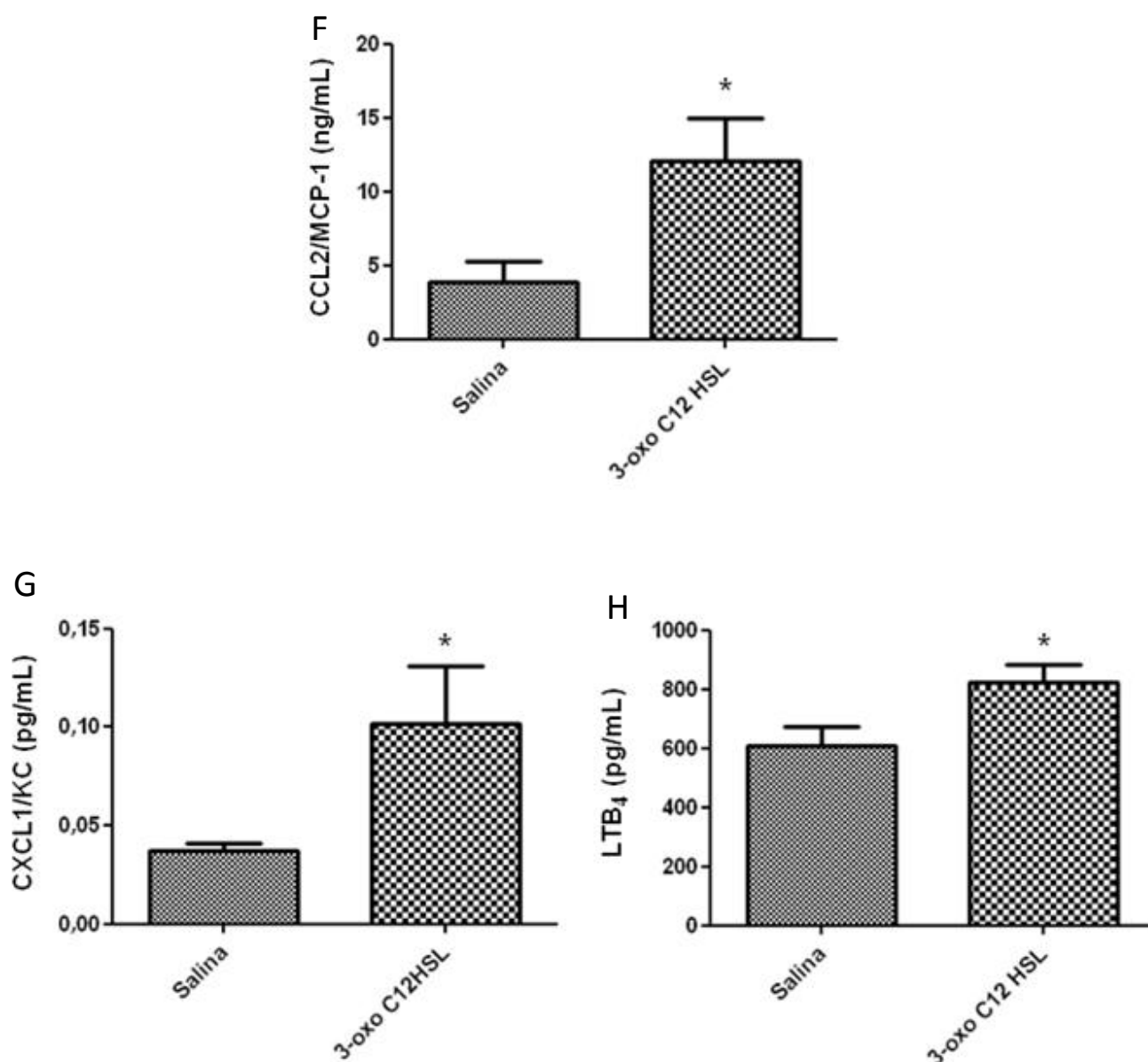


Figura 4.5. Caracterização dos mediadores solúveis envolvidos na resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) tiveram amostras de BAL coletadas seis horas após. Nos sobrenadantes destas amostras foram determinados os níveis de IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12 (C), MIF (D), TNF- α (E), CCL2/MCP-1 (F), CXCL1/KC (G) por ELISA e LTB₄ (H) por EIA. Dados apresentados como média + erro padrão da média ($6 \leq n \leq 10$). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.1.6. Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas que atuam como sítios de síntese de mediadores lipídicos envolvidos na resposta inflamatória (32). A biogênese dessas organelas em leucócitos se mostra altamente regulada durante os processos inflamatórios, podendo ser induzida diretamente por componentes microbianos ou por moléculas envolvidas na resposta inflamatória, como CCL2/MCP-1 (41). Como existe uma correlação positiva entre a indução destas organelas e a produção de eicosanóides (39, 40, 42), investigamos a biogênese de corpúsculos nos leucócitos recuperados do lavado bronco-alveolar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Para isso, citocentrifugados confeccionados com células presentes no BAL de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) ou veículo foram coradas com a sonda de lipídios neutros Bodipy. A montagem das lâminas foi feita em meio contendo DAPI, de modo a permitir a visualização do material nuclear. Foi possível observar que as células de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL (4.6.A e 4.6.B) parecem apresentar uma maior quantidade de corpúsculos quando comparadas ao grupo salina (4.6.C e 4.6.D), indicando um possível papel dessas organelas na resposta inflamatória induzida por este componente de *quorum sensing*.

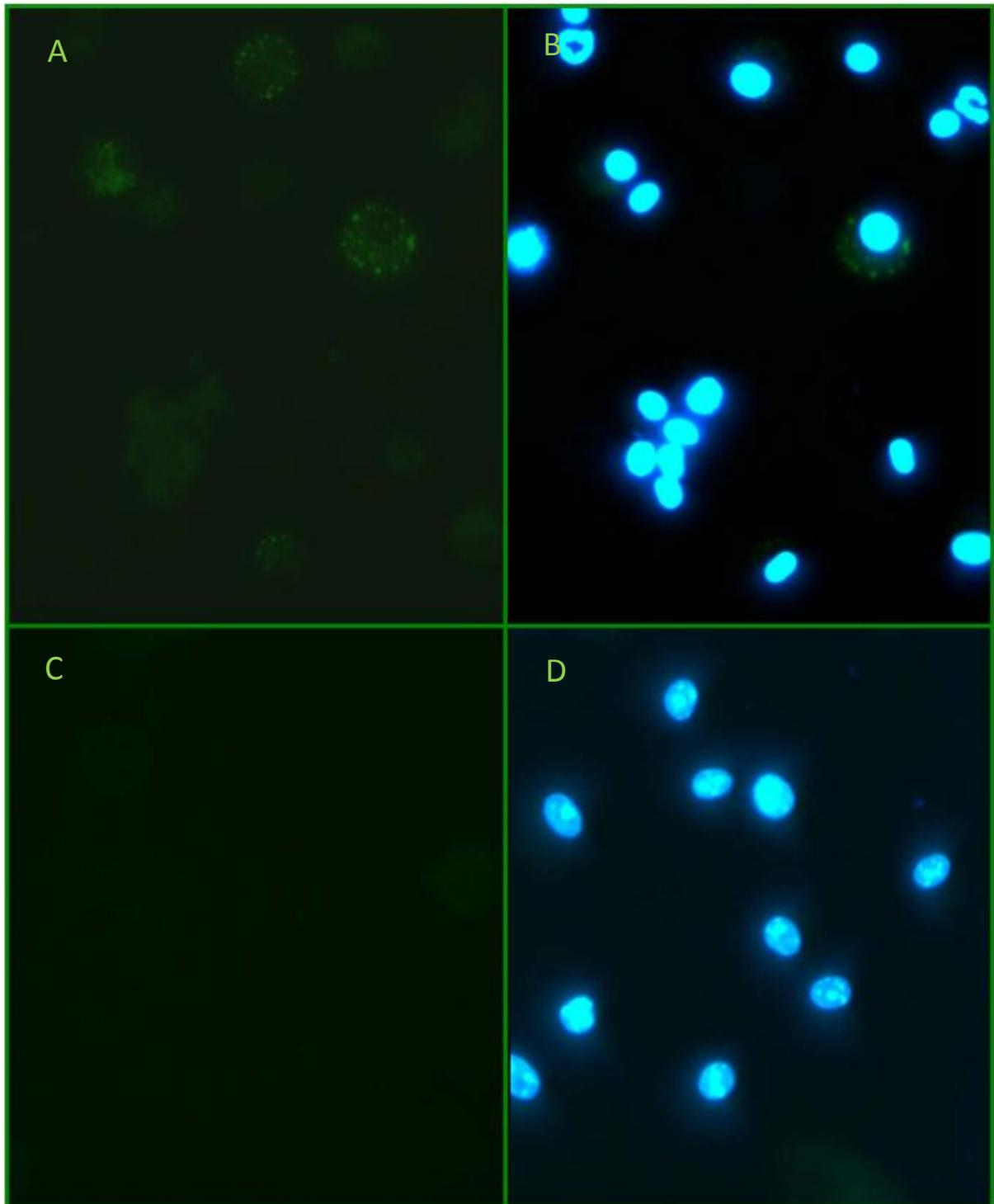


Figura 4.6. Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos em células presentes no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) tiveram amostras de BAL coletadas seis horas após para marcação intracelular de corpúsculos lipídicos com a sonda Bodipy (em verde). O material nuclear das células foi marcado por DAPI (em azul). A e B: 3-oxo C12 HSL; C e D: Salina. Fotos representativas de pelo menos cinco animais por grupo.

4.2. Investigação sobre o papel do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL

4.2.1. Efeito do tratamento com o agonista de PPAR rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a migração celular causada por 3-oxo C12 HSL

Após a caracterização da inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL foi avaliado o papel do receptor nuclear PPAR γ na migração celular induzida por esse estímulo. Estudos *in vitro* demonstram que 3-oxo C12 HSL interage com membranas celulares (135) e é capaz de se ligar ao receptor nuclear PPAR γ (101). Pneumócitos humanos do tipo II (linhagem A549) estimulados com 3-oxo C12 HSL expressam diversos genes pró-inflamatórios, incluindo IL-8. A expressão desses genes em resposta ao estímulo com 3-oxo C12 HSL se mostrou inibida pelo tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona, indicando papéis fisiológicos opostos para esses ligantes (101). De fato, a ligação de 3-oxo C12 HSL ao PPAR γ afeta a capacidade desse receptor de se ligar à sequências responsivas (PPRE) presentes em genes-alvo, além de reduzir o efeito anti-inflamatório de agonistas de PPAR γ pela inibição da transrepressão de genes pró-inflamatórios *in vitro* (100, 101). Essas evidências sugerem que a modulação farmacológica do PPAR γ pode representar uma estratégia terapêutica interessante nas infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa*. Para investigar essa hipótese, camundongos Swiss instilados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo (DMSO) por via intravenosa 1 hora após o procedimento cirúrgico. Seis horas após o estímulo, foram recolhidas amostras de lavado bronco-alveolar para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. Como indicado nas figuras 4.7.A, 4.7.B e 4.7.C, os animais desafiados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona apresentaram uma diminuição significativa no número de leucócitos totais recuperados no BAL, sendo essa redução significativa tanto para a população de células mononucleares quanto para a população de neutrófilos quando comparadas com o grupo tratado com veículo.

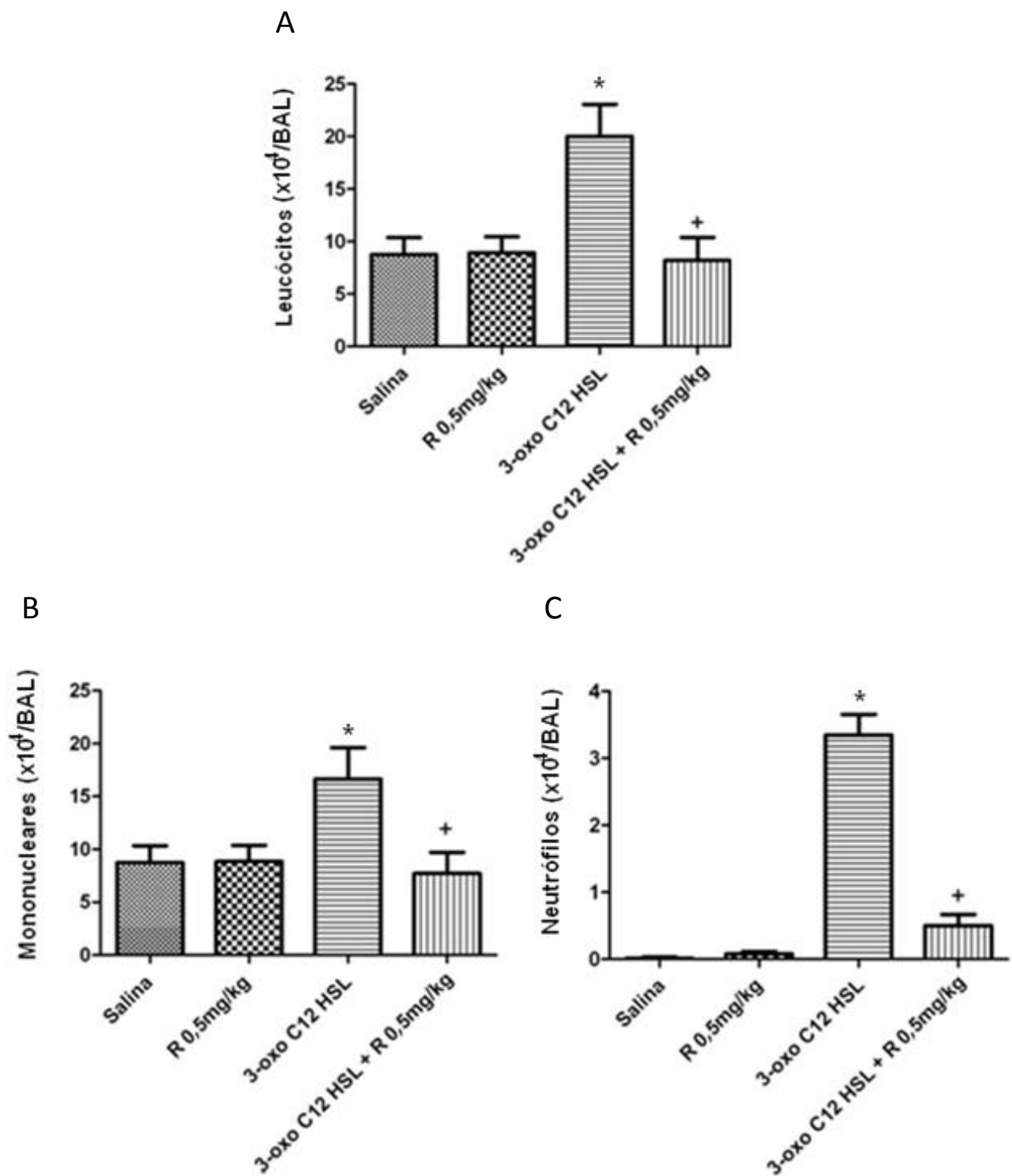


Figura 4.7. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a migração de células no modelo de inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de BAL para análise de celularidade. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n=6). Figura representativa de 3 experimentos. (*) p<0,05 em relação ao grupo salina. (+) p<0,05 em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.2. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL

Para investigarmos esse parâmetro, camundongos Swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo sofreram perfusão seis horas após o procedimento cirúrgico para coleta das amostras de tecido pulmonar. O ensaio de mieloperoxidase mostrou que o tratamento com rosiglitazona foi capaz de reduzir neutrofilia no tecido pulmonar animais desafiados com 3-oxo C12 HSL, de acordo com a redução da migração de neutrófilos demonstrada na figura 4.7.C.

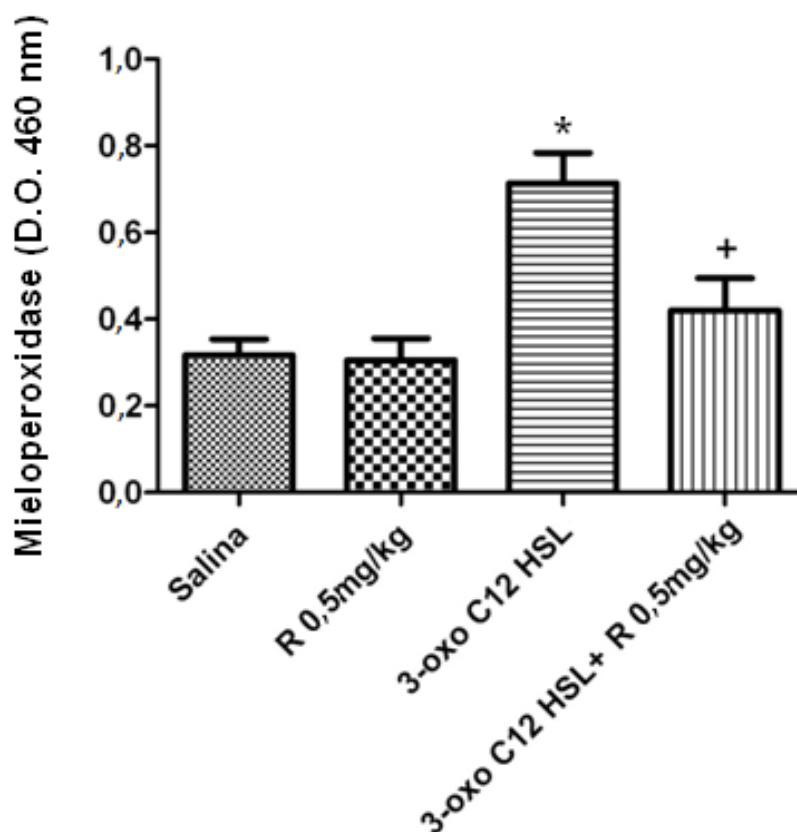


Figura 4.8. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de tecido pulmonar para o ensaio de mieloperoxidase. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n=6). Figura representativa de 3 experimentos. (*) p<0,05 em relação ao grupo salina. (+) p<0,05 em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.3. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre o edema pulmonar em animais estimulados com 3-oxo C12 HSL

Dando continuidade ao estudo das alterações causadas pelo tratamento com rosiglitazona na inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL, foram investigados os efeitos dessa droga sobre a formação de edema. Para isso, camundongos Swiss instilados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo (DMSO) 1 hora após o procedimento tiveram amostras de lavado bronco-alveolar recolhidas seis horas após o estímulo. A quantificação de proteínas totais pelo método do BCA revelou que a rosiglitazona foi capaz de reverter a formação de edema causada pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL.

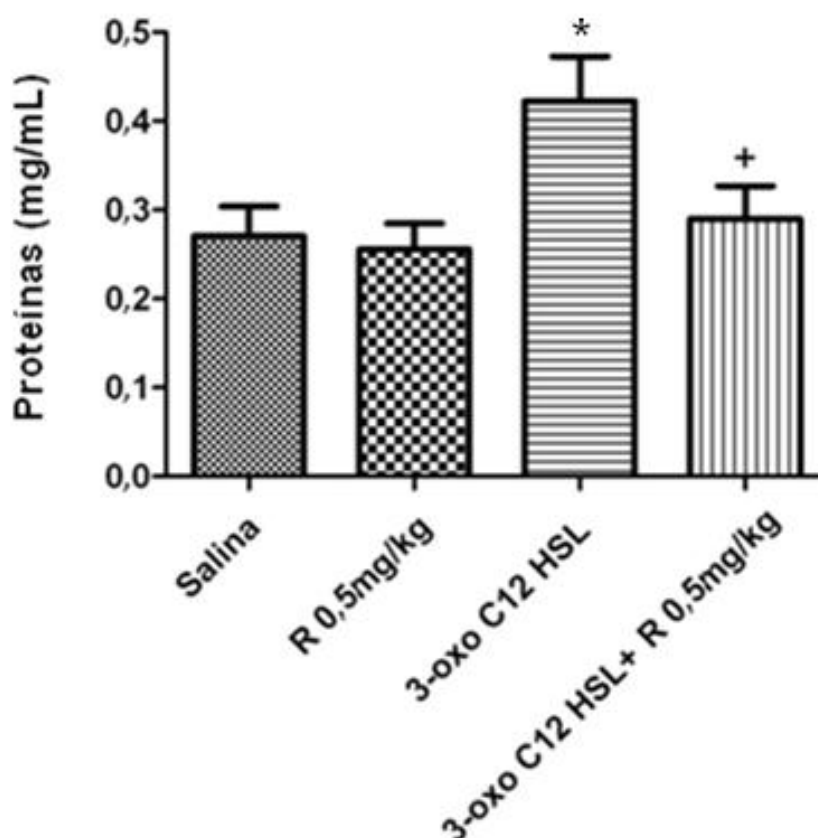


Figura 4.9. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de BAL. A determinação do edema pulmonar foi feita pela quantificação do teor de proteínas totais presentes no sobrenadante. Dados apresentados como média + erro padrão da média ($13 \leq n \leq 15$). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.4. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL

Estudos *in vitro* demonstraram que a rosiglitazona é capaz de antagonizar a expressão de IL-6 e IL-8 na linhagem de pneumócitos do tipo II A549 estimulada com 3-oxo C12 HSL. A caracterização do modelo de inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL nos permitiu identificar alterações nos níveis de IL-6, CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC nos animais desafiados. Sendo assim, os níveis dessas citocinas foram investigados no sobrenadante de BAL de camundongos Swiss instilados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo (DMSO) 1 hora após o procedimento. As dosagens de IL-6, CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC revelaram que o tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona é capaz de reduzir o aumento nos níveis desses mediadores induzido pela inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL, podendo esta modulação justificar os outros efeitos antiinflamatórios da rosiglitazona descritos para este modelo até o momento.

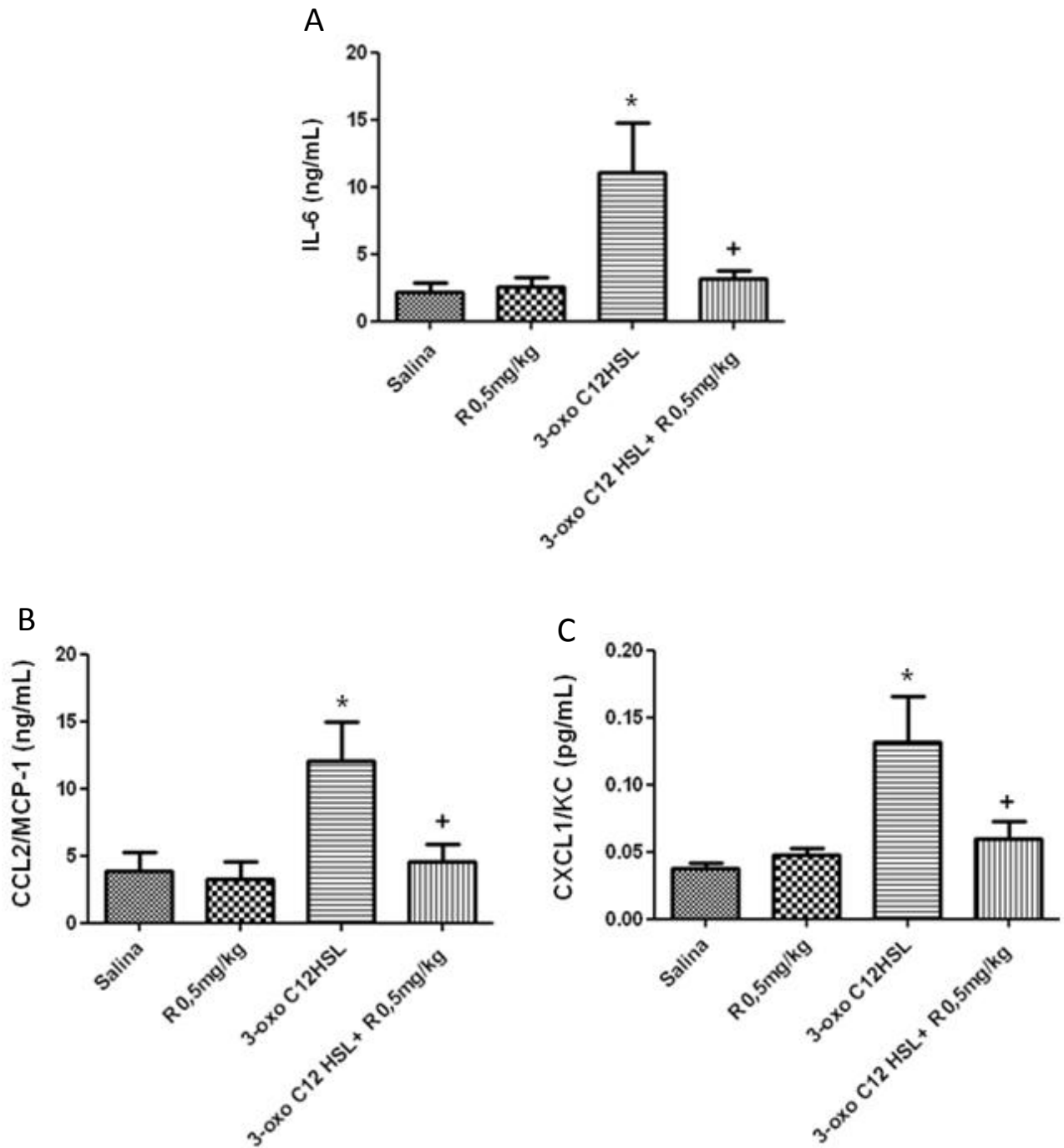
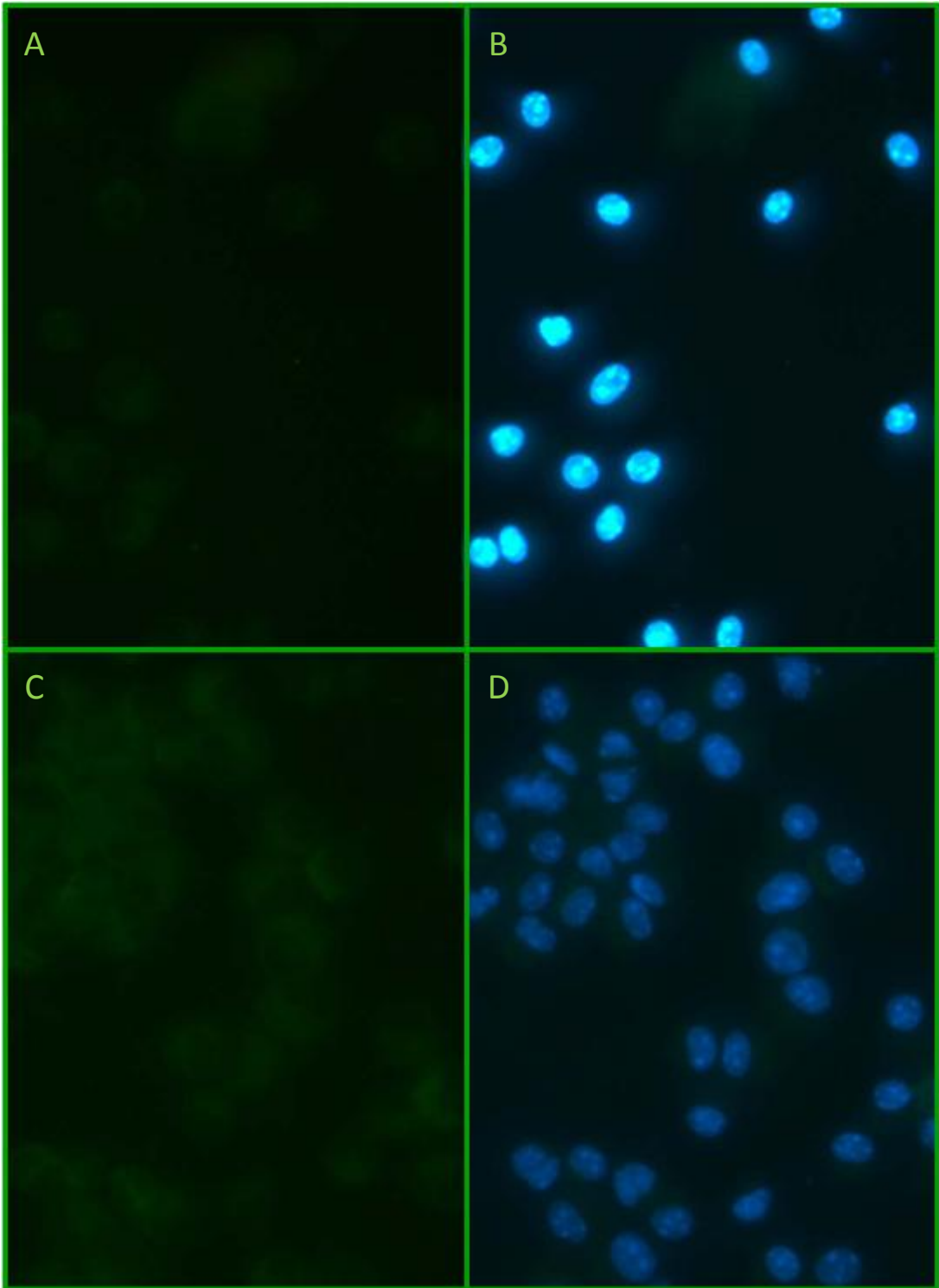


Figura 4.10. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória causada por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de BAL. As dosagens de IL-6 (A), CCL2/MCP-1 (B) e CXCL1/KC (C) foram feitas no sobrenadante por ELISA. Dados apresentados como média + erro padrão da média ($8 \leq n \leq 11$). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.5. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL

Já foi demonstrado que o receptor nuclear PPAR γ está envolvido na biogênese de corpúsculos lipídicos em modelos de infecção bacteriana *in vitro* (*M. tuberculosis*)(134). Além disso, também já foi caracterizado o envolvimento da quimiocina CCL2/MCP-1 na indução da biogênese dessas organelas (41). Como os resultados anteriormente descritos sugerem uma redução nos níveis de CCL2/MCP-1 no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg), decidimos investigar a biogênese de corpúsculos lipídicos nos leucócitos recuperados do lavado bronco-alveolar desses animais. Foi possível observar que as células mononucleares de animais estimulados com salina e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) (figura 4.11.C e 4.11.D) apresentam uma quantidade de corpúsculos semelhante à observada no grupo tratado com veículo (4.11.A e 4.11.B), enquanto nas células mononucleares de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona (4.11.G e 4.11.H) parece haver uma menor quantidade de corpúsculos quando comparadas ao grupo tratado com veículo (4.11.E e 4.11.F). Esses dados sugerem uma possível participação (direta ou indireta) do receptor nuclear PPAR γ na modulação dessas organelas durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL .



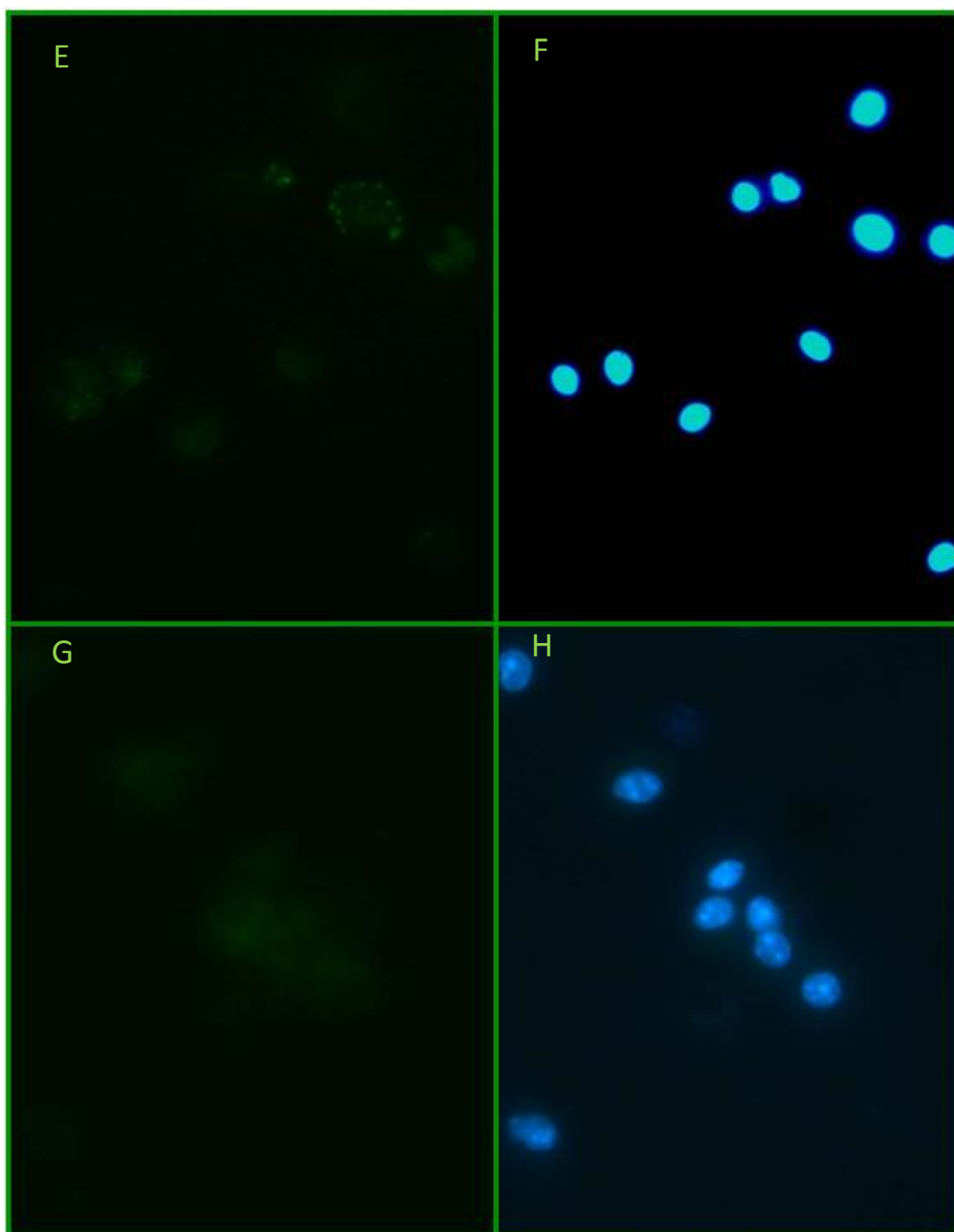


Figura 4.11. Efeitos da rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a inflamação induzida por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo tiveram amostras de BAL coletadas seis horas após a instilação para marcação intracelular de corpúsculos lipídicos com a sonda Bodipy (em verde). O material nuclear das células foi marcado por DAPI (em azul). **A e B:** Salina; **C e D:** R0,5 mg/kg; **E e F:** 3-oxo C12 HSL; **G e H:** 3-oxo C12 HSL+ R0,5 mg/kg. Fotos representativas de pelo menos cinco animais por grupo.

4.2.6. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre expressão de paraoxonase no tecido pulmonar durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL

Trabalhos recentes demonstram que a enzima paraoxonase possui uma intensa atividade lactonase (107). De fato, o componente de *quorum sensing* de *Pseudomonas* 3-oxo C12 HSL consiste no melhor substrato até hoje identificado para a isoforma 2 (109), encontrada no interior de inúmeros tipos celulares. Há evidências de que a própria 3-oxo C12 HSL pode diminuir a expressão de paraoxonase *in vitro* (111), sendo essa estratégia favorável à persistência da bactéria no hospedeiro. Além disso, já foi descrito que o receptor nuclear PPAR γ está envolvido na regulação da expressão dessa enzima em linhagem de macrófagos murinos (células Raw 264.7)(113).

Não existem relatos sobre a regulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar na presença de 3-oxo C12 HSL; portanto, decidimos investigar a modulação da expressão dessa enzima no modelo de inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. Para isso, o tecido pulmonar de camundongos Swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo foi perfundido e coletado seis horas após o procedimento cirúrgico.

Os resultados indicam que a administração de rosiglitazona parece induzir um discreto aumento na expressão de paraoxonase no tecido pulmonar, enquanto o estímulo com 3-oxo C12 HSL reduz drasticamente a expressão dessa enzima. Já o tratamento com rosiglitazona após o desafio com 3-oxo C12 HSL não se mostrou capaz de reverter a diminuição da expressão de paraoxonase, indicando que a dose empregada não foi suficiente para alcançar este efeito.

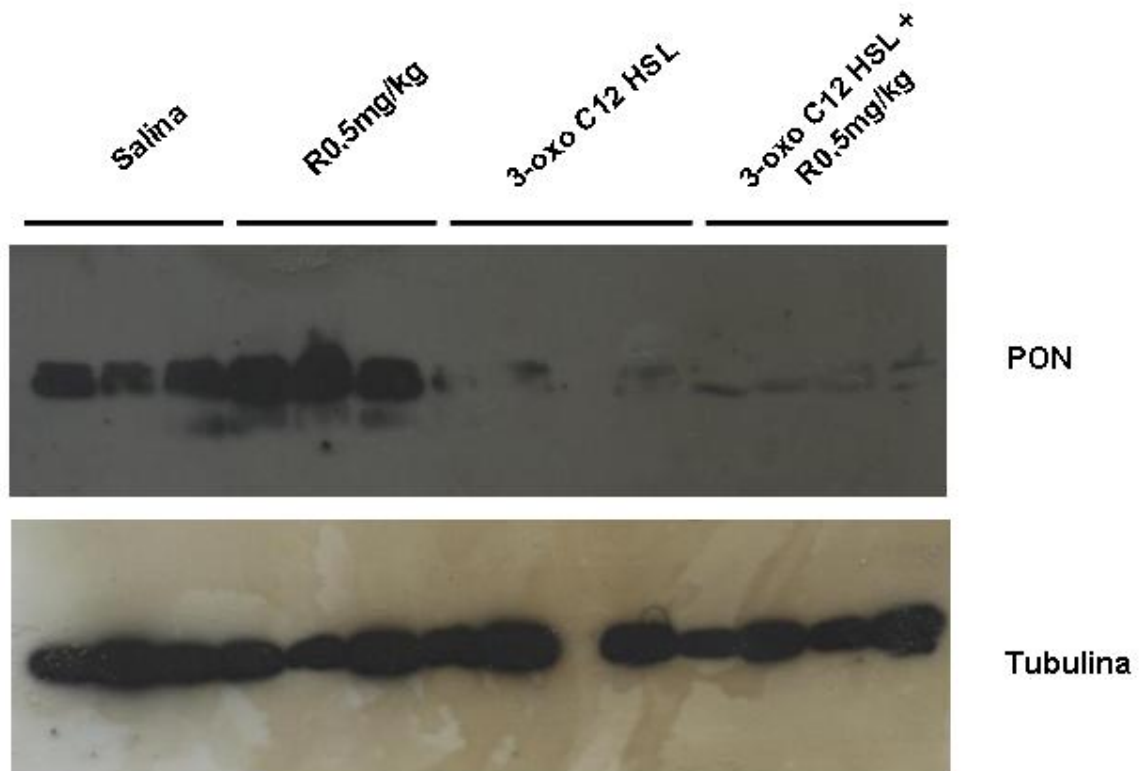


Figura 4.12. Efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a modulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo tiveram amostras de tecido pulmonar coletadas seis horas após o estímulo. A expressão de paraoxonase no macerado do tecido pulmonar foi feita por Western Blotting; o controle de carregamento consistiu na detecção de tubulina.

4.2.7. Modulação da expressão de paraoxonase pelo tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL

Já foi demonstrado que a superexpressão de paraoxonase 1 é capaz de proteger *Drosophila* da mortalidade por *Pseudomonas aeruginosa* (112). Para tentar reverter a diminuição na expressão de paraoxonase causada pelo desafio com 3-oxo C12 HSL e assim criar uma proposta de tratamento mais completa para testes futuros em modelos de pneumonia por instilação com *P. aeruginosa*, decidimos testar uma dose maior de rosiglitazona em nosso modelo. Sendo assim, analisamos o efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) na expressão de paraoxonase pulmonar em animais instilados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal). Foi possível observar que o tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) reverteu a diminuição da expressão de paraoxonase induzida pelo desafio com 3-oxo C12 HSL (figura 4.13), demonstrando que essa maior dose foi eficaz na manutenção da expressão de PON durante a inflamação induzida por esse componente bacteriano.

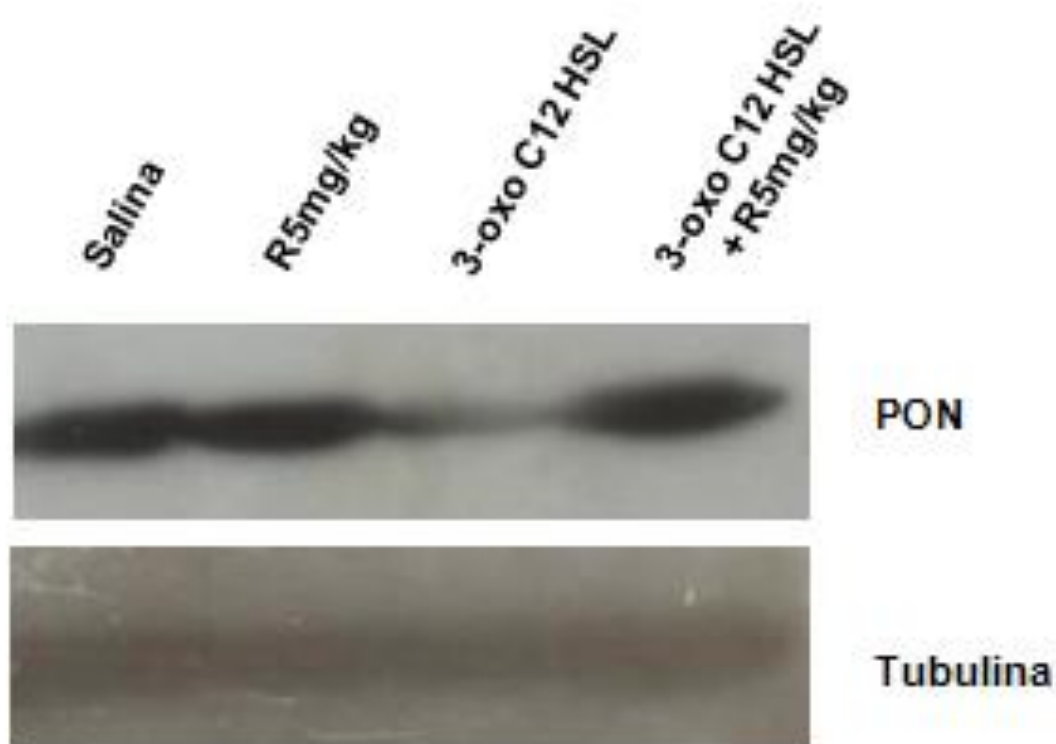


Figura 4.13. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a modulação da expressão de paraoxonase no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo tiveram amostras de tecido pulmonar coletadas seis horas após o estímulo. A expressão de paraoxonase no macerado do tecido pulmonar foi feita por Western Blotting; o controle de carregamento consistiu na detecção de tubulina.

4.2.8. Efeito do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a migração celular causada por 3-oxo C12 HSL

Para tentar validar a maior dose de rosiglitazona como possível estratégia terapêutica a ser testada em modelos de infecção por *P. aeruginosa*, continuamos a analisar o efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) nos parâmetros anteriormente avaliados no modelo de inflamação pulmonar induzida por instilação com 3-oxo C12 HSL. Nossas análises demonstraram que o tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) foi eficaz na inibição do acúmulo de neutrófilos induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL. O tratamento, porém, não se mostrou capaz de inibir o aumento de células mononucleares nos animais estimulados, fato que se refletiu na ausência de inibição do acúmulo de leucócitos totais induzido pela instilação com 3-oxo C12 HSL.

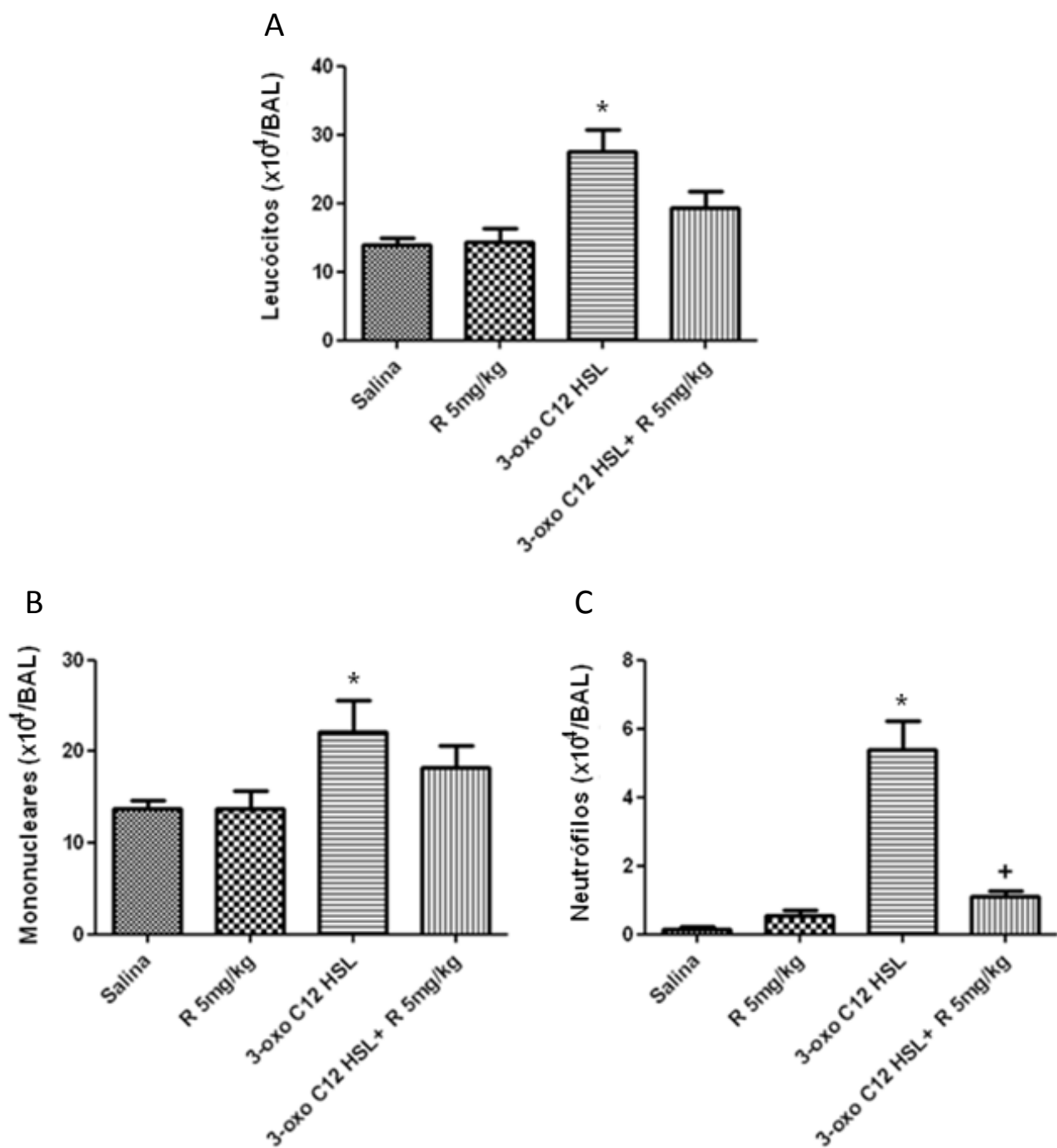


Figura 4.14. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a migração de células no modelo de inflamação pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo. Seis horas após o estímulo foram coletadas amostras de BAL para contagem de células totais (A) e análise diferencial (B e C). Dados apresentados como média + erro padrão da média (n=7). Figura representativa de 2 experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.9. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL

Prosseguindo a avaliação dos efeitos desta dose de tratamento analisamos os níveis de mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (5 mg/kg). Os ensaios para mensuração de atividade mieloperoxidase revelaram que o tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) se mostrou capaz de reduzir o aumento na neutrofilia pulmonar induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL, se correlacionando com o dado anterior referente ao acúmulo de neutrófilos no BAL.

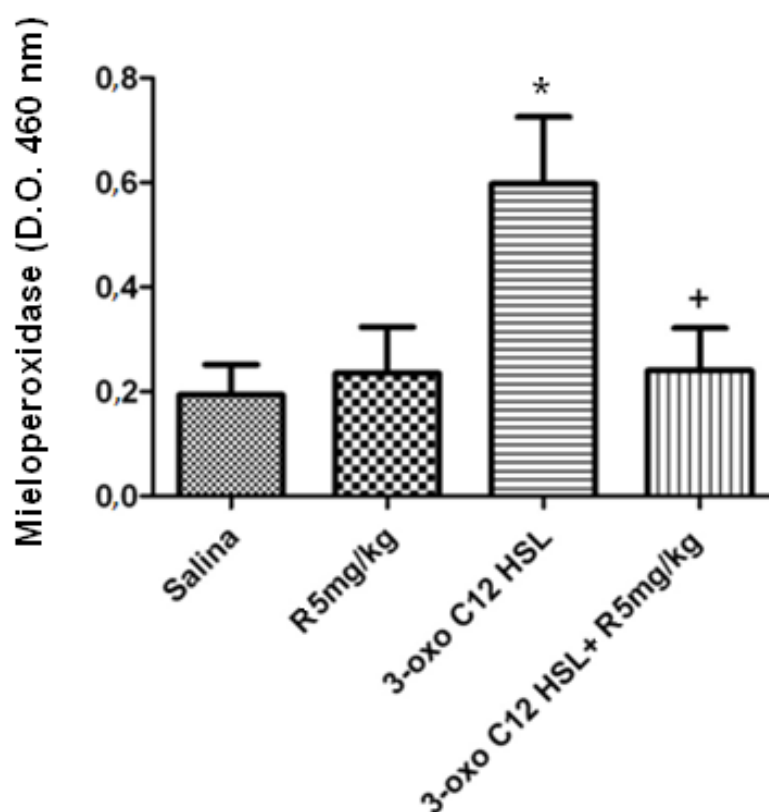


Figura 4.15. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar de camundongos swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de tecido pulmonar para o ensaio de mieloperoxidase. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n=6). Figura representativa de 2 experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.10. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em animais estimulados com 3-oxo C12 HSL

Dando continuidade à caracterização do efeito do tratamento com rosiglitazona na dose de 5 mg/kg sobre a inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL decidimos investigar seu papel na formação de edema pulmonar neste modelo. Amostras de lavado bronco-alveolar de camundongos swiss estimulados através de instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo tiveram seu teor de proteínas totais determinado pelo método do ácido bicincônico (BCA). Foi possível observar que o tratamento com rosiglitazona nesta dose também foi eficaz na inibição do acúmulo protéico induzido por 3-oxo C12 HSL de modo semelhante ao observado para a dose de 0,5 mg/kg.

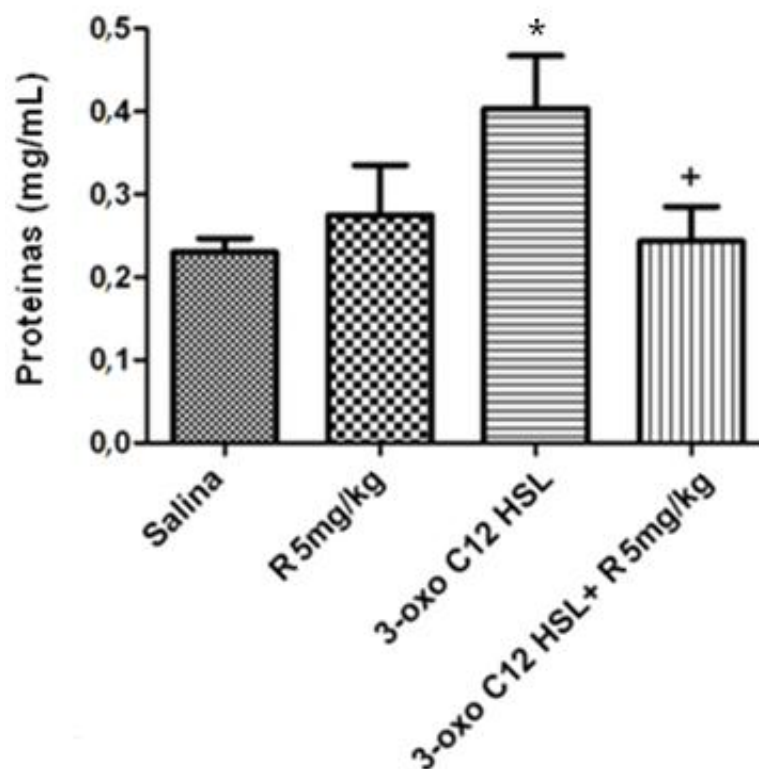
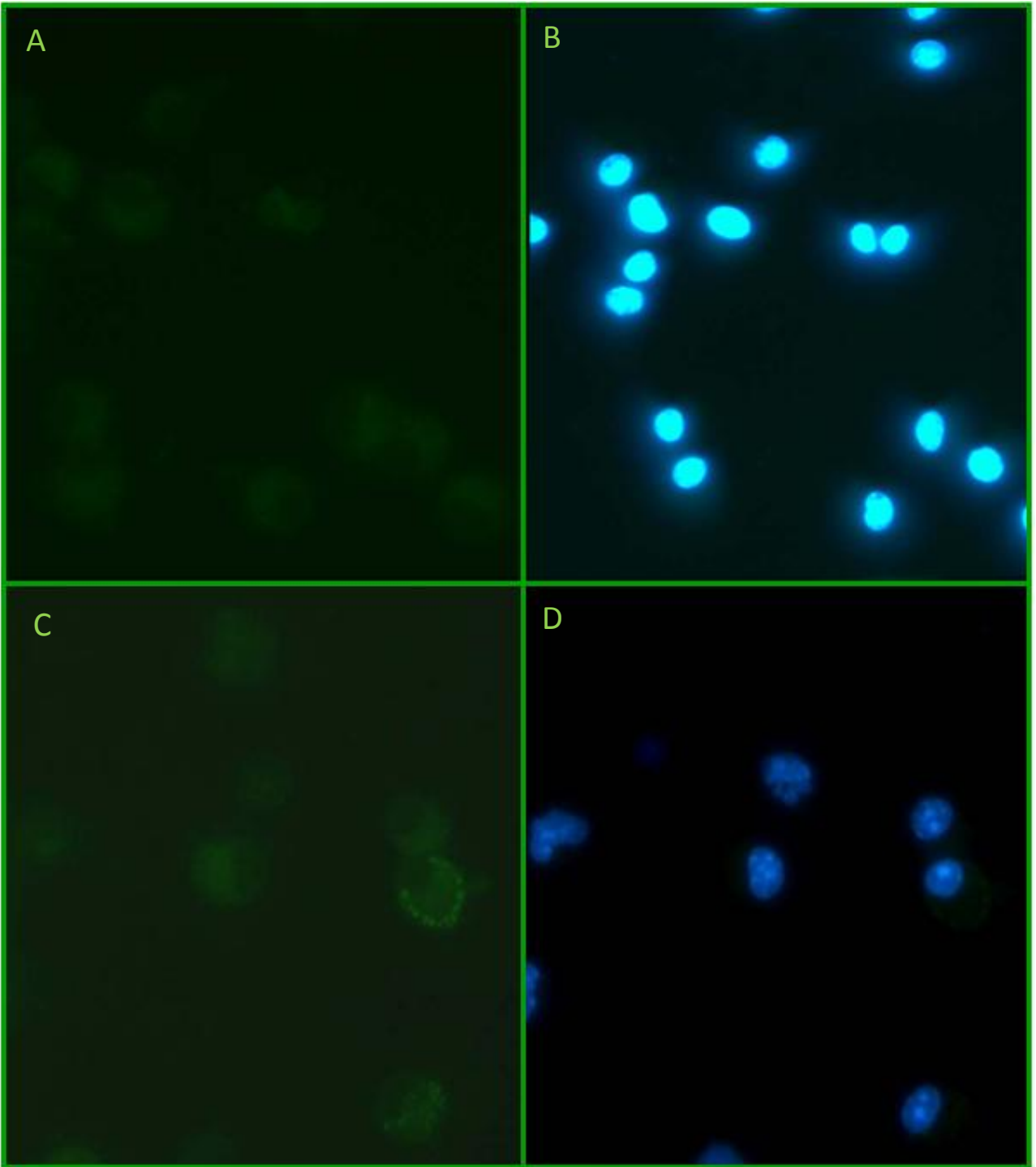


Figura 4.16. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a formação de edema pulmonar em camundongos swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo 1 hora após o estímulo. Seis horas após a instilação foram coletadas amostras de BAL. A determinação do edema pulmonar foi feita pela quantificação do teor de proteínas totais presentes no sobrenadante. Dados apresentados como média + erro padrão da média (n= 6). Figura representativa de 2 experimentos. (*) p<0,05 em relação ao grupo salina. (+) p<0,05 em relação ao grupo 3-oxo C12 HSL.

4.2.11. Efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL

Por fim, decidimos investigar o efeito do tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) na biogênese de corpúsculos lipídicos em células recuperadas do BAL de animais submetidos ao modelo de inflamação pulmonar induzido pela instilação com 3-oxo C12 HSL. Nossos resultados indicam que a administração de rosiglitazona na dose de 5 mg/kg parece induzir uma discreta formação de corpúsculos lipídicos em células mononucleares (4.17.C e 4.17.D) quando comparada ao grupo salina (4.17.A e 4.17.B). Já as células de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona (4.17.E e 4.17.F) parecem apresentar uma maior quantidade de corpúsculos quando comparadas com as do grupo desafiado tratado com veículo (4.17.G e 4.17.H), sugerindo uma possível potencialização da indução de corpúsculos pelo tratamento com rosiglitazona na dose de 5 mg/kg.



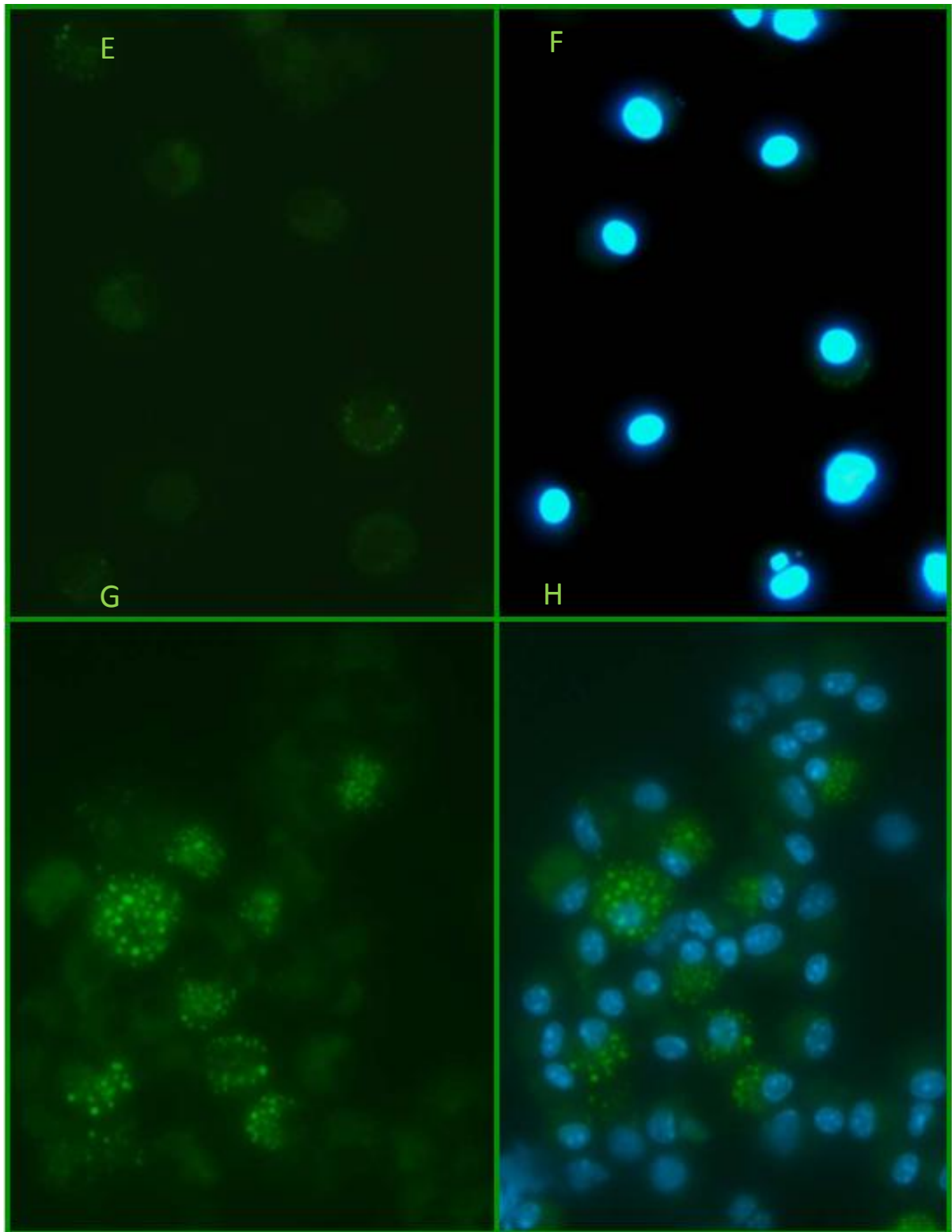


Figura 4.17. Efeitos da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a inflamação induzida por 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss estimulados com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) e tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo tiveram amostras de BAL coletadas seis horas após a instilação para marcação intracelular de corpúsculos lipídicos com a sonda Bodipy (em verde). O material nuclear das células foi marcado por DAPI (em azul). **A e B:** Salina; **C e D:** R5 mg/kg; **E e F:** 3-oxo C12 HSL; **G e H:** 3-oxo C12 HSL+ R5 mg/kg. Fotos representativas de pelo menos cinco animais por grupo.

4.2.12. Análise do efeito da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre os níveis de CCL2/MCP-1 presentes durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12-HSL:

Para compreender melhor os efeitos da rosiglitazona na dose de 5mg/kg sobre a indução de corpúsculos lipídicos decidimos investigar os níveis da quimiocina MCP-1 no BAL de animais submetidos ao modelo de inflamação pulmonar induzido por 3-oxo C12 HSL. Os ensaios de ELISA realizados nos sobrenadantes de BAL revelaram que a dose de 5 mg/kg sozinha foi capaz de elevar significativamente os níveis de CCL2/MCP-1 em comparação ao grupo salina. O tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) não foi capaz de reduzir a indução de CCL2/MCP-1 causada por 3-oxo C12 HSL.

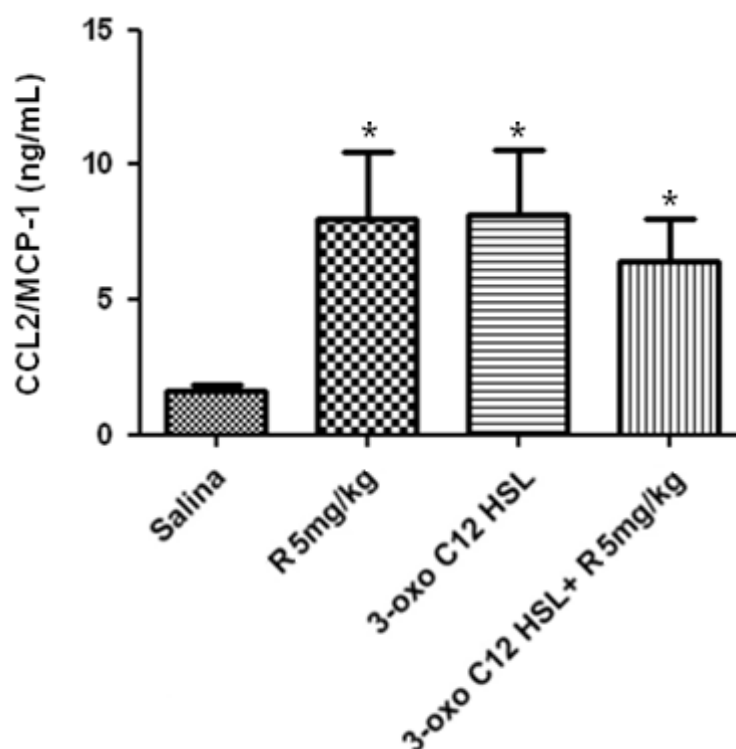


Figura 4.18. Efeito da rosiglitazona (5 mg/kg) sobre os níveis de CCL2/MCP-1 presentes no BAL de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Camundongos Swiss submetidos à instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL (0,5 nmol/animal) foram tratados com rosiglitazona (5 mg/kg) ou veículo. Seis horas após o estímulo foram coletadas amostras de BAL em cujos sobrenadantes foi realizada a determinação dos níveis de CCL2/MCP-1 por ELISA. Dados representados como média + erro padrão da média ($5 \leq n \leq 6$). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

5. Discussão

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* se tornou um dos principais agentes etiológicos de pneumonias nosocomiais, cujo surgimento está associado a condições diversas como SARA, bronquiectasia, terapia com antibióticos de amplo espectro, uso de dispositivos de ventilação mecânica e imunossupressão por causas variadas (100). Esta prevalência pode ser atribuída a sua presença ubíqua, sua capacidade natural de desenvolver resistência a antibióticos, e ao seu grande arsenal de fatores de virulência, descritos como componentes bacterianos implicados na fisiopatologia dos quadros infecciosos.

Dentre os fatores de virulência de *P.aeruginosa* podemos mencionar o pigmento piocianina, o polissacarídeo alginato, exotoxinas, elastases, ramnolipídeos e moléculas conhecidas como autoindutores, envolvidas no sistema de *quorum sensing* bacteriano (74). *Quorum sensing* é o sistema de comunicação microbiano capaz de orquestrar respostas fenotípicas coordenadas de acordo com a densidade populacional. Através desse sistema as bactérias podem regular a expressão de diversas características relacionadas à virulência (89), sobrepujando as defesas do hospedeiro. Logo, estratégias terapêuticas visando o sistema de comunicação bacteriano são bastante atraentes, especialmente porque ao afetar a produção de fatores de virulência e não diretamente a sobrevivência da bactéria o surgimento de cepas resistentes é evitado ou ao menos grandemente retardado (95).

A principal molécula envolvida no *quorum sensing* de *P. aeruginosa* é a 3-oxo dodecanoil homoserina lactona (3-oxo C12 HSL). Já foi demonstrado que cepas mutantes deficientes na produção dessa molécula tem sua capacidade infecciosa reduzida, sendo incapazes de gerar infecções disseminadas em modelos de pneumonia animal (97). Além de sua participação na regulação da expressão de fatores de virulência bacterianos, 3-oxo C12 HSL é capaz de gerar respostas biológicas em células eucariotas, possuindo efeitos imunomodulatórios. A maioria dos dados a respeito desses efeitos advém de modelos *in vitro*, porém estudos em modelos murinos de injeção intradérmica de 3-oxo C12 HSL apontam seu potencial para atrair células mononucleares e neutrófilos para o sítio inflamatório (97).

Apesar das evidências sobre o potencial pró-inflamatório do componente de 3-oxo C12 HSL em células do trato respiratório de mamíferos, não existe nenhum estudo caracterizando os efeitos dessa molécula no ambiente pulmonar, que clinicamente se coloca como um dos principais sítios afetados por infecções

causadas por *P. aeruginosa*. Sendo assim, a etapa inicial do nosso trabalho focou a caracterização da resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL num modelo de instilação intratraqueal em camundongos Swiss. Para a padronização do nosso modelo, utilizamos como parâmetro a migração de neutrófilos detectada pela análise diferencial das células presentes no lavado bronco-alveolar (BAL) de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Nós pudemos observar que as doses de 0,5 e 5 nmol por animal foram capazes de causar um aumento significativo no número de neutrófilos presentes no BAL seis horas após o estímulo, enquanto a menor dose (0,05 nmol por animal) não exerceu nenhum efeito apreciável. Como não havia diferença estatística entre as duas doses que apresentaram atividade, optamos por utilizar a dose menor em nossas investigações posteriores.

Apesar de serem células características de inflamações agudas, os neutrófilos possuem um papel importante nas infecções crônicas por *P. aeruginosa*. As pneumonias causadas por essa bactéria são caracterizadas por uma infiltração neutrofílica exuberante, que resulta na liberação de enzimas proteolíticas e culmina na destruição tecidual, levando à falência pulmonar (9). A geração de ácido hipocloroso, um potente microbicida, também pode ser um fator causador de dano tecidual acarretado pela presença de neutrófilos (136). Como a geração deste poderoso oxidante depende da atuação da mieloperoxidase, nós decidimos avaliar a atividade dessa enzima no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. Nossos resultados mostraram que o estímulo com 3-oxo C12 HSL levou a um aumento na atividade mieloperoxidase, conforme esperado pelo aumento no número de neutrófilos detectado na análise do BAL.

O edema pulmonar representa outro importante parâmetro durante pneumonias de diferentes etiologias; portanto, decidimos avaliá-lo durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL. Através da análise do conteúdo de proteínas totais do BAL pudemos caracterizar a formação de edema pulmonar induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL. Já foi demonstrado que durante a infecção por *P. aeruginosa* há intensa formação de edema, sendo este inicialmente associado à atividade do sistema de secreção do tipo III presente nessa bactéria sobre a GTPase RhoA (137). Estudos demonstram que os níveis basais de ERK1/2 fosforiladas são regulados negativamente em diversos tipos celulares encontrados no ambiente pulmonar após a exposição à 3-oxo C12 HSL *in vitro*. Possivelmente, os efeitos de 3-oxo C12 HSL sobre ERK 1/2 podem estar contribuindo para a promoção do edema durante as infecções por *P. aeruginosa*, uma vez que essas

quinases estão envolvidas na transdução de sinal associado a pequenas GTPases como RhoA (138). Desta forma, nosso trabalho demonstrou que outro fator de virulência deste microorganismo, a 3-oxo C12 HSL, também é capaz de levar a uma alteração de permeabilidade no ambiente pulmonar, podendo contribuir para o quadro fisiopatológico observado durante a pneumonia por *P. aeruginosa*.

Em seguida, decidimos caracterizar os mediadores envolvidos na resposta inflamatória causada pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL. Para isso foram analisados os níveis de IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , MIF, CXCL1/KC e CCL2/MCP-1 e LTB₄ no BAL de camundongos instilados com 3-oxo C12 HSL ou veículo. Nossas análises demonstraram que o estímulo com 3-oxo C12 HSL não alterou os níveis de IL-10, IL-12, TNF- α , e MIF. Estes resultados indicam que a 3-oxo C12 HSL parece não polarizar a resposta inflamatória em direção a um perfil Th1 ou Th2 num momento inicial, pois não foram detectadas alterações nas citocinas relacionadas a uma resposta celular (IL-12 e IFN- γ , dados não mostrados) ou humoral (IL-10 e IL-4, dados não-mostrados) no tempo analisado.

Em contrapartida, nossas análises detectaram um aumento nos níveis de IL-6 nas amostras de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL. A IL-6 possui um papel dual na resposta inflamatória. Classicamente, essa citocina é descrita como um mediador necessário para início e para a sustentação da resposta inflamatória (139), estando relacionada aos processos fibróticos no pulmão observados nos quadros inflamatórios crônicos (140). Por outro lado, já foi descrito que a IL-6 é capaz de regular negativamente os níveis de TNF- α durante a resposta inflamatória, abolindo os potentes efeitos pró-inflamatórios dessa citocina no hospedeiro (141). Além disso, a IL-6 determina o contexto de polarização de linfócitos CD4⁺ na presença de TGF- β , induzindo a diferenciação do subtipo Th17(142). Este subtipo celular está relacionado à inflamação pulmonar crônica caracterizada pelo infiltrado neutrofílico exuberante observada em pacientes portadores de fibrose cística infectados com *Pseudomonas* (143). Portanto, é possível que a IL-6 gerada na resposta inflamatória causada por 3-oxo C12 HSL sinergize com o TGF- β produzido na presença de outros componentes bacterianos (como, por exemplo, a flagelina de *Pseudomonas* (144)) e determine o perfil de resposta adaptativa durante a fisiopatologia das pneumonias por *P. aeruginosa*.

Em relação aos mediadores quimiotáticos, foi possível observar um aumento de CCL2/MCP-1 no BAL de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL. Esse resultado

é suportado por evidências *in vivo* acerca da expressão dessa quimiocina na derme de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL (97) e sugere que o aumento de células mononucleares observado no BAL de animais estimulados com esse componente bacteriano pode estar relacionado à indução da secreção de CCL2/MCP-1.

Os animais estimulados também apresentaram um aumento nos níveis de CXCL1/KC e LTB₄, moléculas quimiotáticas para neutrófilos. Esses resultados corroboram com dados da literatura a respeito da secreção de IL-8 em decorrência do estímulo com 3-oxo C12 HSL *in vitro* (100) e demonstram que esse componente de *quorum sensing* também pode estar envolvido na indução de leucotrieno B₄ observada nas infecções pulmonares por *Pseudomonas*. Apesar do seu importante papel na quimiotaxia de neutrófilos, há evidências de que o LTB₄ pode não ser o principal mediador envolvido no recrutamento de células em modelos animais de pneumonia por *P.aeruginosa*, uma vez que ratos deficientes na produção desse eicosanóide apresentam um padrão de migração celular idêntico ao observado em animais normais quando desafiados com *Pseudomonas* (145). Além disso, outro fator de virulência secretado por *Pseudomonas*, a piocianina, se mostrou capaz de inibir a síntese de LTB₄, o que hipoteticamente reduziria ainda mais a participação desse mediador numa pneumonia causada por esta bactéria (146).

Como foi observado um aumento de LTB₄ nos animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e existe uma correlação entre os níveis de eicosanóides e a biogênese de corpúsculos lipídicos (39, 42), nós decidimos investigar a formação destas organelas em células recuperadas no BAL de animais estimulados. A visualização dos corpúsculos lipídicos pela marcação com a sonda de lipídios neutros Bodipy sugeriu um aumento no número e tamanho destas organelas em células mononucleares de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL, porém metodologias mais robustas de quantificação (como a coloração por tetróxido de ósmio) são necessárias para a confirmação destes dados. Além de uma participação presumível na produção de LTB₄ nesse modelo, outro possível papel para os corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória promovida por 3-oxo C12 HSL envolve a secreção de prostaglandina E₂. Esse mediador não foi quantificado em nosso modelo, uma vez que o tempo escolhido para a análise experimental não era adequado para tal. A indução de PGE₂ já foi correlacionada com a capacidade de disseminação de *P. aeruginosa* em modelos de infecção de queimaduras (19), podendo, portanto, ser relevante para o desenvolvimento de quadros sépticos originados a partir de infecções pulmonares causadas por esta bactéria.

Já foi demonstrado que 3-oxo C12 HSL é capaz de induzir a expressão de IL-6, IL-8 e COX-2 em células da linhagem de pneumócitos humanos A549 pela modulação do receptor nuclear PPAR γ . Além de seu papel na regulação da resposta inflamatória, o receptor nuclear PPAR γ está envolvido no controle do metabolismo lipídico e glicídico, sendo o alvo das drogas da classe tiazolidinedionas à qual pertencem os agonistas rosiglitazona, pioglitazona e ciglitazona (147). Essas drogas são utilizadas rotineiramente e de forma segura no combate ao diabetes do tipo 2 e tem sido alvo de estudos em decorrência de seu potencial anti-inflamatório (56). Em adição ao suporte da literatura a respeito da interação de 3-oxo C12 HSL com o receptor nuclear PPAR γ , nosso grupo vem ativamente estudando o papel desse receptor em diferentes modelos de inflamação; por esse motivo, decidimos investigar o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na resposta inflamatória pulmonar induzida por 3-oxo C12 HSL. Para isso, camundongos Swiss desafiados com 3-oxo C12 HSL foram tratados uma hora após o estímulo com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo (DMSO). Nossas investigações revelaram que o tratamento com rosiglitazona foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL, sendo essa redução causada por uma diminuição do influxo de células mononucleares e neutrófilos.

Prosseguindo as investigações, decidimos avaliar a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou seu veículo. Nossos resultados mostraram que o tratamento com rosiglitazona reduziu o aumento na atividade mieloperoxidase induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL, conforme esperado pela diminuição do influxo de neutrófilos detectada na análise do BAL.

Em seguida, decidimos analisar o efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a formação de edema pulmonar durante a resposta inflamatória induzida por 3-oxo C12 HSL. Novamente, o tratamento com o agonista de PPAR γ apresentou um resultado favorável ao reduzir o extravasamento protéico induzido pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL. Possivelmente, a interação da rosiglitazona com ERK 1/2 pode estar contribuindo para a modulação do edema, uma vez que há evidências de modulação da atividade destas quinases pela ação de agonistas de PPAR γ (148). Conforme mencionado anteriormente, as quinases ERK 1/2 estão implicadas na transdução de sinal associado a pequenas GTPases como RhoA (138), envolvidas no processo de formação de edema pulmonar.

Posteriormente, avaliamos o efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória causada pela instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL. Para isso foram analisados os níveis de IL-6, CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC no BAL de camundongos desafiados com 3-oxo C12 HSL e tratados com rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo. Os resultados indicaram uma redução dos níveis desses mediadores nos animais estimulados com 3-oxo C12 HSL e tratados com o agonista de PPAR γ . A diminuição nos níveis de quimiocinas pode representar um mecanismo adicional na redução do influxo celular observado durante o tratamento com rosiglitazona no nosso modelo, uma vez que já foram reportados efeitos diretos dos agonistas de PPAR γ sobre a migração de eosinófilos, monócitos e neutrófilos (149-151).

A paraoxonase é uma enzima capaz de degradar 3-oxo C12 HSL de maneira eficiente, de modo que sua superexpressão num modelo de infecção por *P. aeruginosa* em *Drosophila* (que não expressam nenhuma isoforma de paraoxonase) promove uma maior sobrevivência nos animais infectados. Porém, já foi demonstrado que o influxo de cálcio causado por 3-oxo C12 HSL em células eucariotas é capaz de reduzir a expressão de paraoxonase pela desestabilização de seu mRNA (111). Essa regulação negativa apresenta diversas vantagens para *P. aeruginosa*, pois preserva o sistema de comunicação bacteriano no hospedeiro e conseqüentemente favorece a expressão de fatores de virulência necessários ao estabelecimento e manutenção da infecção.

Como existem evidências de que o receptor nuclear PPAR γ esteja envolvido na regulação da expressão de paraoxonase (113), nós decidimos investigar o efeito do tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) sobre a modulação da expressão dessa enzima no tecido pulmonar de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL. A análise por Western Blotting revelou que o estímulo com 3-oxo C12 HSL reduziu a expressão de paraoxonase no tecido pulmonar e que o tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg) não foi capaz de restaurar a expressão dessa enzima.

Esse fenômeno pode ser interpretado com bases farmacológicas. Estudos envolvendo ensaios de ligação (*binding assays*) empregando o PPAR γ LBD (do inglês *Ligand Binding Domain* ou Domínio de Associação ao Ligante) demonstram que 3-oxo C12 HSL é capaz de se ligar a essa região e promover uma fraca ativação deste receptor, o que caracteriza essa molécula como um agonista parcial de PPAR γ . Além disso, concentrações muito baixas de 3-oxo C12 HSL (1 nM) são capazes de inibir a ligação da rosiglitazona em sua concentração ótima (100 nM) ao

LBD (152), demonstrando a alta afinidade de 3-oxo C12 HSL pelo receptor nuclear PPAR γ . Desta forma, a ligação de 3-oxo C12 HSL ao PPAR γ antagonizaria o efeito de agonistas plenos, justificando a ausência de indução de paraoxonase pela rosiglitazona nos animais estimulados.

As concentrações de 3-oxo C12 HSL recuperadas no BAL de pacientes portadores de fibrose cística variam na faixa de picomolar a nanomolar (153, 154); porém, estima-se que as concentrações de 3-oxo C12 HSL nos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa in vitro* alcancem até 600 μ M (155). Todavia, estudos demonstram que o agonista de PPAR γ troglitazona exerce uma atividade anti-inflamatória durante a pneumonia por *P.aeruginosa* num modelo murino de fibrose cística (156). O fato desse agonista possuir uma afinidade pelo PPAR γ LBD pelo menos 100x menor que a rosiglitazona (157) sugere que a concentração pulmonar de 3-oxo C12 HSL durante as infecções por *P.aeruginosa* não seja alta o suficiente para inibir os efeitos de algumas drogas agonistas de PPAR γ (152).

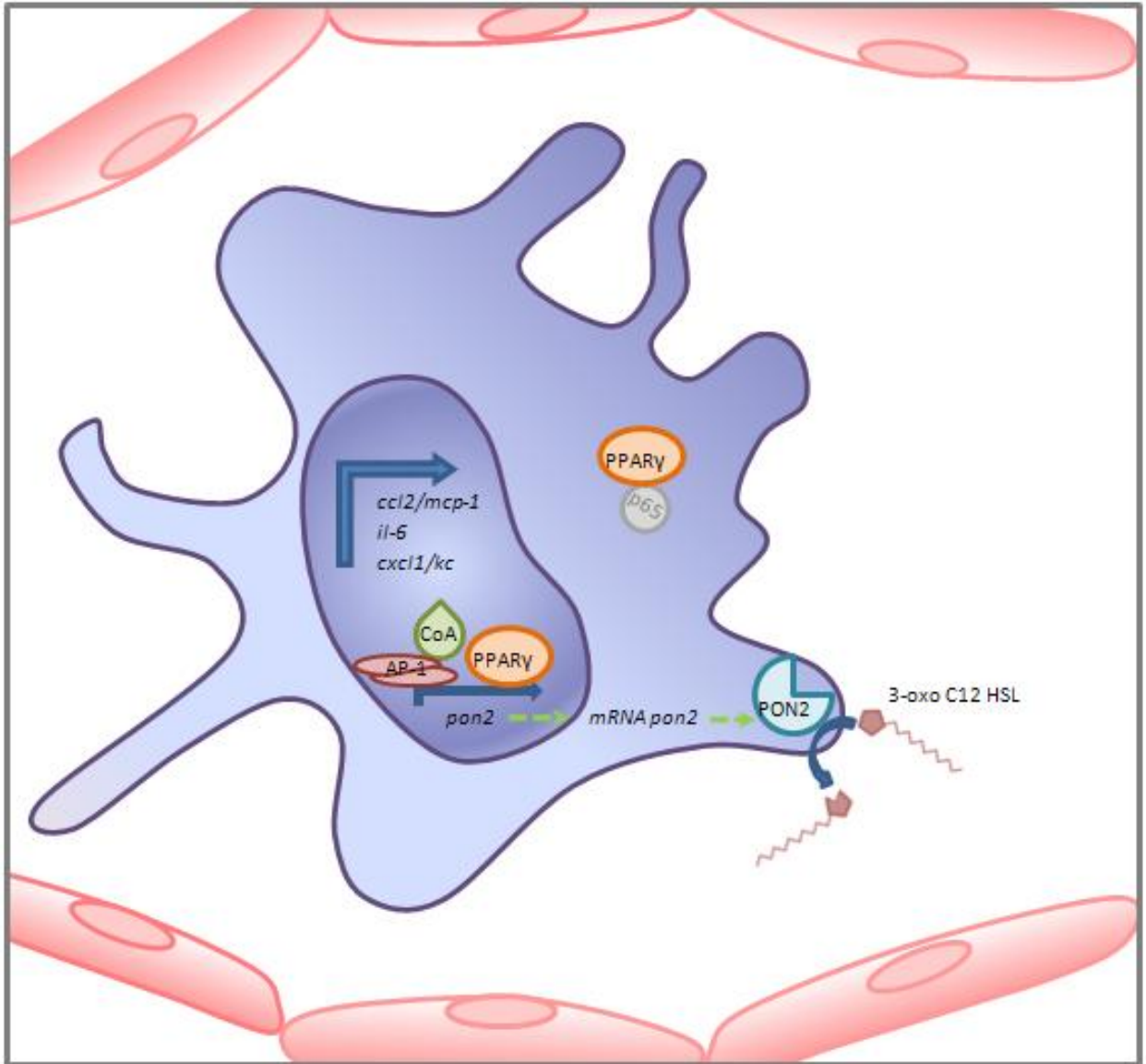
Para verificar nossa hipótese e tentar induzir a expressão de paraoxonase (somando mais uma vantagem terapêutica à utilização desta droga como tratamento de infecções por *Pseudomonas*), decidimos empregar uma dose maior de rosiglitazona: 5 mg/kg. O tratamento com essa dose de rosiglitazona foi capaz de reverter efetivamente a diminuição da expressão de paraoxonase causada pelo estímulo com 3-oxo C12 HSL, confirmando nossa idéia de que o fenômeno da não-reversão observado anteriormente consistia numa questão farmacológica.

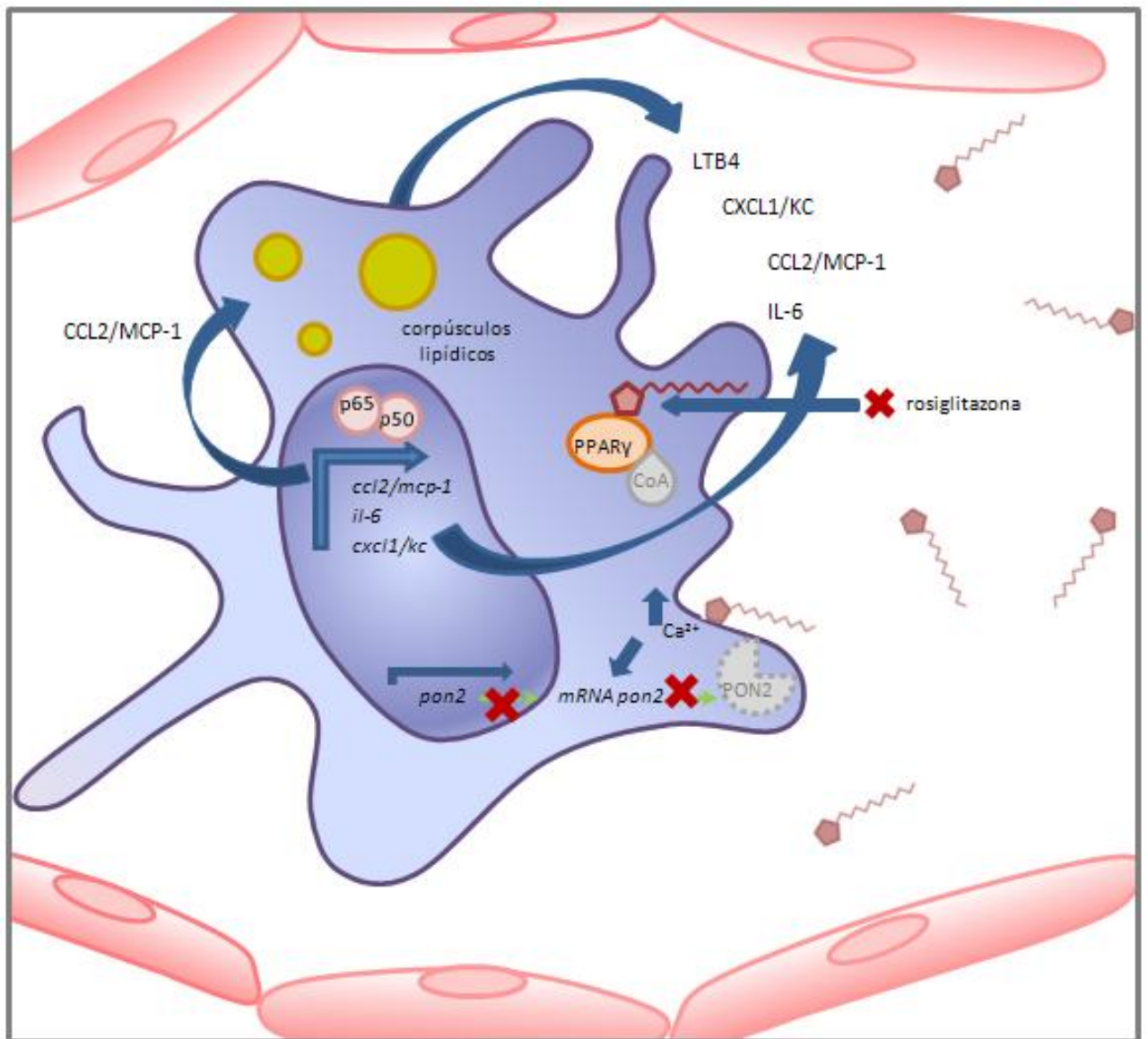
Prosseguindo nossas análises, pudemos observar que o tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) foi capaz de reduzir o edema pulmonar induzido por 3-oxo C12 HSL, diminuindo também o número de neutrófilos recuperados no BAL e a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar de animais estimulados.

Em relação aos corpúsculos lipídicos, nossas análises revelaram que o tratamento com rosiglitazona (5 mg/kg) aparentemente causou uma indução dessas organelas por si só, além de uma possível potencialização de sua biogênese em animais desafiados com 3-oxo C12 HSL. Esses resultados podem ser justificados pelo aumento nos níveis de CCL2/MCP-1 no BAL de animais tratados com rosiglitazona (5 mg/kg). Os níveis desse mediador variaram num padrão semelhante ao observado para os corpúsculos e, além disso, a quimiocina CCL2/MCP-1 já foi descrita como capaz de induzir a biogênese de corpúsculos através de alterações no citoesqueleto (41).

A modulação de CCL2/MCP-1 pela administração de rosiglitazona na dose de 5 mg/kg pode justificar ainda a ausência de redução na contagem de células mononucleares recuperadas no BAL de animais desafiados com 3-oxo C12 HSL, fato que se refletiu na contagem total de leucócitos. Apesar de promover a biogênese de corpúsculos por si só, a administração de rosiglitazona (5 mg/kg) não levou a um aumento de células mononucleares no BAL de animais instilados com salina, sugerindo que outros estímulos sejam necessários para esse processo. Vale ressaltar que a indução de CCL2/MCP-1 e a predominância de células mononucleares no pulmão durante a infecção por *Pseudomonas* podem oferecer algumas vantagens. Foi demonstrado que a diferença na suscetibilidade às infecções pulmonares crônicas por *P.aeruginosa* entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57Bl/6 reside na natureza das células envolvidas na resposta inflamatória; enquanto camundongos C57Bl/6 (susceptíveis) apresentam resposta inflamatória exagerada caracterizada pela predominância de neutrófilos, animais da linhagem resistente (BALB/c) demonstram uma inflamação modesta, na qual predominam macrófagos alveolares (158, 159). Além disso, pesquisadores do laboratório de Imunofarmacologia e outros demonstraram a importância da quimiocina CCL2/MCP-1 na eliminação bacteriana (160-162). Foi observado que o CCL2/MCP-1 produzido por pneumócitos do tipo II incubados com *P. aeruginosa* é um fator central para o aumento da capacidade fagocítica de macrófagos alveolares (162) e que sua neutralização *in vivo* piora a injúria tecidual num modelo de pneumonia por *Pseudomonas* (161).

Em conjunto, nossas análises permitiram caracterizar a resposta inflamatória causada pelo componente de *quorum sensing* 3-oxo C12 HSL no ambiente pulmonar, além de destacar a rosiglitazona como uma droga com potencial aplicação nas infecções por *P. aeruginosa*. Ambas as doses de rosiglitazona empregadas em nossos estudos representam estratégias terapêuticas interessantes, devendo ser testadas em modelos agudos e crônicos de pneumonia por *P. aeruginosa* para validar a melhor abordagem para cada quadro patológico.





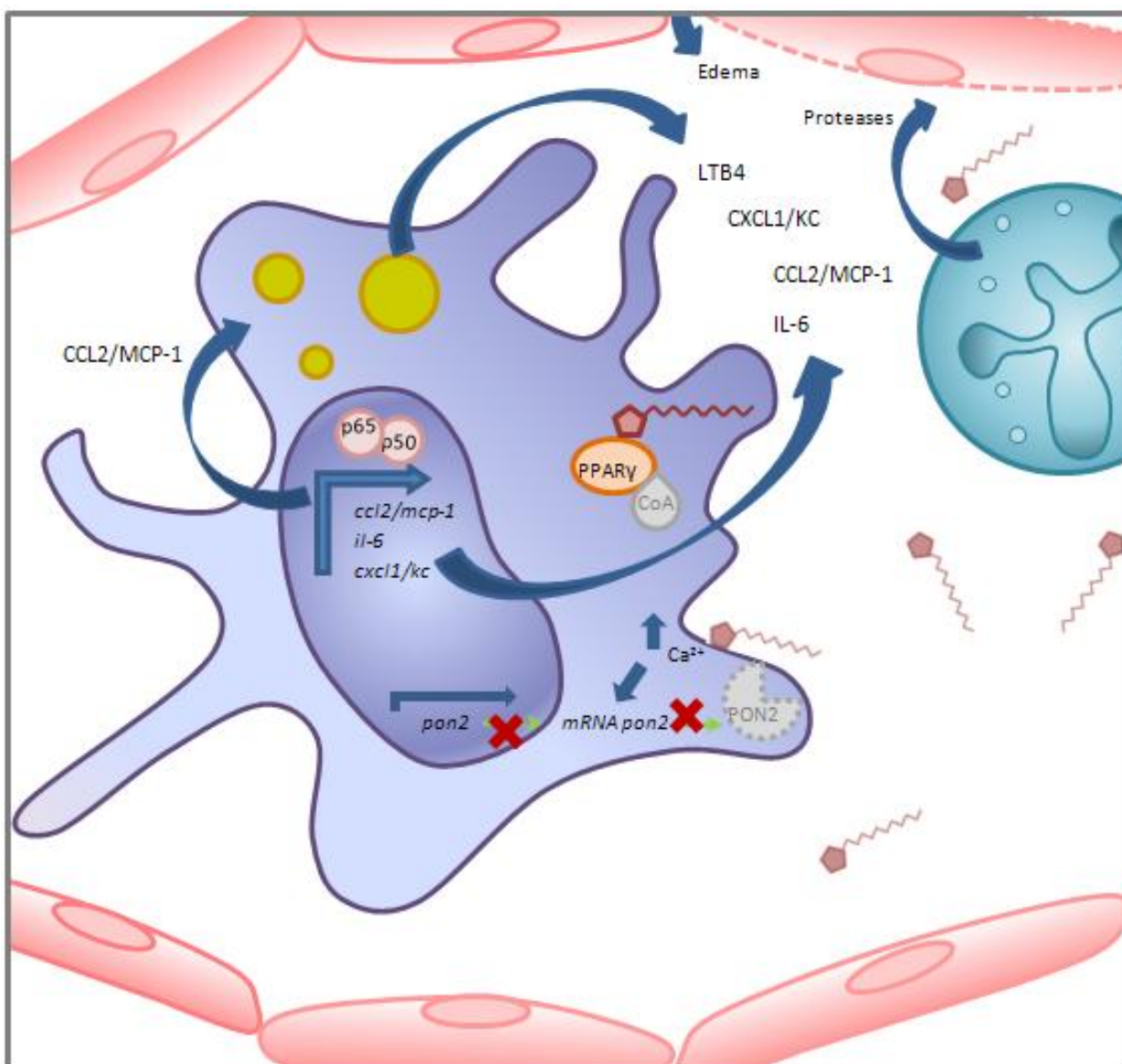


Figura 5.1. Resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL. Evidências na literatura descrevem que na ausência de estímulos pró-inflamatórios o receptor nuclear PPAR γ pode interagir com a subunidade p65 de Nf- κ B, impedindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias. A enzima paraoxonase 2 (PON2) é normalmente expressa em macrófagos, tendo o receptor nuclear PPAR γ e o fator transcricional AP-1 (juntamente com seus co-ativadores, CoA) como reguladores de sua transcrição. A presença de 3-oxo C12 HSL leva a um influxo de cálcio capaz de desestabilizar o mRNA de PON2, além de antagonizar a atividade agonista de ligantes endógenos (como a 15 -deoxi PGJ2) do receptor nuclear PPAR γ . A ligação de 3-oxo C12 HSL possivelmente altera a interação do PPAR γ com seqüências responsivas no promotor *pon2*, bem como sua interação com outros fatores de transcrição e co-fatores. Neste cenário, a formação de Nf- κ B pela liberação de p65 pode levar à expressão de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, CCL2/MCP-1 e CXCL-1. Além de recrutar células mononucleares, a quimiocina CCL2/MCP-1 é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, organelas capazes de sintetizar LTB $_4$. Em conjunto com CXCL1/ KC, este eicosanóide recruta neutrófilos para o sítio inflamatório. Uma vez presentes nos alvéolos, os neutrófilos podem causar dano tecidual pela liberação do conteúdo de seus grânulos, levando à formação de edema pulmonar. Agonistas de PPAR γ (como a rosiglitazona) podem antagonizar os efeitos da 3-oxo C12 HSL mediados por PPAR γ , reduzindo a inflamação pulmonar e restaurando a expressão de PON2.

6. Conclusões

6.1. Resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL

- ✓ A instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL gerou uma inflamação pulmonar caracterizada pela migração de células mononucleares e neutrófilos para o espaço alveolar, acompanhada por neutrofilia tecidual;
- ✓ O estímulo com 3-oxo levou à formação de edema;
- ✓ A instilação intratraqueal com 3-oxo C12 HSL levou a um aumento nos níveis de IL-6, CCL2/MCP-1, CXCL1/KC e LTB4 no sobrenadante de BAL de animais estimulados;
- ✓ A resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL levou à indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em células mononucleares recuperadas em amostras de BAL.

6.2. Efeitos do tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona na resposta inflamatória pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL

- ✓ O tratamento com o agonista de PPAR γ rosiglitazona (0,5 mg/kg) se mostrou eficaz em reduzir a inflamação pulmonar causada por 3-oxo C12 HSL, diminuindo a migração de leucócitos, a atividade mieloperoxidase no tecido pulmonar e o edema;
- ✓ A migração de células mononucleares para o pulmão de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL parece ser regulada pela quimiocina CCL2/MCP-1, cujos níveis são significativamente reduzidos pelo tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg);
- ✓ A migração de neutrófilos para o pulmão de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL parece depender da quimiocina CXCL1/ KC, cujos níveis também são significativamente reduzidos pelo tratamento com rosiglitazona (0,5 mg/kg);
- ✓ A aparente indução de corpúsculos lipídicos pelo estímulo com 3-oxo C12 é reduzida pelo tratamento com Rosiglitazona (0,5 mg/kg);

- ✓ O tratamento com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) não se mostrou capaz de reverter a diminuição da expressão de PON no tecido pulmonar de animais estimulados com 3-oxo C12 HSL.

- ✓ O tratamento com uma dose maior de Rosiglitazona (5 mg/kg) foi eficaz na reversão da diminuição da expressão de PON no tecido pulmonar, reduzindo a migração de neutrófilos, a atividade mieloperoxidase e o edema nos animais estimulados com 3-oxo C12 HSL;

- ✓ A dose de 5 mg/kg não reduziu a migração de células mononucleares, elevou os níveis de CCL2/MCP-1 e aparentemente foi capaz de potencializar a indução de corpúsculos lipídicos em resposta ao estímulo com 3-oxo C12 HSL;

- ✓ Estudos em modelos de pneumonia por *P. aeruginosa* precisam ser conduzidos para validar agonistas farmacológicos de PPAR γ como estratégias terapêuticas no combate a infecções causadas por essa bactéria.

7. Referências Bibliográficas:

1. Van der Schans CP. Bronchial mucus transport. *Respir Care*. 2007 Sep;52(9):1150-6; discussion 6-8.
2. Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J Suppl*. 2003 Aug;42:10s-4s.
3. Lopez-Vidriero MT. Airway mucus; production and composition. *Chest*. 1981 Dec;80(6 Suppl):799-804.
4. Kim KJ, Malik AB. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Feb;284(2):L247-59.
5. Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*. 25(1):13-26.
6. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Feb;141(2):471-501.
7. Davis GS, Poynter ME. Pulmonary Macrophages. In: Laurent GJ, Shapiro SD, editors. *The Encyclopedia of Respiratory Medicine* Oxford, UK.: Elsevier, Ltd.; 2006. p. 563-72.
8. Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun*. 16(3):201-10.
9. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011 Mar-Apr;17(3-4):293-307.
10. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*. 2000 Sep;52(3):349-74.
11. Wiggs BR, English D, Quinlan WM, Doyle NA, Hogg JC, Doerschuk CM. Contributions of capillary pathway size and neutrophil deformability to neutrophil transit through rabbit lungs. *J Appl Physiol*. 1994 Jul;77(1):463-70.
12. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3503-21.
13. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.
14. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
15. Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*. 2008;15:164-87.
16. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2619-22.
17. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*. 1994 Dec;56(6):672-86.
18. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. Aug;16(8):887-96.
19. Shoup M, He LK, Liu H, Shankar R, Gamelli R. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 improves survival and restores leukocyte counts in burn infection. *J Trauma*. 1998 Aug;45(2):215-20; discussion 20-1.
20. Di Gennaro A, Kenne E, Wan M, Soehnlein O, Lindbom L, Haeggstrom JZ. Leukotriene B4-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *FASEB J*. 2009 Jun;23(6):1750-7.
21. Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):540-51.
22. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001 Sep;40(5):325-438.
23. Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Mar;100 Suppl 1:113-20.

24. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15;277(46):44507-12.
25. Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol.* 2001 Jun 5;11(11):R446-9.
26. Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Sep 18;1469(2):101-20.
27. Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):45-9.
28. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Feb;10(1):51-8.
29. Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* 2002 Aug 30;277(35):32253-7.
30. Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1791(6):408-18.
31. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 2006 Oct 9;580(23):5484-91.
32. Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007 Jan;113(1):30-49.
33. Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Aug;21(2):253-8.
34. Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller A, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 1989 Nov;135(5):947-59.
35. Weller PF, Ryeom SW, Picard ST, Ackerman SJ, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1991 Apr;113(1):137-46.
36. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998 Mar;152(3):759-69.
37. Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, et al. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Mar;1791(3):156-65.
38. Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LC, Sergeant S, et al. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2 α fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Aug;1783(8):1544-50.
39. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 1997 Sep 15;186(6):909-20.
40. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 2002 Dec 1;169(11):6498-506.
41. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8500-8.
42. Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1515-25.
43. Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22779-87.

44. Bandeira-Melo C, Weller PF, Bozza PT. EicosoCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol.* 689:163-81.
45. D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3087-97.
46. Reynolds JH, McDonald G, Alton H, Gordon SB. Pneumonia in the immunocompetent patient. *Br J Radiol.* Dec;83(996):998-1009.
47. Mayaud C, Parrot A, Cadranet J. Pyogenic bacterial lower respiratory tract infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur Respir J Suppl.* 2002 Jul;36:28s-39s.
48. Shorr AF, Susla GM, O'Grady NP. Pulmonary infiltrates in the non-HIV-infected immunocompromised patient: etiologies, diagnostic strategies, and outcomes. *Chest.* 2004 Jan;125(1):260-71.
49. Duncan MD, Wilkes DS. Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):449-55.
50. Torres A, Rello J. Update in community-acquired and nosocomial pneumonia 2009. *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 15;181(8):782-7.
51. Mertz D, Johnstone J. Modern Management of Community-Acquired Pneumonia: Is It Cost-Effective and are Outcomes Acceptable? *Curr Infect Dis Rep.* Jun;13(3):269-77.
52. Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest.* 2009 Sep;136(3):832-40.
53. Vardakas KZ, Matthaïou DK, Falagas ME. Incidence, characteristics and outcomes of patients with severe community acquired-MRSA pneumonia. *Eur Respir J.* 2009 Nov;34(5):1148-58.
54. von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Ewig S. Community-acquired pneumonia through Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: Diagnosis, incidence and predictors. *Eur Respir J.* Mar;35(3):598-605.
55. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S64-74.
56. Guyton K, Zingarelli B, Ashton S, Teti G, Tempel G, Reilly C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate macrophage activation by gram-negative and gram-positive bacterial stimuli. *Shock.* 2003 Jul;20(1):56-62.
57. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 Jan 9;348(2):138-50.
58. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics.* Mar 1;6(3):273-83.
59. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA.* 1997 Apr 2;277(13):1058-63.
60. Pene F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8513-20.
61. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2605-17.
62. Cunha BA. Nosocomial pneumonia. *Journal [serial on the Internet].* 2011 Date.
63. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 32(October 2004):470-85.
64. Berra L, Sampson J, Wiener-Kronish J. *Pseudomonas aeruginosa*: acute lung injury or ventilator-associated pneumonia? *Minerva Anesthesiol.* Oct;76(10):824-32.
65. Flanagan JL, Brodie EL, Weng L, Lynch SV, Garcia O, Brown R, et al. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1954-62.
66. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):3100-5.

67. El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Aug;64(2):229-38.
68. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol.* Jun;12(6):1377-83.
69. Hardalo C, Edberg SC. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 1997;23(1):47-75.
70. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):959-64.
71. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):194-222.
72. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother.* 1999 Sep;33(9):960-7.
73. Hermsen ED, Sullivan CJ, Rotschafer JC. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am.* 2003 Sep;17(3):545-62.
74. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998 Oct-Dec;4(4):551-60.
75. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998 Oct;30(2):295-304.
76. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008 Dec;35(3):124-34.
77. Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):640-6.
78. Oliver AM, Weir DM. The effect of *Pseudomonas alginate* on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin Exp Immunol.* 1985 Jan;59(1):190-6.
79. Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(4):347-53.
80. Hoiby N. Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 1975 Dec;83(6):549-52.
81. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JI, Jensen P, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology.* 1999 Jun;145 (Pt 6):1349-57.
82. Kropinski AM, Jewell B, Kuzio J, Milazzo F, Berry D. Structure and functions of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Antibiot Chemother.* 1985;36:58-73.
83. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, et al. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Apr;278(4):L658-66.
84. Iglewski BH, Sadoff J, Bjorn MJ, Maxwell ES. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jul;75(7):3211-5.
85. Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, et al. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* 2003 Jun 16;22(12):2959-69.
86. Machado GB, de Assis MC, Leao R, Saliba AM, Silva MC, Suassuna JH, et al. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. *Shock.* Mar;33(3):315-21.
87. Davies JC, Bilton D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care.* 2009 May;54(5):628-40.
88. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Nov;285(5):L1077-86.
89. de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):4839-49.

90. Kempner ES, Hanson FE. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol.* 1968 Mar;95(3):975-9.
91. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970 Oct;104(1):313-22.
92. Eberhard A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol.* 1972 Mar;109(3):1101-5.
93. Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1119-34.
94. Martin CA, Hoven AD, Cook AM. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Aug;27(8):635-42.
95. Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1213-22.
96. Moker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol.* Apr;192(7):1946-55.
97. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1132-9.
98. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998 Apr 10;280(5361):295-8.
99. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11229-34.
100. Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):366-74.
101. Jahoor A, Patel R, Bryan A, Do C, Krier J, Watters C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *J Bacteriol.* 2008 Jul;190(13):4408-15.
102. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8951-6.
103. Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3587-90.
104. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Jan;369(1):78-88.
105. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Apr;21(4):542-7.
106. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44444-9.
107. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005 Jun;46(6):1239-47.
108. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry.* 2005 Apr 26;44(16):6371-82.
109. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, et al. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* 2008 Jun;76(6):2512-9.

110. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis AJ, et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Apr;292(4):L852-60.
111. Horke S, Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Forstermann U, et al. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J*. Feb 15;426(1):73-83.
112. Stoltz DA, Ozer EA, Taft PJ, Barry M, Liu L, Kiss PJ, et al. *Drosophila* are protected from *Pseudomonas aeruginosa* lethality by transgenic expression of paraoxonase-1. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3123-31.
113. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):313-21.
114. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:261-311.
115. Hsueh WA, Law RE. PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Dec;21(12):1891-5.
116. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1147-56.
117. Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17042-8.
118. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):82-6.
119. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):229-40.
120. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):241-52.
121. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):79-82.
122. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):137-43.
123. Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:1-39.
124. Wang M, Tafuri S. Modulation of PPARgamma activity with pharmaceutical agents: treatment of insulin resistance and atherosclerosis. *J Cell Biochem*. 2003 May 1;89(1):38-47.
125. Davies SS, Pontsler AV, Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, et al. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16015-23.
126. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):131-6.
127. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6931-6.
128. Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*. 2005 May;23(5):393-9.
129. Birrell MA, Patel HJ, McCluskie K, Wong S, Leonard T, Yacoub MH, et al. PPAR-gamma agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia. *Eur Respir J*. 2004 Jul;24(1):18-23.

130. Patel HJ, Belvisi MG, Bishop-Bailey D, Yacoub MH, Mitchell JA. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2663-9.
131. Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol*. 2003 May;139(1):163-71.
132. Kaplan JM, Cook JA, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Zingarelli B. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock. *Shock*. 2005 Jul;24(1):59-65.
133. Rachek LI, Yuzefovych LV, Ledoux SP, Julie NL, Wilson GL. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Nov 1;240(3):348-54.
134. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, Dezso B, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1337-45.
135. Davis BM, Jensen R, Williams P, O'Shea P. The interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for inter-kingdom signaling. *PLoS One*. 5(10):e13522.
136. Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol*. 2007 Nov;152(6):838-54.
137. Carles M, Lafargue M, Goolaerts A, Roux J, Song Y, Howard M, et al. Critical role of the small GTPase RhoA in the development of pulmonary edema induced by Pseudomonas aeruginosa in mice. *Anesthesiology*. Nov;113(5):1134-43.
138. Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol*. 1998 Aug 1;56(3):269-77.
139. Desmet C, Warzee B, Gosset P, Melotte D, Rongvaux A, Gillet L, et al. Pro-inflammatory properties for thiazolidinediones. *Biochem Pharmacol*. 2005 Jan 15;69(2):255-65.
140. Losa Garcia JE, Rodriguez FM, Martin de Cabo MR, Garcia Salgado MJ, Losada JP, Villaron LG, et al. Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Mediators Inflamm*. 1999;8(1):43-51.
141. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today*. 1997 Sep;18(9):428-32.
142. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
143. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res*. 2007 Dec;33(10):507-18.
144. Yang JJ, Wang DD, Sun TY. Flagellin of Pseudomonas aeruginosa induces transforming growth factor beta 1 expression in normal bronchial epithelial cells through mitogen activated protein kinase cascades. *Chin Med J (Engl)*. Feb;124(4):599-605.
145. O'Sullivan BP, Mong S, Votta B, Schidlow DV. Reduction of eicosanoid production by essential fatty acid depletion does not attenuate the inflammatory response induced by Pseudomonas aeruginosa pneumonia in rat lung. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992 Jul;46(3):203-10.
146. Muller M, Sorrell TC. Production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by human neutrophils is inhibited by Pseudomonas aeruginosa phenazine derivatives. *Infect Immun*. 1991 Sep;59(9):3316-8.
147. Willson TM, Lehmann JM, Kliewer SA. Discovery of ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Dec 27;804:276-83.
148. Aronoff DM, Serezani CH, Carstens JK, Marshall T, Gangireddy SR, Peters-Golden M, et al. Stimulatory Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma on Fc-gamma Receptor-Mediated Phagocytosis by Alveolar Macrophages. *PPAR Res*. 2007;2007:52546.

149. Ueki S, Matsuwaki Y, Kayaba H, Oyamada H, Kanda A, Usami A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates eosinophil functions: a new therapeutic target for allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Jun;134 Suppl 1:30-6.
150. Kintscher U, Goetze S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. *Eur J Pharmacol*. 2000 Aug 11;401(3):259-70.
151. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4250-8.
152. Cooley MA, Whittall C, Rolph MS. Pseudomonas signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes Infect*. Mar;12(3):231-7.
153. Chambers CE, Visser MB, Schwab U, Sokol PA. Identification of N-acylhomoserine lactones in mucopurulent respiratory secretions from cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Mar 15;244(2):297-304.
154. Middleton B, Rodgers HC, Camara M, Knox AJ, Williams P, Hardman A. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 22;207(1):1-7.
155. Charlton TS, de Nys R, Netting A, Kumar N, Hentzer M, Givskov M, et al. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ Microbiol*. 2000 Oct;2(5):530-41.
156. Perez A, van Heeckeren AM, Nichols D, Gupta S, Eastman JF, Davis PB. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in cystic fibrosis lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Aug;295(2):L303-13.
157. Young PW, Buckle DR, Cantello BC, Chapman H, Clapham JC, Coyle PJ, et al. Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Feb;284(2):751-9.
158. Sapru K, Stotland PK, Stevenson MM. Quantitative and qualitative differences in bronchoalveolar inflammatory cells in Pseudomonas aeruginosa-resistant and -susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 1999 Jan;115(1):103-9.
159. Tam M, Snipes GJ, Stevenson MM. Characterization of chronic bronchopulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in resistant and susceptible inbred mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Apr;20(4):710-9.
160. Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, Laranjeira AP, et al. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock*. 2006 Nov;26(5):457-63.
161. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, et al. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):398-409.
162. Kannan S, Huang H, Seeger D, Audet A, Chen Y, Huang C, et al. Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate P. Aeruginosa infection. *PLoS One*. 2009;4(3):e4891.