



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

IMPACTO DA EFEROCITOSE NA FAGOCITOSE E ATIVIDADE MICROBICIDA
VIA RECEPTORES “SCAVENGER” EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES
PAPEL DE PROSTAGLANDINA E₂

Dissertação de Mestrado

TAÍS PICOLO DE SOUZA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Araraquara

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

IMPACTO DA EFEROCITOSE NA FAGOCITOSE E ATIVIDADE MICROBICIDA
VIA RECEPTORES “SCAVENGER” EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES
PAPEL DE PROSTAGLANDINA E₂

TAÍS PICOLO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Imunologia Básica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Araraquara

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S719o Souza, Taís Picolo de
O Impacto da eferocitose na fagocitose e atividade microbicida via receptores "scavenger" em macrófagos alveolares - Papel da Prostaglandina E2 / Taís Picolo de Souza. – Araraquara, 2013
67 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Alexandra Ivo de Medeiros

1. Macrófago alveolar. 2. Células apoptóticas. 3. Receptor scavenger, Prostaglandina E2. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*Dedico esse trabalho aos meus pais Isidoro e Cristiane e à
minha avó Dirce os quais por toda a vida batalharam para
realização de todos os meus sonhos.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me fortalecer até conquistar meu ideal, por amparar e acalmar meu coração nos momentos turbulentos.

Agradeço aos meus pais, irmão e avó tão queridos e amados que sempre me acalmaram com palavras sábias e gestos doces nos momentos de desespero, angústia, nervosismo e irritação.

Agradeço da mesma maneira meu amigo, companheiro e noivo Cristiano que de modo afável ajudou-me principalmente nos momentos de angústia e nervosismo, além de cooperar com a tomada de decisões difíceis.

Às amigas Thaís e Heloísa agradeço em particular pela companhia nos momentos difíceis que passei e pela grande participação que tiveram e ainda tem em minha vida.

Aos demais amigos, pelo convívio e pelas horas de diversão e descontração.

Aos amigos de laboratório, Ana, Fernandinha, Felipe, Mandy, Naiara, Vicky agradeço a todos pela boa convivência e pela ajuda quando precisei.

Agradeço a nossa técnica “mãe Valéria” que sempre nos proporcionou ótimos momentos contando suas piadas ou até mesmo suas histórias, seja na hora do café, do almoço, ou trabalhando, além de nos ajudar muito cuidando de nossas células ou ratas para aproveitarmos o feriadão.

À Prof^a Dr^a Alexandra, pela grande oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos valiosos e pela vivência acadêmica.

À FCF-UNESP, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Abstract | 11 |
| Resumo | 12 |
| Receptores e ligantes associados a eferocitose | 14 |
| O Impacto de Células Apoptóticas na Resposta Imune | 16 |
| Mecanismos de Ação e Sinalização Dependente de Prostaglandinas..... | 18 |
| Envolvimento de PGE ₂ no Aumento da Suscetibilidade a Infecções..... | 21 |
| Receptor <i>scavenger</i> na infecção por <i>S. pneumoniae</i> | 22 |
| Injúria Pulmonar e PGE ₂ | 23 |
| 1. Objetivo Geral | 25 |
| Objetivos específicos | 25 |
| Hipótese de Estudo e Resultados Esperados..... | 26 |
| 3. Material e Métodos..... | 27 |
| Animais | 27 |
| Isolamento e cultura de AMs | 27 |
| Indução de apoptose celular..... | 27 |
| Padronização da curva de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> | 28 |
| Ensaio de fagocitose mediada por receptor <i>scavenger</i> | 29 |
| Avaliação da atividade microbicida através a recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) | 32 |
| Análise estatística | 32 |
| Delineamento Experimental | 33 |
| 4. Resultados | 34 |
| Validação da conjugação do <i>S. pneumoniae</i> com FITC | 34 |
| Efeito da eferocitose por AMs na fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> | 36 |

| | |
|---|-----------|
| PGE ₂ promove a supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose via EP2/adenilil ciclase/cAMP e independente de PKA. | 38 |
| Avaliação dos receptores <i>scavenger</i> envolvidos na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose..... | 44 |
| Efeito da eferocitose e o envolvimento de PGE ₂ endógena no crescimento de <i>S. pneumoniae</i> em AMs..... | 48 |
| 5. Discussão | 54 |
| 6. Conclusões..... | 59 |
| 7. Referências Bibliográficas | 60 |
| Capítulo 2 | 64 |
| Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para utilização de animais..... | 65 |
| Anexo II | 67 |
| Comprovante de submissão de artigo científico. | 67 |

Lista de Ilustrações

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fagocitose de células apoptóticas..... | 15 |
| Figura 2. Vias de sinalização de receptores de prostaglandina E2 - EP1, EP2, EP3 e EP4..... | 20 |
| Figura 3. Hipótese e Resultados Esperados..... | 26 |
| Figura 4. Padronização da curva de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> (ATCC 49619)..... | 28 |
| Figura 5. Efeito do Azul de Trypan no “quench” de <i>S. pneumoniae</i> ^{+FITC} em ensaio de microplaca | 31 |
| Figura 6. Conjugação de <i>S. pneumoniae</i> com FITC..... | 35 |
| Figura 7. Efeito da eferocitose na fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> | 37 |
| Figura 8. Envolvimento de PGE ₂ na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose..... | 41 |
| Figura 9. PGE ₂ promove a supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs via receptor EP2. | 42 |
| Figura 10. Envolvimento da molécula de PKA na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose..... | 43 |
| Figura 11. Avaliação dos receptores <i>scavenger</i> envolvidos na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose..... | 46 |
| Figura 12. Avaliação dos receptores <i>scavenger</i> (SR-A e SR-B) envolvidos na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por AMs no contexto de eferocitose..... | 47 |
| Figura 13. Efeito da eferocitose em AMs na recuperação de UFC de <i>S. pneumoniae</i> | 49 |
| Figura 14. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de <i>S. pneumoniae</i> utilizando bloqueadores de receptores <i>scavengers</i> | 51 |
| Figura 15. Eferocitose por AMs suprime a atividade microbicida contra <i>S. pneumoniae</i> via PGE ₂ /EP2 | 53 |

Abreviaturas

AA – Ácido Araquidônico

AC – *Apoptotic cells*

ATP – Adenosina trifosfato

BAI 1 – *Brain-specific angiogenesis inhibitor*

cAMP– Adenosil Monofosfato Cíclico

cPLA₂– Fosfolipase A₂ Citoplasmática

CPT – Camptotecina

CR – Receptor de Complemento

CREB – *cAMP response element binding protein*

D.O.– Densidade Ótica

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EP – *Prostaglandin E Receptors*

Epac– *Exchange protein directly activated by cAMP*

Ex/Em – Excitação/ Emissão

FcR– Receptores da porção Fc

FcγR– Receptores da porção Fc de IgG

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate*

GEF – *Guanine nucleotide-exchange factors*

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IFN-γ – Interferon gama

IgG– Imunoglobulina G

IL – Interleucina

Indo – Indometacina

LPS – Lipopolissacarídeo

LTC₄– Leucotrieno C₄

AM– *Alveolar macrophages*

MOI – *Multiplicity of infection*

oxLDL–*Oxidized low-density lipoprotein*

PGE₂– Prostaglandina E₂

PKA – Proteína Quinase A

PKAi– Inibidor de Proteína Quinase A

PLA₂– Fosfolipase A₂

PRR – *Pattern recognition receptors*

PS – *Phosphatidylserine*

PSR – *Phosphatidyl serine receptor*

RBC -IgG– *Red Blood Cell-Immunoglobulin G*

ROI – *Reactive Oxygen Intermediates*

SBF – Soro BovinoFetal

Sp– *Streptococcus pneumoniae*

SR – *Scavenger receptor*

SSRA – Síndrome do Estresse Respiratório Agudo

TIM -4 – *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-4*

TGF-β – *Transforming Growth Factor-β*

TNF-α – *Tumor necrosis factor-α*

TLR – *Toll-like receptor*

UAF – Unidade Arbitrária de Fluorescência

UFC – Unidade Formadora de Colônia

Abstract

The scavenger receptors (SR) are the major receptors involved in the *Streptococcus pneumoniae* phagocytosis by alveolar macrophages (AMs) that act as the first line of defense in the lung. The increase of susceptibility to bacterial infections has been demonstrated in chronic inflammatory pulmonary disease in which there is an intense accumulation of apoptotic cells (ACs). Our hypothesis is that the uptake of ACs by macrophages could suppress immune responses by releasing anti-inflammatory mediators, such as TGF- β and PGE₂. However, the way in which PGE₂ suppress the effector mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* by SR in alveolar macrophages is unclear. We found that the pre-incubation with AC inhibited the ingestion and killing of *S. pneumoniae* by AMs. The inhibition of *S. pneumoniae* phagocytosis by efferocytosis was partially reverted when endogenous PGE₂ production was repressed with a COX inhibitor, EP2 antagonist and likewise with an adenylate cyclase inhibitor. However, this suppressive effect was PKA independent. Moreover, we demonstrated that the inhibition of *S. pneumoniae* phagocytosis by efferocytosis was more pronounced in scavenger receptors class B (SR-B). Thus, we suggest that the presence of ACs in the lungs of patients with COPD could trigger the synthesis of PGE₂ and promote the suppression of effector functions of AMs against bacterial infections, such as *S. pneumoniae*. Therefore, treatment with COX inhibitors, concomitant-microbial therapy, could lead to an improvement in the immunosuppression triggered by the action of PGE₂ in the lung microenvironment and thus restoration of effector functions of AMs.

Resumo

Os receptores *scavenger* (SR) são os principais receptores de reconhecimento padrão (PRR) envolvidos na fagocitose de *Streptococcus pneumoniae* por macrófagos alveolares (AMs), células estas consideradas a primeira linha de defesa no pulmão. Sabe-se que indivíduos acometidos por doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) são susceptíveis a infecções bacterianas recorrentes e apresentam um intenso acúmulo de células apoptóticas (ACs) no parênquima pulmonar. A hipótese deste estudo fundamenta-se em que o acúmulo de ACs e a fagocitose destas por AMs poderia suprimir as funções efetoras destas células, através da liberação de mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF- β e PGE₂. No entanto, nada se sabe quanto aos mecanismos pelos quais PGE₂ poderia suprimir esses mecanismos efetores de macrófagos alveolares contra *S. pneumoniae*, via SR. Nossos resultados demonstram que a presença de ACs promove a inibição da fagocitose e a atividade microbicida de AMs contra *S. pneumoniae*. A inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* mediada pela eferocitose foi revertida pela inibição da síntese de PGE₂ endógena, assim como pelo tratamento com antagonistas de EP2 e pela inibição da enzima adenililciclase. No entanto, estes efeitos supressores de PGE₂ decorrentes da eferocitose por AMs foram independentes da ação de PKA. Desta forma, podemos sugerir que a presença de ACs no pulmão de indivíduos com DPOC poderia desencadear a síntese exacerbada de PGE₂ e contribuir na supressão das funções efectoras de AMs contra infecções bacterianas, como *S. pneumoniae*. Portanto, o tratamento com inibidores da COX, concomitante à terapia antimicrobiana, poderia levar a uma melhora no quadro de imunossupressão desencadeado pela ação de PGE₂ no microambiente pulmonar e, portanto, restauração das funções efectoras de AMs.

Capítulo 1

1. Introdução

Receptores e ligantes associados a eferocitose

A apoptose, ou morte celular programada, é essencial para o controle do crescimento, diferenciação e manutenção da homeostase do tecido (Wyllie *et al.*, 1980; Schmidt e Tuder, 2010). A eliminação de células e corpos apoptóticos por fagócitos, denominado eferocitose, representa um mecanismo pelo qual se previne a exposição de componentes intracelulares visando manter a homeostase e solucionar respostas inflamatórias nos tecidos (Inoue *et al.*, 2012; Schmidt e Tuder, 2010; Donnelly e Barnes, 2012).

O processo de remoção de células apoptóticas por fagócitos envolve múltiplos receptores, adaptadores e moléculas quimiotáticas (Fadok 2003; Grimsley and Ravichandran 2003) (Figura 1). Dentre as mudanças na superfície das células apoptóticas que facilitam a interação e o reconhecimento destas por fagócitos, a melhor caracterizada é a perda da assimetria de fosfolipídios de membrana. Essa assimetria resulta na inversão da fosfatidilserina (*PS - phosphatidylserine*) do interior para o exterior da bicamada lipídica, um evento que ocorre logo no início do processo apoptótico e parece ser crucial para a eferocitose por fagócitos (Fadok *et al.*, 1998b; Fadok *et al.*, 1992; Schlegel e Williamson, 2001; Gardai *et al.*, 2006). Várias moléculas solúveis podem facilitar a interação com receptores expressos na superfície de fagócitos com a *PS* exposta em células apoptóticas. Dentre estas tem-se descrito proteína S – proteína plasmática dependente de vitamina K (Anderson, Maylock *et al.* 2003), trombospondina (Savill, Hogg *et al.* 1992).

A exposição de *PS* na porção externa da membrana celular é o principal sinal que permite o reconhecimento da célula apoptótica por vários receptores presentes na superfície de fagócitos dentre eles receptor que reconhecem diretamente ou indiretamente *PS* (Hoffmann, deCathelineau *et al.* 2001).

Dentre os receptores presentes na superfície de fagócitos que estão envolvidos no reconhecimento direto de *PS* em células apoptóticas tem-se descrito TIM-4 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-4*) (Miyanishi, Tada et al. 2007) e as moléculas *BAl1* (*Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*) (Park, Tosello-Tramont et al. 2007) e *stabilin-2* (Park, Jung et al. 2008) todos expressos em macrófagos e células dendríticas. Por outro lado, dentre os receptores que interagem indiretamente com *PS* foram descritos, receptor *scavenger* (CD36) através da interação de *PS* associados à proteína oxLDL (*oxidized low-density lipoprotein*) (Platt, Suzuki et al. 1996; Todt, Hu et al. 2008), receptor de vitronectina ($V\alpha\beta3$) utilizando trombospondina como proteína ligante (Savill, Dransfield et al. 1990), CD14 (Devitt, Moffatt et al. 1998) e os receptores de proteínas do sistema complemento – CR3 e CR4 (Mevorach, Mascarenhas et al. 1998).

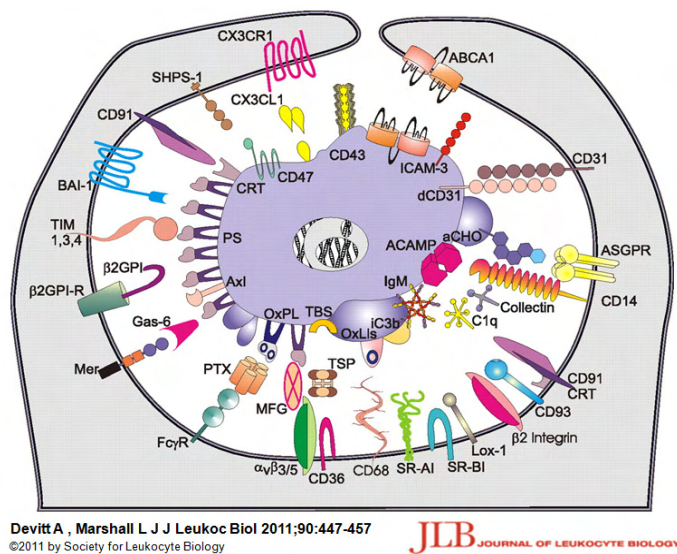


Figura 1. Fagocitose de células apoptóticas. Receptores de superfície em fagócitos, ligantes solúveis e modificações moleculares expressos na membrana celular de células apoptóticas.

O Impacto de Células Apoptóticas na Resposta Imune

A eferocitose resulta na supressão da resposta imune através da liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β , prostaglandina E₂ (PGE₂), assim como inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12, IL-1 β , IL-18 e LTC₄ (Fadok, Bratton et al. 1998; Kim, Chung et al. 2005; Medeiros, Serezani et al. 2009). Sabe-se que a interação de macrófagos com células apoptóticas via receptor de vitronectina (V α β 3) e receptor *scavenger* (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000) e ou receptores que interagem com *PS* (Henson, Bratton et al. 2001; Freire-de-Lima, Xiao et al. 2006) induz a síntese de PGE₂ e TGF- β , sendo estes mediadores sabidamente conhecidos como supressores da resposta imune. As células apoptóticas podem também desempenhar um efeito pró-inflamatório após a interação com receptores *toll-like* (*TLR*) favorecendo o aparecimento de doenças autoimunes, como por exemplo, o Lúpus Eritematoso Sistêmico (*SLE*) (Barber 2011). No entanto, existem relatos na literatura que sugerem a regulação da inflamação e autoimunidade pelo *clearance* de células apoptóticas mediado por TLR-2. (de Freitas, Banerjee et al. 2012)

O impacto da imunossupressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas tem sido demonstrado em diferentes modelos de infecção e processos inflamatórios. No modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* (Lopes, da Veiga et al. 1995) foi demonstrado previamente que há uma intensa apoptose de linfócitos durante o curso da infecção. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados promove a proliferação descontrolada do parasito de maneira dependente de PGE₂, TGF- β e poliaminas. Uma única injeção de células apoptóticas em camundongos previamente infectados com *T. cruzi* foi capaz de aumentar a parasitemia nestes animais. Além disso, o tratamento destes com inibidores de PGs como, indometacina, aspirina e NS398, aboliram a

parasitemia nestes animais (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000). O efeito anti-inflamatório da eferocitose foi também comprovado *in vivo*, utilizando um modelo de inflamação pulmonar induzida por endotoxina, através da instilação de células apoptóticas (Vandivier et al., 2006).

Sabe-se que durante a fase aguda das infecções há um grande acúmulo de células apoptóticas no tecido afetado [revisado em (Chung, Kim et al. 2006)]. PGE₂, por sua vez, é um importante mediador envolvido na imunossupressão e no aumento da suscetibilidade a infecções (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000; Aronoff, Canetti et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005; Serezani 2007). Desta forma, os estudos referentes aos receptores e sinais moleculares desencadeados por PGE₂ na supressão da resposta imune induzido por células apoptóticas são de grande relevância para o entendimento da participação de eicosanóides como moduladores da resposta imune. Recentemente, nosso grupo de pesquisa (Medeiros, Serezani et al. 2009) demonstrou que a pré-incubação de macrófagos alveolares (AMs) com células apoptóticas resulta na inibição da fagocitose mediada por receptores *Fc* de maneira tempo-dependente e proporção de células apoptóticas. Além disso, nós demonstramos *in vitro* que o efeito supressor de células apoptóticas na fagocitose e na atividade microbicida em AMs é mediado por cicloxigenase/PGE₂/receptor EP2/cAMP. A participação de PGs foi confirmada através do pré-tratamento de AMs com inibidores de COX e de adenilil ciclase resultando na reversão da inibição da atividade fagocítica e microbicida por AMs induzida por células apoptóticas. Além disso, AMs obtidos de animais deficientes do receptor para EP2 (EP2^{-/-}) foram capazes de reverter a inibição da fagocitose de IgG-RBC induzida por células apoptóticas. O papel supressor de PGE₂, induzido pela eferocitose por AMs, foi confirmado *in vivo* através da instilação de animais com células apoptóticas. A prévia instilação de células apoptóticas seguido do desafio com *Streptococcus pneumoniae* resultou na proliferação e disseminação para a corrente sanguínea da bactéria. Esse efeito supressor foi revertido em

animais deficientes do receptor de PGE₂, EP2 (Medeiros, Serezani et al. 2009). Visto que estes camundongos não possuem anticorpos pré-existentes contra *S. pneumoniae* os resultados obtidos *in vivo* sugerem que PGE₂, parece exercer um importante papel na supressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas. Esse efeito supressor de PGE₂ parece ser efetivo não apenas em alvos opsonizados por IgG, mas também na modulação da função efetora de fagócitos através de outros receptores, como receptor *scavenger* e/ou TLR-2 (*Toll-like receptor -2*), considerados de fundamental importância na interação fagócitos-bactérias Gram-positivas.

Mecanismos de Ação e Sinalização Dependente de Prostaglandinas

Dentre os prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos), PGE₂ é o um dos principais mediadores lipídicos inflamatórios envolvido na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (McCoy, Wicks et al. 2002). Esse lipídio é gerado a partir da ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que leva a liberação do ácido araquidônico (AA) que pode ser metabolizado pelas cicloxigenases (COX). Existem duas isoformas de COX, COX-1 que é constitutiva e COX-2 que é induzida e expressa em baixos níveis em células não ativadas. O aumento da expressão de COX-2 ocorre em situações de estresse como processos inflamatórios ou infecciosos. As principais células responsáveis pela síntese de PGE₂ no pulmão são AECs (*Alveolar Epithelial Cell*) (Chauncey, Peters-Golden et al. 1988), macrófagos (Wilborn, DeWitt et al. 1995), e fibroblastos (Wilborn, Crofford et al. 1995). Dentre as PGs, a PGE₂, gerada a partir da ação de PGE₂ sintase, é um dos principais mediadores lipídicos sintetizados por macrófagos e outros diferentes tipos celulares na presença de LPS (Brock, McNish et al. 2003). Além da atividade edematogênica das prostaglandinas, a PGE₂ pode agir indiretamente na modulação da síntese de diferentes

citocinas e quimiocinas (Gualde and Harizi 2004; Sugimoto, Fukada et al. 2005). Apesar da vasta literatura correlacionando PGE₂ como um importante mediador inflamatório nos processos inflamatórios agudos e crônicos, o potencial anti-inflamatório deste prostanóide vem sendo descrito em diferentes modelos experimentais (Tilley, Coffman et al. 2001; Serezani, Kane et al. 2012). PGE₂ inibe a migração de leucócitos (Armstrong 1995), geração de O₂⁻ (McLeish, Stelzer et al. 1987; Aronoff, Canetti et al. 2005), síntese de leucotrienos (Christman, Christman et al. 1993; Aronoff, Canetti et al. 2005) e de várias citocinas, entre elas IL-12 (Iwasaki, Noguchi et al. 2003), IFN- γ (Betz and Fox 1991) e TNF- α (Kunkel, Spengler et al. 1988; Aronoff, Canetti et al. 2005). Além disso, PGE₂ aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Shinomiya, Naraba et al. 2001).

Sabe-se que esse efeito antagônico de PGE₂ está diretamente relacionado ao tipo de receptor expresso na superfície dos diferentes tipos celulares. Atualmente são conhecidas quatro classes de receptores EP (*Prostaglandin E Receptors*), os quais são acoplados à proteína G (Figura 2). EP1 é acoplado à G_q, que resulta no aumento de Ca²⁺ intracelular. EP3 é acoplado à G_i, cuja ativação leva à diminuição de cAMP. EP2 e EP4 são acoplados à G_s, resultando no aumento de cAMP intracelular. Vários trabalhos têm demonstrado que o caráter supressor da PGE₂ deve-se ao aumento da cAMP, como resultado da interação com os receptores EP2 e/ou EP4 (Breyer, Bagdassarian et al. 2001; Nataraj, Thomas et al. 2001; Aronoff, Canetti et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005).

Os receptores EP2 e EP4 requerem diferentes concentrações de PGE₂ devido a sua baixa ou alta afinidade respectivamente, para exercer seu efeito supressor, em AMs por exemplo. Por outro lado, EP1 apresenta uma menor afinidade à PGE₂ quando comparado ao EP3 com maior afinidade, de modo que em diferentes tipos celulares favorece no aparecimento de doenças crônicas e autoimunes. (Kalinski 2012). Em contra partida o envolvimento de PGE₂ na imunidade adaptativa vem sendo desvendado nos últimos anos e

diferente dos efeitos supressores descritos na ativação de células T “naive” (Betz 1991; Baratelli 2005; Kalinski 2012) recentes trabalhos demonstram uma importante função imunoestimuladora desse mediador lipídico no desenvolvimento de células T produtoras de IL-17 em vários modelos de infecção e autoimunidade. (Yao, Sakata et al. 2009; Kalinski 2012)

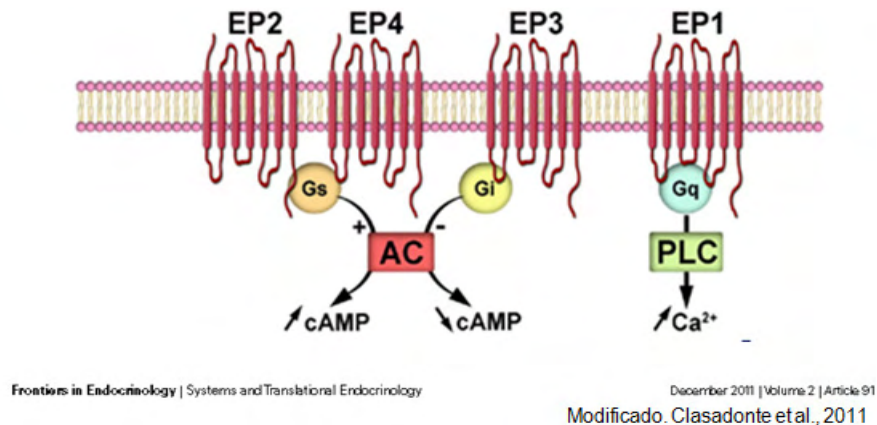


Figura 2. Vias de sinalização de receptores de prostaglandina E2 - EP1, EP2, EP3 e EP4

Classicamente, a via de sinalização intracelular do cAMP envolve a ativação imediata da proteína quinase dependente de cAMP ou PKA (*protein kinase A*), que fosforila alvos subsequentes como o CREB (*cAMP response element binding protein*). No entanto, outros alvos envolvidos na sinalização do cAMP que afetam as funções celulares independentemente de PKA têm sido descritos. Dentre eles a proteína Epac-1 e 2 (*Exchange protein directly activated by cAMP*) (Kawasaki, Springett et al. 1998). Epac-1 é conhecida como uma importante GEF (*guanine nucleotide-exchange factors*) capaz de tornar Rap1-GDP, uma *small GTPase* da família Ras, na forma ativa Rap1-GTP. A ativação de Rap1-GTP promove a ativação de MEK e ERK. PKA e Epac-1 podem co-existir no interior de um mesmo tipo celular, e suas ações podem ser antagônicas, sinérgicas ou de importância única dependendo da função efetora (Aronoff, Canetti et al. 2005). Entretanto, os estudos relacionados a essas moléculas sinalizadoras nas funções efetoras de fagócitos ainda são incipientes. Recentemente, Peters-Golden e colaboradores demonstraram que os efeitos supressores da

PGE₂ em AMs são distintamente regulados por PKA (que inibe a síntese de citocina e atividade microbica) e Epac-1 que inibe a fagocitose de alvos opsonizados por IgG e também atividade microbica (Aronoff, Canetti et al. 2005). No entanto, até o momento nada se sabe sobre o papel de PGE₂ na modulação da cascata de sinalização induzida por receptores *scavenger*, especificamente os de classe A (SR-A I/ II e MARCO), descritos como os principais receptores envolvidos na fagocitose de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*.

Envolvimento de PGE₂ no Aumento da Suscetibilidade a Infecções.

A produção exacerbada de PGE₂ normalmente está associada ao aumento de suscetibilidade às infecções bacterianas, que acometem os indivíduos infectados por HIV (Azzam, Kedzierska et al. 2006), desnutridos (Redmond, Shou et al. 1991), ou submetidos a transplante de órgão (Ballinger, Aronoff et al. 2006). PGE₂ inibe muitos aspectos funcionais de macrófagos e neutrófilos atuando diretamente nos mecanismos de defesa antimicrobiana no pulmão (Greenberger, Strieter et al. 1995). Esse efeito pode ser evidenciado pela administração de inibidores de COX em modelos experimentais de infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. O tratamento destes animais infectados com inibidor de COX resultou numa drástica diminuição da carga bacteriana e aumento da sobrevivência dos animais (Campanile, Giampietri et al. 1993). Aronoff *et al.* (2004) demonstraram que PGE₂, produzida por AMs, foi capaz de inibir a fagocitose de bactérias mediada pelo receptor *Fc*. Esta ação imunossupressora é mediada pelo aumento nos níveis de cAMP através da interação de PGE₂ ao receptor EP2 e consequente ativação da Epac-1. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que tanto PGE₂ endógena quanto exógena suprime a capacidade microbica de AMs infectados com *Klebsiella pneumoniae* opsonizada com IgG. A inibição da atividade

microbicida por PGE₂ é mediado por EP2 e EP4 através da inibição da ativação de NADPHox e geração de ROI (*reactive oxygen intermediate*) (Serezani 2007).

A fagocitose via IgG é uma das principais vias de reconhecimento do patógeno na resposta contra agentes microbianos. No entanto, outros receptores como TLR, receptor de complemento e receptores *scavenger* são de fundamental importância no reconhecimento de microrganismos durante a resposta imune inata. A fagocitose via receptor *Fc* é uma das vias extensivamente estudada quando a sinalização intracelular, especialmente quanto ao papel supressor de PGE₂. No entanto, poucos trabalhos descrevem o papel de PGE₂ na infecção pulmonar por *S. pneumoniae*. Sabe-se que, dentre as toxinas secretadas por *S. pneumoniae*, a pneumolisina é um dos principais fatores de virulência capaz não apenas de promover a formação de poros na membrana celular, mas também de suprimir a resposta imune do hospedeiro através da indução de apoptose, induzir uma intensa reação inflamatória (Marriott, Mitchell et al. 2008) assim como induzir a secreção de PGE₂ (Cockeran, Steel et al. 2001). Além disso, a infecção pulmonar por *S. pneumoniae* induz o aumento da expressão de COX-2 resultando no aumento de PGE₂ (Szymanski *et al.*, 2012). No entanto, até o momento, poucos estudos descrevem o impacto de PGE₂ na modulação da função efetora de fagócitos na infecção por *S. pneumoniae* via receptor *scavenger*.

Receptor *scavenger* na infecção por *S. pneumoniae*

As infecções do trato respiratório inferior lideram entre as principais causas morte de infecções no mundo (Murray and Lopez 1997), principalmente àquelas causadas por bactérias Gram-positivas, como pneumonia por *S. pneumoniae* (Paterson e Orihuela, 2010; Dominis-Kramarić et al., 2011; Jeong et al., 2011). Os AMs são uma das principais células envolvidas nos mecanismos de defesa contra microrganismos no pulmão. Num processo infeccioso estas

células fagocitam os microrganismos resultando na ativação e liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Laskin and Laskin 2001).

Dentre os receptores expressos na superfície de AM, tem-se descrito aqueles que interagem com a porção *Fc* da IgG ($Fc\gamma R$, denominado FcR), envolvido na fagocitose de microrganismos opsonizados, o receptor de complemento (Greenberg and Grinstein 2002), receptor de manose, receptores *Toll-like* (TLR) e o receptor *scavenger* (SR) também envolvidos na fagocitose de microrganismos não opsonizados (Platt, Haworth et al. 2002). Os receptores *Fc* ($Fc\gamma R$) são capazes de mediar a ingestão de microrganismos opsonizados com IgG, porém esta interação *in vivo*, não ocorre durante a resposta imune inata exceto mediante a presença de anticorpos pré-existentes de um prévio contato com o patógeno. Além disso, o CR é expresso em baixa densidade na superfície de AM, especialmente em ratos (Berger, Norvell et al. 1994). Neste contexto, os receptores *scavenger*, expressos tanto na superfície de células dendríticas como de macrófagos, possuem um importante papel na interação parasita-hospedeiro na fase inicial da infecção. Mas, especificamente em AMs, os receptores *scavenger* possuem um papel crítico na ligação e captura de diferentes bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como com seus respectivos componentes de parede celular, LPS e ácido lipoteicóico (ALT). Dentre os receptores *scavenger* existentes, os SR-A I e II (SR-A I, SR-A II e MARCO) e SR-B I e II (SR-B I e SR-B II ou CD36 e CD 163) são os principais envolvidos no reconhecimento de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae* (Rennemeier, Hammerschmidt et al. 2007).

Injúria Pulmonar e PGE₂

Sabe-se que a apoptose de células da parede dos alvéolos ocorre em grande escala na Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) associada a um aumento na suscetibilidade a

infecções bacterianas no trato respiratório. Como descrito anteriormente, a interação e fagocitose de células apoptóticas resulta na liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF- β e PGE₂ (Chung, Kim et al. 2006). Apesar de PGE₂ ser um dos principais mediadores envolvidos na imunossupressão e no aumento da suscetibilidade a infecções (Aronoff, Canetti et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005; Serezani 2007) até o momento, pouco se tem descrito quanto à correlação existente entre o papel PGE₂ no aumento a suscetibilidade a *S. pneumoniae* no modelo de DPOC. Assim, os modelos experimentais de DPOC são de grande relevância clínica para prevenção dos processos de supressão da resposta imune nas infecções.

Baseado nos dados previamente obtidos, que a instilação de células apoptóticas *in vivo* induz o aumento de PGE₂, carga bacteriana no pulmão e disseminação do *S. pneumoniae* na corrente sanguínea (Medeiros, Serezani et al. 2009), nossa hipótese fundamenta-se que a PGE₂ seja um dos principais fatores que medeia o impacto das células apoptóticas na diminuição das funções efetoras de AMs, na fagocitose mediada pelo receptor *scavenger*. Assim, os estudos *in vitro* relacionados aos mecanismos de ação mediados por PGE₂ em AMs são de grande relevância clínica para a prevenção e ou intervenção do processo de supressão da resposta imune.

1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho visa avaliar os mecanismos pelos quais PGE₂, endógena e exógena, através de seus receptores, modulam sinais moleculares capazes de interferir em processos fagocíticos e microbicidas, via receptor *scavenger* em AMs previamente incubados com células apoptóticas.

Objetivos específicos

1. Determinar o efeito da eferocitose por macrófagos alveolares na atividade fagocítica e microbicida de *S. pneumoniae*;
2. Investigar o efeito supressor de células apoptóticas nos mecanismos efetores de AMs na infecção por *S. pneumoniae* via receptores *scavenger*, SR-A e SR-B.
3. Avaliar a participação de PGE₂/adenilil ciclase/cAMP/PKA na supressão dos mecanismos efetores de macrófagos alveolares pela eferocitose na infecção por *S. pneumoniae*;
4. Determinar o papel de receptores de PGE₂, EP2 e EP4, na supressão dos mecanismos efetores de macrófagos alveolares pela eferocitose na infecção por *S. pneumoniae*;

Hipótese de Estudo e Resultados Esperados

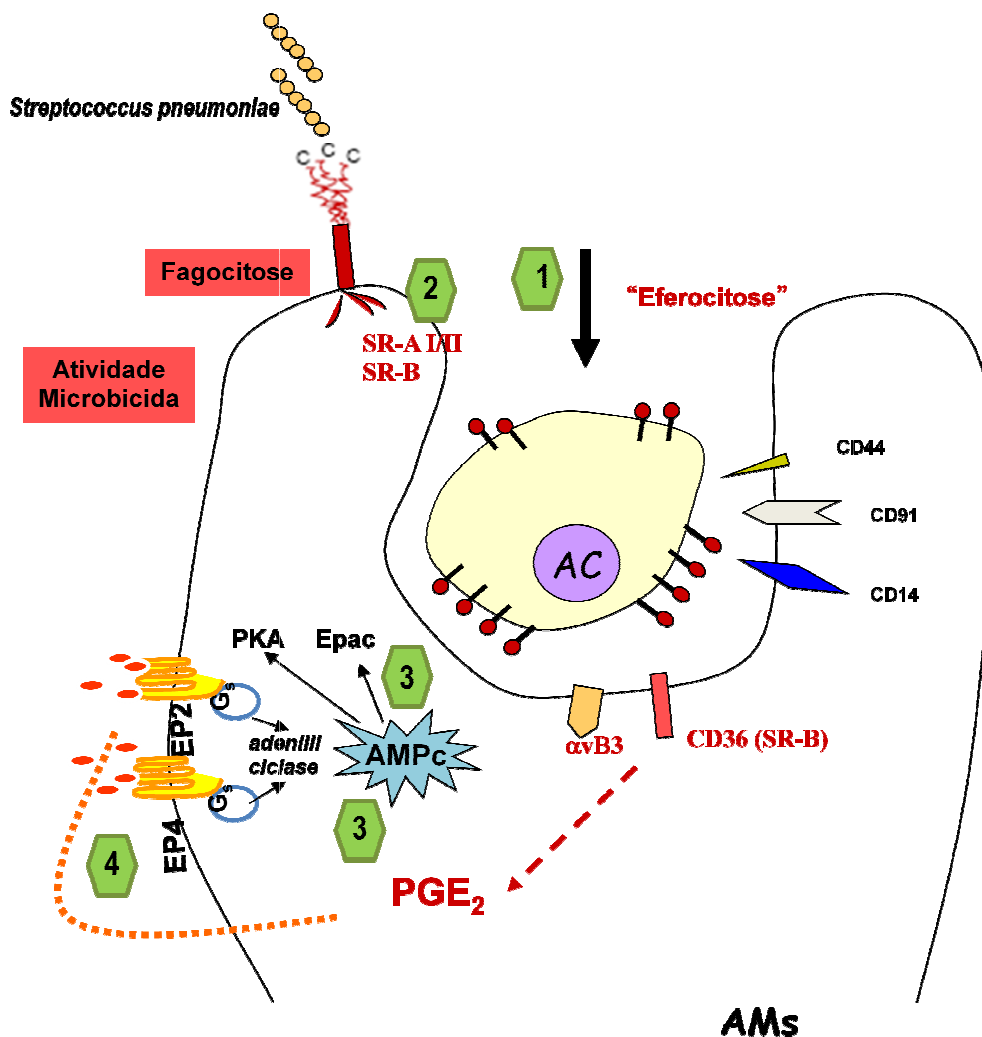


Figura 3. A eferocitose por AMs resulta na síntese de PGE₂ que pode interagir com os receptores EP2 e EP4 acoplados a proteínas Gs. A interação de PGE₂ a estes receptores, induz a ativação de adenilil ciclase que catalisa a conversão de ATP ao AMP cíclico (cAMP). O cAMP promove a ativação de PKA e/ou Epac que pode modular a ativação da cascata de sinalização de MAPK que é considerada via de sinalização utilizada na interação via receptor *scavenger*. Numeração em verde corresponde aos objetivos específicos descritos no texto acima.

3. Material e Métodos

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, com 6 a 8 semanas de idade, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em bolhas de pressão negativa, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e ração estéreis. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a ética em experimentação animal e com prévia aprovação do Comitê de Ética da UNESP – Protocolos CEP/FCF/CAr nº 03/2011 e nº 28/2011.

Isolamento e cultura de AMs

AMs residentes foram obtidos como previamente descrito por Peters-Golden M. et al. (Peters-Golden, McNish et al. 1990) e Baile et al. (Baillie, Standiford et al. 1996). Brevemente, os AMs foram obtidos através do lavado bronco alveolar e mantidos em RPMI-1640 livre de soro bovino fetal (SBF) por 1 h. Posteriormente, foi adicionado RPMI-1640 completo (10% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina), e as células permaneceram em cultura por 16-18 h a 37°C, 5% de CO₂.

Indução de apoptose celular

Como fonte de células apoptóticas, a linhagem Jurkat (linhagem humana de células T) foi submetida ao tratamento com Camptotecina (CPT - 2µg/mL) por 5 h em RPMI 1640-completo a 37°C, 5% de CO₂. A porcentagem de células apoptóticas precoces (Anexina+/PI-) e tardias (Anexina+/PI+) foi determinada por citometria de fluxo após marcação das células com anexina V/PI, conforme descrito previamente (Medeiros, Bonato et al. 2002).

Padronização da curva de crescimento de *S. pneumoniae*

Para determinação da curva de crescimento, a bactéria *S. pneumoniae* (Cepa ATCC 49619) foi cultivada em meio TSB a 37° C por um período de 5h. Nesse período, duas alíquotas foram adquiridas a cada 1 h, sendo uma delas utilizada para leitura de D.O. ($\lambda=600$ nm) no espectrofotômetro e a outra para cultivo em ágar sangue para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 24 h. A curva de crescimento foi determinada correlacionando-se o número de UFC com a D.O. obtida nos respectivos tempos de incubação (Figura 4).

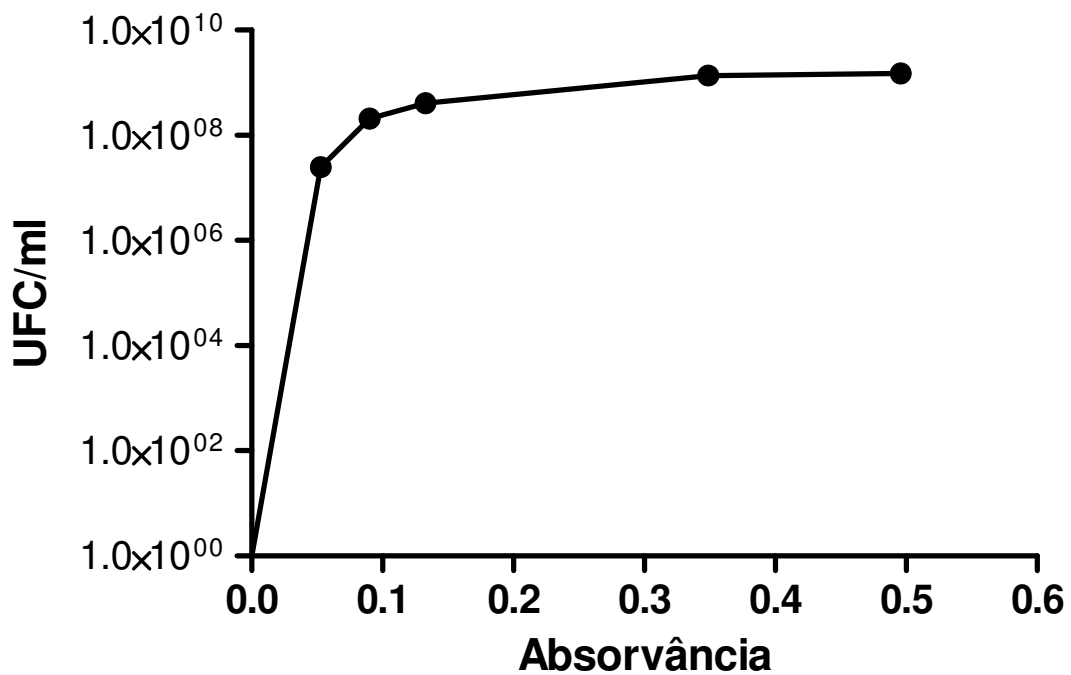


Figura 4. Padronização da curva de crescimento de *S. pneumoniae* (ATCC 49619). A curva de crescimento bacteriano foi determinada através da contagem de UFC e sua absorvância equivalente D.O. ($\lambda=600$ nm). O resultado apresentado equivale a um experimento representativo de cinco experimentos independentes.

Ensaio de fagocitose mediada por receptor *scavenger*

Para o ensaio de fagocitose, *S. pneumoniae* foram conjugadas com FITC como previamente descrito (Arredouani, Yang et al. 2004). Brevemente, a suspensão de *S. pneumoniae* na D.O. de ~ 0.4 (~10⁹ UFC/mL - determinado pela curva de crescimento bacteriano como descrito previamente) foi lavada 2 vezes e ressuspensas em tampão carbonato/FITC protegido da luz e então incubadas por 1h a 37° C. Após esse período a suspensão de *S. pneumoniae* + TSB foi lavada três vezes para remoção do excesso de FITC e ressuspensa em RPMI-1640 (livre de soro e gentamicina) contendo 0,5% de para-formaldeído.

A fagocitose de *S. pneumoniae*, marcada com FITC (*S. pneumoniae*^{+FITC}), foi avaliada conforme previamente descrito (Aronoff, Canetti et al. 2004). Assim, AMs foram incubados em placas pretas com fundo translúcido de 96 poços (BD – 353219) por um período de 16 h em RPMI-1640 10% de SBF, 50 µg/mL de gentamicina a 37° C, 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e substituído por RPMI-1640 livre de soro. Inibidores e bloqueadores de receptores *scavenger* foram adicionados 30 min antes da adição de células apoptóticas e/ou da incubação com a bactéria. Células apoptóticas foram adicionadas a cultura numa proporção de 3:1(AC:AMs) durante 1h como descrito previamente por (Medeiros, Serezani et al. 2009), seguido da incubação de *S. pneumoniae*^{+FITC} (1:50, 1:100 e 1:150) por um período de 3 h. Ao final desta incubação foi adicionado à cultura o mesmo volume de Azul de Trypan (250 µg/mL) por 10 min para inibir a fluorescência das bactérias que possam estar ligadas à membrana do AM. Por fim, a intensidade de fluorescência foi determinada por fluorímetro 485ex/535em (BioTek - Synergy H1) e os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle).

Para avaliar se a intensidade máxima de fluorescência e a eficiência do azul de trypan no “quench” das bactérias ligadas à membrana, as diferentes quantidades de *S. pneumoniae*^{+FITC} utilizadas nos ensaios fagocitose (1:50, 1:100 e 1:150) foram avaliadas separadamente. Como demonstrado na Figura 5 a intensidade de fluorescência, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), foi proporcional à quantidade de *S. pneumoniae*^{+FITC} adicionada aos poços. No entanto, a adição de azul de trypan aos respectivos poços inibiu ~96% da intensidade de fluorescência emitida por *S. pneumoniae*^{+FITC}.

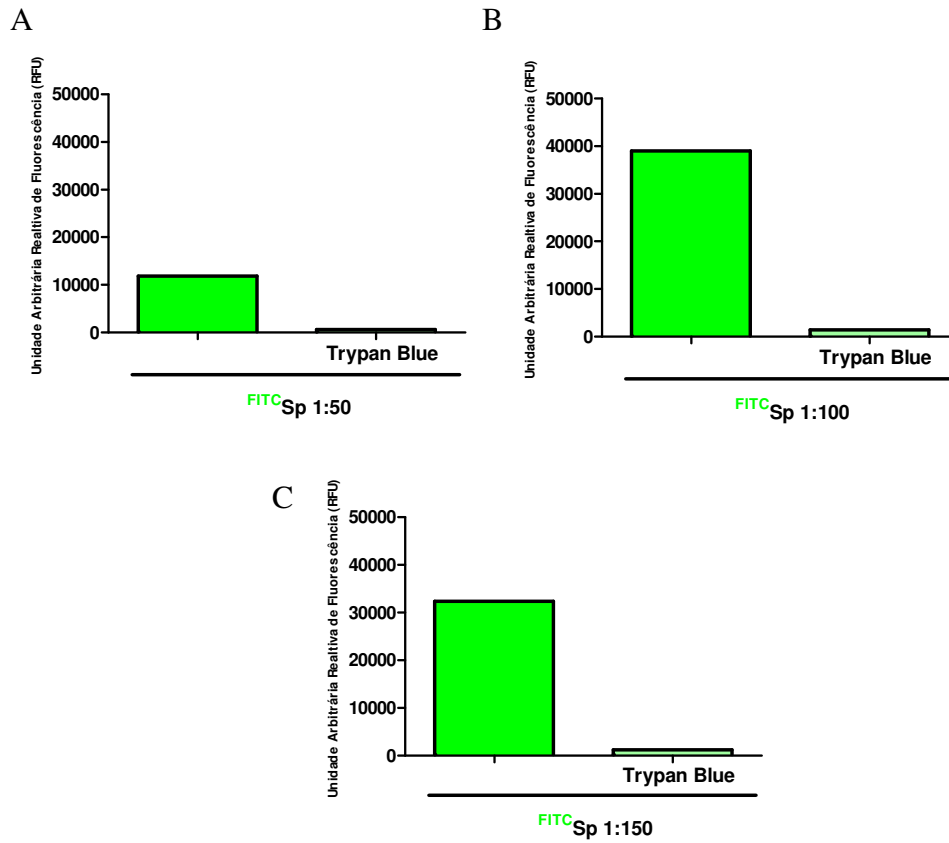


Figura 5. Efeito do Azul de Trypan no “quench” de *S. pneumoniae*^{+FITC} em ensaio de microplaca. Diferentes quantidades de *S. pneumoniae*^{+FITC} (1:50, 1:100 e 1:150) foram adicionadas aos poços na presença ou não de Azul de Trypan. A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando um fluorímetro (BioTek - Synergy H1), comprimento de onda de 485nm excitação/535nm emissão e os resultados são expressos como Unidade Arbitrária de Fluorencência (UAF).

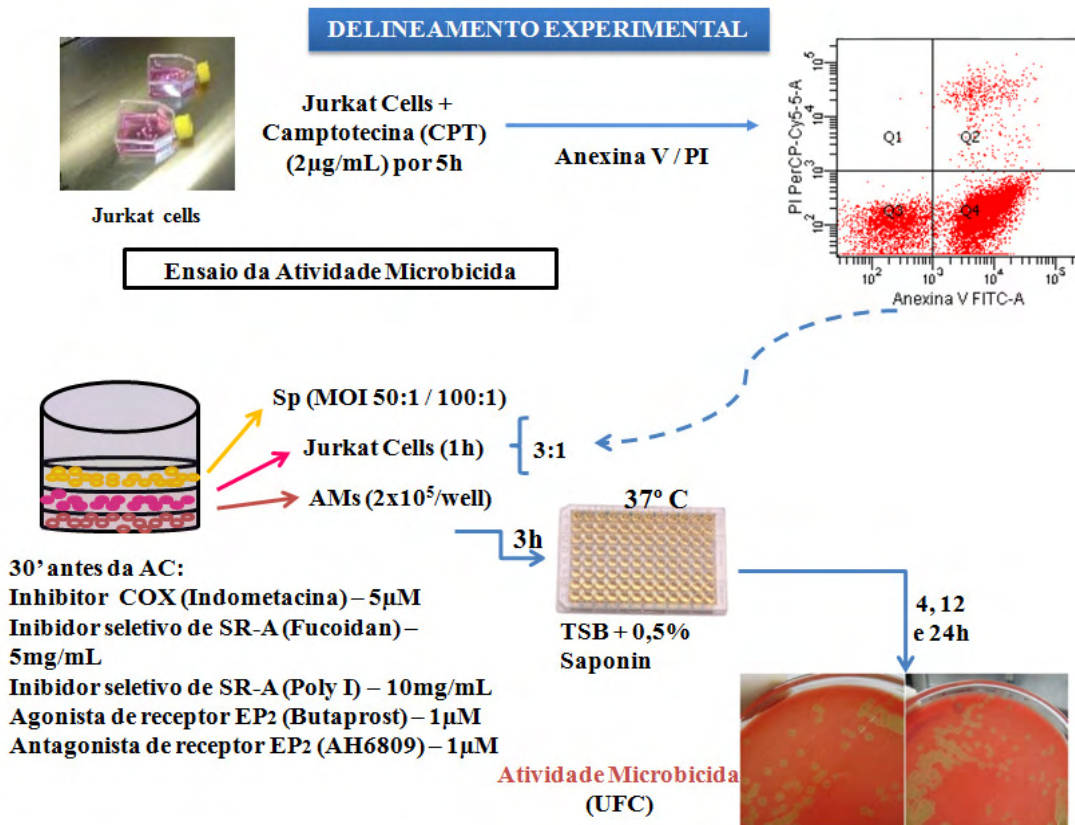
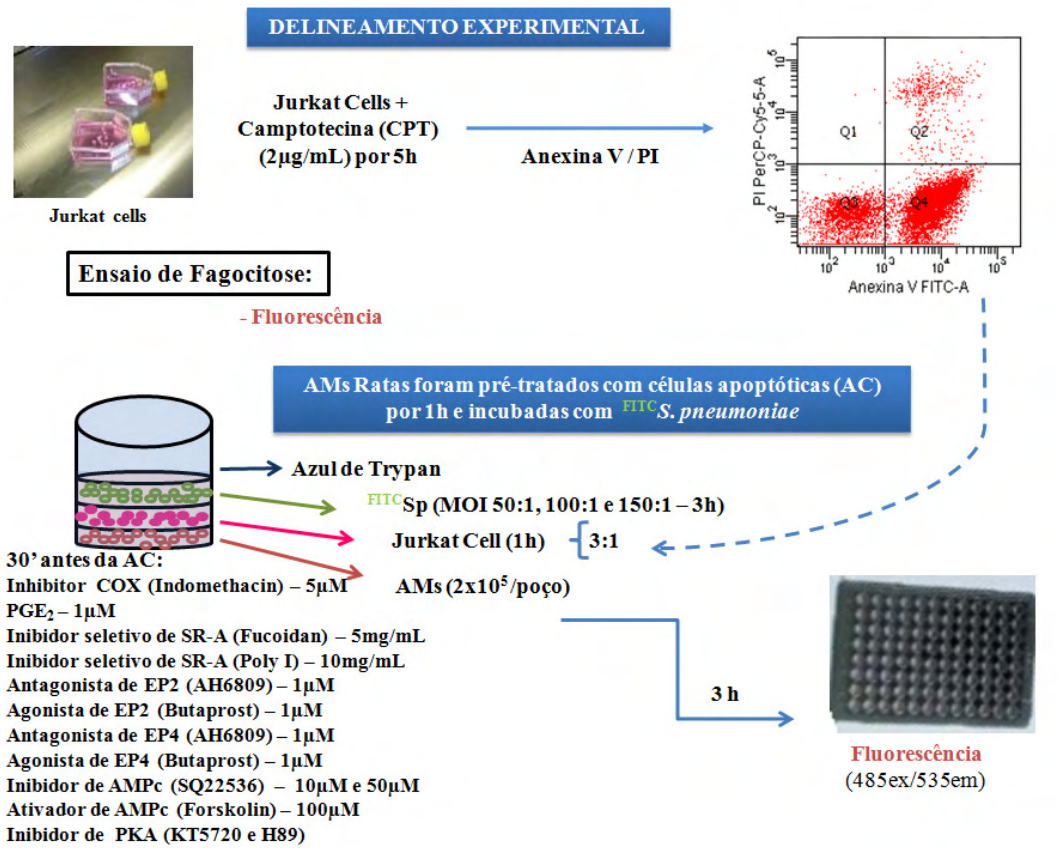
Avaliação da atividade microbicida através a recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC)

A recuperação de UFC de *S. pneumoniae* foi realizada a partir da lise dos macrófagos utilizando 200 µL de TSB + 0,5 % saponina gelada. Foi feito uma diluição seriada na base dez com a suspensão contendo o lisado celular para recuperação de UFC de *S. pneumoniae* em ágar sangue. As placas de ágar sangue foram incubadas em estufa de CO₂ à 37°C por 24 h e realizada a contagem de UFC. Os resultados foram expressos em número de UFC/mL.

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e estão apresentados como média ± SEM. Para comparações entre dois grupos experimentais foram utilizadas o teste de Student's *t* e para comparações entre três ou mais grupos experimentais foi aplicado ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$. Todos os experimentos serão realizados ao menos três vezes em diferentes períodos.

Delineamento Experimental



4. Resultados

Validação da conjugação do *S. pneumoniae* com FITC

Para os ensaios de fagocitose de *S. pneumoniae* por macrófagos alveolares utilizamos em nossos experimentos *S. pneumoniae* conjugados com FITC (*S. pneumoniae*^{+FITC}). Para validarmos a conjugação do fluorocromo à bactéria, a suspensão de *S. pneumoniae*^{+FITC} foi avaliada tanto por microscopia de fluorescência (Figura 6A) quanto por citometria de fluxo (Figura 6B). Nossos resultados mostram que em ambas as metodologias empregadas, ~100% das bactérias apresentaram marcação positiva para FITC. Além disso, a adição do azul de trypan após 15 min foi capaz de impedir a emissão da fluorescência em aproximadamente 80%. Além disso, para confirmar o tempo confiável de utilização de bactérias conjugadas para os ensaios de fagocitose foi realizada uma cinética de tempo destas bactérias marcadas. Os resultados obtidos demonstram que após uma semana da conjugação com o FITC a mediana da intensidade de fluorescência de bactérias conjugadas decaiu em aproximadamente 20% (dados não mostrados). Portanto, para os ensaios de fagocitose, *S. pneumoniae*^{+FITC} foi utilizado por aproximadamente cinco dias após a conjugação para que houvesse o mínimo de interferência quanto à perda da fluorescência destas bactérias.

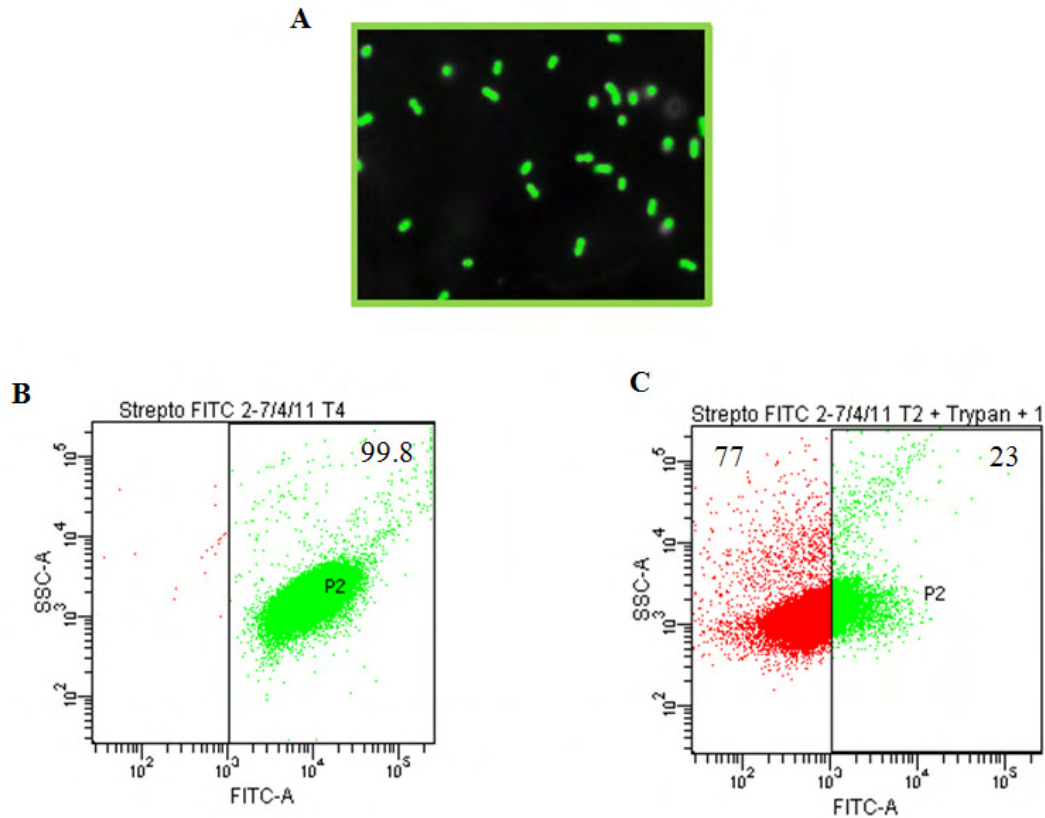


Figura 6. Conjugação de *S. pneumoniae* com FITC. *S. pneumoniae* foram conjugadas com o fluorocromo (FITC) e após 24 h as amostras avaliadas quanto à porcentagem de bactérias positivas através de A) microscopia de fluorescência; B) porcentagem de bactérias positivas para FITC na ausência de azul de trypan; C) porcentagem de bactérias positivas para FITC após 15 min. de incubação com Azul de trypan. Microscopia de fluorescência aumento de 1000x. Para os ensaios de citometria de fluxo foram adquiridos 30.000 eventos.

Efeito da eferocitose por AMs na fagocitose de *S. pneumoniae*

Resultados obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a incubação de células apoptóticas inibe a fagocitose mediada pelo receptor *Fc* de maneira proporção e tempo-dependente. No entanto, a proporção 3:1 ou 5:1 (AC:AMs) durante um período de incubação maior ou igual a 30 min mostrou-se igualmente eficiente quanto a capacidade de suprimir a fagocitose via receptores *Fc* por AMs (Medeiros, Serezani et al. 2009). Além disso, nós e outros grupos demonstramos previamente que a proporção de 3:1 é capaz de induzir a produção de altos níveis de PGE₂ (Medeiros, Serezani et al. 2009 e Fadok et al., 1998). Portanto, para os ensaios de fagocitose de *S. pneumoniae*, AMs foram incubados na proporção de 3:1 (AC:AMs) por um período de 60 min e a capacidade fagocítica para *S. pneumoniae* foi avaliada após 3h de incubação. Inicialmente determinamos se a prévia incubação de ACs era capaz de inibir a fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs independentemente do MOI (AMs:*S. pneumoniae*) utilizado. Nossos resultados demonstram que a prévia incubação de AMs com ACs inibiu em 16% a 39.4% a capacidade fagocítica de *S. pneumoniae* por AM nas diferentes proporções utilizadas, porém de maneira mais pronunciada na proporção de 1:100 (~39%). Desta forma, nos subseqüentes experimentos de fagocitose utilizamos a proporção de 1:100 (AMs: *S. pneumoniae*).

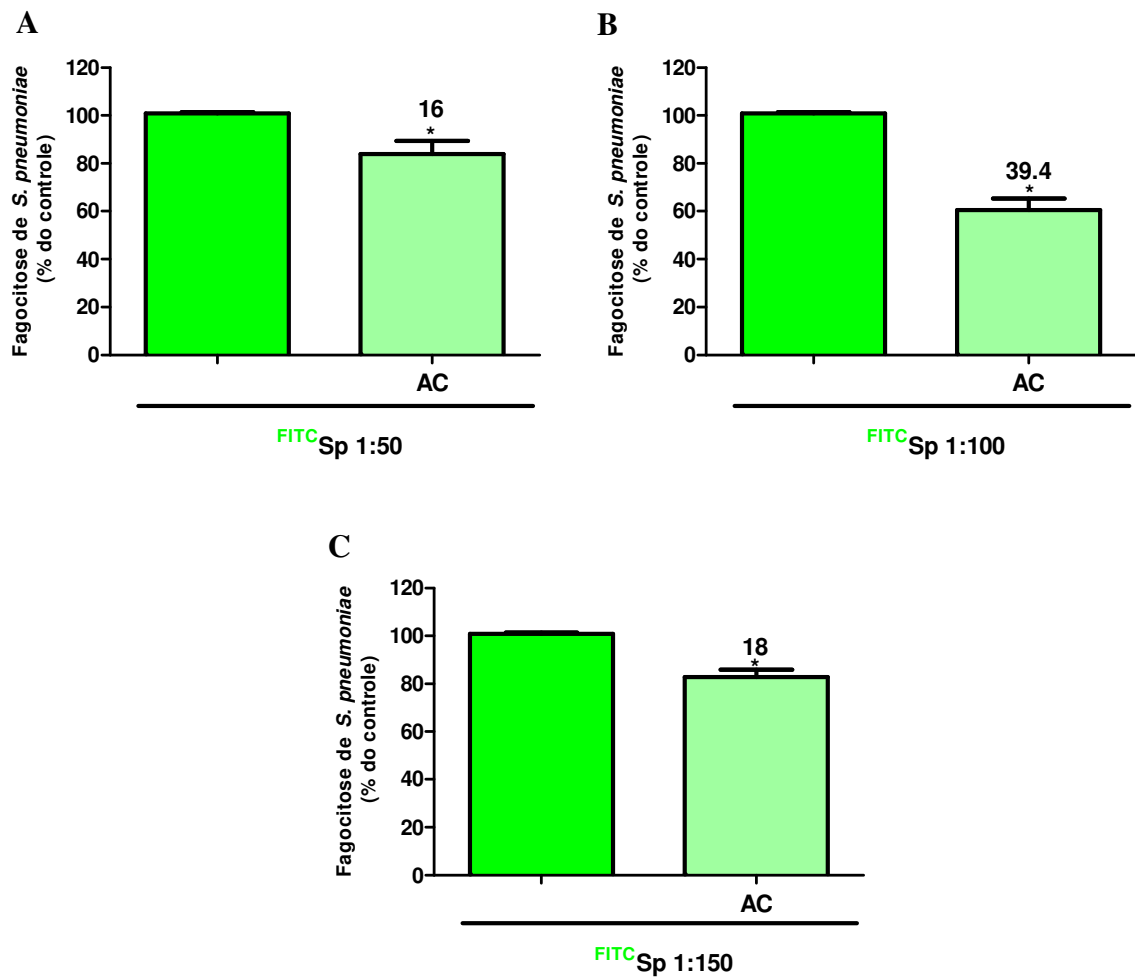


Figura 7. Efeito da eferocitose na fagocitose de *S. pneumoniae*. AMs foram pré-tratados por 1h com 3:1 (AC:AMs) e então incubados com diferentes proporções de *S. pneumoniae*^{+FITC}. (A) 1:50; B) 1:100 e C) 1:150. Após 3h de incubação, foram adicionados aos poços 80µL de Azul de Trypan (250 µg/mL) e após 10 min. a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de cinco experimentos independentes realizados em quintuplicatas. * P < 0.05 versus AMs+Sp.

PGE₂ promove a supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose via EP2/adenilil ciclase/cAMP e independente de PKA.

Sabe-se que a fagocitose de ACs por macrófagos diferenciados de monócitos leva a liberação de mediadores anti-inflamatórios como, PGE₂, TGF-β e IL-10 (Fadok et al., 1998a; Kim et al., 2005; Medeiros et al., 2009). Mais especificamente, resultados obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa demonstram que a incubação de ACs em cultura de AMs também promove a síntese de altos níveis de PGE₂, TGF-β e IL-10 que resulta na inibição da fagocitose via FcR. Nosso próximo passo foi investigar se a supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs pela eferocitose (na proporção de 1:100) seria mediada por PGE₂.

Nossos resultados demonstram que a inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs pela prévia incubação de ACs foi revertida pelo pré-tratamento com indometacina (inibidor da COX) quando comparado com os AMs incubados apenas com ACs e desafiados com *S. pneumoniae* (Figura 8A). Para comprovar que a PGE₂ é capaz de promover a supressão da fagocitose de *S. pneumoniae*, AMs foram pré-tratados com PGE₂ exógena e então incubados com a bactéria. A adição exógena de PGE₂ foi tão eficiente quanto ACs em inibir a fagocitose de bactérias por AMs quando comparado com o controle de AMs desafiados com *S. pneumoniae* (Figura 8A).

Sabe-se que o efeito supressor de PGE₂ ocorre principalmente via receptores EP2 e EP4 devido à associação destes a proteína Gs. A interação de PGE₂ a EP2/EP4 promove a ativação de adenilil ciclase que catalisa a conversão de ATP a AMP cíclico (cAMP). Para avaliar a via de sinalização pelo qual PGE₂ exerce suas funções efetoras, AMs foram pré-tratados com SQ 22536, inibidor de adenilil ciclase, incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. O prévio tratamento de AMs com o respectivo inibidor foi capaz de reverter o

efeito supressor mediado pela eferocitose, quando comparamos com os AMs incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae* sugerindo desta forma a participação de adenilil ciclase na inibição da fagocitose (Figura 8B). Para comprovar que a ativação de cAMP pode interferir no processo de fagocitose de *S. pneumoniae*, AMs foram incubados com forskolin, capaz de aumentar os níveis intracelulares de cAMP, e então desafiados com *S. pneumoniae*. A prévia incubação com forskolin resultou na inibição da fagocitose de bactérias quando comparado com AMs desafiados com *S. pneumoniae* porém de maneira não tão eficiente quanto à observada por incubação com ACs (Figura 8C).

Para determinar os receptores de PGE₂ envolvidos no efeito supressor da fagocitose de *S. pneumoniae*, AMs foram pré-tratados com agonistas e antagonistas de EP2 e EP4, incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. O efeito supressor induzido pela presença com ACs foi revertido na presença do antagonista de EP2 (Figura 9A), mas não de EP4 (Figura 9B) quando comparado com AMs incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. Para confirmar o envolvimento de PGE₂ via EP2/EP4 na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae*, AMs foram incubados com agonistas de EP2 e EP4 na tentativa de mimetizar o efeito supressor induzido pela fagocitose de ACs. A presença do agonista de EP2 (Butaprost) (Figura 9C), mas não EP4 (Figura 9D), resultou na inibição da fagocitose de bactérias quando comparamos com AMs desafiados com *S. pneumoniae*, mimetizando desta forma o efeito supressor mediado pela presença de ACs.

Para determinar as possíveis vias de sinalização da cascata bioquímica envolvidas na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* mediada pela presença de ACs, AMs foram inicialmente incubados na presença de inibidores de PKA, H-89 e KT5720. Os resultados obtidos demonstram que independente da concentração dos inibidores de PKA utilizados não houve reversão da inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* mediado por ACs quando

comparado com AMs incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae* (Figura 10 A e B).

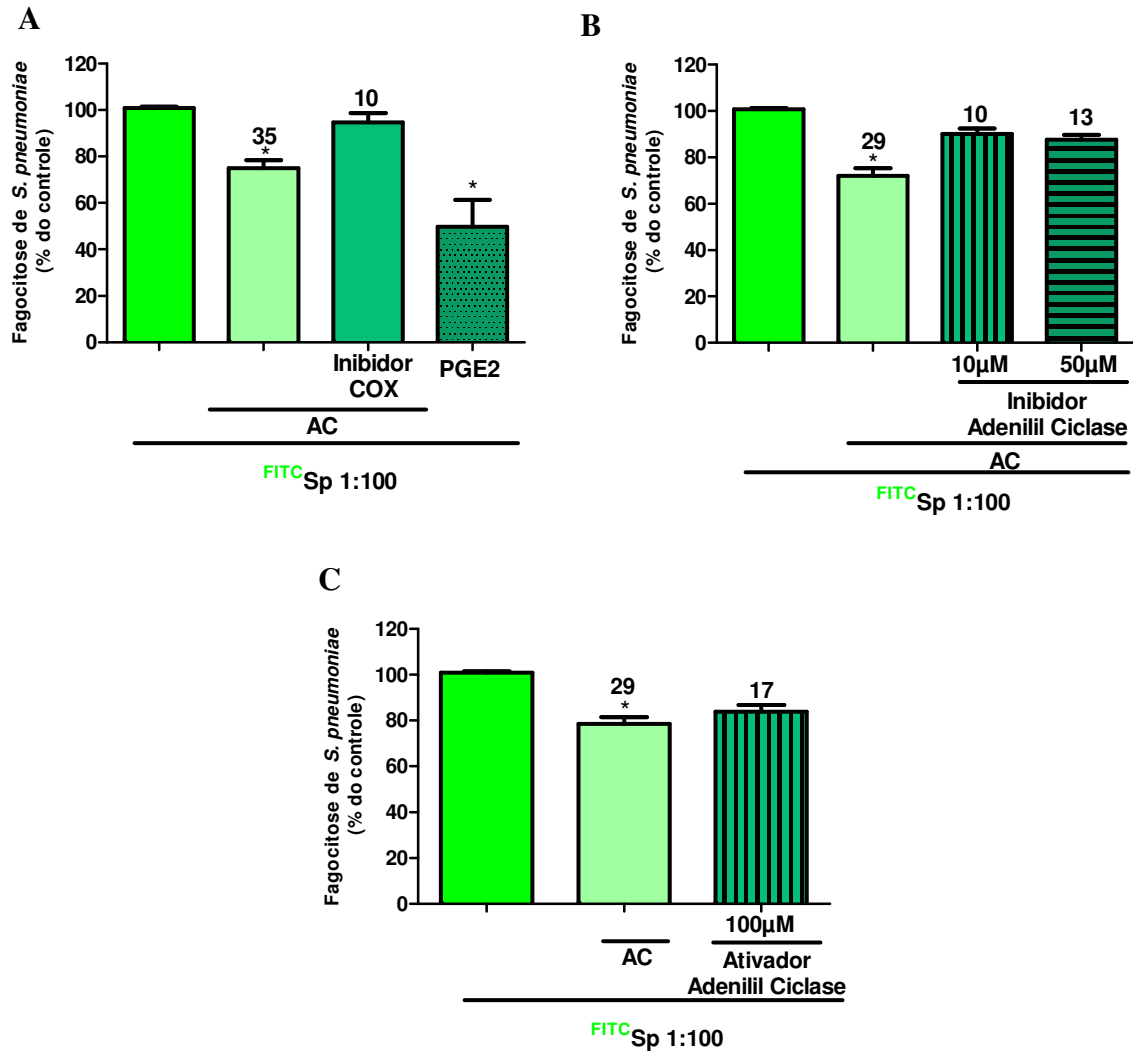


Figura 8. Envolvimento de PGE₂ na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose. AMs foram pré-tratados por 30 min com inibidor de cicloxigenase (INDO) ou PGE₂ (A), inibidor de adenilil ciclase - SQ 22536 (B) ou Forskolin (C), incubados por 1 h com 3:1 (AC:AMs) e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} (1:100-AMs:Sp). Após 3h de incubação foi adicionado à cultura 80µL de Azul de Tryan (250 µg/mL) e após 10 min. a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 versus AMs+Sp, # P < 0.05 versus AMs+AC+Sp.

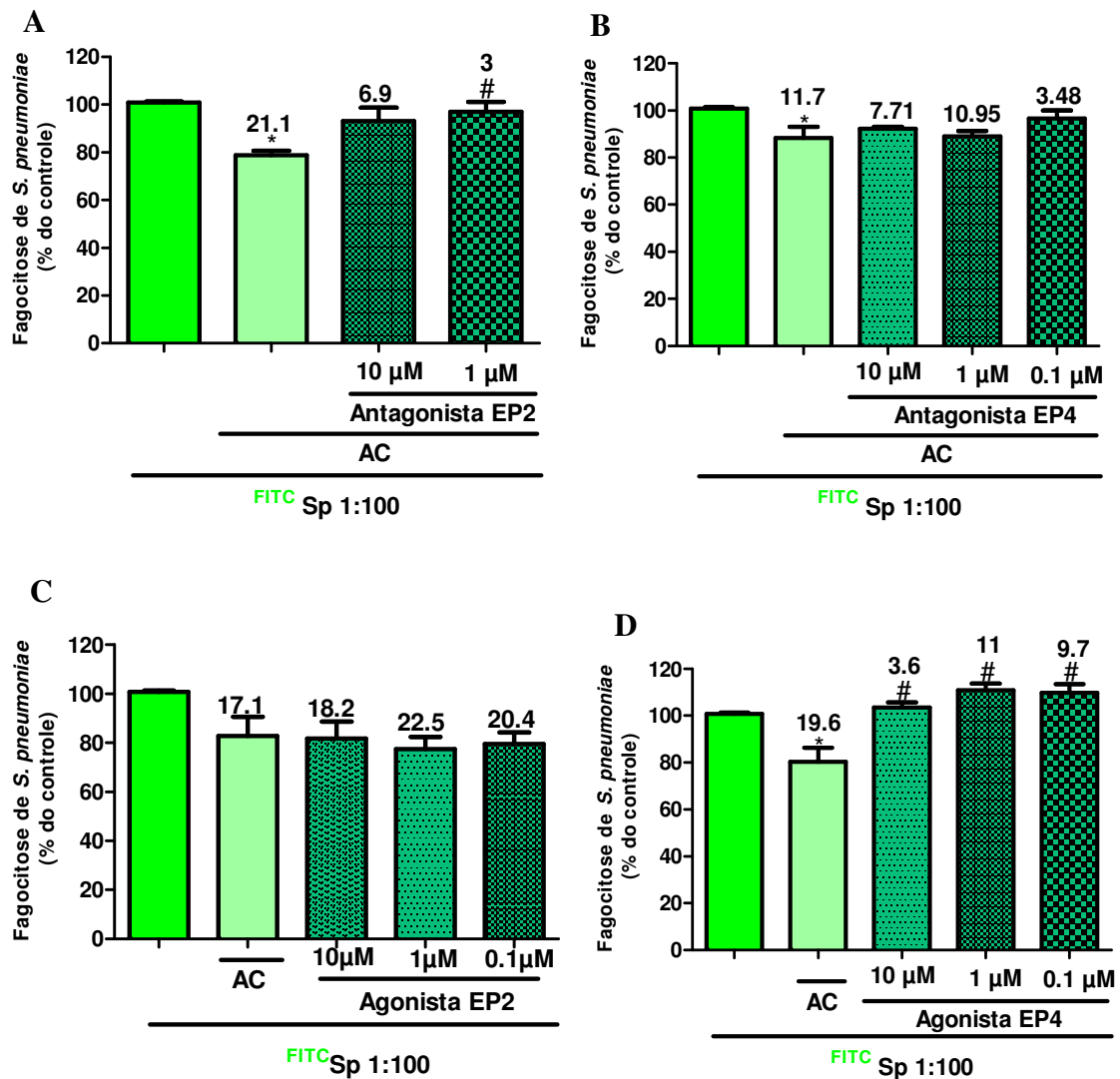


Figura 9. PGE₂ promove a supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs via receptor EP2. AMs foram pré-tratados por 30 min com Agonista (Butaprost) e antagonista (AH 6809) de receptores EP2 (A, C), ou agonista (CAY 10598) e antagonista (AH23848) de EP4 (B, D), incubados por 1 h com 3:1 (AC:AMs) e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} 1:100 (AMs:Sp). Após 3h de incubação foi adicionado à cultura 80μL de Azul de Tryan (250 μg/mL) e após 10 min. a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 versus AMs+Sp, # P < 0.05 versus AMs+AC+Sp.

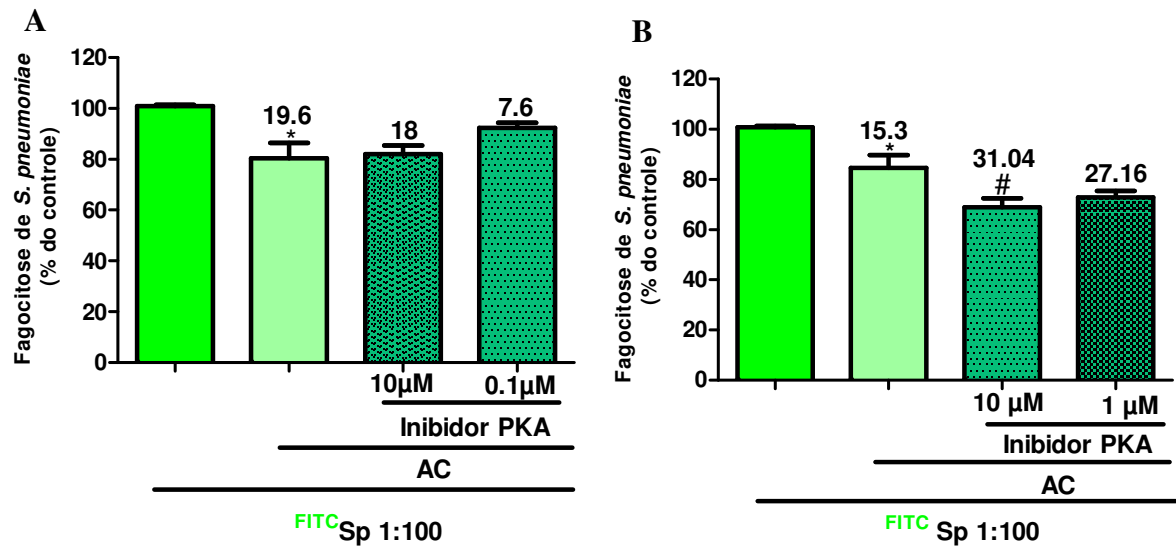


Figura 10. Envolvimento da molécula de PKA na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose. AMs foram pré-tratados por 30 min com inibidores de PKA (KT5720) (A), ou H89 (B), incubados por 1 h com 3:1 (AC:AMs) e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} 1:100 (AMs:Sp). Após 3h de incubação foi adicionado à cultura 80μL de Azul de Trypan (250 μg/mL) e após 10 min. a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 versus AMs+Sp, # P < 0.05 versus AMs+AC+Sp.

Avaliação dos receptores *scavenger* envolvidos na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose

Sabe-se que a fagocitose de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*, ocorre principalmente via receptores *scavenger*, sendo estes os SR-A (SR-A I, SR-A II e MARCO) e SR-B (SR-B I e SR-B II ou CD36 e CD 163) (Greaves e Gordon, 2009; Thelen et al., 2010). De acordo com os resultados apresentados na Figura 7 e 8, a incubação de AMs com ACs inibe a fagocitose de *S. pneumoniae* e PGE₂ parece ser um dos mediadores envolvidos neste processo. Sabendo que a expressão de receptores SR-A e SR-B pode ser diferenciada dependendo do microambiente em que estes fagócitos estão presentes, nosso próximo passo foi investigar o efeito supressor da eferocitose nas diferentes classes de receptores *scavenger* (SR-A e/ou SR-B) expressos em AMs.

AMs foram incubados na presença ou ausência de diferentes bloqueadores de receptores de SR-A (Fucoïdan e Poly I), incubados com ACs e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} para determinação da fagocitose. Inicialmente avaliamos a importância destes receptores. Os resultados apresentados demonstram que o bloqueio individual dos receptores SR-A e SR-B (CD36) com Poly I/Fucoïdan e anti-CD36, respectivamente, resulta na inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs (Figura 11 e 12). A importância dos receptores SR-A e SR-B na fagocitose de *S. pneumoniae* pode ser evidenciada quando AMs foram incubados concomitante com anti-CD36 e fucoïdan (bloqueador de SR-A). A incubação concomitante de ambos bloqueadores resultou na inibição de ~37% na fagocitose de *S. pneumoniae* quando comparado aos AMs desafiados com *S. pneumoniae* (Figura 12A e B). No entanto, a incubação de AMs com diferentes bloqueadores de receptores de SR-A (Fucoïdan e Poly I) seguido da incubação de ACs resultou numa inibição mais pronunciada na fagocitose de *S. pneumoniae* quando comparado aos AMs apenas tratados com ACs (Figura 11A e B).

Esses resultados sugerem que a inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs devido a incubação de ACs concomitante ao bloqueador fucoïdan resultou em um efeito sinérgico quanto a inibição da fagocitose destas bactérias por AMs.

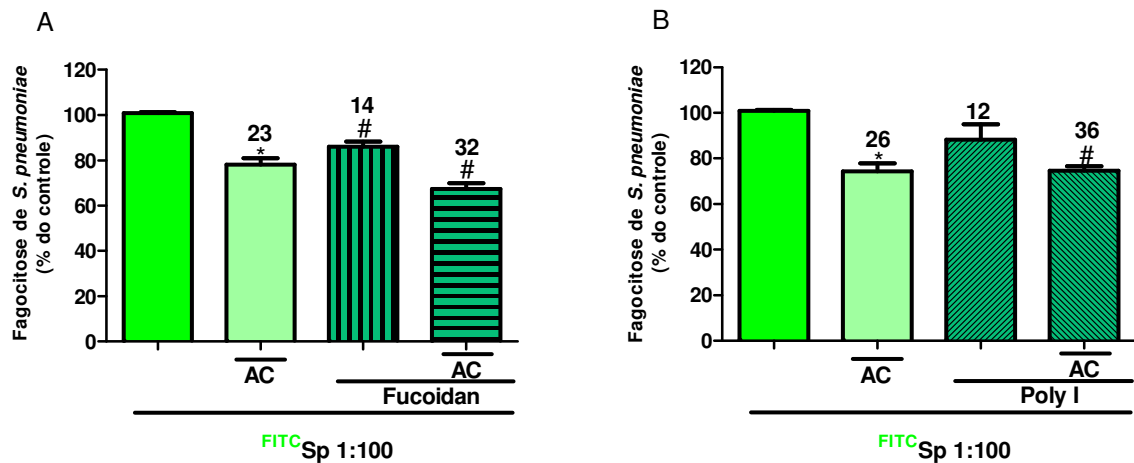


Figura 11. Avaliação dos receptores *scavenger* envolvidos na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose. AMs foram pré-tratados por 30 min com diferentes bloqueadores de receptores de SR-A, Fucoïdan (A) ou Poly I (B) na presença ou ausência de ACs e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} na proporção de 1:100 (AMs:Sp). Após 3 h de incubação, foi adicionada à cultura 80µL de Azul de Trypan (250 µg/mL), e após 10 min, a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 versus AMs+Sp, # P < 0.05 versus AMs+AC+Sp.

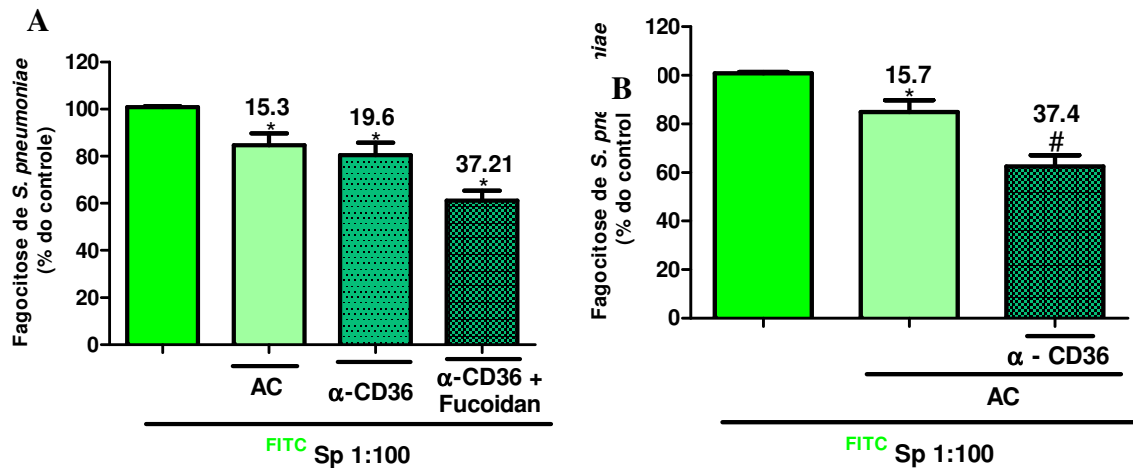


Figura 12. Avaliação dos receptores scavenger (SR-A e SR-B) envolvidos na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose. AMs foram pré-tratados por 30 min com anticorpo anti-CD36 (A) na presença ou ausência de ACs, ou associado com bloqueadores de SR-A (Fucoïdan) (B) e então desafiados com *S. pneumoniae*^{+FITC} na proporção de 1:100 (AMs:Sp). Após 3 h de incubação, foi adicionada a cultura 80 μ L de Azul de Trypan (250 μ g/mL) e após 10 min. a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando fluorímetro (485ex/535em). Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao controle contendo AM + *S. pneumoniae* (% do controle). Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 versus AMs+Sp, # P < 0.05 versus AMs+AC+Sp.

Efeito da eferocitose e o envolvimento de PGE₂ endógena no crescimento de *S. pneumoniae* em AMs.

Inicialmente, para que pudéssemos avaliar a melhor proporção de *S. pneumoniae* a ser utilizada em nossos ensaios, AMs foram incubados na presença ou ausência de ACs na proporção de 1:3. Em seguida, AMs foram desafiados com *S. pneumoniae* nas proporções de 1:50 e 1:100 (AMs:Sp) e após o período de fagocitose as células incubadas por diferentes períodos de tempo para determinação do número de UFC de *S. pneumoniae*.

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento de AMs com ACs resultou um intenso aumento no número de UFC de *S. pneumoniae* em ambas as proporções testadas, 1:50 (Figura 13A) e 1:100 (Figura 13B) e nos três diferentes tempos quando comparado com AMs desafiados apenas com *S. pneumoniae*. O pico do crescimento bacteriano na presença de ACs ocorreu após 12 h de incubação, porém com 24 h ainda observamos o efeito supressor mediado pela eferocitose.

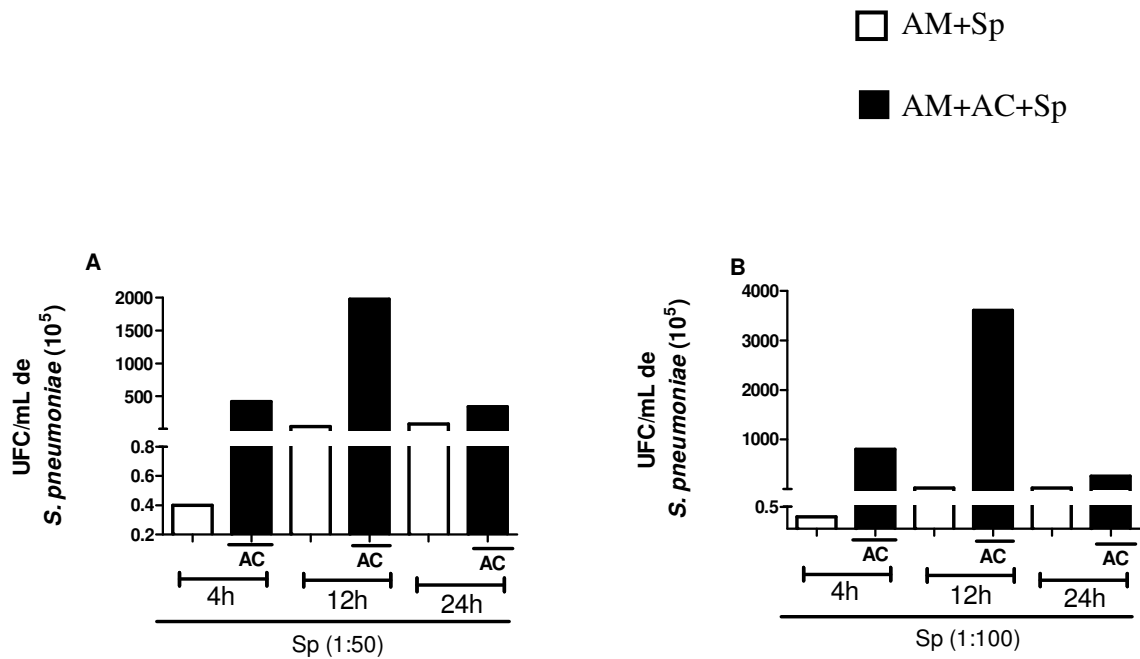


Figura 13. Efeito da eferocitose em AMs na recuperação de UFC de *S. pneumoniae*. AMs foram pré-tratados na presença ou ausência de ACs na proporção 3:1 (AC:AMs). Em seguida, desafiados com *S. pneumoniae* em duas diferentes proporções (A) 1:50; (B) 1:100 e incubados por 3 h para a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços foram lavados para remoção das bactérias não fagocitadas e após 4, 12 e 24 h as células foram lisadas e a suspensão celular adicionada em placas de ágar sangue por um período de 24 h. A suspensão do lisado celular é oriunda de um pool de quintuplicatas experimentais. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Os dados apresentados são referentes a dois experimentos independentes.

Impacto da eferocitose na atividade microbica de *S. pneumoniae* via receptores scavengers

A partir dos resultados obtidos na Figura 13, os experimentos subsequentes foram realizados apenas na menor proporção de AMs:Sp (1:50) e no período 4 h de incubação. A escolha destas condições deve-se não apenas pela reprodutibilidade dos resultados individuais obtidos nos experimentos, mas também por ser o período cujo efeito específico apenas de PGE₂ e não outras citocinas é mais pronunciado. Sabe-se que a fagocitose de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*, ocorre principalmente via receptores *scavenger*, tanto os SR-A I e II como os SR- B I e II (CD36 e CD 163, respectivamente). Para investigar a classe de receptores *scavenger* (SR-A e/ou SR-B) envolvidos na supressão da atividade microbica de *S. pneumoniae* pela fagocitose de ACs foram utilizados bloqueadores de SR-A, fucoidan e poly I. AMs foram pré-incubados com fucoidan ou poly I, incubados com ACs e então desafiados com *S. pneumoniae*. Após o período de fagocitose, as células foram lavadas e incubadas por um período de 4 h para determinação da atividade microbica.

Os resultados obtidos demonstram que o bloqueio dos receptores SR-A, utilizando fucoidan e poly I, não interfere na recuperação de UFC quando comparado com AMs infectados com *S. pneumoniae*. No entanto, o bloqueio dos receptores SR-A na presença de ACs aumentou a atividade microbica de AMs quando comparado com células incubadas apenas com ACs e desafiadas com *S. pneumoniae* (Figura 14).

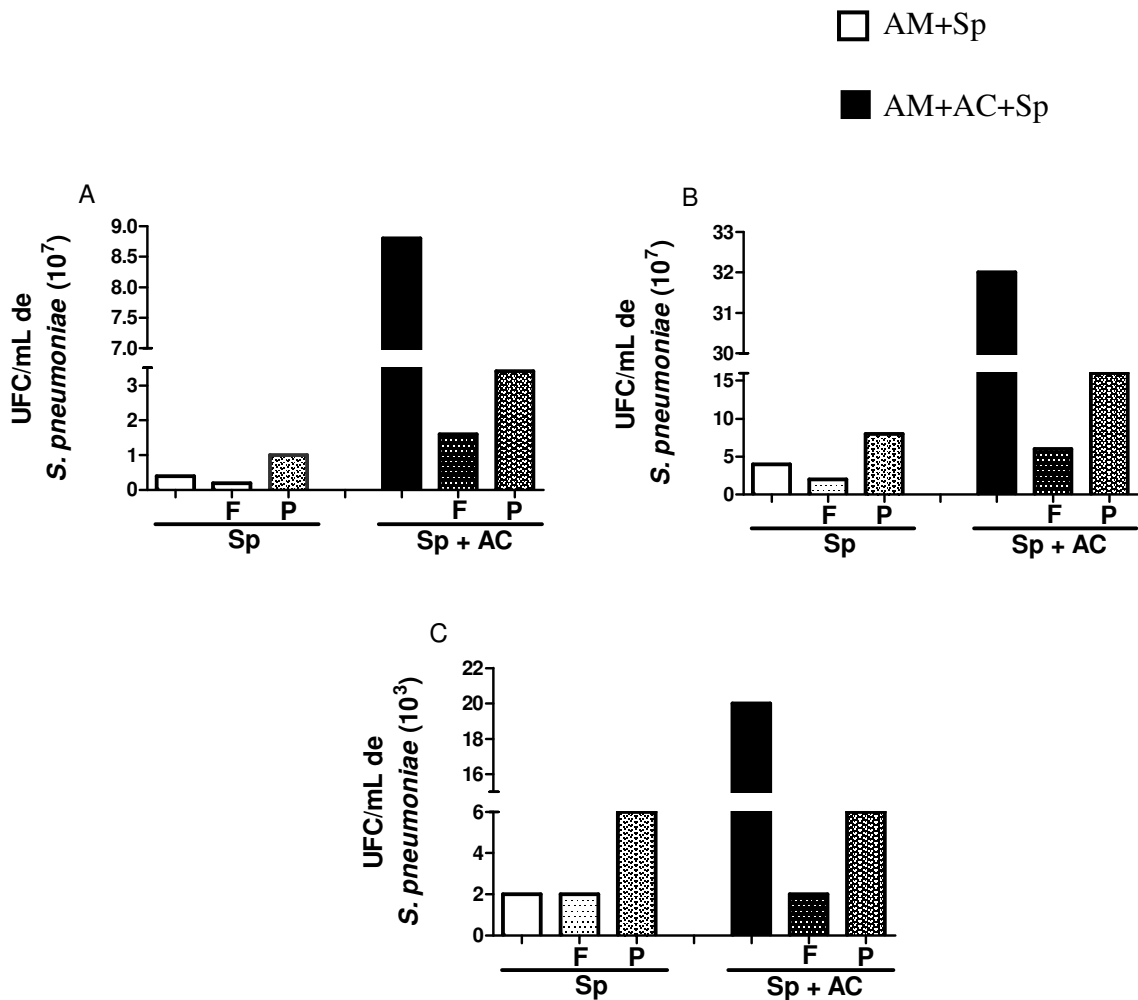


Figura 14. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de *S. pneumoniae* utilizando bloqueadores de receptores scavengers. AMs foram pré-tratados ou não com bloqueadores de receptor SR- A, fucoidan e poly I, por 30 minutos. Em seguida, AMs foram incubados na presença ou ausência de ACs 3:1 (AC:AMs). Os AMs foram então desafiados com *S. pneumoniae* por 3 h para a fagocitose da bactéria e após esse período, os poços foram lavados para remoção das bactérias não fagocitadas. Em seguida, os AMs foram incubados por um período de 4h e lisados para recuperação de UFC. A suspensão do lisado celular é oriunda de um pool de quintuplicatas experimentais. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Os resultados apresentados referem-se a três experimentos independentes (A, B e C).

Envolvimento de PGE₂ na supressão da atividade microbica de *S. pneumoniae* por AMs no contexto de eferocitose

Sabe-se que a fagocitose de ACs por macrófagos leva a liberação de mediadores anti-inflamatórios como PGE₂, TGF- β e IL-10 que atuam inibindo as funções efetoras de macrófagos. Esse efeito supressor parece estar diretamente associado com a síntese de PGE₂ endógena e não com a presença de TGF- β (Medeiros et al., 2009). Dessa forma, fomos investigar se a supressão da atividade microbica de *S. pneumoniae* por AMs pela eferocitose é mediada por PGE₂.

Para tanto, os AMs foram incubados na presença ou ausência de indometacina, um inibidor não seletivo da enzima COX, e em seguida incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. Nossos resultados demonstram que o tratamento com indometacina foi capaz de inibir o efeito supressor da atividade microbica de AMs mediado pela incubação de ACs, ou seja, na presença de Indo houve uma diminuição no número de UFC quando comparado com AMs incubados com ACs (Figura 15).

Sabe-se que PGE₂ exerce suas funções efetoras via EP2 e EP4 por estarem acoplados a proteínas Gs, que aumenta os níveis de cAMP. Para reforçar a participação de PGE₂ e determinar os receptores envolvidos neste processo, AMs foram pré-tratados com antagonista de EP2 (AH 6809), e então incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. Os resultados apresentados demonstram que o bloqueio do receptor de EP2 foi capaz de diminuir o número de UFC quando comparado com AMs incubados com ACs (Figura 15).

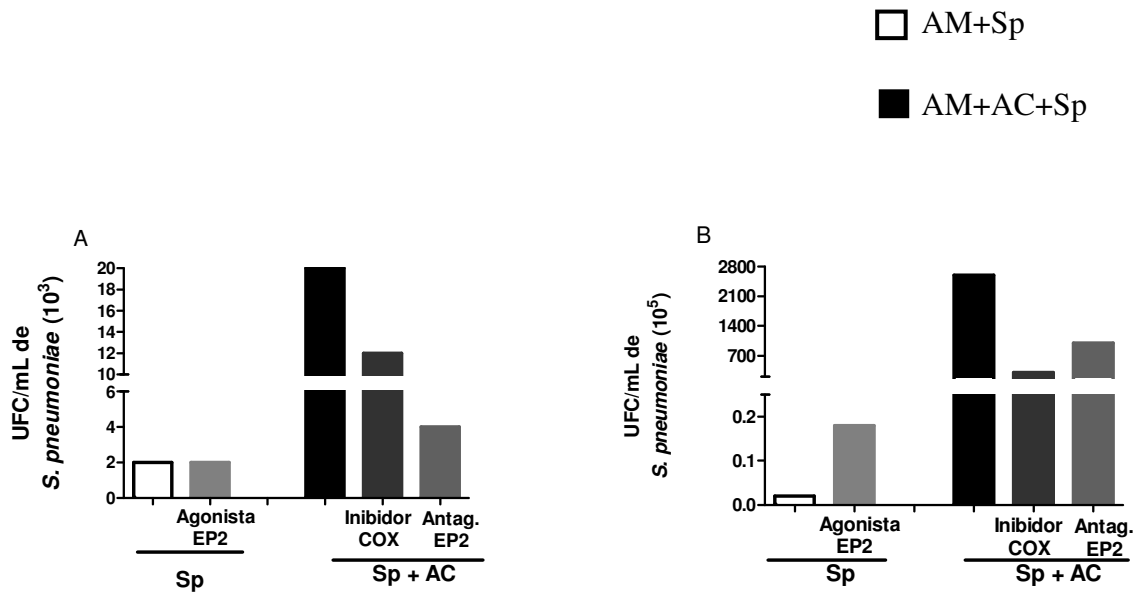


Figura 15. Eferocitose por AMs suprime a atividade microbicida contra *S. pneumoniae* via PGE₂/EP2. AMs foram pré-tratados com indometacina ou antagonistas de EP2 por 30 min., incubados na presença ou ausência de ACs (3:1 - AC:AMs) e então desafiados com *S. pneumoniae* por 3h para a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços foram lavados para remoção das bactérias não fagocitadas e novamente incubados por 4h. Após esse período AMs foram lisados e o número de UFC foi determinado nas diferentes condições. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Os resultados apresentados referem-se a dois experimentos independentes (A e B) realizados em quintuplicas.

5. Discussão

Em países em desenvolvimento, as infecções do trato respiratório estão entre as principais causas de morte de pacientes por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). A síndrome de stress respiratório agudo (SSRA) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são caracterizadas pelo intenso acúmulo de ACs no pulmão e no espaço bronco-alveolar. Uma vez fagocitadas, as ACs levam à produção de vários mediadores anti-inflamatórios, dentre eles a PGE_2 , que poderiam promover um cenário propício para supressão da resposta imune. Os resultados aqui apresentados demonstram que a fagocitose de células apoptóticas por AMs resulta na supressão dos mecanismos efetores destes fagócitos contra *S. pneumoniae*.

Trabalhos prévios publicados na literatura mostram que a eferocitose de ACs por macrófagos promove a supressão das funções efetoras destes fagócitos através da inibição da fagocitose de alvos via receptores *Fc* (Medeiros et al., 2009) e diminuição da atividade microbicida contra *T. cruzi* (Freire-de-Lima et al., 2000). Além disso, estes estudos demonstram que PGE_2 é um dos principais mediadores solúveis responsáveis pelos efeitos supressores mediados pela eferocitose (Medeiros, Serezani et al. 2009; Donnelly 2012). Um dos principais objetivos deste estudo foi investigar se a supressão das funções efetoras no contexto de eferocitose, observado previamente via receptor *Fc*, também seria interferir nas atividades fagocíticas e microbicidas de AMs via receptores da resposta imune inata, como receptores *scavenger*. Nossos resultados demonstram que eferocitose por AMs resulta na inibição da capacidade fagocítica de *S. pneumoniae* e que PGE_2 é um dos principais, mas não o único, mediador envolvido neste processo de supressão. Os resultados obtidos demonstram o tratamento com indometacina, EP2 antagonista e inibidor de adenilil ciclase foram capazes de promover uma reversão do efeito supressor mediado pela eferocitose, como observado previamente nos dados descritos na literatura quanto a fagocitose via receptor *Fc* (Medeiros,

Serezani et al. 2009). Corroborando com esses dados, a adição exógena de PGE₂ e em menor intensidade com agonista de EP2 foi capaz de promover uma supressão mais pronunciada na fagocitose de *S. pneumoniae*. Esses resultados sugerem que talvez a concentração de PGE₂ liberada pela eferocitose por AMs não seja eficiente, quanto observado previamente para receptores *Fc* (Medeiros, Serezani et al. 2009), em promover uma efetiva supressão da fagocitose via receptores *scavenger*. Para comprovar essa hipótese novos experimentos poderiam ser realizados utilizando maiores proporções de ACs:AMs que indiretamente resultaria no aumento da concentração de PGE₂.

Quanto aos mecanismos envolvidos neste processo, nossos resultados demonstram que cAMP participa na supressão da resposta mediada por PGE₂ oriunda da eferocitose. Classicamente, a via de sinalização intracelular do cAMP envolve a ativação de PKA e/ou Epac-1 e 2. Recentemente, Aronoff et al.(2005) demonstraram que os efeitos supressores da PGE₂ em AMs são distintamente regulados por PKA (que inibe a atividade microbicida) e Epac-1 que inibe a fagocitose de alvos opsonizados por IgG e também atividade microbicida (Aronoff, Canetti et al. 2005). Nossos resultados quanto ao efeito de PGE₂ na fagocitose, receptores *scavenger* estão de acordo com os resultado da literatura demonstrados através da fagocitose de alvos opsonizados por IgG, ou seja, via receptores *Fc*. A presença de inibidores de PKA não interferiu na fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs, demonstrando que a PGE₂ oriunda da eferocitose promove o aumento de cAMP, mas não a ativação de PKA. Novos experimentos serão realizados para avaliar a participação de Epac neste processo, porém a inexistência de inibidores específicos requer a utilização de técnicas, como siRNA, para comprovar a participação desta proteína. O conjunto destes resultados sugere que a PGE₂ endógena, oriunda da eferocitose por AMs, é um importante mediador envolvido na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs, e esta função é parcialmente executada via

EP2/adenilil ciclase/cAMP e por uma via independente de PKA. Outras vias relacionadas com essa função de PGE₂ ainda serão investigadas.

Vários trabalhos na literatura demonstram a importância que receptores *scavenger* exercem na fagocitose de bactérias Gram-positivas, como por exemplo, *S. pneumoniae* (Thelen, Hao et al. 2010; Mukouhara, Arimoto et al. 2011; Ganesan, Faris et al. 2012). Nossos resultados corroboram com a literatura, visto que o bloqueio concomitante de SR-A e SR-B resulta na inibição da fagocitose *S. pneumoniae*. Apesar de uma inibição expressiva da fagocitose pelo tratamento com os respectivos bloqueadores de SR-A e SR-B, os resultados apresentados sugerem que além dos receptores *scavenger* outros receptores provavelmente participam da fagocitose de *S. pneumoniae* por AMs. Apesar da importância destes receptores na fagocitose de *S. pneumoniae*, pouco se sabe sobre atuação da PGE₂ interferindo nas funções fagocíticas através das diferentes classes de receptores *scavenger*, SR-A e SR-B. Nossos resultados demonstram na presença dos bloqueadores de SR-A, ou seja, favorecendo a fagocitose de *S. pneumoniae* via SR-B, a eferocitose por AMs inibiu drasticamente a capacidade fagocítica de AMs. Essa potencialização do efeito supressor, mediado pela eferocitose por AMs, sugere que a expressão diferenciada dos receptores SR-A e/ou SR-B (CD36) na superfície de macrófagos pode refletir no aumento da suscetibilidade a infecção por *S. pneumoniae*.

No pulmão, os AMs, através de receptores *scavenger* classe A e classe B, possuem um papel crítico não apenas na fagocitose, mas também na atividade microbicida contra diferentes bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*. Inicialmente, utilizamos bloqueadores de SR-A para determinar a classe do receptor *scavenger* envolvido na supressão da atividade microbicida contra *S. pneumoniae* pela fagocitose de ACs por AMs. Os dados obtidos demonstram que o bloqueio dos receptores SR-A, via fucoidan e poly I, levou a uma reversão da supressão da atividade microbicida de AMs quando comparado às células não

tratadas com esses bloqueadores, evidenciada pela diminuição do número de UFC de *S. pneumoniae*. Esses resultados sugerem que uma vez bloqueada a entrada da bactéria via SR-A, a via de entrada preferencial passa a ser os SR-B, resultando num aumento da capacidade microbicida destes AMs.

Na tentativa de determinar o papel da PGE₂ e/ou outros prostanóides produzidos pela eferocitose por AMs na supressão da atividade microbicida de *S. pneumoniae*, AMs foram pré-tratados com indometacina. Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento de AMs com indometacina resultou na reversão do efeito supressor da atividade microbicida decorrente da incubação de AMs com ACs. Estes resultados sugerem, portanto, o envolvimento da PGE₂, liberada pela fagocitose de ACs, como um dos principais mediadores envolvidos na supressão das funções microbicidas de AMs contra de *S. pneumoniae*.

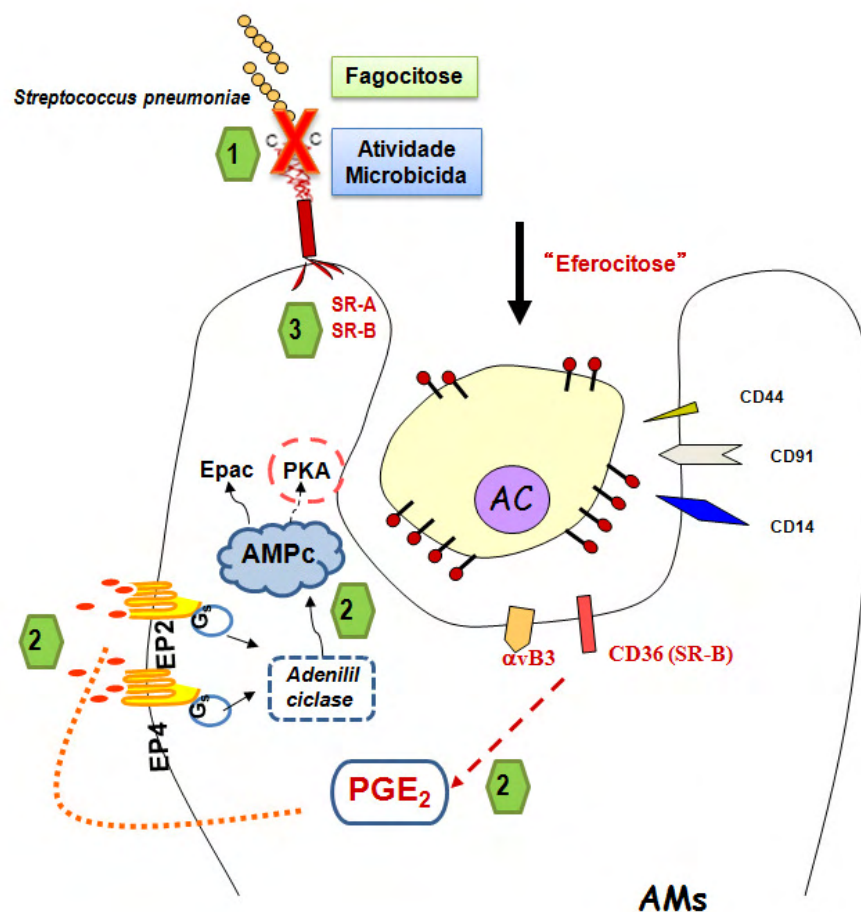
Sabe-se que para a PGE₂ exercer suas funções é necessário que ocorra a interação deste mediador com receptores específicos que são acoplados a proteínas G, podendo ser EP1, EP2, EP3 e EP4. Sabendo que EP2 e EP4 são receptores acoplados a proteínas G_s, que promove o aumento de cAMP, e sabidamente envolvidos nas funções supressoras mediadas por PGE₂, utilizamos inicialmente como ferramenta farmacológica, agonista e antagonista de EP2. Nossos resultados demonstram que a pré-incubação de AMs com o agonista de EP2 foi capaz de mimetizar o efeito supressor resultante da incubação com ACs resultando no aumento do número de *S. pneumoniae* recuperadas e, portanto, diminuição da atividade microbicida dos AMs. Corroborando com esses resultados, a utilização de antagonistas de EP2 foi capaz de bloquear a ação da PGE₂ e, dessa forma, restaurar a capacidade microbicida desses macrófagos, observada pela diminuição do número de UFC. Apesar do receptor EP2 ser o mais expresso na superfície de AMs, os mesmos experimentos serão realizados utilizando os agonistas e antagonistas de EP4.

Mediante ao conjunto de resultados apresentados, podemos sugerir que a presença de ACs no pulmão de indivíduos com doenças pulmonares obstrutivas crônicas poderia desencadear a produção de mediadores lipídicos, como a PGE₂, e portanto interferir direta e indiretamente tanto na capacidade fagocítica como microbicida de AMs contra bactérias como *S. pneumoniae*. Dessa forma, o tratamento com inibidores da COX, concomitante à terapia antimicrobiana, poderia levar a uma melhora no quadro de imunossupressão desencadeado pela ação de PGE₂ no microambiente pulmonar e, portanto, restauração das funções efetoras de AMs na eliminação de bactérias como *S. pneumoniae*.

6. Conclusões

A partir dos resultados encontrados sugerimos que 1) a eferocitose por AMs possui um efeito imunossupressor na atividade fagocítica e microbicida contra *S. pneumoniae*; 2) a PGE_2 , oriunda da eferocitose, liga-se ao receptor EP_2 e via cAMP e independente de PKA suprime a atividade fagocítica e microbicida de AMs; 3) a presença de bloqueadores de SR-A (fucoidan e poly I) e de SR-B inibi a fagocitose *S. pneumoniae* e esse efeito é potencializado na presença de ACs.

Representação Esquemática da Conclusão:



7. Referências Bibliográficas

- Anderson, H. A., C. A. Maylock, et al. (2003). "Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells." Nat Immunol **4**(1): 87-91.
- Armstrong, R. A. (1995). "Investigation of the inhibitory effects of PGE2 and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils." Br J Pharmacol **116**(7): 2903-2908.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2004). "Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP." J Immunol **173**(1): 559-565.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." J Immunol **174**(2): 595-599.
- Arredouani, M., Z. Yang, et al. (2004). "The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles." J Exp Med **200**(2): 267-272.
- Azzam, R., K. Kedzierska, et al. (2006). "Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism." AIDS Res Hum Retroviruses **22**(7): 619-629.
- Bailie, M. B., T. J. Standiford, et al. (1996). "Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from Klebsiella pneumonia in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities." J Immunol **157**(12): 5221-5224.
- Ballinger, M. N., D. M. Aronoff, et al. (2006). "Critical role of prostaglandin E2 overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation." J Immunol **177**(8): 5499-5508.
- Baratelli, F. *et al.* (2005). "<J Immunol-2005-Baratelli-1483-90.pdf>."
- Barber, G. N. (2011). "<Glen N Barber.pdf>."
- Berger, M., T. M. Norvell, et al. (1994). "Tissue-specific Fc gamma and complement receptor expression by alveolar macrophages determines relative importance of IgG and complement in promoting phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa." Pediatr Res **35**(1): 68-77.
- Betz (1991). "<J Immunol-1991-Betz-108-13.pdf>."
- Betz, M. and B. S. Fox (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." J Immunol **146**(1): 108-113.
- Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, et al. (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 661-690.
- Brock, T. G., R. W. McNish, et al. (2003). "Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins." Prostaglandins Other Lipid Mediat **71**(3-4): 131-145.
- Campanile, F., A. Giampietri, et al. (1993). "Accelerated hematopoietic recovery and protective effect of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin in bacterial infection of neutropenic mice." Cell Immunol **147**(2): 341-352.
- Chauncey, J. B., M. Peters-Golden, et al. (1988). "Arachidonic acid metabolism by rat alveolar epithelial cells." Lab Invest **58**(2): 133-140.
- Christman, B. W., J. W. Christman, et al. (1993). "Prostaglandin E2 limits arachidonic acid availability and inhibits leukotriene B4 synthesis in rat alveolar macrophages by a nonphospholipase A2 mechanism." J Immunol **151**(4): 2096-2104.
- Chung, E. Y., S. J. Kim, et al. (2006). "Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells." Cell Res **16**(2): 154-161.

- Cockeran, R., H. C. Steel, et al. (2001). "Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E(2) and leukotriene B(4) by human neutrophils." *Infect Immun* **69**(5): 3494-3496.
- de Freitas, A., S. Banerjee, et al. (2012). "Identification of TLT2 as an Engulfment Receptor for Apoptotic Cells." *The Journal of Immunology* **188**(12): 6381-6388.
- Devitt, A., O. D. Moffatt, et al. (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." *Nature* **392**(6675): 505-509.
- Donnelly, L. E. (2012). "Defective Phagocytosis in Airways Disease<alt-title alt-title-type="short">Phagocytic Dysfunction and Airways Disease</alt-title>." *CHEST Journal* **141**(4): 1055.
- Fadeel, B. (2003). "Programmed cell clearance." *Cell Mol Life Sci* **60**(12): 2575-2585.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." *J Clin Invest* **101**(4): 890-898.
- Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, et al. (2000). "Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages." *Nature* **403**(6766): 199-203.
- Freire-de-Lima, C. G., Y. Q. Xiao, et al. (2006). "Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages." *J Biol Chem* **281**(50): 38376-38384.
- Ganesan, S., A. N. Faris, et al. (2012). "Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A." *Am J Pathol* **180**(1): 61-72.
- Greenberg, S. and S. Grinstein (2002). "Phagocytosis and innate immunity." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 136-145.
- Greenberger, M. J., R. M. Strieter, et al. (1995). "Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia." *J Immunol* **155**(2): 722-729.
- Grimsley, C. and K. S. Ravichandran (2003). "Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals." *Trends Cell Biol* **13**(12): 648-656.
- Gualde, N. and H. Harizi (2004). "Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity." *Immunol Cell Biol* **82**(4): 353-360.
- Henson, P. M., D. L. Bratton, et al. (2001). "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 627-633.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, et al. (2001). "Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells." *J Cell Biol* **155**(4): 649-659.
- Iwasaki, K., K. Noguchi, et al. (2003). "Prostaglandin E2 downregulates interleukin-12 production through EP4 receptors in human monocytes stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and interferon-gamma." *Oral Microbiol Immunol* **18**(3): 150-155.
- Kalinski, P. (2012). "Regulation of immune responses by prostaglandin E2." *J Immunol* **188**(1): 21-28.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* **282**(5397): 2275-2279.
- Kim, S., E. Y. Chung, et al. (2005). "Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells." *Cell Cycle* **4**(2): 231-234.
- Kunkel, S. L., M. Spengler, et al. (1988). "Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression." *J Biol Chem* **263**(11): 5380-5384.
- Laskin, D. L. and J. D. Laskin (2001). "Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity." *Toxicology* **160**(1-3): 111-118.

- Lopes, M. F., V. F. da Veiga, et al. (1995). "Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease." J Immunol **154**(2): 744-752.
- Marriott, H. M., T. J. Mitchell, et al. (2008). "Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction." Curr Mol Med **8**(6): 497-509.
- McCoy, J. M., J. R. Wicks, et al. (2002). "The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." J Clin Invest **110**(5): 651-658.
- McLeish, K. R., G. T. Stelzer, et al. (1987). "Regulation of oxygen radical release from murine peritoneal macrophages by pharmacologic doses of PGE2." Free Radic Biol Med **3**(1): 15-20.
- Medeiros, A. I., V. L. Bonato, et al. (2002). "Histoplasma capsulatum inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leucocytes." Scand J Immunol **56**(4): 392-398.
- Medeiros, A. I., C. H. Serezani, et al. (2009). "Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling." J Exp Med **206**(1): 61-68.
- Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, et al. (1998). "Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages." J Exp Med **188**(12): 2313-2320.
- Miyanishi, M., K. Tada, et al. (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." Nature **450**(7168): 435-439.
- Mukouhara, T., T. Arimoto, et al. (2011). "Surface lipoprotein PpiA of Streptococcus mutans suppresses scavenger receptor MARCO-dependent phagocytosis by macrophages." Infect Immun **79**(12): 4933-4940.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**(9061): 1269-1276.
- Nataraj, C., D. W. Thomas, et al. (2001). "Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse." J Clin Invest **108**(8): 1229-1235.
- Park, D., A. C. Tosello-Trampont, et al. (2007). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." Nature **450**(7168): 430-434.
- Park, S. Y., M. Y. Jung, et al. (2008). "Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor." Cell Death Differ **15**(1): 192-201.
- Peters-Golden, M., R. W. McNish, et al. (1990). "Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung." J Immunol **144**(1): 263-270.
- Platt, N., R. Haworth, et al. (2002). "The many roles of the class A macrophage scavenger receptor." Int Rev Cytol **212**: 1-40.
- Platt, N., H. Suzuki, et al. (1996). "Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12456-12460.
- Redmond, H. P., J. Shou, et al. (1991). "Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition." Surgery **110**(2): 311-317.
- Rennemeier, C., S. Hammerschmidt, et al. (2007). "Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan." FASEB J **21**(12): 3118-3132.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Nature **343**(6254): 170-173.
- Savill, J., N. Hogg, et al. (1992). "Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis." J Clin Invest **90**(4): 1513-1522.
- Serezani, C. H., D. Aronoff, M. Ballinger, B. Moore, and M. Peters-Golden (2007). "E-prostanoid receptors 2 and 4 orchestrate the suppression of bacterial killing in alveolar macrophages by prostaglandin E2." J. Biochem Chem.

- Serezani, C. H., S. Kane, et al. (2012). "PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE₂-mediated inhibition of phagocytosis of fungi." Sci Signal **5**(210): ra12.
- Shinomiya, S., H. Naraba, et al. (2001). "Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I₂ and E₂: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists." Biochem Pharmacol **61**(9): 1153-1160.
- Sugimoto, Y., Y. Fukada, et al. (2005). "Prostaglandin E₂ stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP₂ receptor in mouse peritoneal neutrophils." J Immunol **175**(4): 2606-2612.
- Thelen, T., Y. Hao, et al. (2010). "The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages." J Immunol **185**(7): 4328-4335.
- Tilley, S. L., T. M. Coffman, et al. (2001). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." J Clin Invest **108**(1): 15-23.
- Todt, J. C., B. Hu, et al. (2008). "The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Mertk during apoptotic cell uptake by murine macrophages." J Leukoc Biol **84**(2): 510-518.
- Wilborn, J., L. J. Crofford, et al. (1995). "Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E₂ and to express cyclooxygenase-2." J Clin Invest **95**(4): 1861-1868.
- Wilborn, J., D. L. DeWitt, et al. (1995). "Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): L294-301.
- Yao, C., D. Sakata, et al. (2009). "Prostaglandin E₂-EP₄ signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion." Nat Med **15**(6): 633-640.

Anexo I

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para utilização de animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 03/2011

Interessado: Taís Picolo de Souza

Orientador: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Projeto: Impacto da Eferocitose na Fagocitose e Atividade Microbicida Via Receptores "Scavenger" em Macrófagos Alveolares – Papel de Prostaglandina E₂

Parecer nº 15/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Impacto da Eferocitose na Fagocitose e Atividade Microbicida Via Receptores "Scavenger" em Macrófagos Alveolares – Papel de Prostaglandina E₂", apresentado pela Pós-Graduanda Taís Picolo de Souza, orientada pela Professora Doutora Alexandra Ivo de Medeiros, do Departamento de Ciências Biológicas, desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em setembro de 2013.

Araraquara, 26 de abril de 2011.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Coordenador do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 28/2011

Pesquisador: ANA CAROLINA GUERTA SALINA

Orientador: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

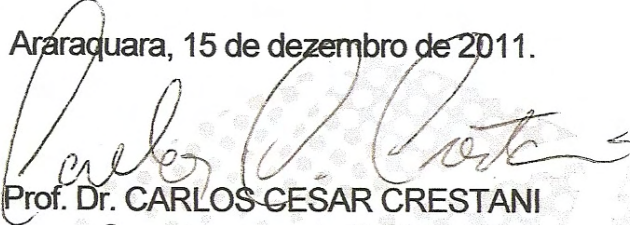
Projeto: Efeito da fagocitose de células apoptóticas nas funções efectoras de macrófagos contra *Streptococcus pneumoniae*

Parecer nº 27/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Efeito da fagocitose de células apoptóticas nas funções efectoras de macrófagos contra *Streptococcus pneumoniae*", apresentado pela graduanda Ana Carolina Guerta Salina, sob orientação da Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em novembro de 2013, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 15 de dezembro de 2011.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo II

Comprovante de submissão de artigo científico.

Immunology

© 2013 Blackwell Publishing Ltd



Special Issue: Abstracts of the European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, Scotland

September 2012

Volume 137, Issue Supplement s1

Pages 1–809



process. The altered number of DCs is caused by altered cell trafficking after myocardial injury. The functional relevance of DCs in the heart, as well as their migration, proliferation and cytokine pattern is currently under observation.

PO237

Detection of cytokines in human cell lines stimulated with metal ions

Z. Venclikova*, J. Bartova* & J. Belacek†

*Institute of Clinical and Experimental Dental Medicine GUH and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic,

†Institute of Biophysics and Informatics GUH and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Purpose/Objective: Human mucosal surface represents a vast area in which the external and internal environments come into contact. An important role in this contact is played by epithelial cells and the chemicals they produce. We therefore concentrated on studying the production of cytokines in cells stimulated with metal ions that are parts of dental alloys and whose corrosion products affect not only the oral cavity mucosa but, after ingestion, also the mucosal epithelium of the gastrointestinal tract.

Materials and methods: The study was performed on the macrophage cell line THP1 and two lines of human intestinal epithelial cells cultivated with Hg and Ni salts and also with other allergens such as Ti, Pd, Co and Cr. The cytokines were determined by the Ray Bio[®] Human Inflammation Antibody Array III, which permits the determination of 40 cytokines.

Results: The intestinal epithelial cell lines DLD 1 and HT 29 were found to respond differently to stimulation with metal ions. Cultivation with ions affected epithelial lines to various degrees of production of pro- as well as anti-inflammatory factors, growth factors and chemokines. Cultivation of the THP1 macrophage cell line with metal ions brought about a higher production of cytokines than that found with the epithelial cell lines; e. g. stimulation with chromium ions caused a significantly higher production of the pro-inflammatory factor Rantes. Nickel ions significantly increased the production of pro-inflammatory cytokine IL-6, chromium enhanced the production of IL-8. Cobalt activated the pro-inflammatory TNF beta.

Conclusions: The findings in the macrophage cell line THP1 were in keeping with the clinical experience implying the observation of high proliferative activity of mononuclear cells in patients diagnosed with undesirable response to dental alloys.

This project was supported by IGA of MH CR No. NT/12206-4.

PO238

Effects of interleukin-33 on phagocytosis and nitric oxide synthesis in macrophages

H. Aksoy, E. U. Bagriacik & V. Bulut

Immunology, Gazi University, Ankara, Turkey

Purpose/Objective: This study is aimed to enlighten effects of IL-33 on NO synthesis and the phagocytosis in macrophage J774.1 cell line. **Materials and methods:** J774.1 cell line macrophages were used in this study. Cells were divided into several groups. In order to induce cells, low dose LPS (10 ng/ml), high dose LPS (1 µg/ml), IFN-γ (40 U/ml) + LPS (10 ng/ml), IL-33 in a variety of concentrations were applied.

In our study, NO production was measured by Griess reaction. Phagocytosis tests were done by using fluorometry. Kruskal-Wallis and Student's t statistical tests were applied by using SPSS.15.0 v. software.

Results: IL-33 was added into J774.1 cell cultures stimulated by IFN-γ plus LPS or high dose LPS alone and unstimulated. Then, nitrite levels

were measured by Griess reaction. We observed that IL-33 in a variety of concentrations did not lead to NO production in J774.1 cell line. IL-33 also did not alter NO levels in J774.1 cells stimulated by IFN-γ plus low dose LPS or high dose LPS alone in a dose dependent manner and in time-point experiments.

When added IL-33 into cultures, it caused to increase in phagocytosis response of macrophages compared to negative controls ($P < 0.01$). Phagocytosis responses were found to be 865% and 792% in response to IL-33 (20 ng/ml, 100 ng/ml, respectively). In cells stimulated by IFN-γ plus LPS, phagocytosis response was found to be 489%.

Conclusions: Macrophages are critical effectors and regulators of inflammation and the innate immune response. Although IL-33 did not lead to elevation in NO levels in macrophages, J774.1 cell line, it caused to a remarkable eightfold increase in phagocytosis response. In comparison with cells stimulated by IFN-γ and LPS, this phagocytosis response was twofold higher in cells induced by IL-33. It is a paradigm of macrophages that IFN-γ plus LPS induction leads to fully activation of macrophages. However, in our study we show that IL-33 is more potent effector for phagocytosis. Further experiments have been going on in order to elicit mechanisms for the effect of IL-33.

PO239

Efferocytosis by alveolar macrophages inhibit phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by PG2/cAMP

T. Picolo-Souza, A. C. G. Salina, T. R. Toledo & A. I. Medeiros
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' – UNESP,
Biological Science, Araraquara/São Paulo, Brazil

Purpose/Objective: Alveolar macrophages (AMs) are the first line of defense against microbial pathogens in the lung. The uptake of ACs by macrophages suppresses immune responses by releasing anti-inflammatory mediators such as TGF-β and PGE₂. The Scavenger receptor AI/II (SR-AI/II) and macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) are the major receptors involved in the *Streptococcus pneumoniae* phagocytosis. However, the role of PGE₂ produced in response to efferocytosis in the phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages is unclear.

Materials and methods: To induce early apoptosis, Jurkat cell were treated for 5 h with 8 µg/ml camptothecin (CPT). AMs were pre-incubated for 30 min pharmacological inhibitor and then incubated with AC (3:1) for 1 h, followed by FITC-labeled *S. pneumoniae*.

Results: We found that the pre-incubation for 1 h with AC (3:1) inhibited the ingestion of different *S. pneumoniae*-to-cell ratios by rat AMs (AMs:Sp 1:100 = - 43%, * $P < 0.05$ versus AM*Sp). The inhibition of *S. pneumoniae* phagocytosis by efferocytosis was partially reverted when endogenous PGE₂ production was inhibited with COX inhibitor indomethacin (AMs:Sp - 1:100 = - 25%, #, $P < 0.05$ versus AM*Sp) and by adenylate cyclase inhibitor (AMs:Sp - 1:100 = - 17%, versus AM*Sp). The suppressor effect of efferocytosis by AMs on *S. pneumoniae* phagocytosis was compared with exogenous PGE₂ and Forskolin (1:100 = 41%, #, $P < 0.05$ versus AM*Sp). Moreover, we investigated whether efferocytosis by AMs are able to inhibit the *S. pneumoniae* phagocytosis by scavenger receptor: AI/II (SR-AI/II) and/or macrophage receptor with collagenous structure (MARCO). The inhibition of *S. pneumoniae* phagocytosis by efferocytosis was more pronounced when SR-AI/II were blocked CASE antagonist, fucoidan. **Conclusions:** Conclusion: In the present study, we demonstrated that efferocytosis by AMs through of PGE₂/adenylate cyclase/cAMP pathway inhibit *S. pneumoniae* phagocytosis and MARCO is the most important scavenger receptor involved in this suppressive effects mediated by efferocytosis.

Financial Support: CNPq - 471539/2006-0, FAPESP 2011/17611-7, CAPES and FUNDECIP/UNESP.