



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**EFEITO DAS FOSFATIDILCOLINAS DO LÍQUIDO SURFACTANTE NA
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E FAGOCÍTICA DE
MACRÓFAGOS ALVEOLARES**

LUMA DA COSTA LOUREIRO

MANAUS – AMAZONAS

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**EFEITO DAS FOSFATIDILCOLINAS DO LÍQUIDO SURFACTANTE NA
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E FAGOCÍTICA DE
MACRÓFAGOS ALVEOLARES**

LUMA DA COSTA LOUREIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ARTERIO SORGI

Coorientador: Prof^a. Dr^a. LUCIA HELENA FACCIOLI

MANAUS – AMAZONAS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L892e Loureiro, Luma da Costa
Efeito das fosfatidilcolinas do líquido surfactante na modulação da
atividade inflamatória e fagocítica de macrófagos alveolares / Luma
da Costa Loureiro. 2017
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Arterio Sorgi
Coorientadora: Lucia Helena Faccioli
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Fosfolipídios. 2. Macrófagos. 3. Prostaglandinas. 4. Klebsiella
pneumoniae. I. Sorgi, Carlos Arterio II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Juracileide, aos meus irmãos, sobrinhos, e a todos meus familiares e amigos, por todo apoio e palavras de ânimo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Por todo Seu cuidado, proteção, sustento e força durante esse tempo de aprendizagem!!

Agradeço aos meus pais e familiares, por toda ajuda, orações, e palavras de fé e encorajamento. E principalmente, a minha gêmea Luana da Costa Loureiro por sempre está presente!! Lhe amo!!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos e dedicação durante esse período!!

Agradeço a minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Faccioli, pela oportunidade em está aprendendo em seu laboratório. Obrigada por todo auxílio e ensinamentos!!

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini, por gentilmente ceder a cepa bacteriana para que este trabalho fosse realizado. E também a técnica Joseane Cristina Ferreira por toda ajuda e paciência!!

Agradeço aos membros da Banca examinadora, pela aceitação em participar da avaliação deste trabalho!!

Agradeço ao LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética) por todos os momentos vividos, dentro e fora do laboratório. Sejam com estresse e sem estresse, ruins ou bons, tristes ou alegres, todos eles foram muito importantes! Obrigada pela ajuda e paciência! Obrigada pela amizade de vocês!

Agradeço a todos os outros amigos que Deus colocou em minha vida durante esse período em Manaus e em Ribeirão Preto!! Obrigada por vocês existirem!!

Agradeço a secretária do Programa de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA-UFAM) pela disponibilidade em sempre ajudar!!

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP-RP) pela oportunidade e parceria desenvolvida!!

E agradeço a CAPES pela ajuda financeira fundamental para realização deste trabalho!!

**“Confie no SENHOR,
todos os que o temem!
Ele é a ajuda e o escudo de vocês.”
Salmos 115:11**

RESUMO

Bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, possuem LPS em suas membranas, componente responsável por desencadear processo inflamatório por células do sistema imune como os macrófagos (MA), produzindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. A inflamação é importante no combate aos microrganismos, mas a exacerbação deste evento pode causar sérios prejuízos ao tecido. Da mesma forma, os MA são importantes no controle de infecções, atuando na fagocitose e morte de microrganismos. Os lipídios de membrana têm sido alvo de estudos para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas (Terapia de Lipídios de Membrana - TLM). Neste sentido, os lipídios do líquido surfactante (LS) são alvos para desenvolvimento de TLM pulmonar. Dentre os fosfolipídios mais abundantes do LS, encontramos o POPC, uma fosfatidilcolina (PC), e também seus produtos oxidados, como *PaldoPC*. Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar os efeitos das PC derivadas do LS na modulação da polarização (M1 e M2), atividade inflamatória e fagocítica de MA contra *K. pneumoniae*. Nossos resultados demonstram que POPC e *PaldoPC* aumentaram a produção de NO nos M1 estimulados com LPS. Da mesma forma, o tratamento com as PC aumentaram a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias no perfil M0 e M1 pós-estimulados com LPS. O aumento da produção de mediadores inflamatórios nos MA tratados com PC, correlacionou com o aumento da expressão gênica de TLR2, TLR4, e MYD88. Além disso, o tratamento com POPC aumentou a fagocitose de *K. pneumoniae*, corroborando com o aumento produção de PGD₂. No entanto, o tratamento com *PaldoPC* inibiu a fagocitose, e aumentou a produção de PGE₂. Nossos dados sugerem que PC não tem efeito inflamatório direto sobre MA, mas, potencializa a resposta de MA com LPS, aumentando a expressão de receptores da imunidade inata e modulando a produção de prostaglandinas; influenciando a resposta imune do microambiente pulmonar.

Palavras chave: Fosfolipídios; Macrófagos; Prostaglandinas; *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Gram-negative bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, have LPS in their membranes, a component that triggers inflammatory process, by cells of the host immune system such as macrophages (MA), produced cytokines, chemokines and lipid mediators. Inflammation is important in preventing microorganisms, but the exacerbation can cause serious tissue damage. Indeed, MA are also important in the control of infections, phagocytosis and death of microorganisms. Membrane lipids have been the subjects of studies to development of new pharmacological therapies (Membrane Lipid Therapy - MLT). On this way, lipid of surfactant liquid (LS) were target to development pulmonary MLT. Among the most abundant phospholipids in LS, we found POPC, a phosphatidylcholine (PC), the oxidized phospholipids product, such as *Paldo*PC. In this work, our aim was to evaluate the effects of LS-derived PCs on modulation of polarization (M1 and M2), inflammatory and phagocytic activity of macrophages against *K. pneumoniae*. Our results demonstrated that POPC and *Paldo*PC increase NO production when M1 are stimulated with LPS. Indeed, the treatment with PC increased the production of inflammatory cytokines and chemokines in the M0 and M1 profile, post LPS-stimulated. The increment on inflammatory mediators production by MA treated with PC, correlated with the increased on gene expression of TLR2, TLR4, and MYD88. The treatment with POPC increased phagocytosis of *K. pneumoniae*, corroborating with the increased production of PGD₂. However, *Paldo*PC inhibited the phagocytosis and increased the production of PGE₂. Our data suggest that PC did not have inflammatory effect direct on MA, but increased the MA response against LPS, increasing expression of innate immune receptors, and modulation of prostaglandins production; influenced the pulmonary microenvironment immune response.

Key words: Phospholipids; Macrophages; Prostaglandins; *Klebsiella pneumoniae*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMJ2-C11	Linhagem celular de macrófagos alveolares de camundongos
BHI	Brain Heart Infusion
CD14	Cluster of differentiation 14
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COX	Cicloxigenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DPPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
DP-	Receptor de prostaglandina D-
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-	Interleucina-
IFN-γ	Interferon gamma
iNOS	Sintase óxido nítrico induzível
IRF	Fator de regulação do Interferon
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LO	Lipoxigenase
LPA	Lesões pulmonares agudas
LPP	Lipoproteína bacteriana
LPS	Lipopolissacarídeos
LS	Líquido surfactante
LTs	Leucotrienos
M1	Macrófago ativado pela via clássica
M2	Macrófago ativado pela via alternativa
MA	Macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
MD2	Proteína mieloide de diferenciação 2
MIF	Média da Intensidade de Fluorescência

MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MOI	Multiplicity of Infection
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
MYD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NLRs	Receptores semelhantes a NOD
NO	Óxido nítrico
NO ²⁻	Nitrito
O ₂ ⁻	Ânio superóxido
OxPAPC	1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina
OxPLS	Fosfolipídios oxidados do liquido surfactante
PAFr	Receptor do fator de ativação de plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão Salina-fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PG	Prostaglandinas
PI	Fosfatidilinositol
PLA2	Fosfolipases A2
PLs	Fosfolipídios
PaldoPC	Palmitoil- <i>aldo</i> -fosfatidilcolina
PaldoPG	Palmitoil- <i>aldo</i> -fosfatidilglicerol
POPC	Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina
POPG	Palmitoil-oleil-fosfatidilglicerol
PPAR γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROI	Intermediários reativos de oxigênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBF	Soro Bovino Fetal
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Esfingomielina

STAT-	Sinais de transdução e ativadores de transcrição
THP-1	Linhagem celular derivadas de monócitos humanos
TLM	Terapias de Lipídios de Membranas
TLR-	Toll-like receptor-
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TX-	Tromboxano-
UFC	Unidades formadoras de colônias
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diluições de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e equação da reta para experimentos <i>in vitro</i>	32
Figura 2. Estrutura química dos fosfolipídios derivados do surfactante.....	33
Figura 3. Padronização da técnica da contagem de UFCs de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pela técnica de resazurina.	39
Figura 4. Fosfolipídios não apresentam citotoxicidade em macrófagos de linhagem AMJ2-C11.....	43
Figura 5. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de NO por macrófagos M0 e M1 (AMJ2-C11) pós-estimulados com LPS.....	45
Figura 6. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de citocinas e quimiocinas por M0, pós-estimulados com LPS.....	47
Figura 7. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de citocinas e quimiocinas por M1, pós-estimulados com LPS.....	49
Figura 8. Produção de citocinas e quimiocinas por M2, tratados com fosfolipídios, e pós-estimulados com LPS.....	51
Figura 9. A linhagem celular AMJ2-C11 possui plasticidade celular.....	53
Figura 10. Fosfolipídios modulam a expressão de receptores da Imunidade Inata em AMJ2-C11.....	56
Figura 11. Produção de PGE ₂ e PGD ₂ por AMJ2-C11 tratados com fosfolipídios, e pós-estimulados com LPS.....	58
Figura 12. Fagocitose de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por AMJ2-C11 tratados com fosfolipídios.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Biologia dos macrófagos e funções nas infecções bacterianas	17
2.2. Infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
2.3. Resposta imunológica na infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.4. Os lipídios e a Imunidade inata	22
2.5. Fosfolipídios do líquido surfactante	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Fluxograma metodológico	28
4.2. Obtenção e cultivo das células AMJ2-C11	30
4.3. Obtenção e cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
4.4. Preparação do inóculo de <i>K. pneumoniae</i> para infecção <i>in vitro</i>	31
4.5. Fosfatidilcolinas do Líquido surfactante	32
4.6. Ensaio de citotoxicidade celular.....	33
4.7. Polarização de MA, estimulação e tratamentos	34
4.8. Dosagem de mediadores proteicos por ensaio imunoenzimático (ELISA)	34
4.9. Dosagem de NO	35
4.10. Análise quantitativa de prostaglandinas	35
a) Extração e purificação de lipídios	36
b) Análise das PGs por HPLC-MS/MS	36
4.11. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	37
4.12. Ensaio de fagocitose de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
4.13. Análise estatística	40
4.14. Soluções e Meios utilizados nos procedimentos experimentais	40
5. RESULTADOS	42
5.1. Citotoxicidade de fosfolipídios do líquido surfactante para macrófagos da linhagem AMJ2-C11	42

5.2.	Produção de NO por macrófagos tratados com fosfolipídios do líquido surfactante e estimulados com LPS	44
5.3.	Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos alveolares não polarizados (M0), e pós-estimulados com LPS	46
5.4.	Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos ativados pela via clássica (M1), e pós-estimulados com LPS	48
5.5.	Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos ativados pela via alternativa (M2), e pós-estimulados com LPS	50
5.6.	Determinação da expressão gênica de marcadores dos fenótipos M1 e M2 para células AMJ2-C11	52
5.7.	Efeitos dos fosfolipídios na expressão gênica de marcadores de fenótipos e receptores da imunidade inata nos macrófagos AMJ2-C11	54
5.8.	Produção de prostaglandinas por AMJ2-C11 (M0) tratados com fosfolipídios do líquido surfactante	57
5.9.	Avaliação do efeito dos fosfolipídios na atividade fagocítica de AMJ2-C11 contra <i>K. pneumoniae</i>	59
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÃO	67
8.	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo importante na defesa do hospedeiro. Bactérias como as Gram-negativas possuem LPS em suas membranas, e este componente desencadeia este processo por células do sistema imune do hospedeiro, como os macrófagos, iniciando assim uma sinalização intracelular para a produção de mediadores inflamatórios (FAN et al., 2008; HANADA; YOSHIMURA, 2002). Por mais que este processo seja muito importante no combate ao microrganismo, a inflamação exacerbada pode causar sérios prejuízos ao tecido, sendo causador das Lesões pulmonares agudas (LPA) e a Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (LEE; DOWNEY, 2001; WARE; MATTHAY, 2000).

As atividades de ácidos nucleicos e de proteínas estão comumente associadas às funções celulares. Por isso, tradicionalmente várias doenças são retratadas com falhas biológicas nestas moléculas. Mas, pesquisas atuais demonstraram que os lipídios de membrana controlam inúmeras funções celulares, principalmente através da regulação da atividade e localização de proteínas (LEE, 2004; VÖGLER et al., 2004; YEAGLE, 2005). Muitas funções celulares acontecem dentro ou ao redor das membranas. E alterações que ocorrem nas quantidades e tipos de lipídios de membranas têm sido relatadas em várias patologias humanas (ESCRIBÁ, 2006). Com isso, é plausível que as Terapias de Lipídios de Membrana (TLM) sejam específicas e tenham como base a regulação da estrutura da membrana lipídica (ESCRIBÁ et al., 1997; YANG et al., 2005).

Na quimioterapia tradicional a principal interação dos fármacos é com as proteínas. Após esta ligação de fármaco e proteína, acontece a inibição da atividade proteica, e conseqüentemente a regulação das cascatas intracelulares que levarão a diferente expressão gênica (ESCRIBÁ, 2006). Já na TLM, os fármacos atuam nos lipídios de membrana, indiretamente regulando a atividade de proteínas de membrana, que por seguinte, também induzirão modificações na expressão gênica (ESCRIBÁ, 2006; MARTÍNEZ et al., 2005). As proteínas são formadas por 20 diferentes aminoácidos e as membranas são compostas por inúmeros lipídios, mostrando assim, a imensa complexidade da bioquímica dos lipídios em relação às

proteínas. Como também, o número de estruturas secundárias formadas pelos lipídios é muito maior comparado às proteínas (ESCRIBÁ, 2006). Dessa forma, diferentes células podem expressar diferentes composições e arranjos de lipídios de membrana, que irá proporcionar mais especificidade ao tratamento com a TLM.

O alvo da TLM está na criação de fármacos eficazes em influenciar a organização dos lipídios pela sua estrutura-função, levando a modulação da atividade celular. E isto, pode levar à mudanças na sinalização celular e expressão gênica, podendo inverter o estado funcional de uma célula em determinada patologia (ESCRIBÁ, 2006). Existem diferentes estratégias de desenvolvimento de TLM relacionados aos eventos celulares, que estão envolvidos com a biologia das membranas plasmáticas: 1) regulação direta através da modificação da estrutura da membrana; 2) regulação da atividade enzimática para alterar as quantidades de lipídios da membrana; 3) modulação da expressão gênica que resulta em alterações na composição lipídica da membrana; 4) alterações lipídicas que afetam as interações proteína-proteína em microdomínios específicos da membrana; e 5) ligação direta de um fármaco a uma proteína que altera a sua afinidade de ligação à membrana ou a de outras proteínas de sinalização (ESCRIBÁ et al., 2015).

Muitas infecções pulmonares são causadas por bactérias, levando a aspectos severos de pneumonia. Dentre as principais bactérias que causam pneumonias podemos destacar o *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, e a *Klebsiella pneumoniae* resistente à 3ª geração de cefalosporinas e carbapenema (WHO, 2014). Assim, também foi demonstrado que lipídios estão associados com os processos de sinalização respiratória, e estes podem ser usados para o tratamento de doenças pulmonares, como a pneumonia (PALESTINI et al., 2003; PINOT et al., 2000). No pulmão, as células alveolares do tipo II são responsáveis por produzir o surfactante, e este é composto cerca de 90% de lipídios em peso (LEWIS; JOBE, 1993; WRIGHT, 2005), e os lipídios podem ter funções importantes no controle de inflamações. FU e BIRUKOV relatam que em uma fase tardia de modelos de LPA, os fosfolipídios oxidados (do inglês, OxPL) podem restaurar a barreira vascular e contribuir na resolução da inflamação e lesão pulmonar (FU; BIRUKOV, 2009). Carneiro e colaboradores destacam o papel de lisofosfatidilcolina (LPC) na inibição da sinalização inflamatória de TLR4 induzida por LPS (CARNEIRO et al., 2013).

A terapia de lipídios de membrana surgiu como novo meio de desenvolver drogas capazes de regular a estrutura e composição dos lipídios de membranas (ESCRIBÁ et al., 2015). Assim, sabendo da importância da TLM na modulação da membrana lipídica, sua ação em células imunes, podendo inibir a produção de citocinas inflamatórias, e assim modificar o estado da patologia, compreender os efeitos desta terapia pode ser de grande significância para o tratamento de processos inflamatórios exacerbados ocasionados por bactérias Gram-negativas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia dos macrófagos e funções nas infecções bacterianas

Os macrófagos (MA) foram descobertos por Ilya Metchnikof no século XIX (TAUBER, 2003). A maioria dos macrófagos dos tecidos origina-se durante o desenvolvimento embrionário, e persistem na idade adulta, mesmo com a chegada de monócitos no sangue na homeostase. Mas durante um processo inflamatório os monócitos são diferenciados em macrófagos, tornando-se macrófagos inflamatórios (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Nos tecidos, os MA residentes, como células de Langerhans (pele), microglia (cérebro) são células sentinelas com funções contra microrganismos (MORRISSETTE; GOLD; ADEREM, 1999; MOTA, 2009). A fagocitose é um processo complexo e versátil, que faz parte das funções dos MA, e contribui para a imunidade inata através da ingestão e eliminação de patógenos, como também para a homeostase e remodelação dos tecidos através da remoção de células mortas (FREEMAN; GRINSTEIN, 2014).

MA dos diferentes tecidos apresentam uma ampla variedade de fenótipos funcionais e morfológicos, e tem contribuição em grande parte pelo microambiente (MORRISSETTE; GOLD; ADEREM, 1999). A capacidade dos MA em desempenhar funções tão diversas, é devida em grande parte, aos seus inúmeros receptores (FREEMAN; GRINSTEIN, 2014). Para que ocorra a ativação de MA, são essenciais dois sinais: (1) o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs e (2) a estimulação por citocinas do padrão de resposta de linfócito T (Th1 ou Th2). Logo, o padrão de ativação do MA é induzido a partir da presença desses fatores no microambiente celular, polarizando-as em dois padrões distintos: ativação clássica (M1) ou ativação alternativa (M2) (ISHII et al., 2009; LAWRENCE; NATOLI, 2011). Para se induzir células do fenótipo M1, é preciso à estimulação, por exemplo, de lipopolissacarídeos (LPS), ou outros PAMPs bacterianos ou fúngicos, e/ou citocinas do padrão Th1, como o interferon gama (IFN- γ); que polarizam a resposta dos MA para a produção de IL-2, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e várias outras moléculas, como quimiocinas, e a expressão da enzima iNOS, que participa na liberação de óxido nítrico (NO) (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). No entanto, para indução de MA do fenótipo M2, é necessária à estimulação por PAMPs

de helmintos/parasitas (DAVICINO et al., 2011), e/ou citocinas do padrão Th2, como IL-4 e IL-13, polarizando a resposta dos MA para a expressão de arginase-1, fibronectina, prolina, produção de IL-10, e receptores de manose (MARTINEZ et al., 2008). Desta maneira, M1 e M2 diferem em expressões de receptores, citocinas e quimiocinas, como também nas suas funções efectoras no sistema imunológico (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008).

Desta forma, podemos considerar que os M1 são microbicidas e inflamatórios, enquanto os M2 são imunomoduladores. Assim, a ativação de MA pode ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Essa ativação pode ser plástica, rápida e reversível, sugerindo que as populações de MA são dinâmicas e podem participar tanto da inflamação, como também da resolução (PORCHERAY et al., 2005). A ativação de M1 é geralmente associada à proteção durante doenças infecciosas agudas. Por exemplo, *Listeria monocytogenes* que causa doença em pacientes imunodeprimidos e mulheres grávidas, induz o perfil M1, evitando assim o escape da bactéria do fagossoma e estimulando a morte intracelular de bactérias *in vitro* e *in vivo* (SHAUGHNESSY; SWANSON, 2007). Camundongos com ausência da produção de IFN- γ , TNF- α e seus receptores, (característicos com fenótipos de M1), morrem de infecção por *L. monocytogenes* (PFEFFER et al., 1993). Da mesma forma, *Salmonella typhi*, o agente da febre tifoide, e *Salmonella typhimurium*, um agente de gastroenterite, induzem a polarização M1 de MA humanos e de murino, e está associada com o controle da infecção (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Durante a infecção por *M. tuberculosis* os MA também são polarizados para o perfil M1 (CHACON-SALINAS et al., 2005). Já a polarização para M2 está associada com a fase crônica de infecções por micobactérias (KISZEWSKI et al., 2006), como de outras doenças infecciosas (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). De acordo com esses dados, dependendo do perfil de macrófago, podemos ter diferentes respostas em relação as infecções bacterianas.

2.2. Infecções por *Klebsiella pneumoniae*

A família Enterobacteriaceae é composta por bactérias Gram-negativas e os principais gêneros que possuem mecanismos de resistência são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* e *Serratia* (BOWERS; HUANG, 2016). O gênero *Klebsiella* pode ser atualmente considerado composto de cinco espécies legítimas e suas subespécies: *K. pneumoniae* (ssp. *pneumoniae*; ssp. *ozaenae*; ssp. *rhinoscleromatis*), *K. quasipneumoniae* (ssp. *quasipneumoniae*; ssp. *similipneumoniae*), *K. variicola*, *K. michiganensis* e *K. oxytoca*. Sendo que as espécies que podem ser reconhecidos como importantes patógenos humanos são *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (JANDA, 2015).

Klebsiella pneumoniae foi descrita por Trevisan, e o gênero surgiu em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (LPSN, 2016). *K. pneumoniae* é um bastonete Gram-negativo, não móvel. Seu crescimento pode ser aeróbio facultativo, mas cresce melhor em condições aeróbicas e causa uma grande variedade de infecções hospitalares. Esta bactéria coloniza uma vasta gama de hospedeiros variando de plantas a mamíferos, mas também pode ser encontrada no solo e na água superficial (PODSCHUN et al., 2001).

A infecção por *K. pneumoniae* está sendo reconhecida como uma grande ameaça à saúde devido ao aumento a resistência aos antibióticos, portanto, limitando terapias eficientes (VIEIRA et al., 2016). Os genes mais importantes capazes de conferir resistência ao carbapenema (através das carbapenemases) estão presentes nela, tornando deste modo, os tratamentos existentes quase todos ineficazes. E para muitos pacientes infectados com estas bactérias não existem outras alternativas de tratamentos. Esta resistência é conferida pela transferência horizontal de elementos genéticos móveis, tais como transposões ou plasmídeos (WHO, 2014).

Estas infecções tem um relevante papel de saúde pública, exigindo uma ação de práticas de prevenção e controle, desenvolvimento de antimicrobianos, participações do corpo clínico, e métodos de detecção laboratorial eficiente (GISKE et al., 2008; ROSSI, 2011). A escolha de antimicrobianos apropriados no tratamento destas infecções tem se tornado cada vez mais difícil, pelo aumento e disseminação

de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar, como também, a diminuição de opções terapêuticas (DOORDUIJN et al., 2016; PATERSON, 2006). Estas infecções ocorrem tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento e com taxas de morbidade e mortalidade elevadas (GISKE et al., 2008).

As infecções por *Klebsiella pneumoniae* são particularmente comuns entre os indivíduos mais vulneráveis, como bebês prematuros, pacientes imunocomprometidos com distúrbios de diabetes ou por consumo de álcool, como também aqueles que recebem cuidados médicos avançados, ou aqueles que possuem a Síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS (WHO, 2014). *K. pneumoniae* pode causar infecções pulmonares, urinárias e intra-abdominais (LANDMAN et al., 2007). A pneumonia é caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada, associada com o excesso de infiltração de macrófagos e neutrófilos, e alta produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a injúria pulmonar severa (SOARES et al., 2006). A taxa de mortalidade vai depender da gravidade, e pode exceder 50% em doentes vulneráveis, mesmo quando tratados com drogas antibacterianas adequadas (WHO, 2014). Por isso, é de extrema relevância pesquisar terapias mais eficazes para o tratamento de infecções microbianas resistentes as terapias convencionais, como é o caso da infecção por *K. pneumoniae*.

2.3. Resposta imunológica na infecção por *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pode persistir dentro das vias respiratórias do hospedeiro, e resistir tanto à fagocitose quanto a morte celular, isto tudo é devido a sua baixa imunogenicidade e incapacidade de estimular uma resposta pró-inflamatória eficiente (PACZOSA; MECSAS, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A sinalização por toll-like receptor 4 (TLR4) e toll-like receptor 9 (TLR9) está envolvida na ativação de MA, e na indução da imunidade adaptativa pela produção das citocinas, IL-23 e IL-17 (BHAN et al., 2010) na infecção por *K. pneumoniae*. O TLR4 tem um papel central na defesa do hospedeiro (SCHURR et al., 2005). Estudos demonstraram ainda, que camundongos deficientes do Receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) (MOORE et al., 2003), ou deficiência gênica para

MyD88/TRIF (CAI et al., 2009) tem a mortalidade aumentada na infecção experimental por esta bactéria, mostrando a importância de citocinas pró-inflamatórias na sua eliminação. A expressão pulmonar de CXCL10, que age em vários tipos de células, como os monócitos, os MA e células T, foi muito relevante para a eliminação de *Klebsiella pneumoniae* (ZENG et al., 2005).

Não se sabe muito a respeito dos mecanismos de morte celular em resposta a *K. pneumoniae*, mas algumas pesquisas mostraram que provavelmente a piroptose tem um papel importante no controle de infecções bacterianas (WEBSTER et al., 2010). Por exemplo, a produção de IL-1 β tem sido associada com NLRC4 (CAI et al., 2012), e NLRP3 dependente de ASC (WILLINGHAM et al., 2009) em respostas associadas com a piroptose. IL-36 γ , um membro da nova família de citocinas pró-inflamatórias semelhantes a IL-1, mostrou um efeito protetor gerando uma resposta do tipo 1 e polarizando MA para o perfil clássico em camundongos knockout IL-36 γ e infectados com *K. pneumoniae* (KOVACH et al., 2017). IFN- γ é importante para a resolução da infecção pulmonar localizada, ocasionada por *Klebsiella pneumoniae*, mas para a infecção sistêmica a resposta do hospedeiro é independente desta citocina (MOORE et al., 2002). Para a produção também de citocinas pró-inflamatórias, e defesa contra patógenos bacterianos do pulmão, STAT4 foi muito importante, pois animais knockout STAT4 tinham sua sobrevivência diminuída e apresentavam uma diminuição destas citocinas (DENG et al., 2004).

A participação das células dendríticas na defesa do hospedeiro contra a infecção pulmonar por *K. pneumoniae* envolve a indução de IL-12, IL-23 e IL-17, que são críticas para as defesas do hospedeiro contra esse patógeno (HAPPEL et al., 2005). As células Th17 são muito importantes, pois conferem proteção contra bactérias extracelulares e fungos, especialmente em superfícies epiteliais (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007; WEAVER et al., 2006, 2007). O aumento da susceptibilidade à infecção por *Klebsiella pneumoniae* ou *Citrobacter rodentium* em animais deficientes do receptor-IL-23p19 e deficientes em IL-17A indica a importância da IL-23 / IL-17 na imunidade para bactérias extracelulares (HAPPEL et al., 2005; MANGAN et al., 2006; YE et al., 2001).

Com isso, constatamos que os macrófagos são células do sistema imune inato bastante importante na defesa do hospedeiro contra diversos microrganismos,

sejam eles intracelulares ou extracelulares. No entanto, sabe-se que muitos microorganismos possuem mecanismos de escape, necessitando assim, de estudos para entender como estimular os macrófagos, e induzir uma resposta efetiva.

2.4. Os lipídios e a Imunidade inata

A inflamação é um processo biológico de resposta dos tecidos vascularizados após danos químicos, físicos, e presença de microrganismo, ou outros agentes infecciosos. Esta resposta apresenta sucessões de eventos envolvendo modificações celulares, moleculares e fisiológicas (STABLES; GILROY, 2011). Os MA atuam nesse evento sintetizando e produzindo citocinas, quimiocinas e os mediadores lipídicos, que são metabólitos derivados do ácido araquidônico (AA) (SIBILLE; REYNOLDS, 1990).

O Ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo de 20 carbonos, precursor dos eicosanoides. Ele é liberado dos fosfolipídios de membrana (principalmente da membrana nuclear) pela ação das enzimas fosfolipases (PLA₂). Estas enzimas são ativadas pelo aumento do Ca²⁺ intracelular e deslocam do citosol para a membrana celular. Os Leucotrienos (LTs) são eicosanoides derivados dos AA pela ação da via da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). A via das lipoxigenases (LO) é composta pelas enzimas 5-, 12- e 15-LO, e entre estas a 5-LO é a mais estudada. Após a ativação celular, a 5-LO é translocada para a membrana nuclear onde interage com a proteína de ativação da 5-lipoxigenase (FLAP), que é crucial para o metabolismo do AA para 5-HPETE e, posteriormente, para a biossíntese de LTA₄. O LTA₄ pode ser convertido em LTB₄ pela LTA₄-hidrolase ou ser conjugado a uma glutatona pela ação da LTC₄-sintase para a formação de LTC₄, que pode ainda ser metabolizado em LTD₄ e LTE₄ extracelularmente (PETERS-GOLDEN et al., 2005; SAMUELSSON; FUNK, 1989).

Os LTs possuem função relevante na inflamação, como potentes mediadores quimioatraentes para outras células (FACCIOLI et al., 1991), e favorecem também a fagocitose e a atividade microbicida de macrófagos (PETERS-GOLDEN et al., 2005). Trabalhos como o de (WIRTH; KIERSZENBAUM, 1985a, 1985b) mostraram pela primeira vez a importância dos LTs na defesa do hospedeiro, onde tanto LTB₄ e

LTC₄ aumentaram a fagocitose e a morte de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoniais. Outros estudos *in vitro* e em *in vivo* revelaram papéis fundamentais para LTs, onde estes induziram ao aumento da fagocitose por monócitos/macrófagos (MANCUSO et al., 1998; MANCUSO; PETERS-GOLDEN, 2000) e a atividade microbida (BAILIE et al., 1996; DEMITSU et al., 1989; MANCUSO et al., 1998; MANCUSO; PETERS-GOLDEN, 2000). No que diz respeito à imunidade inata pulmonar, camundongos deficientes de 5-LO demonstraram prejudicada eliminação bacteriana, e aumento da mortalidade durante a pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* (BAILIE et al., 1996). *In vitro*, LTs exógenos aumentaram a fagocitose mediada por Receptor-Fcγ pelos MA alveolares (CANETTI et al., 2003; MANCUSO; PETERS-GOLDEN, 2000). Estudos com outros tipos de MA mostram que o aumento da produção de LTs, potencializa a atividade microbida através da geração de moléculas antimicrobianas, como o óxido nítrico (NO), (LÄRFARS et al., 1999; TALVANI et al., 2002) enzimas lisossomais, defensinas (FLAMAND et al., 2004; ITO, 2002) e a ativação da via NADPH-oxidase (NADPHox) (LÄRFARS et al., 1999; LINDSAY et al., 1998). A ativação NADPHox leva à produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI), tais como o ânion superóxido (O₂⁻) e H₂O₂, que são utilizados por fagócitos (incluindo MA alveolares) para matar bactérias fagocitadas (TAKAO et al., 1996; VAZQUEZ-TORRES et al., 2000).

O AA também pode ser metabolizado por uma enzima bifuncional chamada cicloxigenase (COX) originando as prostaglandinas (PGs). A COX apresenta duas isoformas, a COX-1 (expressos em quase todas as células e tecidos) e a COX-2 (induzida quando as células estão em um processo inflamatório) e atuando especialmente em sítios inflamatórios (DUBOIS et al., 1998). A geração destas PGs deriva de um mesmo precursor instável (PGH₂), podendo dar origem a várias outras PGs, como PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} e TXA₂, sendo reguladas por enzimas sintases específicas, assim como a PGE-sintase, responsável pela produção de PGE₂. A expressão destas enzimas depende do tipo celular, e os MA são os principais produtores de PGE₂ (STABLES; GILROY, 2011). Tanto PGE₂ endógena, como a exógena, suprime a capacidade microbida de MA alveolares infectados com *K. pneumooniae* (SEREZANI et al., 2007). Infecções em camundongos com *Mycobacterium intracellulare* tem alta produção de PGE₂, e o tratamento destes

animais com IFN- γ ou indometacina reduziu o número de bacilos tanto no pulmão como no baço (EDWARDS et al., 1986). Os autores propõem que PGE₂ inibe a produção de IFN- γ pelos linfócitos, suprimindo assim as funções microbicidas dos MA. Outro trabalho mostra que na fase crônica da infecção murina por *Mycobacterium tuberculosis*, a supressão de PGE₂ contribui para a redução do número de bacilos nos pulmões (MORENO et al., 2002). Estes dados sugerem que PGE₂ produzida na fase tardia da infecção têm participação na patogênese da tuberculose. Tanto a PGD₂, como o seu metabólito (15-PGJ2), parecem desempenhar papéis importantes na regulação da inflamação, via dependente ou independente dos receptores (DP1 e DP2) (SCHER; PILLINGER, 2009). Também pode ter efeito anti-inflamatório em LPA induzidas por endotoxinas, e seu aumento pode ser benéfico no tratamento tanto de LPA como de SDRA (MURATA et al., 2013). Joo e colaboradores demonstraram que, PGD₂ aumenta o “clearance” no pulmão de camundongos infectados com *Pseudomonas aeruginosa* (JOO et al., 2007). PGD₂ também atenua a inflamação em modelo de pleurite experimental (GILROY et al., 1999), como também em modelo de colite experimental (AJUEBOR; SINGH; WALLACE, 2000).

Outros eicosanoides importantes na inflamação são as Lipoxinas (LXA₄) que possuem papel anti-inflamatório. Elas são produzidas de modo transcelular e pela ação de duas lipoxigenase, podendo ser 5-LO/12-LO ou 5-LO/15-LO, porém pouco se sabe sobre o seu papel e produção nas infecções bacterianas. Contudo, já é estabelecido que os mediadores lipídicos possuem papel fundamental na resposta imunológica aos patógenos. Sua função celular vai depender da célula que o produz, do tipo de mediador produzido, e da expressão de receptores específicos.

2.5. Fosfolipídios do líquido surfactante

Assim como os lipídios de membrana têm sido alvo de grandes estudos, principalmente no intuito do desenvolvimento de terapias, os lipídios do líquido surfactante (LS) também têm recebido atenção em pesquisas, revelando a sua eficiência no combate a várias infecções pulmonares.

Células alveolares do tipo II são as células responsáveis por secretar o LS (WRIGHT, 2005). Este é constituído por lipídios e proteínas, cerca de 90% e 10% em peso, respectivamente (LEWIS; JOBE, 1993), sendo secretado na interface ar/tecido dos alvéolos (WRIGHT, 2005). A fosfatidilcolina (PC) é a classe mais presente no LS. E espécies moleculares lipídicas como o dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) é importante para a diminuição da tensão da superfície alveolar e previne o colapso durante o ciclo respiratório (ENHORNING; HOLM, 1993; NIEMAN et al., 1981). Cerca de 10% dos fosfolipídios do líquido surfactante são aniônicos, e a classe dos fosfatidilglicerol (PG), é o grupo de espécie molecular mais abundante, sendo o 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) seu principal componente. Encontram-se também no LS os fosfolipídios: fosfatidilinositol (PI) e fosfatidiletanolamina (PE) (SCHMIDT et al., 2002; WRIGHT et al., 2000). Almstrand e colaboradores, identificaram os fosfolipídios mais abundantes do LS, que são POPC (PC 16:0_18:1), e o POPG (PG 16:0_18:1), e os principais fosfolipídios oxidados por ozônio do líquido surfactante (OxPLS) são, Palmitoil-*aldo*-fosfatidilcolina (*Paldo*PC) e Palmitoil-*aldo*-fosfatidilglicerol (*Paldo*PG) (ALMSTRAND; VOELKER; MURPHY, 2015).

Lipídios que contem uma ligação dupla isolada reagem com o ozônio (BAILEY, 1958; CRIEGEE, 1975). Devido a isso, um intermediário pouco estável é produzido e se decompõe em aldeídos e outros produtos. Essa reação do ozônio com fosfolipídios, principalmente no 1-palmitoil-2-oleoil-glicerofosfocolina (POPC), tem sido bastante estudada (SANTROCK; GORSKI; O'GARA, 1992; SQUADRITO et al., 2000). *Paldo*PC pode agir em muitas células, como por exemplo, células epiteliais do pulmão, levando a uma maior liberação de PGE₂ e IL-8 (KAFOURY et al., 1999), assim como, foi demonstrado a ativação de PLA₂ e outras fosfolipases (KAFOURY et al., 1998) por este fosfolipídio oxidado do líquido surfactante (do inglês, OxPLS). Fosfolipídios éter de cadeia curta estão sendo reconhecidos como produtos oxidados que executam a sua função biológica por meio de receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFr) (MARATHE et al., 1999), como também, como agonista de fatores de transcrição, incluindo os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ) (DAVIES et al., 2001).

Bactérias como as Gram-negativas possuem LPS, e estes PAMPs são os principais causadores da inflamação (LEE; DOWNEY, 2001; WARE; MATTHAY, 2000). MA e células dendríticas são as primeiras células a serem estimuladas pelo LPS no microambiente pulmonar. Em seguida, são recrutados neutrófilos e leucócitos (SAVOV et al., 2002). O LPS se liga a proteínas/receptores (TLR4) e com isso ativam várias cascatas de sinalização celular, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA; TAKEDA, 2004). Neste sentido, muitos trabalhos têm mostrado o PG como um importantíssimo regulador da imunidade inata nos pulmões. Tanto experimentos *in vitro* como *in vivo* evidenciam a diminuição de atividades pró-inflamatórias dos receptores TLR2 e TLR4, após células tratadas com POPG (HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2003; KURONUMA et al., 2009). Assim, segundo NUMATA, KANDASAMY e VOELKER (2012) este mecanismo de ação de POPG, sugere um papel terapêutico para doenças pulmonares crônicas e agudas, principalmente em infecções virais e bacterianas. Estudos *in vitro* com linhagens de MA demonstraram que o tratamento com POPG previne a produção de TNF- α e também de eicosanoides inflamatórios como Tromboxano A₂ (TXA₂) e PGD₂. POPG também pode se ligar a MD2 e impedir que a proteína reconheça LPS e TLR4 (KANDASAMY et al., 2011; KURONUMA et al., 2009). Em estudos *in vivo*, POPG administrados com LPS por via intratraqueal suprime a produção de citocinas inflamatórias, como KC, MIP2 e TNF- α (KURONUMA et al., 2009).

A descoberta de POPG ter potencial regulador da resposta imune inata abre perspectivas para que esses lipídios do LS possam ser alvos de TLM, demonstrando sua importância nas secreções broncoalveolares, como também sendo antagonista em processos inflamatórios e de infecções virais respiratórias (NUMATA et al., 2012). No entanto, pouco se sabe sobre a fosfatidilcolina POPC e seu oxidado *Paldo*PC, e estudar os efeitos destes fosfolipídios na atividade inflamatória e fagocítica de macrófagos mostra-se bastante relevante.

3. OBJETIVO

Objetivo geral: Avaliar os efeitos das Fosfatidilcolinas derivadas do líquido surfactante na modulação da polarização e atividade inflamatória de macrófagos, assim como, na fagocitose de *Klebsiella pneumoniae*.

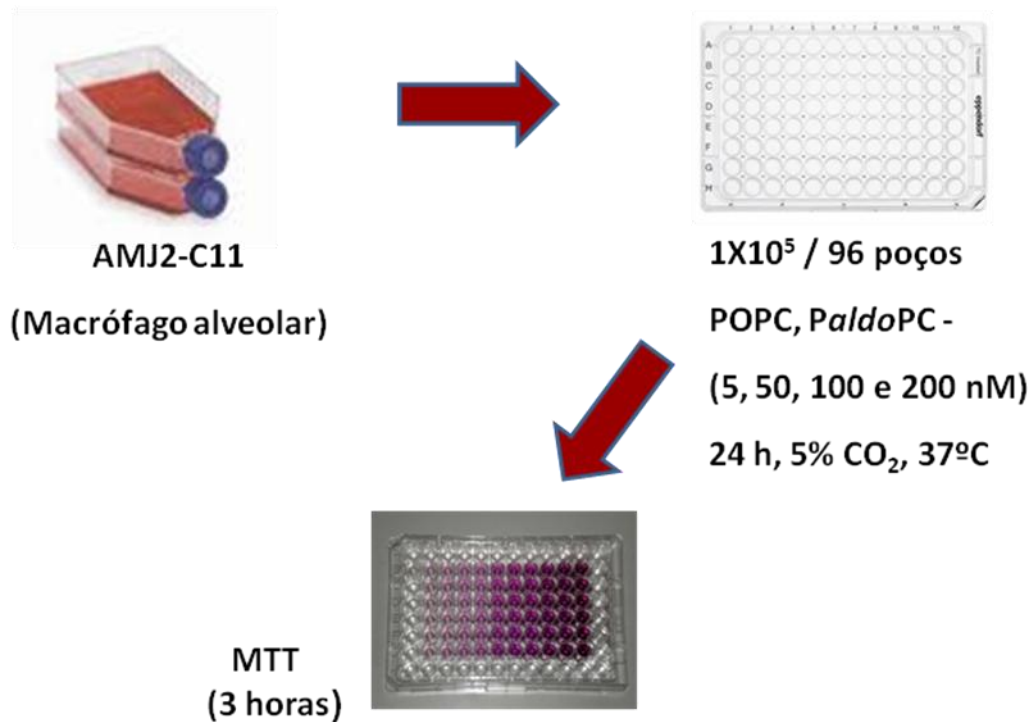
Objetivos específicos:

- Analisar a citotoxicidade do tratamento com fosfatidilcolinas nos macrófagos alveolares (AMJ2-C11);
- Identificar o padrão de produção de mediadores inflamatórios (Óxido nítrico, citocinas e eicosanoides), em macrófagos polarizados e tratados com fosfatidilcolinas *in vitro*.
- Avaliar a indução de fenótipos de macrófagos (M1 e M2) após tratamento com fosfatidilcolinas, e caracterizar a modulação da expressão gênica de receptores da imunidade inata.
- Demonstrar o efeito do tratamento com fosfatidilcolinas na atividade fagocítica de macrófagos contra *Klebsiella pneumoniae*.

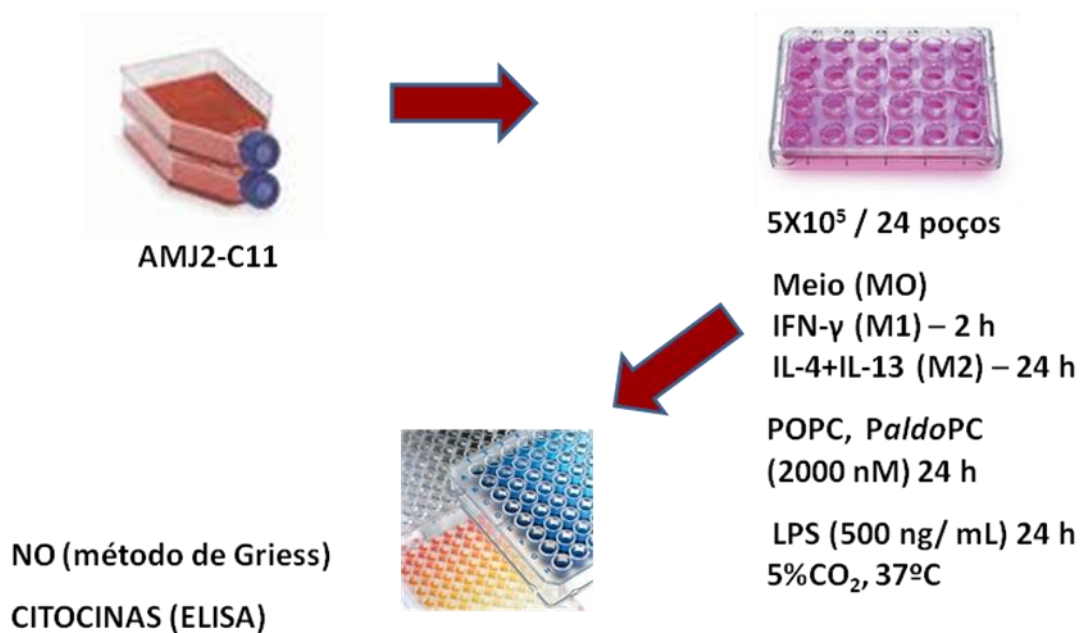
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fluxograma metodológico

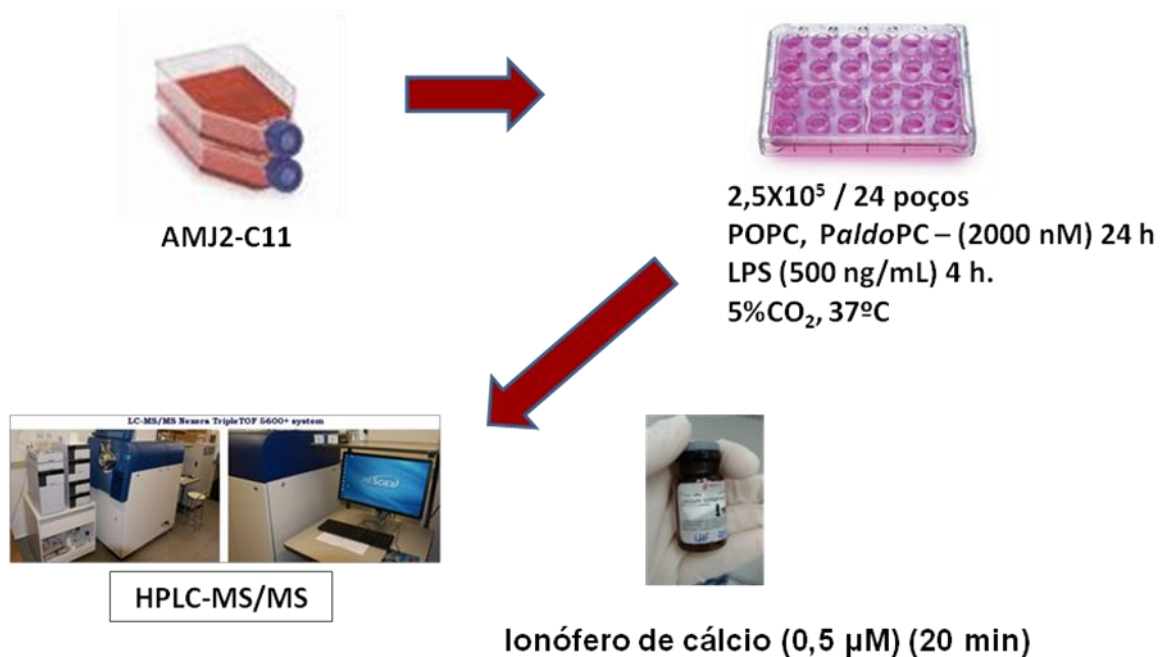
- Analisar a citotoxicidade do tratamento com fosfatidilcolinas nos macrófagos alveolares (AMJ2-C11).



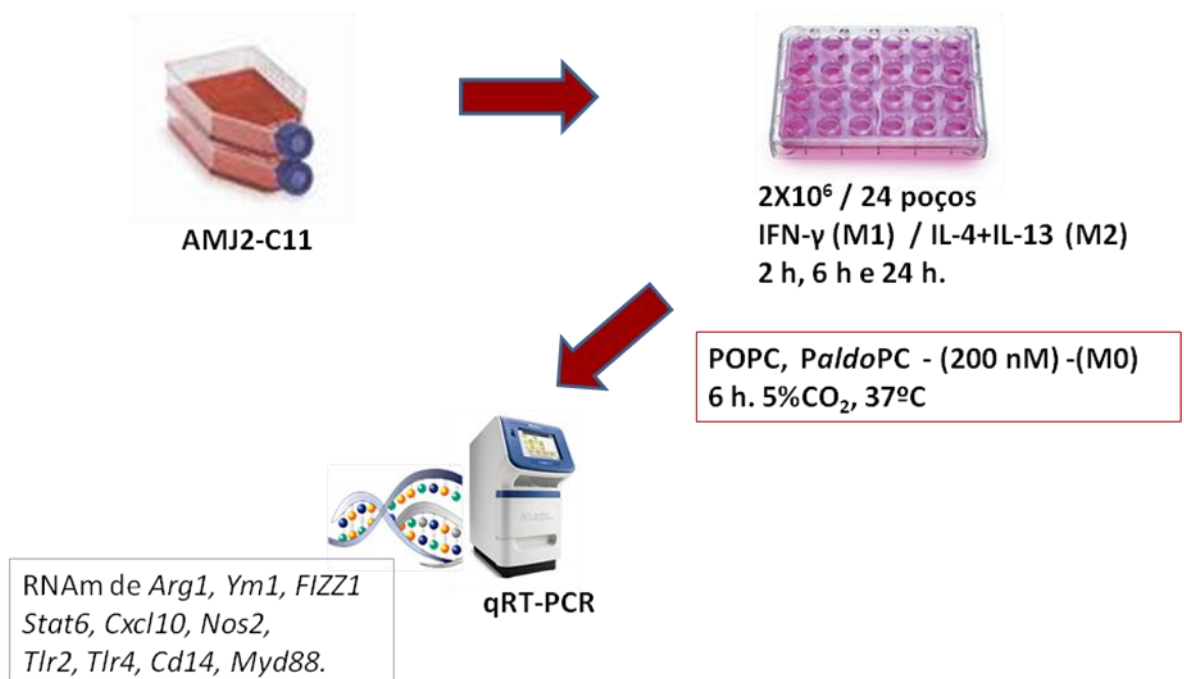
- Identificar o padrão de produção de mediadores inflamatórios (Óxido nítrico, citocinas), em macrófagos polarizados e tratados com fosfatidilcolinas *in vitro*.



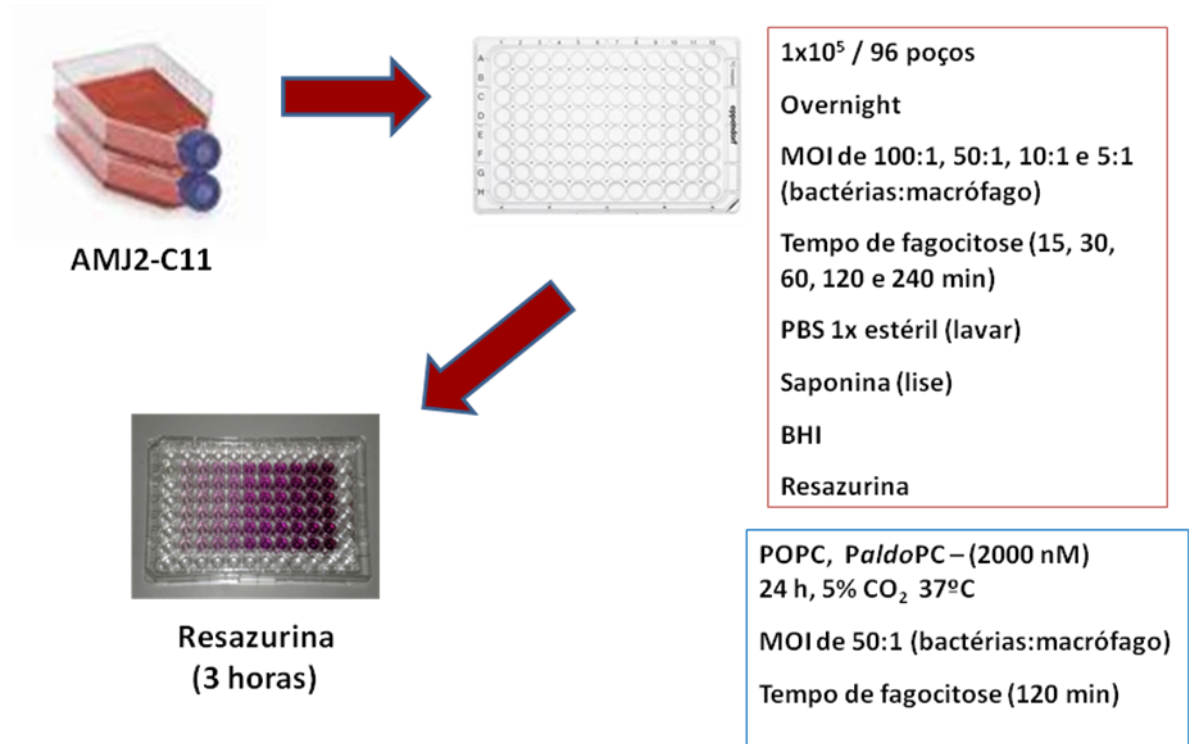
- Identificar o padrão de produção de mediadores inflamatórios (eicosanoides), em macrófagos polarizados e tratados com fosfatidilcolinas *in vitro*.



- Avaliar a indução de fenótipos de macrófagos (M1 e M2) após tratamento com fosfatidilcolinas, e caracterizar a modulação da expressão gênica de receptores da imunidade inata.



- Demonstrar o efeito do tratamento com fosfatidilcolinas na atividade fagocítica de macrófagos contra *Klebsiella pneumoniae*.



4.2. Obtenção e cultivo das células AMJ2-C11. A linhagem de macrófago alveolar AMJ2-C11 foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ code: 0039). O cultivo foi realizado em garrafas de 75 cm² (Kasvi, EUA) com 30 mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e 5 mg / mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) (DMEM-C), mantidas em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂. Quando as garrafas atingiram confluência superior a 80% de células, 15 mL do meio foram removidos, e as células aderidas foram retiradas por raspagem com o meio da cultura restante. Após, foram centrifugadas a 400 g, 10 min, à 4°C, o sobrenadante foi retirado, e o pellet de células foi ressuspensionado em meio de DMEM-I para avaliação da viabilidade celular em microscópio óptico (Zeiss). A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com o corante Azul de Tripán (Gibco, Life Technologies, EUA).

4.3. Obtenção e cultivo de *Klebsiella pneumoniae*. Foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (Schroeter) Trevisan, da American Type Culture Collection – ATCC 13883, tipo 3), gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Ana Lucia da Costa Darini, do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - FCFRP- USP. A cepa de 1º passagem foi cultivada em meio “Brain Heart Infusion” (BHI) (Acumedia, EUA) com 15% de glicerol e estocada em freezer a -80°C. Anteriormente, a cada experimento foi feito o repique das cepas com a técnica de esgotamento de estrias para obter colônias isoladas em meio Ágar MacConkey (Himedia, EUA) e incubadas durante 24 horas à 37°C.

4.4. Preparação do inóculo de *K. pneumoniae* para infecção *in vitro*. Colônias de *K. pneumoniae* foram isoladas de repique feito em meio Ágar MacConkey, como descrito no item anterior, com auxílio de uma alça descartável estéril, sendo ressuspensas em 5 mL de Tampão Salina-fosfato (do inglês, PBS), e homogeneizadas vigorosamente em vórtex. Partindo dessa suspensão, foram feitas diluições sucessivas com o fator de diluição igual a 2. Foi transferido 1 mL de cada diluição para uma placa de 48 poços (Kasvi, EUA), e então foi realizada a leitura da absorbância em 600 nm (SpectraMax- Molecular Devices, EUA). Além disso, foram realizadas diluições seriadas na base de 10 da solução original de bactérias, e cada diluição foi plaqueada (100 µL) em meio Ágar Mueller-Hinton (Acumedia, EUA), e as placas foram incubadas por 18-24 horas à 37°C. Após esse período de incubação, as contagens de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foram obtidas. Os dados de absorbância versus diluição, e de UFC versus diluição, foram utilizados para obter uma equação da reta para comparar o número absoluto de UFC pela absorbância, como descrito na Figura 1. Dessa forma, esta equação da reta modelo foi utilizada para calcular todos os inóculos de *K. pneumoniae* nos experimentos *in vitro*.

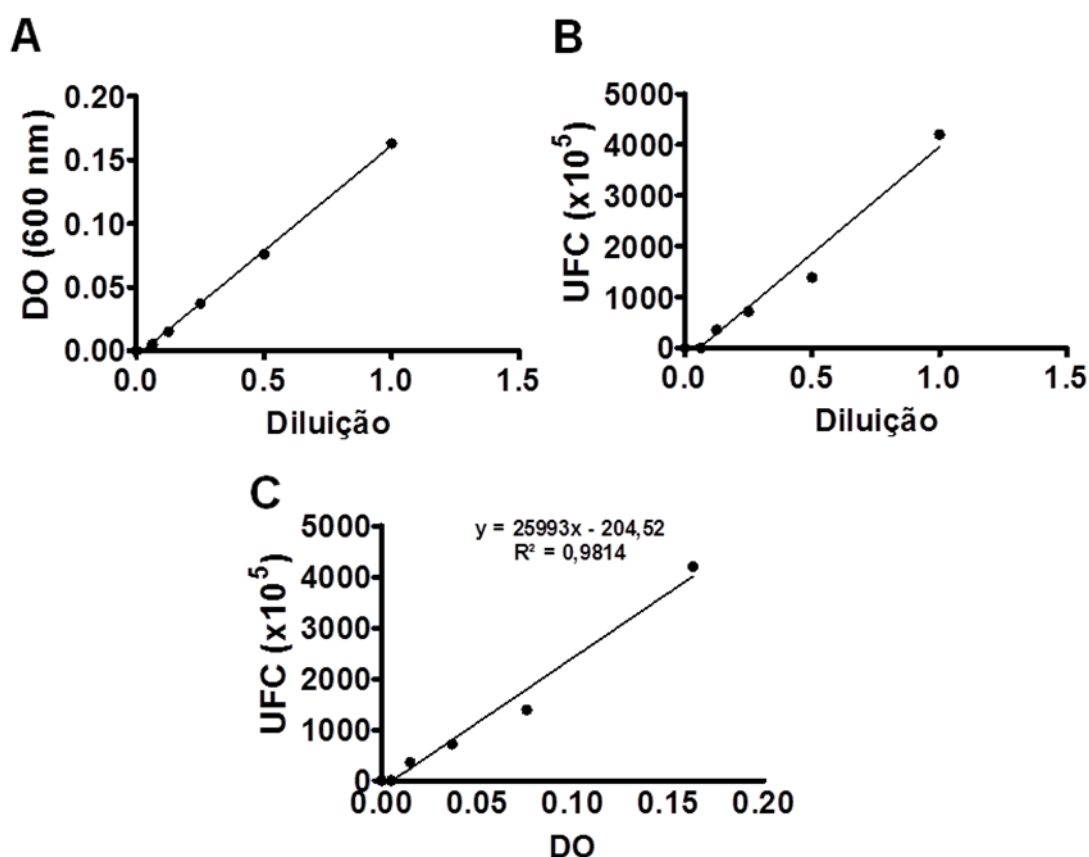


Figura 1. Diluições de *Klebsiella pneumoniae* e equação da reta para experimentos *in vitro*. (A). A partir de uma suspensão, foram realizadas diluições sucessivas com o fator de diluição igual a 2, e determinada densidade óptica (DO) em 600 nm (SpectraMax- Molecular Devices, EUA). **(B).** Em seguida, foram realizadas diluições seriadas na base de 10 da solução original de bactérias, sendo cada diluição plaqueada em meio Ágar Mueller-Hinton (Acumedia, EUA), e assim determinado as UFCs. **(C).** Correlação do número absoluto de UFCs pela absorbância.

4.5. Fosfatidilcolinas do Líquido surfactante. Os fosfolipídios utilizados para os tratamentos de MA *in vitro*, foram obtidos da empresa Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). Os fosfolipídios apresentavam-se na forma liofilizados, e foram ressuspensos em etanol puro e armazenados à - 20°C. No momento do uso, estes fosfolipídios foram diluídos no meio de cultura celular, de modo que a concentração de etanol não fosse superior a 1% (v/v) da solução final. As fosfatidilcolinas do líquido surfactante (PC) utilizadas foram: a POPC e sua forma oxidada *PaldoPC*, com estruturas descritas na Figura 2.

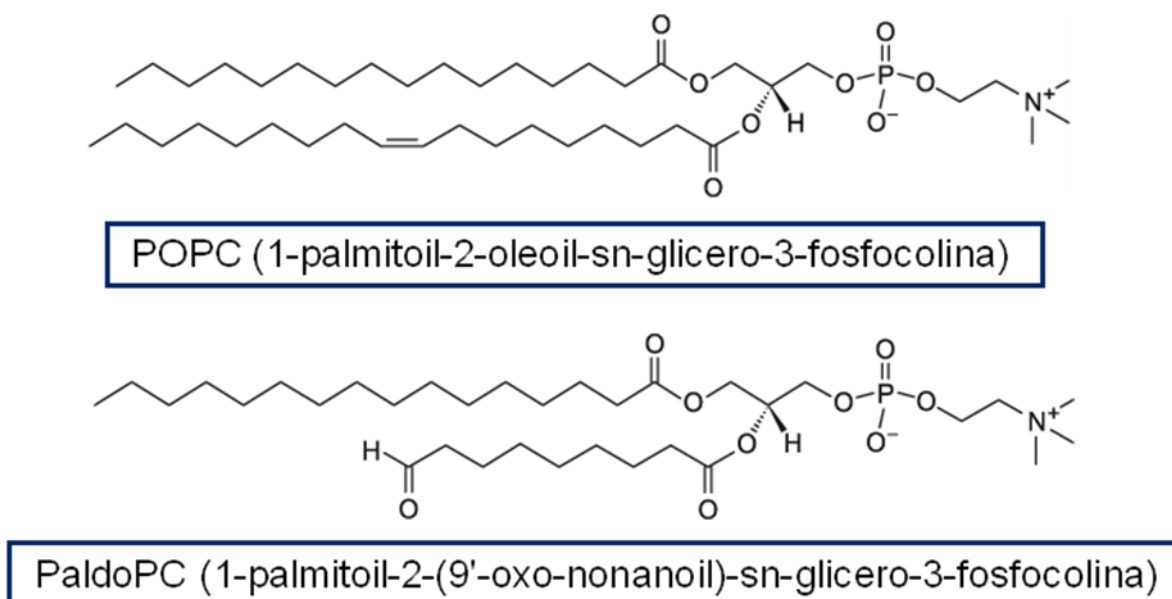


Figura 2. Estrutura química dos fosfolipídios derivados do surfactante. Fosfolipídios utilizados nos tratamentos de MA *in vitro* foram as fosfatidilcolinas POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), onde sua composição de ácido graxo se dá por uma cadeia saturada na posição sn-1 e uma cadeia insaturada na posição sn-2; e *PaldoPC* (1-palmitoil-2-(9'-oxo-nonanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina), onde sua composição de ácido graxo se dá por uma cadeia saturada na posição sn-1, e por uma oxidação no carbono 9 na posição sn-2.

4.6. Ensaio de citotoxicidade celular. O efeito citotóxico das PC (POPC e *PaldoPC*) nas células de linhagem AMJ2-C11 foi determinado de acordo com o método de Mosmann (MOSMANN, 1983). As células (1×10^5 células/poço) foram plaqueadas e incubadas por 18 h em placas de 96 poços (Kasvi, EUA), em 200 μ L de meio DMEM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e 5 mg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) (DMEM-C). Após esse período, o meio de cultura foi removido e substituído por DMEM-C (200 μ L com diluições de PC em várias concentrações (5, 50, 100, 200 nM). Em outros grupos, somente meio (DMEM-C) foi utilizado como controle negativo, e DMSO (30%) como controle positivo de citotoxicidade. Após 24 h de incubação, as placas foram centrifugadas a 400 g, 10°C, 5 min. E os sobrenadantes de cultura foram obtidos e armazenados a -20 °C, para posterior análises. As células foram incubadas com 150 μ L de DMEM-I e 10 μ L de MTT (5 mg/mL) (Sigma, EUA), por 3 h à 37°C. O teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio) avalia a viabilidade celular

verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, no qual ocorre a redução do MTT, de cor amarelada, a azul de formazana nas células viáveis, sendo sua absorbância diretamente proporcional ao número de células vivas presentes. Em seguida foi adicionado 50 µL de SDS 20% (Sigma, EUA) diluído em solução de HCl - 0,01M. A absorbância das culturas celulares foi obtida em 570 nm em leitor de placas (SpectraMax - Molecular Devices, EUA).

4.7. Polarização de MA, estimulação e tratamentos. Os AMJ2-C11 (5×10^5 células/poço) foram aderidos em placas de microcultivo de 24 poços (Kasvi, EUA), em meio DMEM-C, por 2 h à 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. A seguir, os MA foram polarizados para o perfil M1 com adição de IFN-γ (100 ng/mL) por 2 h ou para o perfil M2 com a adição de IL-4/IL-13 (10 ng/mL) por 24 h. Para obter MA não polarizados (M0), estes foram apenas aderidos e cultivados com DMEM-C por 24 h. Após a polarização ou não dos MA, os meios de cultura foram retirados, e os MA foram tratados com as PC (POPC e *Paldo*PC) diluídos em DMEM-C (1000 µL) em concentração de 2000 nM por 24 h, à 37 °C em 5% de CO₂. Após o tratamento, os MA foram estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) por mais 24 h, nas mesmas condições de cultura. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram obtidos e armazenados à -20°C para quantificação de mediadores inflamatórios solúveis.

4.8. Dosagem de mediadores proteicos por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os sobrenadantes de cultura dos MA obtidos anteriormente, foram utilizados para as dosagens das citocinas: TNF-α e IL-6; e quimiocinas: KC (CXCL1) e MCP-1 (CCL2) (R&D, EUA). Primeiramente, foram adicionados em placas de 96 poços de alta afinidade (Kasvi, EUA) os anticorpos monoclonais (primários) de captura (100 µL/poço), por 18 h à temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x + Tween 0,05% (200 µL/poço); e adicionado 200 µL de Tampão Bloqueio (PBS + BSA 1%) por 1 h. Após, as placas foram lavadas novamente, e 50 µL das amostras, ou curva padrão (diluição seriada em base 2) foram adicionados aos poços em duplicata e incubados por 2 h em temperatura ambiente. Após uma nova lavagem, os anticorpos de detecção (secundário) conjugado com biotina (R&D,

EUA) foram adicionados (100 μ L/poço), e a placa foi incubada novamente por 2 h. Após nova lavagem, foi adicionado aos poços a enzima peroxidase (100 μ L/poço) (R&D, EUA) e as placas foram incubadas por mais 20 min. Após esta etapa, as placas foram lavadas novamente e o substrato (OPD- Dicloridrato de o-fenilenodiamina) (Thermo Scientific Pierce, USA) diluído em água Milli-Q (100 μ L/poço) foi adicionado aos poços para a revelação colorimétrica. A reação da enzima com o substrato foi parada com a adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4 -1M). A leitura de absorbância foi feita em 450 nm em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax- Molecular Devices, EUA).

4.9. Dosagem de NO. A detecção de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura dos MA foi avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO^{2-}) através do método de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981), e com leitura de absorbância em 554 nm (SpectraMax - Molecular Devices, EUA). Brevemente, 50 μ L do sobrenadante de cultura foram misturados com volume igual do reagente Griess: NEED 0,1% (v/v) (Sigma, EUA) e Sulfanilamida 1% (v/v) (Sigma, EUA) em placa de 96 poços durante 5 min em temperatura ambiente. Uma curva padrão de nitrito (base 2) foi utilizada para cálculos das concentrações.

4.10. Análise quantitativa de prostaglandinas. MA ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram aderidos em placas de microcultivo de 24 poços (Kasvi, EUA), em meio DMEM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e 5 mg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) (DMEM-C), por 2 h à 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Após, os MA foram tratados com as PC (POPC e *Paldo*PC) diluídos em DMEM-C (1000 μ L) em concentração de 2000 nM por 24 h, à 37 °C em 5% de CO_2 . Após o tratamento, os MA foram estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) por mais 4 h, à 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram removidos, e as células foram tratadas com HBSS + Ca^{+} com Ionóforo de Cálcio (0,5 μ M) por 20 min, nas mesmas condições de cultura. Após, os sobrenadantes foram armazenados à -20°C para posterior quantificação de prostaglandinas.

a) Extração e purificação de lipídios. Foi realizada nos sobrenadantes de cultura empregando extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*, SPE) em cartucho de sílica C18, 500 mg (HyperSep™ -ThermoScientific, EUA). Para isso, foram eluídos pelo cartucho sequência de 4 mL de metanol (Merck, EUA) e 4 mL de água Milli-Q. Após esta preparação do cartucho, foi adicionado as amostras, seguido de lavagens do cartucho com água Milli-Q. Ao término desta etapa, foi adicionado metanol para recuperar a fração lipídica que estava adsorvida na fase sólida (C18) e coletados em tubos. Logo após, foi realizada a secagem do solvente em centrifuga à vácuo (Thermo Scientific Savant, EUA) em média de 4-5 horas, e a massa sólida contendo os lipídios polares foram recuperadas. Após a secagem, os lipídios foram dissolvidos em 50 µL de solução água/metanol (70:30 v/v) e armazenados à -80°C para posterior análise por HPLC-MS/MS.

b) Análise das PGs por HPLC-MS/MS. O método de HPLC-MS/MS para identificação e quantificação das PGs foi otimizado empregando uma coluna cromatográfica de fase estacionária C18 Ascentis EXPRESS (Supelco, UK) de dimensões 100 mm x 30 mm, 2,7 µm. O volume de 10 µL de amostra purificada (como descrito no item a) foi introduzido ao sistema com uso de um auto-injetor e a eluição da mesma foi realizada utilizando sistema de gradiente binário constituído de fase móvel “A” composta por água/acetonitrila/ácido acético (70:30:0,02, v/v/v) e fase “B” composta por acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), de acordo com o seguinte gradiente: 0% de B em 0 min, 15% de B em 2 min, 20% de B em 5 min, 35% de B em 8 min; 40% de B em 11 min; 100% de B em 15 min, 100% de B em 20 min, 0% B de em 21 min, mantendo esta proporção até 30 min com um fluxo de 0,6 mL/min. A fonte de ionização opera no modo negativo e os dados adquiridos são no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). As demais condições experimentais de operação do Espectrômetro de Massas (Triple-TOF 5.600 – Sciex, EUA) foram determinadas para melhor limite de quantificação (> 3 pg/µL). Os critérios adotados para a identificação de PGs incluem o tempo de retenção (Tr) e a transição de MRM. Após a identificação de um determinado prostanoide em uma dada amostra, a quantificação do mesmo foi realizada com base na área do pico correspondente no cromatograma de HPLC-MS/MS obtido no modo MRM em comparação com a curva

de calibração linear obtida para cada padrão nas diferentes amostras biológicas. O processamento dos dados foi pelo programa *Analyst*TM (Sciex, EUA), e a quantificação de cada PG foi realizada com o auxílio dos softwares *Peakview*TM (Sciex, EUA) e *Multiquant*TM (Sciex, EUA).

4.10. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Em macrófagos primários (por exemplo, macrófagos derivados de medula óssea), já é conhecido sua capacidade de plasticidade para fenótipos M1 e M2; que são distintos tanto em relação às funções no organismo, como também, pelas diferentes expressões gênicas de marcadores de fenótipos, receptores da imunidade inata e enzimas relacionadas ao metabolismo celular. No entanto, a padronização do processo de polarização de macrófagos de linhagem, como o AMJ2-C11, ainda não está descrita. Para os experimentos de qRT-PCR, 2×10^6 MA/poço foram plaqueados em DMEM-C em placas de 24 poços (Kasvi, EUA) para adesão por 2 h à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os MA foram polarizadas ou não (M0), para o perfil M1 ou M2 (como descritos no item 4.7) por 2, 6 e 24 h para avaliar a expressão de RNAm para marcadores de fenótipos M1 e M2. Em outro experimento, M0 foram tratados com as PC (POPC e *Paldo*PC) 200 nM diluídos em DMEM-I por 6 h à 37 °C em 5 % de CO₂, para análise de expressão de RNAm para marcadores de fenótipos de MA e receptores da imunidade inata. Após os tratamentos de MA *in vitro*, o sobrenadante foi retirado, e então acrescentado 300 µL da solução de lise (Tampão Lyser Buffer (Invitrogen) mais 1% de 2-mercaptoetanol para obtenção de RNA total. O RNA total foi extraído utilizando colunas de extração de RNA (Spin Cartridge), seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Califórnia - EUA), e então quantificado pelo Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific), no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - FCFRP- USP, da Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão. Para a síntese de cDNA utilizamos 1500 ng de RNA total, aplicando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Califórnia - EUA). A reação foi preparada adicionando 2,0 µL de RT buffer (10X); 0,8 µL de mix de dNTP (100 mM); 2,0 µL RT Randon Primers (10X); 1,0 µL de Transcriptase reversa; 4,2 µL de H₂O livre de Nuclease. Em seguida, a reação foi colocada no termociclador e

incubada seguindo as condições: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, e 85°C por 5 minutos. Por fim, utilizamos o método Taqman® (Applied Biosystems, Califórnia - EUA) e a reação de amplificação de cada gene foi constituída por cDNA *primers* específicos, sonda fluorescente específica e reagente MasterMix (Applied Biosystems - EUA). A expressão de genes Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*Gapdh*) e β -actina (*Actb*) foram analisados como genes constitutivos (*housekeeping*) cujos *primers* e sondas foram desenvolvidos utilizando o sistema PDAR (*Predevelopment TaqMan Assay Reagents*, Applied Biosystems). Para tanto, foi utilizado na reação 10 μ L de *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*; 1,0 μ L de sonda gene-específica; 0,7 μ L de cDNA e 8,3 μ L de H₂O livre de Nuclease para um volume final de 20 μ L, em equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City – EUA). A normalização dos genes estudados foi realizada utilizando a expressão relativa ($\Delta\Delta Ct$). Com esta técnica avaliamos a expressão do RNAm de *Arg1*, *Ym1*, *Stat6*, *Cxcl10*, *Nos2*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Cd14*, *Myd88*.

4.11. Ensaio de fagocitose de *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar a fagocitose de *K. pneumoniae*, primeiramente validamos a técnica quantitativa de análise de viabilidade de bactérias por metabolização de resazurina. Este método consiste na metabolização da resazurina, através de enzimas mitocondriais de células eucarióticas, ou de enzimas da respiração de procariotos (bactérias); formando um composto fluorescente denominado resorufina, como demonstrado na Figura 3. Primeiramente, foi feita uma solução de bactérias em PBS 1x estéril, seguido da leitura no espectrofotômetro em 600 nm (SpectraMax - Molecular Devices, EUA). Em seguida, colocamos na equação da reta (descrita no item 4.4) para sabermos o quanto teríamos de UFC inicial. Posteriormente, foram realizadas várias diluições em saponina, e então plaqueadas em placas de 96 poços (Kasvi, EUA), juntamente com 90 μ L de meio BHI (Acumedia, 7116A) e 10 μ L da solução de resazurina (10 mg/mL). A placa foi incubada por 3 horas no escuro à 37 °C com 5% de CO₂. Após, obteve-se a equação da reta entre o número de UFC com Média da Intensidade de Fluorescência (MIF), como pode ser visto na figura abaixo. A Figura 3A, estão representadas em colunas o número de UFC x MIF, e a Figura 3B representa a linearidade do método e os limites de detecção.

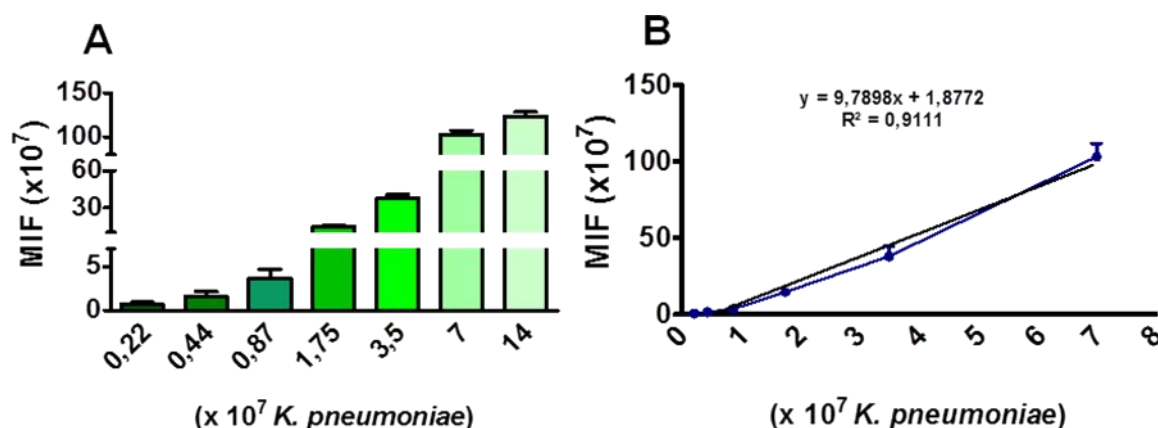


Figura 3. Padronização da técnica da contagem de UFCs de *Klebsiella pneumoniae* pela técnica de resazurina. A partir de uma suspensão conhecida de *K. pneumoniae*, foi realizada uma diluição de base 10, e em seguida várias diluições na base 2. Assim, as bactérias foram plaqueadas em placas de 96 poços, com BHI e resazurina, e incubadas por 3 h. Após foi determinada a fluorescência da resazurina em espectrofotômetro (560 nm de emissão/590 nm de excitação) (SpectraMax-Molecular Devices, EUA). **(A)**. Representação em colunas o número de UFC x MIF **(B)**. Representação da linearidade do método e dos limites de detecção.

Posteriormente, 1×10^5 MA/poço foram aderidos em placas de 96 poços (Kasvi, EUA) em meio DMEM-C, durante 18 h à 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, utilizando a equação da reta descrita no item 4.3, foram quantificadas as quantidades de bactérias na solução principal (colônias isoladas de *K.pneumoniae* ressuspensas em DMEM-I sem antibiótico), e foram adicionadas nas culturas de MA quantidades conhecidas de bactérias, para MOI de 100:1, 50:1, 10:1 e 5:1 (bactérias:macrófago). Os tempos de fagocitose analisados foram de 15, 30, 60, 120 e 240 min. Em outros experimentos, MA foram tratados com as PC (POPC e *Paldo*PC – 2000 nM) por 24 h em meio DMEM-I. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado *K. pneumoniae* aos poços de cultura no MOI de 50:1 (bactérias:macrófago) em meio DMEM-I sem antibiótico por 120 min. Após o período de fagocitose, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x (estéril), para remoção das bactérias não fagocitadas. Logo em seguida, foram adicionados 200 µL de saponina 0,05% (m/v) (Sigma, EUA) para fazer a lise dos MA. Então, foram retirados 100 µL desta solução para realizar o plaqueamento em meio Mueller Hilton (Acumedia, EUA) e contagem de UFC; como controle interno experimental. Nos poços de cultura com o restante de sobrenadante, foram adicionados 90 µL de meio BHI (Acumedia, EUA) e 10 µL

da solução de resazurina (10 mg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas por 3 h à 37°C com 5% de CO₂. A leitura da metabolização da resazurina foi realizada por detecção de fluorescência em 560 nm de emissão e 590 nm de excitação (SpectraMax - Molecular Devices, EUA). O índice fagocítico (IF) foi determinado pela fórmula:

IF = MIF de bactérias fagocitadas com tratamento x 100 / pela média do MIF de bactérias fagocitadas sem tratamento.

Após, foi calculado a porcentagem da fagocitose, levando em conta que a intensidade de fluorescência das bactérias fagocitadas sem tratamento (controle) seria considerada como 100%, e os tratamentos representariam a variação da porcentagem em relação ao grupo controle.

4.12. Análise estatística. Foi utilizado o teste ANOVA (não paramétrico) seguido de Tukey para comparações múltiplas. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPadPrism® (versão 5.00 para Windows).

4.13. Soluções e Meios utilizados nos procedimentos experimentais.

- BHI (BD)

BHI (Brain Heart Infusion) 3, 7 g
Água destilada ou Milli-Q q.s.p 500 mL

- MacConkey – (Himedia – 081 – 500g)

MacConkey 51,5 g
Água destilada ou Milli-Q q.s.p 1 L

- Mueller Hinton – (Acumedia – 7101A – 500g)

Mueller Hinton 38 g
Água destilada ou Milli-Q q.s.p 1 L

- Solução PBS (Solução 10x concentrada)

NaCl	80 g
KCL	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
H ₂ O Milli-Q (q.s.p)	1000 mL
Solução de uso: PBS 1x - Diluir 1:10	

- Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco)

- Solução de Saponina 0,05% (Sigma)

0,05 g/100 mL em Água Milli-Q. Depois filtrar.

- Solução de Resazurina (Sigma)

10 mg/mL em Água Milli-Q. Depois diluir 1:20 em PBS 1x.

- Solução de Lise

Tampão Lyser Buffer (Invitrogen) mais 1% de 2-mercaptoetanol

- MTT (Corante) (Sigma Aldrich)

MTT	100 mg
PBS (1x) estéril	20 mL

- Meio de Cultura DMEM-I

Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA)

- Meio de Cultura DMEM-C

Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA)

10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco)

5 mg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA)