

ANA CAROLINA GUERTA SALINA

**Impacto da eferocitose na atividade microbicida via
receptores “scavenger” em macrófagos alveolares:
Papel de prostaglandina E₂.**

Araraquara

2012

ANA CAROLINA GUERTA SALINA

**Impacto da eferocitose na atividade microbicida via
receptores “scavenger” em macrófagos alveolares:
Papel de prostaglandina E₂.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

2012

*Dedico este trabalho aos meus pais e as
minhas tias, Margarete e Elisabete, que
sempre me apoiaram e me incentivaram nos
momentos de decisões difíceis.*

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, pela educação, amor, carinho e apoio em todos esses anos.

Aos meus irmãos Luis e Maria, que mesmo com todos os nossos desentendimentos estiveram sempre presentes.

Aos amigos:

Paula, companheira de casa, de problemas e de muitas risadas;

Laura, amiga e companheira de faculdade;

Nathi, Fofis, Sarah e o Morpheu por tornar a angústia das vésperas de provas menos pesadas com os grupos de estudos divertidíssimos.

À professora Alexandra pela grande oportunidade acadêmica e pela acolhida em sua trupe.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio e ajuda em todos os momentos: Taís, Mandy,

Renatinha, Naiara Naiana, Felipe, Fernandinha, T.T., Vicky e a Valéria.

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

A Deus, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1. O Impacto de Células Apoptóticas na Resposta Imune	8
1.2. Envolvimento de PGE ₂ no Aumento da Susceptibilidade a Infecções.	10
1.3. Receptor “Scavenger”	12
1.4. Injúria Pulmonar e PGE ₂	14
2. Justificativa e Objetivos	15
2.1. Hipótese do Projeto.....	17
2.2. Delineamento experimental.....	17
3. Material e Métodos	19
3.1. Animais	19
3.2. Isolamento e cultura de MAs	19
3.3. Indução de apoptose celular	19
3.4. Quantificação das citocinas	20
3.5. Avaliação da atividade microbicida através da recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC)	20
3.6. Análise estatística	20
4. Resultados	21
4.1. Indução de apoptose celular por Camptotecina	21
4.2. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de <i>S. pneumoniae</i>	22
4.4. Envolvimento de PGE ₂ na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por MAs no contexto de eferocitose	26
4.5. Avaliação do efeito da eferocitose por MAs na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra <i>S. pneumoniae</i>	27
5. Discussão	31
6. Conclusões.....	35
7. Referências Bibliográficas	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Indução de apoptose celular por Campothecina	22
Figura 2. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de <i>S. pneumoniae</i>	23
Figura 3. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de <i>S. pneumoniae</i> utilizando bloqueadores de receptores “scavengers”	25
Figura 4. Envolvimento de PGE ₂ na supressão da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por MAs no contexto de eferocitose	27
Figura 5. Avaliação do efeito de PGE ₂ endógena na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra <i>S. pneumoniae</i> produzidos por MAs.....	30
Figura 6. Avaliação do efeito de PGE ₂ endógena na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra <i>S. pneumoniae</i> produzidos por MAs.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	células apoptóticas
ALT	ácido lipoteicóico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
COX	cicloxigenase
CPT	camptotecina
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
F	fucoidan
FcγR	receptor de Fc
GM-CSF	fator estimulador de crescimento de monócitos e granulócitos
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IL	interleucina
INDO	indometacina
IgG	imunoglobulina G
LPS	lipopolissacarídeo
LTC₄	leucotrieno C4
M	meio de cultura
MA	macrófagos alveolares
NEED	N-(1-naftil)etilenodiaminodihidroclorido
NADPHox	nicotinamida adenino dinucleotídeo fosfato-oxidase
NO	óxido nítrico
NO₂⁻	dióxido de nitrogênio

P	poly I
PAMP	padrões moleculares associados ao patógeno
PGE₂	prostaglandina E ₂
PGs	prostaglandinas
PI	iodeto de propídio
PSR	receptor fosfatidilserina
RBC	células vermelhas do sangue
RM	receptor de manose
ROI	reativo intermediário do oxigênio
SBF	soro bovino fetal
Sp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SR	<i>receptor scavenger</i>
SSRA	síndrome de stress respiratório agudo
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TLR	receptor toll-like
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TSB	caldo triptona de soja
UFC	unidades formadoras de colônias

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em países de baixa renda as infecções do trato respiratório ocupam o primeiro lugar dentre as causas de morte, sendo responsável por 11,2% das mesmas. Dentre estas, a causada por *Streptococcus pneumoniae* é uma das responsáveis pelo maior número de mortes em crianças ou adultos acometidos por doenças pulmonares crônicas. No pulmão os macrófagos alveolares (MAs) através de receptores expressos na superfície celular, como receptores “scavenger”, possuem um papel crítico na fagocitose e atividade microbicida de diferentes bactérias Gram-positivas. Em indivíduos acometidos por doenças pulmonares crônicas há um grande acúmulo de células apoptóticas (ACs) e estes podem ser mais susceptíveis a infecções pulmonares bacterianas como por *S. pneumoniae*. A presença destas ACs poderia contribuir para o aumento desta susceptibilidade através da supressão da resposta imune. Portanto, neste trabalho avaliamos se o efeito supressor mediado por ACs pode interferir na modulação das atividades microbicidas de MAs contra *S. pneumoniae* via receptores “scavenger”. A partir dos resultados encontrados, pode-se sugerir que 1) a eferocitose por MAs possui efeito imunossupressor na atividade microbicida contra *S. pneumoniae*; 2) a atividade supressora mediada pela fagocitose de ACs por MAs foi inibida na presença de bloqueadores de SR-A, sugerindo que os SR-B I/II são menos sensíveis a efeito supressor decorrente da eferocitose; 3) a PGE₂, oriunda da eferocitose, liga-se ao receptor EP₂ e suprime a atividade microbicida de MAs; 4) as produções de IL-1 α , TNF- α e NO estão aumentadas na presença de ACs, sugerindo que a eferocitose por MAs promove um descontrole na ativação de MAs mediante a infecção por *S. pneumoniae*.

1. Introdução

1.1. O Impacto de Células Apoptóticas na Resposta Imune

A morte celular programada, denominada apoptose, é um processo fisiológico envolvido no desenvolvimento, remodelamento e renovação tecidual homeostática. O processo de fagocitose de células apoptóticas (também denominado eferocitose) envolve a interação de um grande número de receptores e opsoninas com seus respectivos ligantes celulares expostos durante os vários estágios da morte celular programada. A eferocitose resulta na supressão da resposta imune mediada pela liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β , prostaglandina E₂ (PGE₂), assim como inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , GM-CSF, IL-12, IL-1 β e IL-18 e LTC₄ (Fadok *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 2005; Medeiros *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 *et al.*, 2000) e ou PSR (Freire-de-Lima *et al.*, 2006; Henson *et al.*, 2001) é um dos principais receptores envolvidos na síntese de PGE₂ e TGF- β , sendo estes mediadores envolvidos na supressão da resposta imune.

O impacto da imunossupressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas tem sido demonstrado em diferentes modelos de infecção e processos inflamatórios crônicos. No modelo de infecção por *Trypanossoma cruzi* (Lopes *et al.*, 1995) foi demonstrada previamente a presença de um grande número de linfócitos apoptóticos durante o curso da infecção. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados promove o crescimento do parasita de forma dependente de PGE₂, TGF- β e síntese

de poliaminas. Uma única injeção de células apoptóticas em camundongos previamente infectados com *T. cruzi* foi capaz de aumentar drasticamente a parasitemia nestes animais.

A apoptose de células do sistema imune ocorre em grande escala em infecções agudas. Recentes trabalhos da literatura demonstram que a fagocitose de células apoptóticas contendo ou não PAMPs (do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) no seu interior pode influenciar diretamente no padrão inflamatório ou anti-inflamatório da resposta imune contra o agente agressor (Torchinsky *et al.*, 2010 e Chung *et al.*, 2006). O papel de PGE₂ neste processo parece se comportar como um importante mediador envolvido na imunossupressão e no aumento da susceptibilidade a infecções (Aronoff *et al.*, 2004; Aronoff *et al.*, 2005; Freire-de-Lima *et al.*, 2000; Serezani, 2007). Desta forma, os estudos referentes aos receptores e sinais moleculares desencadeados por PGE₂ na supressão da resposta imune induzida 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 *et al.*, 2009) demonstrou que a pré-incubação de macrófagos alveolares (MAs) 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 microbida em MAs é mediado por cicloxigenase/PGE₂/receptor EP₂/AMPC. A participação de PGs foi confirmada através do pré-tratamento de MAs com inibidores de COX e de adenilil ciclase resultando na reversão da inibição das atividades fagocítica e microbida por MAs induzida por células apoptóticas. Além

disso, MAs obtidos de animais deficientes do receptor para EP_2 ($EP_2^{-/-}$) foram capazes de reverter a inibição da fagocitose de IgG-RBC induzida por células apoptóticas. O papel supressor de PGE_2 induzido pela eferocitose por MAs foi confirmado *in vivo* através da instilação de células apoptóticas no pulmão. A prévia instilação de células apoptóticas e o subsequente desafio com *S. pneumoniae* resultou na proliferação e disseminação para a corrente sanguínea da bactéria que foi revertida em animais deficientes do receptor EP_2 (Medeiros *et al.*, 2009). Visto que estes camundongos não possuem anticorpos pré-existentes contra *S. pneumoniae* os resultados obtidos *in vivo* sugerem que PGE_2 , produzida através da fagocitose de células apoptóticas por MAs, parece exercer um papel importante 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”, considerados de fundamental importância na interação fagócitos-bactérias Gram-positivas.

1.2. Envolvimento de PGE_2 no Aumento da Susceptibilidade a Infecções.

As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos oriundas do ácido araquidônico liberado de fosfolípidos de membranas pelas fosfolipases ($cPLA_2$) (Burke *et al.*, 2010). O ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado pela ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) para formar uma prostaglandina intermediária denominada PGH_2 . As enzimas responsáveis pela metabolização da PGH_2 determinam o destino da mesma, podendo ocorrer a formação de PGI_2 , PGF_2 , PGD_2 , PGE_2 ou tromboxanas A_2 (TxA_2). Esses prostanóides são então liberados pela célula através de um transportador de

membrana e, devido sua curta meia vida, logo exercem sua função efetora de forma autócrina e parácrina (Schuster *et al.*, 1998).

Particularmente, a PGE₂ é uma das mais abundantes PG produzida pelas células de nossos tecidos e exerce sua função através de 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos são receptores associados à proteína G (GPCR) e variam quanto a propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e tipo de proteínas G e, consequentemente a transdução de sinais (Sugimoto *et al.*, 2008). Dentre esses, EP1, EP3 são expressos em altos níveis na superfície de MAs.

A produção exacerbada de PGE₂ normalmente está associada ao aumento de susceptibilidade às infecções bacterianas, que acometem os indivíduos infectados por HIV (Azzam *et al.*, 2006), desnutridos (Redmond *et al.*, 1991), ou submetidos a transplante de órgão (Ballinger *et al.*, 2006). Além de induzir a produção de IL-10 (Strassmann *et al.*, 1994), a PGE₂ inibe muitos aspectos funcionais de macrófagos e neutrófilos atuando diretamente nos mecanismos de defesa antimicrobiana no pulmão (Greenberger *et al.*, 1995). Apesar da vasta literatura correlacionado PGE₂ como um importante mediador inflamatório nos processos inflamatório agudos e crônicos, o potencial antiinflamatórios deste prostanóide vem sendo descrito em diferentes modelos experimentais (Medeiros Al *et al.*, 2012; Tilley *et al.*, 2001).. A administração de inibidores de COX em modelos animais de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* resultou na eliminação destes microrganismos e aumento da sobrevivência dos animais (Campanile *et al.*, 1993). O aumento da produção de PGE₂ na tuberculose pulmonar (Rangel Moreno *et al.*, 2002), assim como o aumento da expressão de COX-2 em células epiteliais e MA

são descritos em modelos de pneumonia em primatas não humanos (Khan *et al.*, 2000). Aronoff *et al.* (Aronoff *et al.*, 2004) demonstraram que tanto PGE₂ endógena quanto exógena suprimem a capacidade microbida de MAs (MA) infectados com *Klebsiella pneumoniae* opsonizada com IgG. A inibição da atividade microbida por PGE₂ é mediada por EP₂ e EP₄ através da inibição da ativação de NADPHox e geração de ROI (do inglês reactive oxygen intermediate) (Serezani, 2007).

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, promover intensa reação inflamatória, ativar o sistema complemento (Marriott *et al.*, 2008) assim como induzir a secreção de PGE₂ (Cockeran *et al.*, 2001). 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”.

1.3. Receptor “Scavenger”

As infecções do trato respiratório inferior estão entre as principais causas de mortes por infecções no mundo (Murray and Lopez, 1997). O MA é 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 MA, tem-se descrito os que interagem com a porção Fc da IgG (FcγR, denominado FcR), envolvido na

fagocitose de microrganismos opsonizados, o receptor de complemento (Greenberg and Grinstein, 2002), receptor de manose (RM) e o receptor “scavenger” (SR) (Platt *et al.*, 2002). Os receptores Fc (Fc γ 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-existent de um prévio contato com o patógeno. Além disso, em ratos, os receptores de complemento são expressos em baixa densidade na superfície de MA (Berger *et al.*, 1994). Neste contexto, os receptores “scavenger”, expressos tanto na superfície de células dendríticas como de macrófagos, possuem um papel importante na interação parasita-hopedeiro na fase inicial da infecção. Em MAs, especificamente, 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-classe A I e II (SR-A I e SR-A II) e SR-classe B I e II (SR-B I e SR-B II ou CD36) são os principais envolvidos no reconhecimento de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae* (Rennemeier *et al.*, 2007).

O receptor “scavenger” de classe A (SR-A) é uma proteína transmembrânica expressa principalmente em macrófagos (Freeman *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1997). SR-A pode se ligar a uma variedade de ligantes polianiónicos e graças a essa especificidade ampla esses receptores estão envolvidos em diferentes mecanismos, como crescimento, adesão ao substrato, interação célula-célula, fagocitose e defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos (Dong Zhu *et al.*, 2011).

O receptor “scavenger” de classe B (SR-B) é uma glicoproteína de superfície celular rica em cisteína expresso em altos níveis em macrófagos e parecem exercer um papel chave no reconhecimento e ativação das funções efetoras de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fabriek *et al.*, 2011).

1.4. Injúria Pulmonar e PGE₂

Sabe-se que a apoptose de células da parede alveolar ocorre em grande escala na Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) associada a um aumento na susceptibilidade a infecções bacterianas no trato respiratório. Como demonstrado recentemente por nosso grupo de pesquisa em MAs (Medeiros *et al.*, 2009) e por outros grupos em macrófagos diferenciados de monócitos (Fadok *et al.*, 1998) e macrófagos peritoneais (Freire-de-Lima *et al.*, 2000), a interação e fagocitose de células apoptóticas resulta na liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF- β , NO e PGE₂ (Chung *et al.*, 2006). Apesar de PGE₂ ser um dos principais mediadores envolvidos na imunossupressão e no aumento da susceptibilidade a infecções (Aronoff *et al.*, 2004; Aronoff *et al.*, 2005; Serezani, 2007), até o momento, nada se tem descrito quanto à correlação existente entre o papel da PGE₂ no aumento à susceptibilidade 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 *et al.*, 2009). Nossa hipótese está fundamentada no fato da PGE₂ ser um dos principais fatores

que medeiam o impacto das células apoptóticas na diminuição das funções efetoras de MAs, como a atividade microbicida mediada pelo receptor “scavenger”. Assim, os estudos *in vitro* relacionados aos mecanismos de ação e sinalização intracelular mediados por PGE₂ em MAs são de grande relevância clínica para a prevenção e ou intervenção do processo de supressão da resposta imune.

2. Justificativa e Objetivos

A primeira linha de defesa no pulmão é realizada por células residentes como macrófagos e células dendríticas através da ingestão e destruição de microrganismos. A participação de eicosanóides, em especial prostaglandinas e leucotrienos, possui um papel importante na resposta imune inata do hospedeiro contra agentes infecciosos. PGE₂ inibe a fagocitose e a atividade microbicida de microrganismos opsonizados por IgG em MAs, células importantes na manutenção da esterilidade das vias aéreas. A ingestão de células apoptóticas por fagócitos promove a supressão da resposta imune através da liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β e PGE₂, assim como inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , GM-CSF, IL-12, IL-1 β e IL-18 pelos fagócitos.

Dados da Organização Mundial da Saúde destacam que as infecções do trato respiratório estão entre as doenças infecciosas que mais causam morbidade e morte por ano. Síndrome de stress respiratório agudo (SSRA) e Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são caracterizadas pelo intenso acúmulo de células apoptóticas no pulmão, promovendo um cenário propício para supressão da resposta imune e aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas, como *S. pneumoniae*. Neste contexto, os receptores “scavenger” expressos na superfície de

MAs possuem um papel crítico na fagocitose de diferentes bactérias Gram-positivas. Dentre os receptores “scavenger” existentes, os SR-classe A I e II (SR-A I e SR-A II) são os principais envolvidos no reconhecimento de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*.

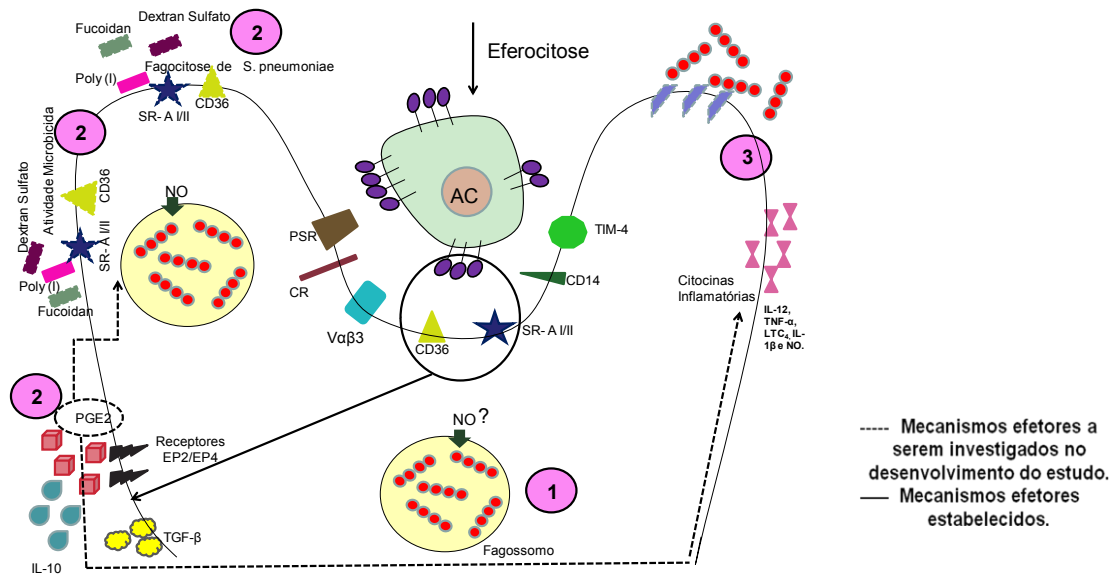
Entretanto, não existem evidências que demonstrem o papel de PGE₂ na supressão das funções efectoras de MAs contra agentes infecciosos que interagem via receptores da imunidade inata, como receptor “scavenger”.

Desta forma, o principal objetivo deste trabalho visa avaliar os mecanismos pelos quais PGE₂ endógena, oriunda da eferocitose por macrófagos alveolares, modulam a atividade microbica contra de *S. pneumoniae*, via receptor “scavenger”.

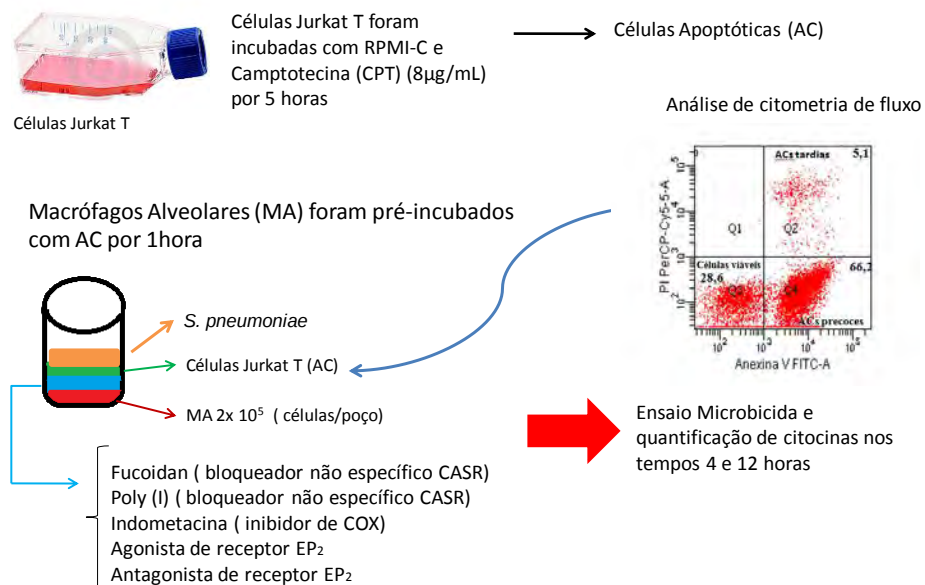
Para tanto, utilizaremos as seguintes estratégias experimentais:

- 1) Avaliar o envolvimento da PGE₂ endógena na atividade microbica de MAs contra *S. pneumoniae* utilizando inibidores de COX, agonista e antagonista de EP₂.
- 2) Avaliar o efeito de PGE₂ endógena nas atividades microbicas contra *S. pneumoniae* por MAs via receptores scavenger (SR-classe A I e II) utilizando bloqueadores específicos;
- 3) Avaliar o efeito de PGE₂ endógena na modulação de citocinas e fatores microbicas contra *S. pneumoniae* produzidos por macrófagos alveolares.

2.1. Hipótese do Projeto



2.2. Delineamento experimental



Estratégia experimental 1. Inibidores de COX, agonista e antagonista de EP₂ para avaliar o envolvimento de PGE₂ endógena na atividade microbicida de

MAs contra *S. pneumoniae*. Para avaliar o efeito de PGE₂ nas funções microbidas de MAs contra *S. pneumoniae*, os mesmos foram tratados ou não com inibidores de COX (Indometacina), agonista e antagonista de EP₂ por 30 min e, então, incubadas com células apoptóticas na proporção de 1:3 (MAs:AC) por 1h. Em seguida, *S. pneumoniae* foi adicionado na proporção de 1:50 (MAs:Sp) e a placa incubada por 3h para que ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços foram lavados com RPMI incompleto sem antibiótico para remoção das bactérias não fagocitadas, e os macrófagos incubados novamente para remoção do sobrenadante para subsequente quantificação de citocinas e nitrito em diferentes tempos (4 e 12h). Após a coleta do sobrenadante, os macrófagos foram lisados com TSB + saponina 0.5% e a partir da suspensão do lisado celular foi feita uma diluição seriada na base dez para recuperação de UFC de *S. pneumoniae* em ágar sangue, conforme descrito em materiais e métodos.

Estratégia experimental 2. Avaliar o efeito de PGE₂ endógena nas atividades microbidas contra *S. pneumoniae* por MAs nas diferentes classes de receptores scavenger (SR-classe A I e II) utilizando bloqueadores específicos.

MAs foram pré-tratados, ou não, com bloqueadores de receptores “scavenger”, como poly I e fucoidan, por um período de 30 min e, então, incubados com AC na proporção de 1:3 (MAs:AC) por 1h. Em seguida, MAs foram desafiados com *S. pneumoniae* na proporção 1:50 e incubados por 3h para que ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços foram lavados com RPMI incompleto sem antibiótico para remoção das bactérias não fagocitadas, e os macrófagos, incubados novamente. Após 4 h, foi feita a coleta do sobrenadante e os macrófagos foram lisados com TSB + saponina 0.5%. A partir da suspensão do lisado celular foi feita

uma diluição seriada na base dez para recuperação de UFC de *S. pneumoniae* em ágar sangue conforme descrito em materiais e métodos. As quantificações de citocinas e nitrito foram feitas a partir do sobrenadante da cultura em diferentes tempos (4 e 12h).

Estratégia experimental 3. Avaliar o efeito de PGE_2 endógena na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra *S. pneumoniae* produzidos por macrófagos alveolares. Os sobrenadantes de cultura obtidos nos experimentos descritos acima foram avaliados quanto à produção de citocinas (TNF- α e IL-1 α) e nitrito como descrito em materiais e métodos, nos tempos 4 e 12h.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar obtidas dos Laboratórios Charles River. Os animais foram tratados de acordo com as normas do comitê de ética em experimentação animal da UNESP, protocolo número 27/2011.

3.2. Isolamento e cultura de MAs

MAs residentes foram obtidos de ratas através do lavado bronco-alveolar como previamente descrito por Peters-Golden M *et al.* (1990) e em seguida, estas células foram mantidas em cultura com RPMI 1640-completo (5% de SBF e gentamicin 50 μ g/ml, 37°C, 5% de CO₂) durante 18h e por 1h em meio livre de soro.

3.3. Indução de apoptose celular

Como fonte de células apoptóticas, a linhagem Jurkat (linhagem humana de células T) foi submetida ao tratamento com Campothecina (CPT - 8 μ g/ml) por 5h

em RPMI 1640-completo (37°C, 5% de CO₂). A porcentagem de células apoptóticas precoces (Anexina+/PI-) e tardias (Anexina+/PI+) foi determinada através da marcação AnexinaV/PI utilizando citometria de fluxo, conforme descrito previamente por Medeiros *et al.* (2002).

3.4. Quantificação das citocinas

A quantificação das citocinas IL-1 α e TNF- α foi feita a partir do sobrenadante retirado da cultura através da técnica de Ensaio Imunoenzimático Competitivo (ACETM EIA) (Armesthan Pharmacia) (Evans *et al.*, 2002). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. O óxido nítrico foi quantificado a partir da reação de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%).

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

A recuperação de UFC de *S. pneumoniae* foi realizada a partir da lise dos macrófagos utilizando 200 μ L de TBS + 0,5 % saponina gelada. Foi feita 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 a 37°C por 24h, e após isso, foi feita a contagem de UFC. Os resultados foram expressos em número de UFC/mL.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SD e analisados utilizando o programa estatístico Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para comparações entre dois grupos experimentais utilizou-se o teste de Student's *t*. Para

comparações entre três ou mais grupos experimentais aplicou-se ANOVA seguido de teste de comparação múltipla Dunnett ou Tukey. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados ao menos três vezes em diferentes períodos.

4. Resultados

4.1. Indução de apoptose celular por Camptotecina

ACs foram obtidas a partir da incubação de células Jurkat com CPT (8 $\mu\text{g/ml}$) por 5h e então a porcentagem de células apoptóticas foi avaliada por marcação com Anexina V/PI. Como observado na Figura 1, o tratamento das células com CPT resultou em 66,2% de ACs precoces ((Anexina V^+ /PI $^-$), 5,1% ACs tardias ((Anexina V^+ /PI $^+$) e 28,6% de células viáveis (Anexina V^- /PI $^-$). Esse protocolo de tratamento mostrou-se eficiente na indução de células apoptóticas precoces, que são as células de interesse deste estudo, e apenas uma pequena porcentagem de células em uma fase inicial de necrose (ACs tardias). A Anexina V se liga a moléculas de fosfatidilserina que são moléculas sinalizadoras de apoptose, enquanto a iodeto de propídio (PI) entra nas células que não estão com a membrana íntegra e se ligam ao DNA celular.

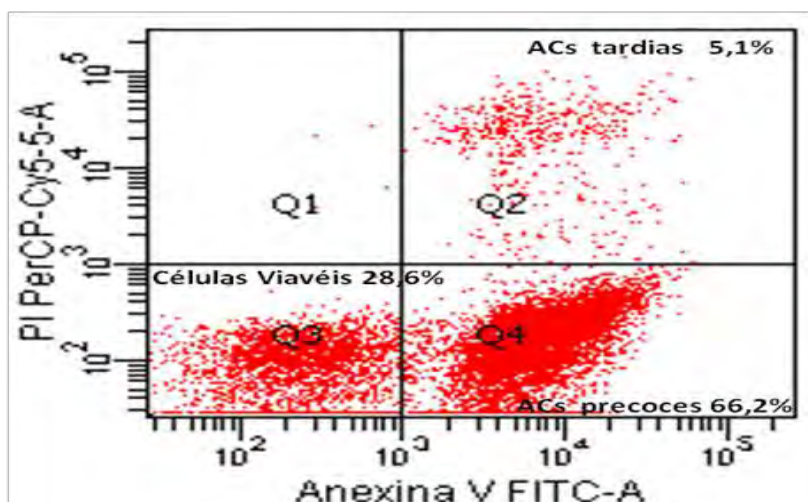


Figura 1. Indução de apoptose celular por Camptothecina. Células da linhagem Jurkat foram incubadas com CPT (8 $\mu\text{g/mL}$) por 5h para a indução da apoptose. A porcentagem de células viáveis (Q3), ACs precoces (Q4) ACs tardias (Q2) foi determinada por citometria de fluxo através da marcação por Anexina V/PI.

4.2. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de *S. pneumoniae*.

Uma das funções efetoras dos macrófagos é a atividade microbicida, atividade esta imprescindível para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. Durante o processo de injúria pulmonar crônica há um acúmulo exacerbado de células epiteliais e neutrófilos apoptóticos que podem contribuir para o aumento da susceptibilidade a microrganismo como *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*. Sabendo que a fagocitose de ACs resulta na produção de vários mediadores anti-inflamatórios, entre eles PGE_2 , inicialmente investigamos se a presença de ACs poderia interferir na atividade microbicida de MAs contra *S. pneumoniae*.

Medeiros *et al.* e outros grupos demonstraram que a proporção de 1:3 (MAs:ACs) é capaz de induzir a síntese de PGE_2 por macrófagos alveolares e monócitos. Dessa forma, optamos por iniciar a padronização de nosso ensaio

utilizando essa mesma proporção de ACs, e, desta forma, avaliar o efeito de ACs na atividade microbicida de MAs. Portanto, para que pudéssemos avaliar a melhor proporção de *S. pneumoniae* a ser utilizada em nossos ensaios, MAs foram incubados na presença ou ausência de ACs na proporção de 1:3, em seguida, desafiados com *S. pneumoniae* nas proporções de 1:50 e 1:100 (MAs:Sp) e incubados por 3h para que ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços foram lavados e as células incubadas por diferentes períodos de tempo (4, 12 e 24 h) para determinação do número de UFC de *S. pneumoniae* a partir da lise de MAs (MAs + TBS+ Saponina 0,5%).

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento de MAs com ACs promoveu um intenso aumento no número de UFC de *S. pneumoniae* em ambas as proporções testadas, 1:50 (Figura 2 A) e 1:100 (Figura 2 B), e nos três diferentes tempos quando comparado com MAs desafiados apenas com *S. pneumoniae*. O pico do crescimento bacteriano na presença de ACs ocorreu após 12h de incubação, porém com 24h ainda observamos o efeito supressor mediado pela eferocitose.

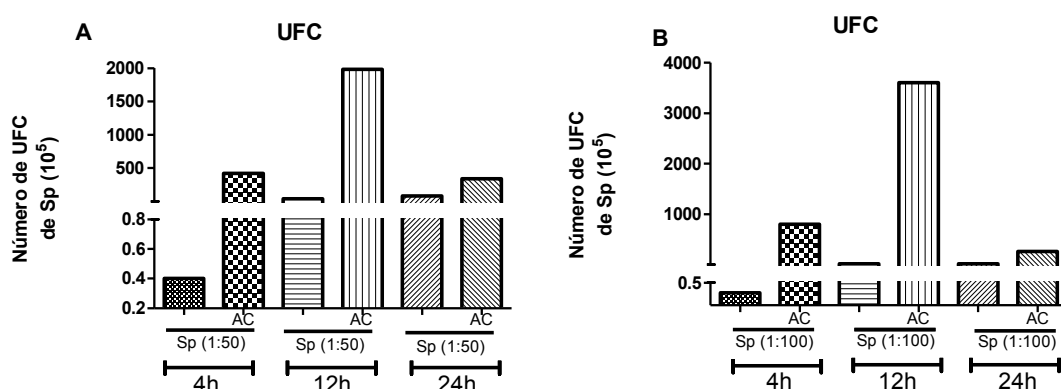


Figura 2. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de *S. pneumoniae*. MAs foram pré-tratados na presença ou ausência de ACs na proporção 3:1 (AC:MAs). Em seguida, desafiados com *S. pneumoniae* em duas diferentes proporções (A) 1:50; (B) 1:100 e incubados por 3h para que ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, os poços

foram lavados com meio RPMI incompleto sem antibiótico para remoção das bactérias não fagocitadas e os macrófagos foram novamente incubados. Após essa segunda incubação, nos tempos 4, 12 e 24h, os MAs foram lisados utilizando TSB + Saponina 0,5% e a suspensão celular foi adicionada em placas de ágar sangue por um período de 24h. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Os dados apresentados são referentes a um experimento representativo de três experimentos independentes.

4.3. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de *S. pneumoniae* utilizando bloqueadores de receptores “scavengers”.

A partir dos resultados obtidos na Figura 2, optamos por dar continuidade aos nossos experimentos utilizando apenas a menor proporção de MAs:Sp (1:50). A escolha da mesma deve-se não apenas pela reprodutibilidade dos resultados individuais obtidos nos experimentos, mas também por ser uma proporção mais encontrada na literatura relacionada à resposta imune contra *S. pneumoniae* (Mancuso *et al.*, 2011). Sabe-se que a fagocitose de bactérias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*, ocorre principalmente via receptores “scavenger”, tanto os SR-A I, SR-A II e MARCO como os SR-B I e SR-B II ou CD36 e CD 163, respectivamente. Para investigar a classe de receptores “scavenger” (SR-A e/ou SR-B) envolvida na supressão da atividade microbicida de *S. pneumoniae* pela fagocitose de ACs por MAs foram utilizados fucoidan e poly I, compostos que sabidamente atuam no bloqueio de SR-A. MAs foram pré-incubados com fucoidan ou poly I, por 30 minutos, em seguida, essas células foram incubadas na presença ou ausência de ACs por 1h e desafiadas com *S. pneumoniae*. Após o período de fagocitose, 3h, as células foram lavadas com meio RPMI incompleto sem antibiótico e uma nova incubação foi realizada para determinação da atividade microbicida no período de 4h.

Nossos resultados demonstram que o bloqueio dos receptores SR-A utilizando fucoidan e poly I aumentaram a atividade microbicida de MAs quando comparado às células não tratadas com esses bloqueadores, resultando, portanto, na diminuição do número de UFC (Figura 3).

Os mesmos testes de atividade microbicida foram realizados utilizando 12h de incubação. Entretanto, os resultados obtidos nos experimentos individuais não apresentaram reprodutibilidade dos efeitos biológicos sendo, portanto, necessária a repetição dos mesmos para conclusão deste período avaliado.

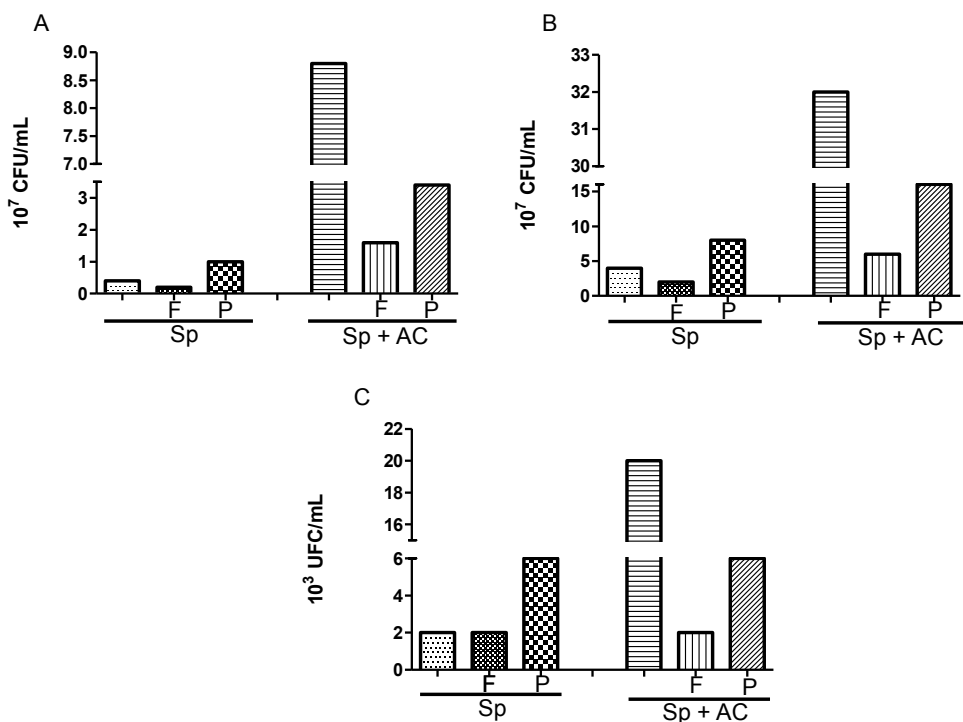


Figura 3. Efeito da eferocitose na atividade microbicida de *S. pneumoniae* utilizando bloqueadores de receptores “scavengers”. MAs foram pré-tratados na presença ou ausência de bloqueadores de receptor SR- A, fucoidan e poly I, por 30 minutos. Em seguida, ACs foram adicionadas à cultura na proporção 3:1 (AC:MAs). Os MAs foram desafiados com *S. pneumoniae* por 3h para a fagocitose da bactéria e após esse período, os poços foram lavados com meio RPMI incompleto sem antibiótico para remoção das bactérias não fagocitadas. Em seguida, os MAs foram incubados por 4h e lisados utilizando TSB +

Saponina 0,5% . O número de UFC foi determinado nas diferentes condições. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Resultados referentes a três experimentos independentes (A, B e C) realizados em quintuplicatas.

4.4. Envolvimento de PGE₂ na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por MAs 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 efectoras 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, nosso próximo passo foi investigar se a supressão da atividade microbida de *S. pneumoniae* por MAs pela eferocitose é mediada por PGE₂.

Para isso MAs foram incubados na presença ou ausência de indometacina, que é um inibidor não seletivo da enzima COX, e em seguida ACs foram adicionadas à cultura por 1h e os macrófagos foram desafiados com *S. pneumoniae*. Nossos resultados demonstram que o tratamento com indometacina foi capaz de inibir o efeito supressor da atividade microbida de MAs mediado pela incubação de ACs, sugerindo, portanto, o envolvimento da PGE₂ no aumento do número de UFC de *S. pneumoniae* mediado pela incubação de MAs com ACs (Figura 4).

Sabe-se que PGE₂ pode atuar via receptores EP₂ e EP₄, e uma forma de demonstrar esse mecanismo é utilizando agonistas e antagonistas destes receptores. Desta forma, MAs foram pré-incubados na presença ou ausência de agonista de EP₂ (Butaprost) ou antagonista de EP₂ (AH 6809), e então incubados com ACs e desafiados com *S. pneumoniae*. De acordo com a Figura 4 (A e B), nossos resultados demonstram que a utilização do agonista do receptor de EP₂ foi capaz de diminuir a atividade microbida dos MAs, mimetizando a ligação PGE₂,

oriunda da fagocitose de células apoptóticas, com o receptor EP₂. Na mesma figura, mostramos que a utilização de antagonistas do receptor EP₂ é capaz de bloquear a ação da PGE₂ e dessa forma restaurar a capacidade microbicida desses macrófagos.

Os mesmos testes foram feitos para incubação de 12h, entretanto, os resultados ainda não são consistentes (dados não mostrados).

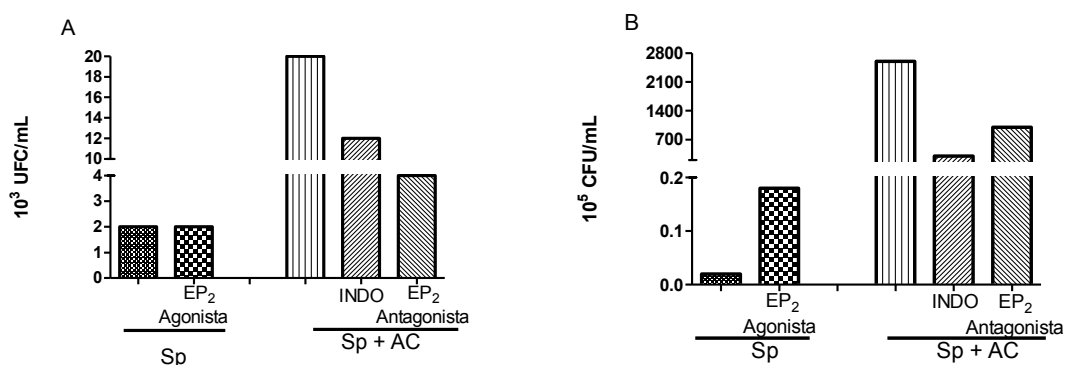


Figura 4. Envolvimento de PGE₂ na supressão da fagocitose de *S. pneumoniae* por MAs no contexto de eferocitose. MAs foram pré-tratados na presença ou ausência de bloqueador de COX, indometacina, agonista e antagonistas de EP₂, por 30 minutos. Em seguida, ACs foram adicionadas à cultura na proporção 3:1 (AC:MAs). Os MAs foram desafiados com *S. pneumoniae* por 3h para a fagocitose da bactéria e após esse período, os poços foram lavados com meio RPMI incompleto sem antibiótico para remoção das bactérias não fagocitadas. Em então, os MAs foram incubados por 4h e lisados utilizando TSB + Saponina 0,5% . O número de UFC foi determinado nas diferentes condições. Os resultados foram expressos em número absoluto de UFC. Resultados referentes a experimentos representativos (A e B) realizados em quintuplicatas.

4.5. Avaliação do efeito da eferocitose por MAs na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra *S. pneumoniae*

Sabe-se que a eferocitose de MAs ou macrófagos peritoneais resulta na supressão da resposta imune através da liberação de mediadores anti-inflamatórios

como IL-10, NO, TGF- β , PGE₂, assim como a inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , GM-CSF, IL-12, IL-1 β e IL-18 e LTC₄ (Fadok *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2009).

Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar se o pré-tratamento de MAs com ACs, seguido da infecção com *S. pneumoniae*, poderia modular citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 α) que participam do processo de ativação celular, assim como da produção de fatores microbicidas (NO₂⁻). MAs foram incubados na presença ou ausência de ACs na proporção de 1:3 (MAs:ACs), em seguida, desafiados com diferentes proporções de *S. pneumoniae*, 1:50 e 1:100 (MAs:Sp) por 3h para a fagocitose das bactérias. Após 4 e 12h o sobrenadante dessa cultura foi coletado e armazenado para quantificação de citocinas. Nossos resultados mostram que independentemente da proporção de *S. pneumoniae*:MAs utilizada na cultura não foi detectada a produção de TNF- α e IL-1 α em nenhum dos tempos avaliados. No entanto, surpreendentemente, a incubação de MAs com ACs seguida do desafio com *S. pneumoniae* resultou em aumento drástico na produção tanto de TNF- α como de IL-1 α (Figura 5). Para IL-1 α , o aumento da concentração desta citocina foi detectado apenas após 12h de incubação com *S. pneumoniae* e a proporção de bactérias não interferiu na quantidade de citocinas produzidas por MAs (Figura 5 A e B). Por outro lado, a produção de TNF- α por MAs, na presença de ACs e Sp, resultou no aumento desta citocina nas primeiras 4h e em maiores quantidades após 12h. Além disso, na proporção de 1:100, diferentemente do observado para IL-1 α , foi observado um aumento de TNF- α por MAs (Figura 5 C e D).

Sabe-se que na infecção por *S. pneumoniae* a produção de H₂O₂ é um dos principais fatores microbicidas de macrófagos para morte desta bactéria, porém o

papel de NO_2^- ainda é bastante controverso (Andisi *et al.*, 2012). Desta forma, mediante aos resultados obtidos na Figura 2, que mostram que a presença de ACs resultou no aumento exacerbado do número de UFC, o próximo passo foi avaliar se a imunossupressão medida pela eferocitose poderia estar associada com a produção de NO_2^- por MAs. Os resultados demonstram que infecção de MAs por *S. pneumonia* induz níveis semelhantes aos controles quanto a síntese de NO_2^- . No entanto, na presença de ACs observou-se um aumento de NO_2^- após 12h, apenas na proporção de 1:50 (Figura 6). Contudo, a relevância da produção deste fator microbicida neste processo ainda será melhor explorada utilizando inibidores de iNOS.

Nossa hipótese quanto ao aumento exacerbado destas citocinas e NO seria que o descontrole da proliferação de *S. pneumoniae*, devido a imunossupressão induzida pela fagocitose de ACs, resulta na ativação exacerbada destes macrófagos e, portanto, na produção de altos níveis $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\alpha$. Provavelmente, a produção exacerbada destes mediadores *in vivo* resultaria em um intenso recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, desencadeando um processo de injúria tecidual e, provavelmente, morte dos animais. Esses experimentos serão futuramente realizando *in vivo* para validarmos os resultados obtidos *in vitro*.

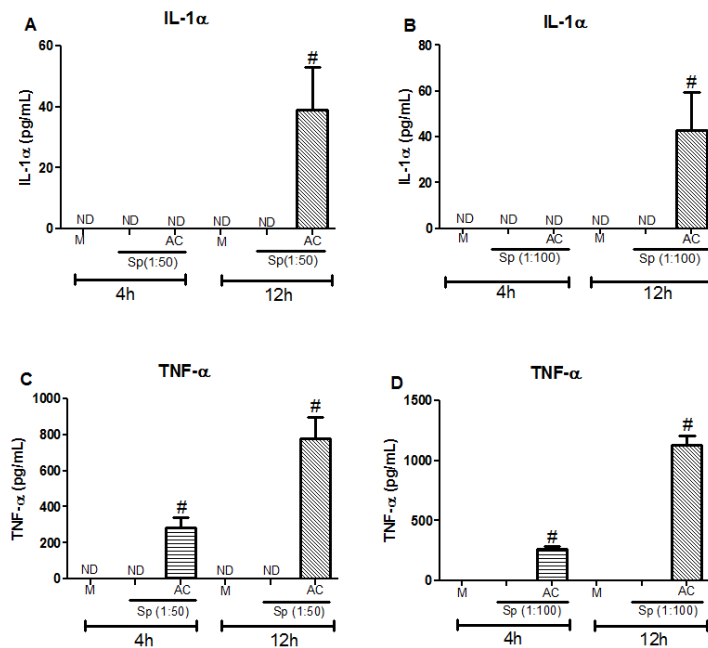


Figura 5. Avaliação do efeito de PGE₂ endógena na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra *S. pneumoniae* produzidos por MAs. MAs foram pré-tratados na presença ou ausência de ACs na proporção 3:1 (AC:MAS). Em seguida, desafiados com *S. pneumoniae* em duas diferentes proporções (A e C) 1:50; (B e D) 1:100 e incubados por 3h para que ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi recolhido para quantificação. Os resultados foram expressos em pg/mL. Resultado representativo de dois experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* P < 0.05 controle de meio versus MAs+Sp, # P < 0.05 MAs+Sp versus MAs+Ac+Sp.

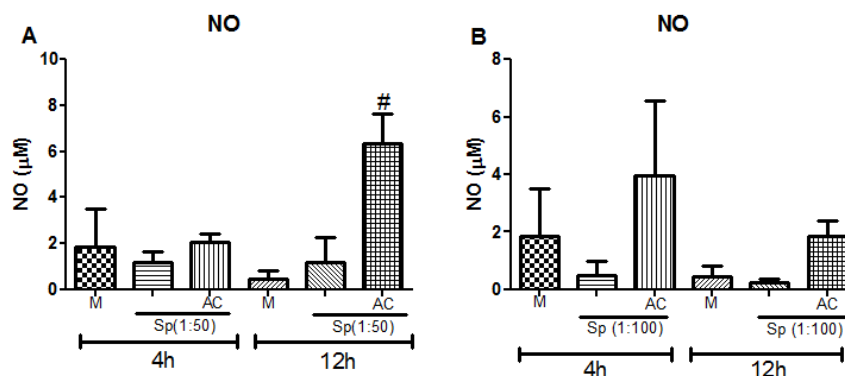


Figura 6. Avaliação do efeito de PGE₂ endógena na modulação de citocinas e fatores microbicidas contra *S. pneumoniae* produzidos por MAs. MAs foram pré-tratados na presença ou ausência de ACs na proporção 3:1 (AC:MAS). Em seguida, desafiados com *S. pneumoniae* em duas diferentes proporções (A) 1:50; (B) 1:100 e incubados por 3h para que

ocorresse a fagocitose da bactéria. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi recolhido para quantificação. Os resultados foram expressos em μM . Resultado representativo de dois experimentos independentes realizados em quintuplicatas.* $P < 0.05$ controle de meio versus MAs+Sp, # $P < 0.05$ MAs+Sp versus MAs+Ac+Sp.

5. Discussão

Em países com baixos níveis de renda per capita, 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 broco-alveolar. Uma vez fagocitadas, as ACs levam a produção de vários mediadores anti-inflamatórios, dentre eles a PGE_2 , que poderiam promover um cenário propício para supressão da resposta imune. Nossos resultados demonstram que a pré-incubação de MAs com ACs resulta em um drástico aumento na sobrevivência e proliferação de *S. pneumoniae*, quando comparados com MAs desafiados somente com a bactéria.

No pulmão, os MAs, através de receptores “scavenger” classe A e classe B, possuem um papel crítico na fagocitose e atividade microbida 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 microbida contra *S. pneumoniae* pela fagocitose de ACs por MAs. Os dados obtidos demonstram que o bloqueio dos receptores SR-A, via fucoidan e poly I, levou a uma reversão da supressão da atividade microbida de MAs 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 MAs. A partir destes resultados podemos concluir que possivelmente os SR-B são mais sensíveis ao efeito supressor de PGE₂ e/ou outros mediadores supressores liberados previamente pela fagocitose de ACs por MAs, mediadores estes que poderiam direta ou indiretamente interferir na ativação dos fatores microbicidas de MAs.

Na tentativa de determinar o papel da PGE₂ e/ou outros prostanóides produzidos pela fagocitose por MAs na supressão da atividade microbicida de *S. pneumoniae*, MAs foram pré-tratados com indometacina, inibidor não seletivo da enzima COX. Essa enzima participa do processo de síntese de PGE₂, e, portanto, quando inibida, a produção deste prostanóides também está inibida. Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento de MAs com indometacina resultou na reversão do efeito supressor da atividade microbicida decorrente da incubação de MAs 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 MAs 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 os principais receptores expressos em MAs e sabidamente envolvidos nas funções supressoras mediadas por PGE₂, utilizamos como ferramenta farmacológica, agonista e antagonista de EP₂. Nossos resultados demonstram que a pré-incubação de MAs

com o agonista de EP₂ foi capaz de mimetizar o efeito supressor resultante da incubação com ACs resultado no aumento do número de *S. pneumoniae* recuperadas e, portanto, diminuição da atividade microbida dos MAs. Corroborando com esses resultados, a utilização de antagonistas de EP₂ foi capaz de bloquear a ação da PGE₂ e, dessa forma, restaurar a capacidade microbida desses macrófagos, observada pela diminuição do número de UFC.

Em seguida, avaliamos se a inibição da atividade microbida mediada pela eferocitose por MAs era resultante da modulação de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 α , que participam do processo de ativação celular, assim como da produção de fatores microbicidas como óxido nítrico (NO). Surpreendentemente, nossos resultados demonstram que a incubação de MAs com ACs seguida do desafio com *S. pneumoniae* resultou em aumento drástico na produção tanto de TNF- α como de IL- 1 α quando comparado com MAs desafiados apenas com a bactéria. Entretanto, os níveis de óxido nítrico se mostraram semelhantes na presença ou não de células apoptóticas. Esse resultados sugerem que o aumento exacerbado destas citocinas inflamatórias seria decorrente de um descontrole da proliferação de *S. pneumoniae*, ocasionado pela imunossupressão induzida pela fagocitose de ACs, que leva a ativação excessiva dos macrófagos e, portanto, aumento na produção de TNF- α e IL-1 α . A produção exacerbada destes mediadores *in vivo* resultaria, provavelmente, em um intenso recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, desencadeando um processo de injúria tecidual que levaria a morte dos animais.

Mediante aos dados obtidos em nosso trabalho, 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 PGE_2 , e portanto interferir direta e indiretamente na capacidade microbicida de MAs contra bactérias como *S. pneumoniae*. Dessa forma, o tratamento com inibidores da COX, concomitante à terapia anti-microbiana, poderia levar a uma melhora no quadro de imunossupressão desencadeado pela ação de PGE_2 no microambiente pulmonar e, portanto, restauração das funções efetoras de MAs na eliminação de bactérias como *S. pneumoniae*.

6. Conclusões

A partir dos resultados encontrados sugerimos que 1) a eferocitose por MAs possui um efeito imunossupressor na atividade microbicida contra *S. pneumoniae*; 2) a atividade supressora mediada pela fagocitose de ACs por MAs foi inibida na presença de bloqueadores de SR-A (fucoidan e poly I), sugerindo que os SR-B I/II são menos sensíveis ao efeito supressor mediado pela eferocitose; 3) a PGE₂, oriunda da eferocitose, liga-se ao receptor EP₂ e suprime a atividade microbicida de MAs; 4) as produções de IL-1 α , TNF- α e NO estão aumentadas na presença de ACs quando comparada ao grupo MAs e Sp, sugerindo que a eferocitose por MAs promove um descontrole quanto a ativação de MAs na infecção por *S. pneumoniae*.

7. Referências Bibliográficas

- Aronoff, D.M., Canetti, C., Peters-Golden, M., 2004. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173, 559-565.
- Aronoff, D.M., Canetti, C., Serezani, C.H., Luo, M., Peters-Golden, M., 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, 595-599.
- Azzam, R., Kedzierska, K., Leeansyah, E., Chan, H., Doischer, D., Gorry, P.R., Cunningham, A.L., Crowe, S.M., Jaworowski, A., 2006. Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22, 619-629.
- Ballinger, M.N., Aronoff, D.M., McMillan, T.R., Cooke, K.R., Olkiewicz, K., Toews, G.B., Peters-Golden, M., Moore, B.B., 2006. Critical role of prostaglandin E2 overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation. *J Immunol* 177, 5499-5508.
- Berger, M., Norvell, T.M., Tosi, M.F., Emancipator, S.N., Konstan, M.W., Schreiber, J.R., 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, 68-77.
- Burke, J.E. & Dennis, E.A. Phospholipase A2 Biochemistry. *Drugs* 23, 1-22 (2010)
- Campanile, F., Giampietri, A., Grohmann, U., Binaglia, L., Fioretti, M.C., Puccetti, P., 1993. Accelerated hematopoietic recovery and protective effect of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin in bacterial infection of neutropenic mice. *Cell Immunol* 147, 341-352.
- Chung, E.Y., Kim, S.J., Ma, X.J., 2006. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* 16, 154-161.
- Cockeran, R., Steel, H.C., Mitchell, T.J., Feldman, C., Anderson, R., 2001. Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E(2) and leukotriene B(4) by human neutrophils. *Infect Immun* 69, 3494-3496.
- Dong Zhu X., Zhuang Y., Ben J., Qian L., Huang H., Bai H., Sha J., He Z., Chen Q..
- Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages. *J. Biological Chemistry*, 286, 8231-8239.
- Evans, J.H., Fergus, D.J., Leslie, C.C., 2002. Inhibition of the MEK1/ERK pathway reduces arachidonic acid release independently of cPLA2 phosphorylation and translocation. *BMC Biochem* 3, 30.

- Fabrick B. O., Bruggen, R. V., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J. M., Nazmi, K., Schornagel K., Vloet R.P. M., Dijkstra C.D., Berg T. K. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria, 2011.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M., 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, 890-898.
- Freeman, M., Ashkenas, J., Rees, D. J., Kingsley, D. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Krieger, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8810–8814
- Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Mello, F.G., DosReis, G.A., Lopes, M.F., 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199-203.
- Freire-de-Lima, C.G., Xiao, Y.Q., Gardai, S.J., Bratton, D.L., Schiemann, W.P., Henson, P.M., 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, 38376-38384.
- Greenberg, S., Grinstein, S., 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 136-145.
- Greenberger, M.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Goodman, R.E., Standiford, T.J., 1995. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* 155, 722-729.
- Henson, P.M., Bratton, D.L., Fadok, V.A., 2001. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 627-633.
- Khan, K.N., Stanfield, K., Trajkovic, D., Harris, R.K., 2000. Cyclooxygenase-2 expression in inflammatory lung lesions of nonhuman primates. *Vet Pathol* 37, 512-516.
- Kim, S., Chung, E.Y., Ma, X., 2005. Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells. *Cell Cycle* 4, 231-234.
- Laskin, D.L., Laskin, J.D., 2001. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* 160, 111-118.
- Lopes, M.F., da Veiga, V.F., Santos, A.R., Fonseca, M.E., DosReis, G.A., 1995. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* 154, 744-752.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J., Dockrell, D.H., 2008. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med* 8, 497-509.
- Medeiros, A.I., Bonato, V.L., Malheiro, A., Dias, A.R., Silva, C.L., Faccioli, L.H., 2002. *Histoplasma capsulatum* inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leucocytes. *Scand J Immunol* 56, 392-398.

- Medeiros, A.I., Serezani, C.H., Lee, S.P., Peters-Golden, M., 2009. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE₂/EP₂ signaling. *J Exp Med* 206, 61-68.
- Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1269-1276.
- Peters-Golden, M., McNish, R.W., Hyzy, R., Shelly, C., Toews, G.B., 1990. Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol* 144, 263-270.
- Platt, N., Haworth, R., Darley, L., Gordon, S., 2002. The many roles of the class A macrophage scavenger receptor. *Int Rev Cytol* 212, 1-40.
- Rangel Moreno, J., Estrada Garcia, I., De La Luz Garcia Hernandez, M., Aguilar Leon, D., Marquez, R., Hernandez Pando, R., 2002. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 106, 257-266.
- Redmond, H.P., Shou, J., Kelly, C.J., Schreiber, S., Miller, E., Leon, P., Daly, J.M., 1991. Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery* 110, 311-317.
- Rennemeier, C., Hammerschmidt, S., Niemann, S., Inamura, S., Zahringer, U., Kehrel, B.E., 2007. Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *FASEB J* 21, 3118-3132.
- Schuster, V.L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *New York* 60, 221-242 (1998).
- 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.*
- Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M., Kambayashi, T., 1994. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med* 180, 2365-2370.
- Sugimoto, Y. & Narumiya, S. Prostaglandin e Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11613-11617 (2008).
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., *et al.* (1997) *Nature* 386, 292-296.
- Torchinsky, M. B., Garaude J., Blander M., 2010. Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Current Opinion in Immunology*, 22:55-62.