



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA NÍVEL MESTRADO**

**JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA PIOCIANINA EM MACRÓFAGOS MURINOS**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

**JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA PIOCIANINA EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

**Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas**

Orientadora

**Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes**

Coorientador

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

S163e Sales Neto, José Marreiro de.  
Efeito anti-inflamatório da piocianina em macrófagos murinos / José Marreiro de Sales Neto.- João Pessoa, 2016.  
70f. : il.  
Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas  
Coorientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB  
1. Biotecnologia. 2. Biotecnologia e saúde. 2. Fenazina natural. 3. Imunossupressor. 4. Óxido nítrico. 5. Citocina.

UFPB/BC

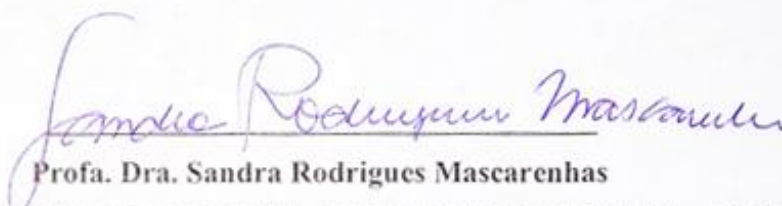
CDU: 60(043)

JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA PIOCIANINA EM MACRÓFAGOS MURINOS

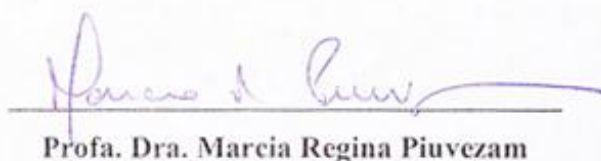
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

Aprovado em 29 de novembro de 2016.



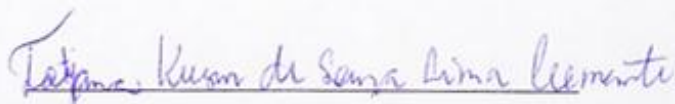
Prof. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR – UFPB  
(Orientadora)



Prof. Dra. Marcia Regina Piueczam

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA – UFPB  
(Examinadora externa)



Prof. Dra. Tatjana Keesen De Souza Lima Clemente

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR – UFPB  
(Examinadora interna)

JOÃO PESSOA – PB

*Dedico este trabalho à minha família – meus parentes e amigos –, aos quais tenho imensurável orgulho por fazer parte.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela permissão de desenvolver esse trabalho. Deus é a essência da vida, certeza do amor incondicional.

Aos meus pais, Josinaldo Manoel (*in memoriam*) e Maria Rosilene, pelo maior presente que me concederam, a vida. Meus pais, independente do passado, o futuro será cheio de amor, carinho e respeito. Meus pais, amo vocês!

Aos meus avós maternos, José Marreiro e Severina Marinho, por terem sido meus pais e continuarem presentes em minha vida. Agradeço todos os dias por ter avós especiais ao meu lado. Agradeço a Deus pela educação que me proporcionaram, que levarei comigo por toda a minha vida. Meus avós maternos, vocês são os melhores pais que alguém poderia ter, amo vocês!

Aos meus avós paternos, Manoel Sabino e Maria do Carmo (*in memoriam*), pelo carinho e amor que recebi e recebo quando estou ao lado de vocês. Meus avós paternos, amo vocês!

Às minhas tias maternas, Maria Cleide, Maria das Dores, Maria do Socorro e Vera Lúcia, e ao meu tio materno, Marcelino Sales, pela atenção, carinho, amor, confiança e apoio que recebi desde que nasci. Meus tios maternos, amo vocês!

Às minhas tias paternas, Adeilda Manoel, Edvânia Manoel e Josineide Farias, e aos meus tios paternos, Adeildo Manoel e Gerson Manoel, pela atenção, carinho, amor, confiança e apoio. Meus tios paternos, amo vocês!

Ao meu irmão, Gabriel Sales, pelo afeto, sorrisos e alegria que recebi e recebo. Meu irmão, amo você!

Aos meus padrinhos, Maria de Lourdes e Antônio Luiz, pelos conselhos, incentivo e apoio. Meus padrinhos, amo vocês!

À Maria Bernadete e José Carlos pelo apoio que recebi durante o início do curso, ensinamentos, carinho e confiança. Agradeço a Deus ter conhecido vocês. Muito obrigado!

Aos meus amigos pelo companheirismo e convivência. Agradeço a Deus por ter conhecido e convivido com todos vocês. Muito obrigado!

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Mascarenhas, pela orientação, conselhos, confiança e paciência, sempre com um sorriso em seu rosto, cativando e motivando a equipe durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa. Professora, muito obrigado!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos, pela orientação, conselhos, confiança e paciência e por ceder a piocianina. Professor, muito obrigado!

Aos componentes da banca examinadora, Profa. Dra. Marcia Piuvezam e Profa. Dra. Tatjana Keesen, pela disponibilidade e contribuição a esse trabalho. Professoras, muito obrigado!

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Nível Mestrado da Universidade Federal da Paraíba, em especial à coordenadora Profa. Dra. Sandra Mascarenhas. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Nível Mestrado da Universidade Federal da Paraíba. Muito obrigado!

Aos demais funcionários do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Muito obrigado!

Aos companheiros do Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em especial à Luiz Henrique e a Éssia Lima, pela ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa. Muito obrigado!

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Muito obrigado!

Aos amigos da Pós-graduação em Biotecnologia Nível Mestrado da Universidade Federal da Paraíba pelo companheirismo e amizade durante 2 anos de convivência. Muito obrigado!

Aos amigos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba pelo companheirismo e amizade. Muito obrigado!

Aos meus eternos amigos da graduação, em especial ao G11, que é composto por Bruna Riviane, Dayse Pereira, Felipe Douglas, Jucilene Pereira, Leandro Costa, Mila castro, Raíssa Mayane, Rayza Morgana, Renally Barbosa e Rhayanne Freitas, pelo companheirismo e amizade. Agradeço a Deus pela amizade construída durante 7 anos de convivência. Amo vocês!

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento a dessa pesquisa.

## RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo ubíquo oportunista frequentemente associado à indivíduos portadores de patologias que causam imunodeficiência, como a fibrose cística. Essa bactéria produz um pigmento típico, a piocianina, que representa o seu fator de virulência majoritário, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio por células do hospedeiro, além de induzir a inflamação em vários tecidos e a apoptose em neutrófilos. No entanto, os protocolos utilizados para a observação desses efeitos são distintos entre si e não se conhece o mecanismo de ação da piocianina em processos de inflamação aguda. O objetivo desse trabalho foi compreender as interações entre a piocianina e os processos inflamatórios agudos, avaliando *in vitro* o efeito da piocianina na viabilidade celular e na produção de óxido nítrico, interleucina (IL)-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongo ativados por lipopolissacarídeo. Em adição, foi avaliado *in vivo* o efeito da piocianina no modelo de peritonite induzida por zimosan em camundongo. A piocianina nas concentrações de 50 ou 100  $\mu$ M induziu a morte celular em 90 e 95% ( $p < 0,0001$ ), respectivamente, enquanto a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M não foi capaz de afetar a viabilidade celular. O pigmento nas concentrações de 5 ou 10  $\mu$ M reduziu a produção do óxido nítrico em 26 % ( $p < 0,05$ ) e 51 % ( $p < 0,0001$ ), respectivamente, além de diminuir os níveis da IL-1 $\beta$  (38 %,  $p < 0,001$ ) e do TNF- $\alpha$  (48 %,  $p < 0,001$ ) em macrófagos tratados com a piocianina na concentração de 5  $\mu$ M. No modelo *in vivo*, a piocianina na dose de 5 mg/kg não interferiu na migração dos leucócitos para o sítio da inflamação. A redução nos níveis do óxido nítrico, da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  induzida pela piocianina pode ser um mecanismo de fuga favorável ao patógeno, capaz de reduzir a resposta inflamatória do hospedeiro nas concentrações avaliadas nesse trabalho, e esse efeito parece ser independente da interferência na migração celular.

Palavras chave: Fenazina natural. Imunossupressor. Óxido nítrico. Citocina.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen ubiquitous often associated with individuals with pathologies that cause immunodeficiency, such as cystic fibrosis. This pathogen synthesizes a typical greenish-blue pigment, the pyocyanin, which represents its major virulence factor, inducing the generation of reactive oxygen species by host cells, in addition to inflammation in several tissues and neutrophil apoptosis. However, the protocols used to study these effects are distinct from each other and the pyocyanin mechanism of action in acute inflammation processes is unknown. The aim of this work was to understand the interactions between pyocyanin and acute inflammatory processes, evaluating *in vitro* effect of pyocyanin on cell viability and nitric oxide, interleukin (IL)-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production by lipopolysaccharide-activated mice peritoneal macrophages. In addition, the *in vivo* effect of pyocyanin on zymosan-induced peritonitis in mice was evaluated. Our results show that pyocyanin 50 or 100  $\mu$ M induced cell death about 90 and 95 % ( $p < 0.0001$ ), respectively, while pyocyanin 1, 5, or 10  $\mu$ M was not able to affect cell viability. The pigment at 5 or 10  $\mu$ M reduced nitric oxide production about 26 % ( $p < 0.05$ ) and 51 % ( $p < 0.0001$ ), respectively, in addition to reducing IL-1 $\beta$  (38 %,  $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  (48 %,  $p < 0.001$ ) levels in macrophages treated with pyocyanin 5  $\mu$ M. In the *in vivo* model, pyocyanin 5 mg/kg has not affect leukocyte migration to the inflammation site. The pyocyanin-induced reduction of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  levels may be a pathogen-friendly escape mechanism, reducing the host's immune response at the concentrations evaluated in this work. This effect seems to be independent of interference in cell migration.

Key words: Natural phenazine. Immunosuppressant. Nitric oxide. Cytokine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural da piocianina .....	18
Figura 2 – Fórmula estrutural da fenazina .....	18
Figura 3 – Biossíntese da piocianina.....	19
Figura 4 – Efeito da piocianina na viabilidade dos macrófagos peritoneais.....	39
Figura 5 – Efeito da piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10 $\mu$ M na viabilidade de macrófagos peritoneais .....	40
Figura 6 – Efeito da piocianina na produção do óxido nítrico por macrófagos peritoneais ...	41
Figura 7 – Efeito da piocianina na produção do TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais.....	42
Figura 8 – Efeito da piocianina na produção da IL-1 $\beta$ por macrófagos peritoneais.....	43
Figura 9 – Efeito da piocianina na migração dos leucócitos totais murinos.....	44
Figura 10 – Efeito da piocianina na migração dos linfócitos murinos.....	44
Figura 11 – Efeito da piocianina na migração dos macrófagos murinos .....	45
Figura 12 – Efeito da piocianina na migração dos neutrófilos murinos .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio tioglicolato fluido .....	34
Tabela 2 – Tampão fosfato salino .....	34
Tabela 3 – Meio de cultura RPMI completo .....	34
Tabela 4 – Corante Azul de Trypan.....	35
Tabela 5 – Solução A.....	36
Tabela 6 – Solução B.....	36
Tabela 7 – Solução corante de Turk .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética em Utilização Animal
IL	Interleucina
PBS	Tampão fosfato
PBST	Tampão fosfato salino contendo 0,05 % de tween 20
RPMI	Meio de cultura <i>Royal Park Memorial Institute</i> 1640
SBF	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.1.1	<b>Piocianina</b> .....	<b>18</b>
2.2	SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	22
2.2.1	<b>Inflamação</b> .....	<b>25</b>
2.2.2	<b>Óxido nítrico</b> .....	<b>28</b>
2.2.3	<b>Citocinas</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3.2.1	<b>Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	<b>32</b>
3.2.2	<b>Ensaio <i>in vivo</i></b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	33
4.2	ANIMAIS .....	33
4.3	DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	33
4.4	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	33
4.4.1	<b>Preparação da piocianina para os ensaios <i>in vitro</i></b> .....	<b>33</b>
4.4.2	<b>Cultura primária de macrófagos peritoneais murinos</b> .....	<b>34</b>
4.4.3	<b>Determinação do efeito da piocianina na viabilidade celular</b> .....	<b>35</b>
4.4.4	<b>Determinação da influência da piocianina na produção de óxido nítrico</b> .....	<b>36</b>
4.4.5	<b>Determinação da influência da piocianina na secreção das citocinas IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>36</b>
4.5	ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	37
4.5.1	<b>Preparação da piocianina para os ensaios <i>in vivo</i></b> .....	<b>37</b>
4.5.2	<b>Peritonite induzida por zimosan</b> .....	<b>37</b>
4.5.3	<b>Determinação do efeito da piocianina na migração total e diferencial de células imunes</b> .....	<b>38</b>
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	<b>EFEITO DA PIOCIANINA NA VIABILIDADE CELULAR</b> .....	<b>39</b>

5.2	INFLUÊNCIA DA PIOCIANINA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO .....	41
5.3	INFLUÊNCIA DA PIOCIANINA NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ .....	42
5.4	EFEITO DA PIOCIANINA NA MIGRAÇÃO TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS IMUNES .....	43
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA n° 099/2015.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A piocianina é uma toxina típica produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, que é um bacilo aeróbio Gram-negativo não fermentador, além de ser ubíquo, ou seja, a *P. aeruginosa* está ao mesmo tempo em toda a parte (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014). Essa bactéria está frequentemente associada aos indivíduos portadores de imunodeficiência, que pode ser gerada pela fibrose cística, síndrome da imunodeficiência humana, quimioterapia e queimaduras (LAU et al., 2004). Na fibrose cística, a *P. aeruginosa* é o micro-organismo majoritário em 80 % dos casos (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

A *P. aeruginosa* pode causar infecções em vários órgãos, como a endoftalmite, que é a inflamação do humor vítreo e da esclerótica (PRIYA; PRAJNA; MOHANKUMAR, 2015), e a pneumonia, caracterizada pela inflamação dos alvéolos pulmonares com a retenção de líquido (RAMÍREZ-ESTRADA; BORGATTA; RELLO, 2016), que podem ser agravadas por fatores de risco, como as doenças subjacentes e a idade avançada (WALKER; MOORE, 2015).

No processo de infecção, a *P. aeruginosa* utiliza vários fatores de virulência, como a formação de biofilme, o sistema *quorum-sensing* e a produção de pigmentos. A formação de biofilme é caracterizada por estruturas sésseis de comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular composta por ácido desoxirribonucleico, água, nutrientes, polissacáridos e proteínas e o sistema *quorum-sensing* é um mecanismo de comunicação entre as células bacterianas que utiliza autoindutores do tipo homoserina lactona (NGUYEN; OGLESBY-SHERROUSE, 2016).

Entre os pigmentos produzidos pela *P. aeruginosa*, estão a piocianina (azul-esverdeado) (NGUYEN; OGLESBY-SHERROUSE, 2016), fluoresceína (verde-amarelo), piomelanina (marrom escuro) (CALDAS; BOISRAMÉ, 2015), pioverdina (verde) (KHALIFA et al., 2011) e aeruginosina (vermelho), cuja descrição emprestou o nome ao epíteto (THOMASSEN et al., 1979). A piocianina é o seu pigmento majoritário, estando ligado à capacidade infecciosa da bactéria, pois participa do estabelecimento e do reestabelecimento de infecções pela *P. aeruginosa* (ALLEN et al., 2005; EL-FOULY et al., 2015; KIM et al., 2015).

O alvo de estudo dessa dissertação, a piocianina, é um pigmento aromático nitrogenado pertencente a classe das fenazinas naturais, que são compostos com atividade de redução que ativam a formação de espécies reativas de oxigênio, além de possuir ação antimicrobiana de amplo espectro e ser produzido por muitos micro-organismos como um fator de virulência

com a síntese regulada pelo mecanismo de comunicação bacteriana *quorum-sensing* (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014).

A piocianina pode gerar espécies reativas de oxigênio (HASSANI et al., 2012; RAY et al., 2015), induzir a inflamação em tecidos do hospedeiro (FORBES et al., 2014) e promover a apoptose em neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o sítio da inflamação (MCCASLIN et al., 2015). Em nível mitocondrial, a piocianina interfere no transporte de elétrons, na respiração celular e no metabolismo energético, além de modular a expressão gênica e os mecanismos imunológicos inatos, como a hiperplasia de células caliciformes e a hiperprodução de muco (RADA; LETO, 2013).

O processo de infecção pela *P. aeruginosa* em diversos organismos modelo, tais como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Mus musculus*, é potencializado pela piocianina (RADA; LETO, 2013) e envolve o sistema imunológico do hospedeiro, incluindo os macrófagos, que são células essenciais na inflamação (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005). Os macrófagos realizam a fagocitose de neutrófilos, células mortas do hospedeiro e patógenos, além de produzir citocinas e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (ALVAREZ et al., 1996; TASAT et al., 2003).

Os macrófagos exibem fenótipos dinâmicos em função do microambiente, como os macrófagos alveolares, localizados entre o ar e o tecido pulmonar, que possuem desempenho superior em termos de potencial microbicida em relação aos macrófagos intersticiais, que são superiores em termos de imunoregulação e de funções suplementares. Já os macrófagos peritoneais possuem maior habilidade para produzir citocinas e espécies reativas de nitrogênio, que atuam como mediadores da inflamação (FRIEDLANDER et al., 1994).

Levando em consideração o efeito imunomodulador da piocianina em macrófagos alveolares (LAUREDO et al., 1998) e citotóxico em neutrófilos (WEBSTER et al., 2014), e o papel do óxido nítrico (FARO et al., 2014), da interleucina (IL)-1 $\beta$  e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  na inflamação (ŠTOFILOVÁ et al., 2015), o presente estudo visou compreender as interações entre a piocianina e os processos inflamatórios agudos, investigando o efeito imunomodulador da piocianina em macrófagos peritoneais murinos.

Logo, esse trabalho poderá contribuir para o entendimento das relações envolvendo a piocianina e os componentes do sistema imunológico. Além disso, os resultados obtidos podem fomentar a indústria farmacêutica, como um insumo teórico para os possíveis processos biotecnológicos que possam atender a demanda industrial com respeito aos produtos destinados ao tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa*, promovendo, dessa forma, a saúde humana.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* está frequentemente associada aos indivíduos portadores de imunodeficiência, podendo estar associada a outros micro-organismos, como as bactérias *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* e *Stenotrophomonas maltophilia* (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

A *P. aeruginosa* pode viver em suspensão em meio líquido (forma planctônica) ou formar estruturas sésseis de comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular composta por ácido desoxirribonucleico, água, nutrientes, polissacáridos e proteínas (conformação em biofilme) (CHIANG et al., 2013).

A conformação em biofilme, que potencializa a infecção bacteriana, pode ser encontrada em diversos tecidos e órgãos do hospedeiro. Nessa conformação, os polissacarídeos extracelulares Pel, Psl e alginato, produzidos pela bactéria, participam da manutenção da conformação da colônia bacteriana em forma de biofilme, desempenhando papel importante na resistência bacteriana ao sistema imunológico do hospedeiro e a antibióticos (IMPERI; LEONI; VISCA, 2014).

Os índices de infecções pela *Pseudomonas* spp. são escassos. No Reino Unido, as infecções pela *Pseudomonas* spp. ocupam o sétimo lugar em bacteriemia, estando presente em aproximadamente 4 % dos casos. Frequentemente, são relatadas infecções pela *Pseudomonas* spp. em unidades de tratamento intensivo. Entre as espécies de *Pseudomonas*, a *P. aeruginosa* destaca-se por suportar e proliferar em uma ampla faixa de temperatura, mesmo com pouca disponibilidade de nutrientes (LOVEDAY et al., 2014)

O processo de infecção pela *P. aeruginosa* ocorre principalmente por meio de dano epitelial, que pode ser gerado por queimaduras e feridas, função mucociliar inadequada, aspiração de muco, ventilação mecânica, dispositivos médicos, como os cateteres, e neutropenia (MÉAR et al, 2013). Os indivíduos portadores de alguma doença subjacente ou hematológica ou com a idade avançada são os mais susceptíveis às infecções causadas pela *P. aeruginosa*, com quadros de infecções que podem culminar na morte do paciente (WALKER; MOORE, 2015).

Embora infecte com maior frequência as vias aéreas, outros tecidos, como a corrente sanguínea e o trato urinário, podem ser afetados por infecções causadas pela *P. aeruginosa* (CANTÓN et al., 2015). Linhagens de *P. aeruginosa* já foram isoladas de ambientes

hospitalares e de amostras de endoftalmite, expectoração, otorreia, pus, queimaduras, sangue e urina de pacientes hospitalizados na Bélgica, Brasil, Bulgária, China, Dinamarca, Espanha, França, Grécia, Hungria, Índia, Irã, Itália, Kuwait, Polônia, Reino Unido, Sérvia, Tailândia e Tunísia (ALMEIDA-SILVA et al., 2016; FUSE et al., 2013; PRIYA; PRAJNA; MOHANKUMAR, 2015; TOUPKANLOU; PEERAYEH; MAHABADI, 2015).

As linhagens de *P. aeruginosa* apresentam fenótipos distintos em função do ambiente de origem, como as secreções de pacientes infectados, os solos e as águas (CALDAS; BOISRAMÉ, 2015; FERRONI et al., 1998; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015). Além disso, a bactéria pode apresentar multirresistência a antibióticos, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactam e ticarcilina-ácido clavulânico (OCHOA et al., 2015).

A *P. aeruginosa* utiliza componentes na superfície celular com atividade inflamatória ou de adesão celular e fatores de virulência, como a formação de biofilme, no processo de infecção. Além da formação de biofilme, o sistema *quorum-sensing*, formação de pequenas colônias variantes mutantes, produção de alquil-quinolonas, produção de sideróforos e produção de pigmentos são fatores de virulência importantes dessa bactéria (NGUYEN; OGLESBY-SHERROUSE, 2016).

Muitos dos fatores de virulência produzidos pela *P. aeruginosa* participam da comunicação entre as células da bactéria e outros micro-organismos ou o ambiente circundante, além de favorecer a sobrevivência e a proliferação bacteriana (ALLEN et al., 2005; EL-FOULY et al., 2015). Entre os mecanismos de comunicação bacteriana, o sistema *quorum-sensing* é o mais importante, regulando o comportamento bacteriano por mecanismos de comunicação entre as células bacterianas. As bactérias detectam a densidade da população bacteriana pela síntese, secreção e detecção de autoindutores do tipo homoserina lactona, que são moléculas de baixo peso molecular produzidas pela população bacteriana. O mecanismo de comunicação bacteriana *quorum-sensing* permite que as bactérias coordenem uma ação comum, que implica no sucesso da infecção, sendo dependente da expressão de fatores de virulência e de habilidades de invasão, além de conferir resistência a antibióticos (RASAMIRAVAKA; JAZIRI, 2016).

Os ramnolipídios, elastases, piomelanina, pioverdina, pioquelina e piocianina também podem participar do sistema *quorum-sensing* (KIM et al., 2015), atuando no meio extracelular e intracelular da célula alvo, além de induzir a produção de toxinas com ação funcional, que conferem vantagem de sobrevivência quando há outras espécies de bactérias no mesmo ambiente (CHEN et al., 2015).

Os componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo, *pilus* e flagelo, também constituem fatores de virulência. O lipopolissacarídeo é um dos componentes mais abundantes da membrana externa das bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, e possui alta patogenicidade, com ação inflamatória. A ação inflamatória do lipopolissacarídeo varia de acordo com a origem, como o lipopolissacarídeo proveniente de linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de casos persistentes de fibrose cística que gera uma resposta inflamatória menos intensa que aquela gerada pelo lipopolissacarídeo de linhagens isoladas de casos típicos da doença (LORENZO et al., 2015). O lipopolissacarídeo é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões do tipo *toll* 4, estimulando a produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, pelas células do sistema imunológico do hospedeiro (SINGH; BORSE; NIVSARKAR, 2016).

O ácido desoxirribonucleico microbiano também participa da formação de biofilme, ligando-se aos agentes antimicrobianos carregados positivamente, como os aminoglicosídeos, aumentando a virulência da bactéria. Linhagens de *P. aeruginosa* selvagens apresentam maior resistência aos tratamentos com os agentes antimicrobianos quando comparadas com as linhagens de bactérias *quorum-sensing* deficientes na secreção do ácido desoxirribonucleico (CHIANG et al., 2013).

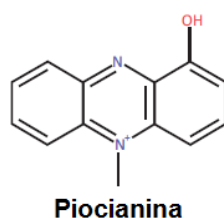
Os componentes bacterianos e os demais fatores de virulência contribuem para o desenvolvimento de infecções crônicas, reduzindo a susceptibilidade da bactéria à resposta imunológica do hospedeiro (CALDAS; BOISRAMÉ, 2015; FERRONI et al., 1998). Além da formação de biofilme, que dificulta a depuração bacteriana pelas células do sistema imunológico do hospedeiro, alguns componentes e fatores de virulência bacterianos podem suprimir a resposta imunológica do hospedeiro, dificultando a depuração bacteriana pela redução da inflamação local (ALLEN et al., 2005).

Adicionalmente, os componentes derivados do hospedeiro também podem favorecer a sobrevivência e a proliferação bacteriana, como o ácido desoxirribonucleico resultante da lise de leucócitos polimorfonucleares, contribuindo para a formação de biofilme. Os fatores de virulência produzidos pela população bacteriana, principalmente os ramnolipídios, lisa os leucócitos polimorfonucleares e o ácido desoxirribonucleico resultante dessa lise é incorporado à matriz do biofilme (CHIANG et al., 2013).

### 2.1.1 Piocianina

O alvo de estudo dessa dissertação, a piocianina (Figura 1), pertence à classe das fenazinas naturais, que é caracterizada por compostos cristalinos com base heterocíclica aromática, cujas moléculas se podem considerar derivadas do antraceno por substituição dos dois metinos centrais por átomos de nitrogênio (Figura 2). Esses compostos possuem atividade de redução, que ativa a formação de espécies reativas de oxigênio por redução direta do oxigênio molecular, e ação antimicrobiana de amplo espectro, além de ser produzido por muitas bactérias como um fator de virulência com a síntese regulada pelo mecanismo de comunicação bacteriana *quorum-sensing* (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014).

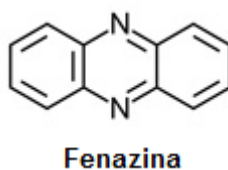
Figura 1 – Fórmula estrutural da piocianina



Fonte: Adaptado de Rada e Leto (2013).

Piocianina – fenazina polar com um grupo negativo (destacado em vermelho) e positivo (destacado em azul) produzida a partir do ácido corísmico com síntese regulada por *quorum-sensing*.

Figura 2 – Fórmula estrutural da fenazina



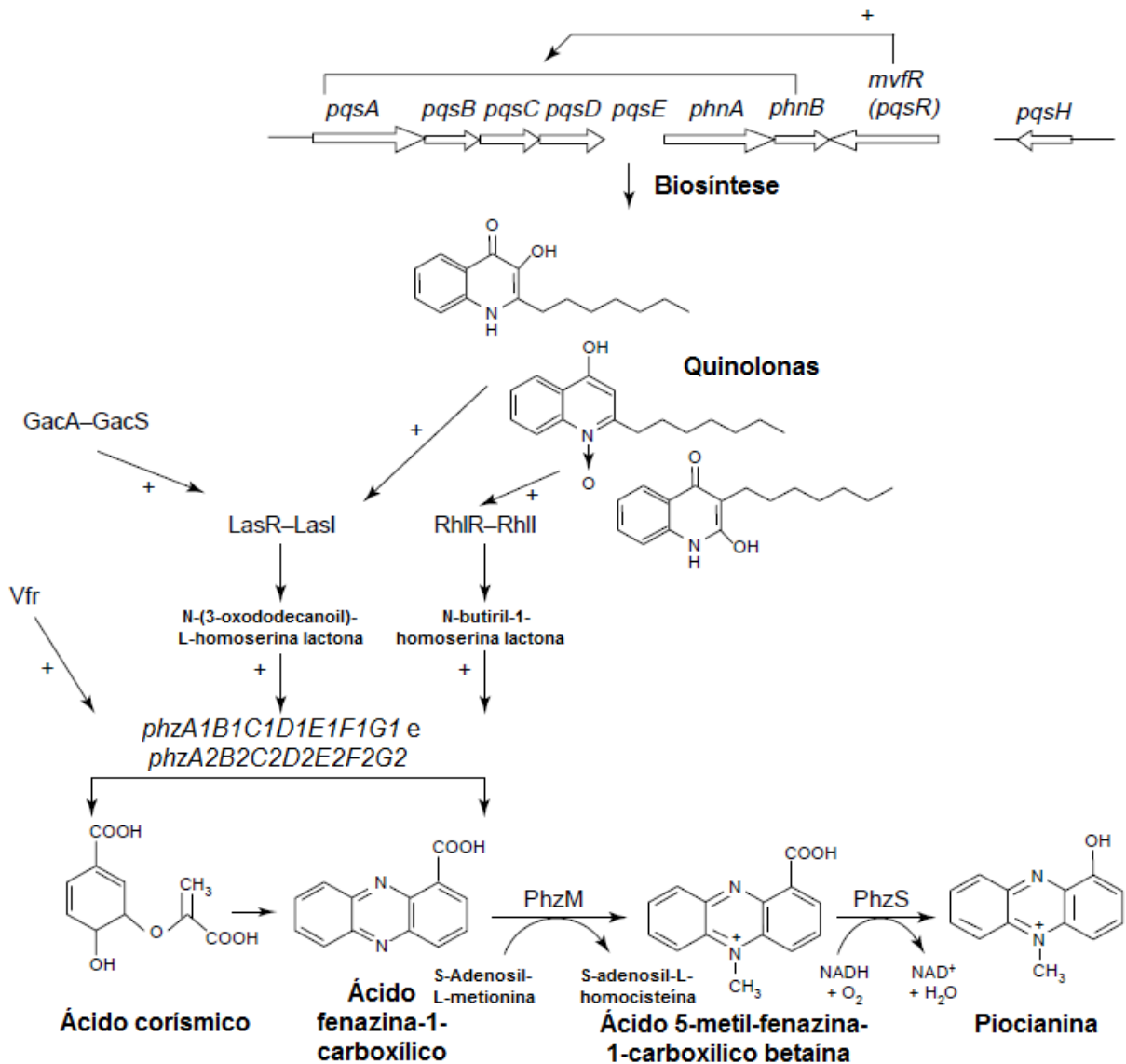
Fonte: Adaptado de Blankenfeldt e Parsons (2014).

Estrutura química da fenazina – composto de base heterocíclica aromática, cujas moléculas se podem considerar derivadas do antraceno por substituição dos dois metinos centrais por átomos de nitrogênio.

A piocianina possui fórmula molecular  $C_{13}H_{10}N_2O$  e é sintetizada a partir do ácido corísmico pela via fenazina utilizando os produtos codificados por dois operons *phzABCDEFG* e pelos genes *phzH*, *phzM* e *phzS*. A acumulação da N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona e da N-butil-1-homoserina lactona, que são moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular sintetizadas pelos produtos dos genes *lasI* e *rhII*, respectivamente, induzem a expressão dos genes envolvidos na produção da piocianina. Em altas densidades populacionais bacterianas, o fator de transcrição LasR se liga à N-(3-oxododecanoil)-L-

homoserina lactona e o RhlR se liga à N-butiril-1-homoserina lactona para ativar a transcrição dos genes que codificam os fatores de virulência bacterianos, muitos deles envolvidos na síntese da piocianina. Adicionalmente, vários metabólitos secundários são produzidos durante esse processo, como as quinolonas, que possuem a síntese regulada pelo fator de transcrição LysR e regulam a expressão do *rhl*, além de regular a comunicação pelo *quorum-sensing*. A síntese da piocianina é regulada positivamente pelo fator de transcrição semelhante ao LysR MvfR pela síntese das moléculas quinolonas, além de ser regulada pelos sinais regulatórios dos sistemas LasR–LasI, RhlR–RhlI, GacA–GacS e Vfr (Figura 3) (LAU et al., 2004).

Figura 3 – Biossíntese da piocianina



Fonte: Adaptado de Lau et al. (2004).

A piocianina é sintetizada a partir do ácido corísmico pela via fenazina utilizando os produtos codificados por dois operons *phzABCDEFGHI* e pelos genes *phzH*, *phzM* e *phzS*.

A piocianina possui atividade de redução, doando e recebendo elétrons, que, juntamente com a habilidade de difusão, torna a molécula um carreador de elétrons. Em condições aeróbicas, o principal aceptor de elétrons da piocianina é o oxigênio molecular. A piocianina reduzida (descolorida) doa um elétron para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido e voltando à conformação oxidada (azul-esverdeado) (RADA et al., 2008).

A piocianina é determinante para o sucesso de infecções pela *P. aeruginosa*, sendo produzida em grandes quantidades, como as encontradas em secreções da orelha de indivíduos mortos infectados pela bactéria (LAU et al., 2004). Devido a produção elevada da piocianina pela *P. aeruginosa* durante o seu crescimento, o pigmento vem sendo utilizado como um marcador da presença da *P. aeruginosa*, ou seja, um método indireto de detecção da bactéria (DAS et al., 2013; DIETRICH et al., 2006), que é normalmente identificada por métodos de cultivo seletivo (MAUCH; LEVY, 2014).

O sucesso da infecção bacteriana pode estar relacionado à supressão da resposta inflamatória por redução da inflamação local, como um mecanismo de fuga para o patógeno ao sistema imunológico do hospedeiro. Camundongos desafiados por instilação intratraqueal da *P. aeruginosa* selvagem apresentam redução na produção das quimiocinas derivadas de queratinócitos, proteína inflamatória de macrófagos-2, IL-1 e IL-6 no pulmão, reduzindo a inflamação local e dificultando a depuração da bactéria pelo hospedeiro. Além disso, quando comparada com a bactéria deficiente na produção de piocianina, a *P. aeruginosa* selvagem apresenta redução no número de neutrófilos no sítio da inflamação, associada à aceleração da apoptose em neutrófilos (ALLEN et al., 2005).

Na comunidade microbiana, além de ser um mediador do mecanismo de comunicação bacteriana *quorum-sensing*, a piocianina interage com os componentes da matriz extracelular, promovendo a formação de biofilme, que é benéfica para o micro-organismo. Entre outros componentes da matriz extracelular, o ácido desoxirribonucleico extracelular pode interagir com a piocianina e elevar a hidrofobicidade, a agregação celular e o tamanho celular, enquanto reduz as interações físico-químicas repulsivas, modulando as propriedades da superfície celular e promovendo a formação de biofilme e a sobrevivência bacteriana (DAS et al., 2013).

Além da comunidade microbiana, o sistema imunológico do hospedeiro pode ser modulado pela piocianina. Entre esses efeitos, há a indução da apoptose em neutrófilos e a atenuação da eliminação de neutrófilos pelos macrófagos, desencadeando um processo de inflamação crônica (MCCASLIN et al., 2015). Essa capacidade de indução de apoptose em neutrófilos difere entre as linhagens da *P. aeruginosa*, variando de acordo com a quantidade

de fatores de virulência bacterianos produzidos, como a piocianina (USHER et al., 2002). Adicionalmente, a piocianina pode promover o influxo de leucócitos totais e de neutrófilos para o sítio da inflamação (LAUREDO et al., 1998) e elevar a produção basal da IL-8 em células epiteliais de forma sinérgica com a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  na estimulação da expressão da IL-8 (DENNING et al., 1998a), que é responsável pelo influxo de neutrófilos (PAN et al., 2006).

Os efeitos gerados pela piocianina nos componentes celulares do sistema imunológico do hospedeiro afetam diretamente a capacidade de depuração da bactéria pelo hospedeiro, pois os leucócitos são essenciais na eliminação de patógenos do hospedeiro e a desregulação da fisiologia dessas células pode favorecer a sobrevivência e a proliferação bacteriana (MCCASLIN et al., 2015).

A piocianina pode modular também a expressão gênica e os mecanismos imunológicos inatos, como a hiperplasia de células caliciformes e a hiperprodução de muco pela inativação do fator de transcrição *forkhead box A2* (HAO et al., 2012). Além das células que compõem o sistema imunológico, outros tipos celulares podem ser afetados pela piocianina, como a linhagem celular A549, que é uma linhagem celular imortalizada originada de adenocarcinoma de células epiteliais da membrana basal de alvéolos humanos e que apresenta o aumento da senescência, da apoptose e do estresse oxidativo, pela geração de peróxido de hidrogênio, após o tratamento com a piocianina por 24 horas (MULLER, 2006).

O estresse oxidativo promovido pelo pigmento está relacionado também ao decréscimo de antioxidantes celulares. A piocianina é reduzida, sem a participação de enzimas, pelo dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido, e produz o ânion superóxido após reagir com o oxigênio molecular, gerando o peróxido de hidrogênio por dismutação. Entretanto, os mecanismos que ocorrem após a síntese das espécies reativas de oxigênio, culminando na morte celular, ainda são desconhecidos (FORBES et al., 2014).

Apesar da piocianina proporcionar vantagem para a bactéria (VASCONCELOS; LIMA; CALAZANS, 2010), que é o principal conceito do papel fisiológico do pigmento, há uma mudança de paradigma que envolve esse papel fisiológico. Pois, a piocianina pode interferir no metabolismo primário bacteriano, oxidando diretamente o dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, que pode ser necessário na manutenção da glicólise em regiões do biofilme com baixo teor de oxigênio (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014). De qualquer forma, apesar dos grandes avanços no entendimento do papel da piocianina no processo de infecção pela *P. aeruginosa*, a relação exata entre a piocianina e os componentes do sistema imunológico permanece desconhecida (LAU et al., 2004).

## 2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico pode direcionar o organismo para o estado de homeostasia (MEDZHITOV, 2008; WU et al., 2015) e é constituído por componentes celulares, como as células dendríticas, células NK, linfócitos B, linfócitos T, neutrófilos e macrófagos, e por componentes não celulares, como os anticorpos e as proteínas do sistema complemento (LEE; IWASAKI, 2007; ROCK et al., 2010).

Os componentes celulares do sistema imunológico podem responder de forma inespecífica ou específica aos estímulos exógenos, tais como o ácido desoxirribonucleico bacteriano, o lipopolissacarídeo e o peptidoglicano, que são constituintes de bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*. No reconhecimento inespecífico, o estímulo é detectado por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo *toll*, desencadeando a resposta imunológica primária, que inclui a migração de leucócitos, que são os componentes celulares do sistema imunológico, e a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas e as moléculas co-estimuladoras (HANSEN et al., 2015).

No reconhecimento específico, o antígeno é apresentado pelas células dendríticas aos leucócitos imaturos, gerando uma resposta secundária, que é específica e mais rápida que a resposta primária (JANEWAY JR; MEDZHITOV, 2002). A especificidade do reconhecimento do antígeno é determinada por receptores ligados à superfície dos linfócitos B e dos linfócitos T e por anticorpos produzidos pelos linfócitos B, que estão presentes desde o nascimento até em condições livres de germes (BORN et al., 2016) e compõem a imunidade humoral (HANSEN et al., 2015). Esses anticorpos atuam reconhecendo, neutralizando e opsonizando o antígeno de forma específica (NINIO; AMIGORENA, 2004). Além de produzir anticorpos, os linfócitos B produzem citocinas, como a IL-10, e o desenvolvimento, a proliferação e o comportamento dos linfócitos B é modulado por citocinas, como a IL-4, IL-6, IL-7 e interferon- $\gamma$ , linfócitos T, células dendríticas e macrófagos (FAN et al., 2016).

Os linfócitos efetores e de memória modificam a capacidade migratória para exercer funções imunológicas. Entre essas modificações, estão o aumento da expressão de moléculas de adesão e de receptores com ação quimiotática para ligantes indutores de inflamação em linfócitos T ativados (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005). Os linfócitos T são amadurecidos no timo, enquanto os linfócitos B e as células demais células que compõem o sistema imunológico são amadurecidas na medula óssea. Na maioria das vezes, as células do sistema imunológico são responsivas aos sinais inflamatórios, enquanto os linfócitos imaturos são pouco responsivos a esses sinais (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005).

Os neutrófilos, assim como os eosinófilos e os basófilos, que são outros granulócitos, são células com meia-vida curta que participam da primeira linha de defesa do hospedeiro contra as infecções, incluindo as infecções bacterianas. Em condições de homeostasia, os neutrófilos são as células mais abundantes e é a primeira população de leucócitos que migra para o sítio da inflamação, enquanto expressam moléculas de adesão para se ligar às células endoteliais durante essa migração (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005). Entre outras funções, os neutrófilos realizam a fagocitose de patógenos, podendo liberar mediadores citotóxicos, que causam danos aos tecidos do hospedeiro, durante esse processo. Após a fagocitose, os neutrófilos entram em processo de apoptose e atraem os macrófagos, que realizam a fagocitose desses corpos apoptóticos (MCCASLIN et al., 2015; WU et al., 2015).

Os macrófagos são células de meia-vida longa e podem gerar efeitos benéficos ao hospedeiro, como a contribuição na cicatrização de feridas e a contenção de infecções bacterianas crônicas (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005). Os macrófagos são células diferenciadas dos monócitos, que são células mieloides, e são classificados em ativados, inflamatórios e anti-inflamatórios, que são subdivididos em clássicos e alternativos, também chamados de macrófagos M1 e M2, respectivamente, exibindo fenótipos dinâmicos em função do microambiente (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008).

No peritônio, os macrófagos residentes são divididos em duas subpopulações, que são os macrófagos peritoneais grandes ( $CD11b^+ F4/80^+$ ) e os macrófagos peritoneais pequenos ( $CD11b^- F4/80^- MHC II^+$ ). A população de macrófagos peritoneais grandes residentes é predominante em condições de homeostasia, desaparecendo rapidamente após os estímulos inflamatórios, como o lipopolissacarídeo ou o tioglicolato, enquanto os macrófagos peritoneais pequenos, derivados dos monócitos presentes no sangue que entram na cavidade peritoneal por diapedese após o estímulo inflamatório, compõem a subpopulação predominante após a indução da inflamação. Os macrófagos peritoneais pequenos controlam infecções pela diferenciação em macrófagos clássicos, enquanto os macrófagos peritoneais grandes mantêm a fisiologia da cavidade peritoneal, atuando como macrófagos alternativos (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI et al., 2015).

Além dos neutrófilos e dos macrófagos, outras células do sistema imunológico, como as células dendríticas, participam da defesa do hospedeiro contra patógenos. As células dendríticas são abundantes em tecidos linfóides e em alguns não linfóides, embora sejam raras no sangue periférico, com subpopulações que diferem em relação à atividade imunológica, a distribuição em tecidos do hospedeiro e as propriedades migratórias, como as mieloides e plasmocitoides, que é a principal subpopulação de células dendríticas produtora do interferon-

$\alpha$ . As células dendríticas formam uma família especializada de células apresentadoras de antígenos, essenciais na ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (auxiliares) e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). As células dendríticas coletam e processam o antígeno e migram para os tecidos linfóides para ativar os linfócitos T em resposta aos sinais de maturação (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005).

Essas subpopulações de linfócitos T diferem em relação as funções imunológicas, embora todas participem da resposta secundária do sistema imunológico, como os linfócitos T que reconhecem os antígenos de forma específica utilizando receptores ligados à superfície celular, fornecendo a imunidade adquirida específica e memória imunológica (KARANTANOS et al., 2016).

A apresentação do antígeno aos linfócitos T auxiliares imaturos estimula a diferenciação dessas células em linfócitos T efetores, com diferentes padrões de produção de citocinas, como Th1, Th2 e Th17, estimulando e ativando as células envolvidas na resposta imunológica (KARANTANOS et al., 2016). Os neutrófilos são frequentemente o tipo celular predominante na resposta com o perfil Th1, enquanto os eosinófilos são normalmente encontrados no perfil Th2, expressando quimiocinas induzidas pelo perfil de citocinas Th2. A IL-1 está relacionada ao perfil Th1, enquanto a IL-4 e a IL-13 estão relacionadas ao perfil Th2. Já a IL-17 e a IL-22 estão relacionadas ao perfil Th17 (LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005).

Os linfócitos T citotóxicos reconhecem e eliminam células infectadas pela produção de substâncias citotóxicas. O reconhecimento do antígeno cognato, pelo linfócito T citotóxico, presente em células infectadas promove a formação de uma sinapse imunológica que ativa a cascata de sinalização e os eventos subsequentes que levam à morte da célula infectada (CHANG et al., 2016).

Adicionalmente, o sistema imunológico é classificado didaticamente em inato e adaptativo, respondendo de forma inespecífica e específica aos estímulos exógenos, respectivamente. Esse dogma afirma que, quando o organismo entra em contato com um antígeno pela primeira vez, a resposta imunológica inata é mais rápida, enquanto a resposta imunológica adaptativa é mais lenta e pode gerar a memória imunológica. Entretanto, o conceito de imunidade treinada ou imunidade inata de memória vem sendo introduzido, que é referente à capacidade do sistema imunológico inato de responder com maior robustez à reinfecção em modelos experimentais quando não há a participação dos linfócitos B e dos linfócitos T, que são componentes essenciais da resposta imunológica adaptativa (NETEA et al., 2016).

### 2.2.1 Inflamação

A inflamação é uma variável crítica para várias doenças, como as doenças infecciosas. Em muitas delas, a resposta inflamatória é maximizada pela contínua acumulação e ativação de componentes celulares do sistema imunológico, gerando uma resposta inflamatória exacerbada, com a ruptura da arquitetura de tecidos e a excessiva produção de tecido fibroso (HASLETT, 1997).

No processo de infecção bacteriana, o patógeno atravessa a barreira física e é reconhecido pelo sistema imunológico do hospedeiro. Entre os mecanismos efetores do sistema imunológico, a inflamação é um mecanismo efetor que pode ser ativado quando a defesa autônoma do tecido é insuficiente ou sobrecarregada para o estímulo, incluindo as infecções, como a infecção pela *P. aeruginosa* (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório inclui a liberação de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, que possuem papel compensatório, atuando localmente, como as citocinas, e desencadeando a dor, calor, rubor, edema e possível perda de função do órgão, compondo os cinco sinais cardinais da inflamação (SEDGWICK; LEES, 1986; SERHAN, 2010).

A maior parte dos sinais cardinais e sintomas da inflamação são causados por mudanças da vascularidade local, que envolve o relaxamento do músculo liso das arteríolas, gerando a vasodilatação, o rubor e o calor. O relaxamento do músculo liso das arteríolas promove o aumento da pressão hidrostática do leito vascular, que interfere na permeabilidade vascular da barreira endotelial e no influxo de líquido rico em proteínas para o sítio da inflamação. O influxo de proteínas para o sítio da inflamação produz o edema, enquanto o acúmulo de pus é gerado em decorrência da diapedese (ROCK et al., 2010).

A diapedese representa a migração de leucócitos presentes na corrente sanguínea para o sítio da inflamação através do endotélio, que inclui a expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos em processo de migração e por células endoteliais presentes nas vênulas. Após ativada a inflamação, há a migração de neutrófilos e subsequente migração de monócitos, que migram dos vasos sanguíneos para o sítio da inflamação. Há também a migração de linfócitos, que migram em tecidos linfoides, como o baço e o timo, e não linfóides, como os vasos sanguíneos. A migração de linfócitos do sistema vascular sanguíneo para o sistema linfático favorece a interação entre o linfócito e o antígeno cognato, além de promover a disseminação das células efectoras (STEEBER; TEDDER, 2000).

Os neutrófilos migram em grande quantidade para o sítio da inflamação, podendo causar lesões aos tecidos, como a perda da função do órgão, além de liberar mediadores inflamatórios, incluindo espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico, e citocinas, como a IL-1 $\beta$ . Os neutrófilos realizam a fagocitose de patógenos, como as bactérias, morrendo em seguida por apoptose (WU et al., 2015), que é constitutiva e controlada por vários fatores, como as citocinas (ALLEN et al., 2005). As citocinas induzem o fim da atividade neutrofílica e o reconhecimento dos corpos apoptóticos pelos macrófagos (HASLETT et al., 1994).

O primeiro passo da diapedese é a interação dos leucócitos com a parede dos vasos sanguíneos, que inclui as interações entre as moléculas de adesão presentes na membrana externa dos leucócitos e os receptores cognatos expressos nas células endoteliais vasculares (STEEBER; TEDDER, 2000). Os receptores das células endoteliais incluem receptores de carboidratos glicoconjugados, que reconhecem as citocinas liberadas pelos macrófagos residentes em tecidos internos (LOWE, 2003; MOORE et al., 1995).

As citocinas participantes da diapedese são apresentadas às células infiltradas por moléculas presentes na matriz extracelular da membrana basal, como os proteoglicanos de sulfato de heparano, e os leucócitos que ganharam acesso aos tecidos inflamados interiores produzem hidrolases, como a heparanase, e proteases, como a colagenase, que maximizam a degradação do sulfato de heparano e das fibras de colágeno da membrana basal, respectivamente, elevando a capacidade de infiltração dos leucócitos (PARISH et al., 1998). Além disso, grande parte dessas proteases possuem ação quimiotática (SPITZNAGEL, 1990), amplificando a resposta inflamatória (HASLETT, 1997).

Uma vez ativada, a resposta inflamatória desenvolve-se rapidamente. A vasodilatação pode ocorrer em segundos e o influxo de líquido e de leucócitos pode ocorrer em poucas horas ou minutos após a ativação da inflamação, liberando componentes do sistema imunológico no sítio da inflamação, como os anticorpos, as proteínas do sistema complemento, os neutrófilos e os monócitos (ROCK et al., 2010).

Diversos estímulos podem ativar a inflamação. Parte deles envolvem os desvios extremos de variáveis reguladoras da homeostasia celular e tecidual, como o estresse físico, enquanto a outra parte engloba os agentes que destroem a homeostasia de tecidos, como os patógenos, as toxinas e os xenobióticos. Os estímulos podem ser reconhecidos de forma direta, que é baseada no reconhecimento de características estruturais, como o reconhecimento por receptores de reconhecimento de padrões, ou de forma indireta, por reconhecimento de características funcionais. No reconhecimento direto, o agente destruidor da homeostasia é

sempre empregado para estimular a resposta inflamatória, permitindo que essa resposta seja iniciada antes mesmo que ocorra o dano tecidual. O reconhecimento indireto é usado quando o agente destruidor da homeostasia não pode ser detectado diretamente, como os alérgenos, as toxinas e os venenos, que são detectados por reconhecimento de características funcionais, como a atividade enzimática, a formação de poros na membrana plasmática e a conjugação química (formação de aduto) (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014).

Quase todos os receptores presentes na superfície celular utilizam as proteínas cinases ativadas por mitógenos, como a p38, a cinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2) e a cinase do N-terminal c-Jun (JNK), ou o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) no mecanismo de transdução da cascata de sinalização (ROBINSON; COBB, 1997). A JNK possui três isoformas, JNK1, JNK2 e JNK3. A JNK1 e JNK2 são largamente expressas em vários tecidos, enquanto a JNK3 é restrita aos tecidos neurais, os testículos e os miócitos cardíacos. As JNKs possuem papel inflamatório em macrófagos, que expressam a JNK1 e a JNK2 quando ativados. As vias de sinalização via ERK1/2 participam da regulação da expressão de citocinas por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais em macrófagos. Além da JNK e ERK1/2, a p38 também possui ação inflamatória, além de estar envolvida em mecanismos de retroalimentação que regulam a inflamação. As proteínas cinases ativadas por mitógenos, juntamente com o NF- $\kappa$ B, são fundamentais no desenvolvimento da inflamação (ARTHUR; LEY, 2013).

O NF- $\kappa$ B é um heterodímero formado pelas subunidades p50 e p65 frequentemente relacionado aos processos inflamatórios, regulando a migração de leucócitos para o sítio da inflamação (ISSEKUTZ; ISSEKUTZ, 1993) e a expressão de genes envolvidos na inflamação, como os genes que codificam a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e TNF- $\alpha$ . O NF- $\kappa$ B é constitutivamente ativado durante o processo inflamatório, principalmente na presença de sinais externos, embora as vias de sinalização que utilizam o NF- $\kappa$ B sejam altamente controladas em condições basais. A ativação do NF- $\kappa$ B envolve o reconhecimento do sinal, como as infecções bacterianas e as infecções virais, por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo *toll* e por receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos. Além disso, os fatores de estresse, o dano tecidual e as citocinas também ativam o NF- $\kappa$ B (DMITRIEVA et al., 2016).

### 2.2.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico é um gás diatômico e não carregado, que atravessa livremente as membranas plasmáticas sem a utilização de receptores de membrana, além de não utilizar receptores de membrana para exercer funções fisiológicas, tanto autócrinas quanto parácrinas. O óxido nítrico possui meia vida entre 5 e 15 segundos, relativamente curta para uma espécie reativa de nitrogênio, permanecendo ativo para exercer função fisiológica até 300  $\mu\text{m}$  do local da síntese. Historicamente, o óxido nítrico é conhecido na biologia como o fator relaxante derivado do endotélio, sendo primeiro identificado como um fator endotelial endógeno que atua no relaxamento vascular induzido por agonistas. O óxido nítrico é conhecido por ser um importante regulador do tônus vasomotor sistêmico, regulando também a pressão sanguínea, além de inibir a coagulação sanguínea e controlar o volume intravascular, pois aumenta a secreção de renina e natriurese. O óxido nítrico afeta funções fisiológicas de vários órgãos, sendo um neurotransmissor não-adrenérgico e não-colinérgico responsável pelo relaxamento do músculo liso bronquial e gastrointestinal, além de modular o sistema nervoso central, com respeito ao comportamento, a memória e a nocicepção (RAWLINGSON, 2003).

O óxido nítrico é produzido de forma endógena e altamente regulada a partir da oxidação do grupo guanidino da L-arginina por enzimas da família óxido nítrico sintase, que podem ser encontradas na forma constitutiva ou induzível. A óxido nítrico sintase constitutiva, que é encontrada em neurônios e em células endoteliais, é regulada pela calmodulina e por alterações de cálcio intracelular, enquanto a óxido nítrico sintase induzível é independente desses dois fatores e é encontrada em macrófagos, células musculares lisas, hepatócitos e células endoteliais. A óxido nítrico sintase constitutiva sintetiza o óxido nítrico em concentrações basais, que atua como um mediador de atividades biológicas, como a neurotransmissão e a vasodilatação. A óxido nítrico sintase induzível produz cerca de 1000 vezes o nível basal de óxido nítrico, com efeitos biológicos que incluem a atividade citotóxica e a indução de apoptose. Em condições fisiológicas, a óxido nítrico sintase constitutiva é expressa e ativa, enquanto a óxido nítrico sintase induzível não é expressa e não está ativa. A óxido nítrico sintase induzível é induzida apenas na presença de estimulantes inflamatórios, como o lipopolissacarídeo, TNF- $\alpha$  e interferon- $\gamma$  (SCHWACHA, 2003).

O óxido nítrico possui ação inflamatória e anti-inflamatória, que são definidas pela quantidade e pela localização do óxido nítrico. As baixas concentrações de óxido nítrico derivado de células endoteliais inibem a adesão e a migração de células inflamatórias, enquanto que as grandes quantidades de óxido nítrico produzido em resposta à presença do

lipopolissacarídeo ou de outros estímulos inflamatórios, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , acentuam a resposta inflamatória, promovendo a permeabilidade vascular e a infiltração de leucócitos para o sítio da inflamação (FARO et al., 2014).

Durante a inflamação, o óxido nítrico atua na defesa do organismo contra patógenos, participando da ação antimicrobiana mediada por leucócitos (LAMAS; PÉREZ-SALA; MONCADA, 1998). O óxido nítrico e as demais espécies reativas de nitrogênio, além de espécies reativas de oxigênio, são exemplos de componentes não celulares do sistema imunológico e estão associados à capacidade antimicrobiana dos macrófagos (JOHNSTON, 1978). Essas espécies reativas ativam as vias de sinalização celulares sensíveis à redução, como as proteínas cinases ativadas por mitógenos ERK1/2 e p38 (DENNING et al., 1998a; JACKOWSKI et al., 1991; KANG et al., 2013). A ativação dessas proteínas cinases ativadas por mitógenos desencadeia a ativação de outros fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, desempenhando papel fundamental na regulação de processos fisiológicos e processos patológicos, como a indução da apoptose durante a inflamação (HENSLEY; FLOYD, 2002).

Além disso, a produção de óxido nítrico pode ter significado patogênico em várias doenças, geralmente quando há a produção em excesso desse radical livre. O excesso de óxido nítrico produzido durante a inflamação crônica ou aguda pode ser responsável por danos teciduais, diretamente, como os danos às proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico, ou indiretamente, modulando a ativação de leucócitos (BABIOR, 2000; FARO et al., 2014; MCCAFFERTY et al., 1997; RAWLINGSON, 2003).

### 2.2.3 Citocinas

As citocinas são estruturas proteicas com aglomerados de aminoácidos carregados positivamente nas estruturas terciárias (GANDHI; MANCERA, 2011; POMIN, 2014) e podem ser produzidas por células do hospedeiro, como a IL-8, produzida pelos macrófagos residentes em tecidos inflamados (WEBB et al., 1993). As citocinas podem modular o desenvolvimento, a diferenciação, o recrutamento, a ativação e a sobrevivência de células imunes (CATAL et al., 2015).

Entre essas citocinas está a família IL-1, que inclui 11 moléculas com sequências gênicas e estruturas de aminoácidos similares. A família IL-1 é formada por 8 ligantes com atividades diversas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$  e IL-37) e 3 receptores antagonistas (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38). A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são codificadas por genes separados, mas muito próximos, com alta homologia proteica e efeitos fisiológicos

similares, ligando-se ao mesmo receptor (DMITRIEVA et al., 2016). A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são citocinas inflamatórias, enquanto a IL-1Ra, que é produzida por vários tipos celulares, como os monócitos, os macrófagos, os queratinócitos e as células endoteliais, possui ação anti-inflamatória, bloqueando vias de sinalização ligando-se aos receptores da IL-1 $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ . A maioria das células, em particular as células epiteliais, expressam constitutivamente a IL-1 $\alpha$ , que é crucial na diferenciação celular e no desenvolvimento da resposta imunológica mediada por leucócitos. A expressão da IL-1 $\beta$  é extremamente limitada em condições fisiológicas, enquanto quantidades maiores da IL-1 $\beta$  são produzidas durante a inflamação, podendo induzir a expressão de vários genes, incluindo genes que codificam proteínas da fase aguda da inflamação, enzimas de remodelação tecidual, moléculas de adesão e citocinas (TAN et al., 2016). A IL-1 $\beta$  é um importante componente do sistema imunológico envolvido na inflamação (WANG et al., 2016) e é crucial em várias doenças, como as doenças autoimunes, alérgicas, infecciosas, cardiopulmonares e cancerígenas (TAN et al., 2016).

O TNF- $\alpha$ , que também constitui um fator pleiotrópico, assim como a família IL-1, é produzido principalmente pelos macrófagos ativados e é fundamental na iniciação da resposta inflamatória, além de induzir a própria expressão e a expressão de outras citocinas, como a IL-1 $\beta$ . O TNF- $\alpha$  também induz a geração de óxido nítrico derivado da óxido nítrico sintase induzível, enquanto o óxido nítrico induz a expressão do TNF- $\alpha$ , pois o óxido nítrico pode atuar como um mediador inflamatório e ativar leucócitos, como os macrófagos, promovendo a expressão do TNF- $\alpha$  (OEHADIAN et al., 2005).

O TNF- $\alpha$  pode ativar os neutrófilos, que infiltram em tecidos inflamados e produzem vários componentes, como enzimas proteolíticas e espécies reativas de nitrogênio. Além disso, os componentes bacterianos também podem induzir a expressão do TNF- $\alpha$ , como o lipopolissacarídeo, que é um componente de alta patogenicidade presente na parede celular de bactérias Gram-negativas. O lipopolissacarídeo é reconhecido pelos receptores do tipo *toll* 4 presentes na membrana plasmática dos leucócitos e induz a expressão do TNF- $\alpha$  (SINGH; BORSE; NIVSARKAR, 2016).

O TNF- $\alpha$  é conhecido por recrutar os leucócitos da corrente sanguínea para o sítio da inflamação e é produzido principalmente pelos macrófagos, linfócitos T, células NK e neurônios, embora outros tipos celulares também possam produzir o TNF- $\alpha$ , como os miócitos cardíacos, células endoteliais, mastócitos, fibroblastos e adipócitos (KUMAR et al., 2016). Os efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  estão associados à ligação do TNF- $\alpha$  aos receptores TNF 1 (receptor p55) (TNFR1) e TNF 2 (receptor p75) (TNFR2), que desencadeiam a cascata de sinalização intracelular. O TNFR1 é expresso em muitos tecidos e reconhece as duas

formas do TNF- $\alpha$ , a trimérica solúvel e ligada à membrana, enquanto o TNFR2 é restrito às células do sistema imunológico e reconhece apenas a forma ligada à membrana (MA; ZHANG; BALOCH, 2016).

Os monócitos e os macrófagos ativados produzem a IL-6 durante a fase aguda da inflamação, enquanto os linfócitos T produzem a IL-6 durante a inflamação crônica, embora seja produzida também por fibroblastos, queratinócitos, linfócitos B, células endoteliais e células tumorais. A expressão da IL-6 pode ser ativada por dano tecidual, radiação, espécies reativas de oxigênio, produtos microbianos, vírus, fatores de transcrição e citocinas, estando também relacionada a várias doenças, como a sepse, obesidade, diabetes, resistência à insulina, doenças inflamatórias intestinais, artrite e câncer (DMITRIEVA et al., 2016).

A IL-17 desempenha papel fundamental em inflamações crônicas e em doenças autoimunes, sendo produzida pelos linfócitos auxiliares. A família IL-17 inclui 6 citocinas (IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17E) e 5 receptores (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE). Entre esses receptores, o heterodímero formado pelos receptores IL-17RA e IL-17RC atua como receptor da IL-17A e da IL-17F, desempenhando papel fundamental em processos inflamatórios (WU et al., 2016).

O interferon- $\gamma$  também possui papel importante na defesa do organismo contra patógenos, além de contribuir para a proteção contra as doenças autoimunes e as inflamações crônicas. O interferon- $\gamma$  é produzido pelas células NK, que podem ser ativadas por citocinas, como a IL-12, IL-15 e IL-18 e que são reconhecidas por funções de defesa contra patógenos (FUCHS, 2016).

Baseado nesse exposto, esse trabalho visa avaliar as interações entre a piocianina e os processos inflamatórios agudos, investigando o efeito imunomodulador dessa toxina em macrófagos peritoneais murinos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Compreender as interações entre a piocianina e os processos inflamatórios agudos, investigando o efeito imunomodulador dessa toxina em macrófagos peritoneais murinos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.2.1 Ensaios *in vitro*

- Avaliar o efeito da piocianina na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos;
- Determinar a influência da piocianina na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais murinos;
- Verificar a influência da piocianina na produção das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais murinos.

##### 3.2.2 Ensaios *in vivo*

- Determinação do efeito da piocianina na migração total e diferencial de células imunes no modelo de peritonite induzida por zimosan.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em João Pessoa, Paraíba, Brasil.

### 4.2 ANIMAIS

Camundongos (*M. musculus*) *Swiss* albinos (n = 3) e C57BL-6 (n = 5) fêmeas com peso entre 25 e 30 g de 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB foram utilizados. Os animais foram mantidos à temperatura de  $21 \pm 1$  °C, no ciclo de luz de 12 horas (6:00 as 18:00 claro e de 18:00 as 6:00 escuro) e com livre acesso à água e ração do tipo *pellets* labina (PURINA®).

### 4.3 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os animais foram manuseados conforme as diretrizes do Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFPB e a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical, conforme as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013). O procedimento é aceitável porque o uso de anestésicos pode alterar a resposta imunológica dos animais (COLUCCI; PUIG; HERNANDEZ-PANDO, 2013).

Após a utilização, os animais foram encaminhados ao Biotério Prof. Dr. Thomas George para o destino adequado e os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA da UFPB com protocolo N° 099/2015 (APÊNDICE A).

### 4.4 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 4.4.1 Preparação da piocianina para os ensaios *in vitro*

A solução-mãe de piocianina (Sigma-Aldrich Co. LLC) foi preparada na concentração de 23,78 mM em 10 % de álcool etílico (Chemco Indústria e Comércio Ltda), de acordo com as informações do fabricante. As demais soluções de piocianina foram preparadas a partir da solução-mãe em meio de cultura *Royal Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) (Cultilab)

filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Microlab Scientific Co. Ltd) imediatamente antes do uso. A substância foi armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , garantindo a estabilidade durante pelo menos 4 anos.

#### 4.4.2 Cultura primária de macrófagos peritoneais murinos

Os camundongos *Swiss* ( $n = 3$ ) foram estimulados com 2 mL de meio tioglicolato fluido (Tabela 1) intraperitoneal e a eutanásia foi efetuada após 4 dias. Os leucócitos peritoneais foram obtidos por lavagem do peritônio com 7 mL de tampão fosfato salino (PBS) (Tabela 2) gelado, filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e suplementado com 3 % de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab) injetados na cavidade peritoneal e recuperados após 30 segundos de massagem. As células foram centrifugadas ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1500 rpm por 5 min) e ressuspensas em 2 mL de meio de cultura RPMI completo (Tabela 3). As células foram coradas com o corante Azul de Trypan (Tabela 4) na proporção 1:10 e a viabilidade foi determinada por contagem das células em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer.

Tabela 1 – Meio tioglicolato fluido

Composto químico	Concentração
Meio tioglicolato fluido (Sigma-Aldrich Co. LLC)	4 %
Água Milli-Q (Merck Millipore Corporation)	q.s.p.

Tabela 2 – Tampão fosfato salino

Composto químico	Concentração
Fosfato monossódico dihidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,0288 %
Fosfato dissódico dihidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,1550 %
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,8760 %
Água Milli-Q (Merck Millipore Corporation)	q.s.p.

Tabela 3 – Meio de cultura RPMI completo

Composto químico	Concentração
SBF (Cultilab)	10 %
Penicilina (Sigma-Aldrich Co. LLC)	100 U.I./mL
Estreptomicina (Sigma-Aldrich Co. LLC)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
RPMI (Cultilab)	q.s.p.

Tabela 4 – Corante Azul de Trypan

<b>Composto químico</b>	<b>Concentração</b>
Azul de Trypan (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,4 %
Cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,9 %
Água Milli-Q (Merck Millipore Corporation)	q.s.p.

As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI completo e distribuídas em placas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/200  $\mu\text{L}$ /poço) (Techno Plastic Products AG), sendo incubadas overnight (37 °C e 5 % de  $\text{CO}_2$ ). O sobrenadante foi removido e foi adicionado, aos macrófagos aderidos às placas, meio de cultura RPMI completo na presença de piocianina nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  com adição ou não de lipopolissacarídeo (Sigma-Aldrich Co. LLC) na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Três grupos controles também foram avaliados, um contendo apenas o meio de cultura RPMI completo, outro o veículo da solução-mãe de piocianina e outro lipopolissacarídeo. Após as substâncias serem adicionadas, as células foram novamente incubadas (37 °C e 5 % de  $\text{CO}_2$  por 24 horas). Cada grupo utilizou 3 animais ( $n = 3$ ), com os respectivos ensaios realizados em triplicata para cada animal.

#### 4.4.3 Determinação do efeito da piocianina na viabilidade celular

O sobrenadante da cultura celular foi removido para a determinação dos níveis de óxido nítrico e das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Para realização do ensaio de viabilidade celular, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$ /poço de meio de cultura RPMI completo e 10  $\mu\text{L}$ /poço de brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich Co. LLC) na concentração de 0,5 % em PBS, filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ , às células que permanecerem aderidas. Após a incubação (37 °C e 5 % de  $\text{CO}_2$  por 4 horas), o sobrenadante foi removido e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço de dimetilsufóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC). A viabilidade celular foi quantificada pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm e a média dos valores de absorbâncias obtidas no grupo controle contendo apenas o meio de cultura RPMI completo foi considerada como 100 % de viabilidade (MOSMANN, 1983).

A metodologia descrita por Mosmann (1983) é baseada na redução do brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio em cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas. A catálise do composto é realizada por desidrogenases mitocondriais e os cristais de formazan, que possuem cor roxa e são insolúveis em meio de cultura, são

dissolvidos em dimetilsulfóxido para a determinação indireta da viabilidade celular (REILLY et al., 1998).

#### 4.4.4 Determinação da influência da piocianina na produção de óxido nítrico

Para determinar os níveis do óxido nítrico, 50  $\mu$ L do reagente de Griess preparado imediatamente antes do uso foram adicionados a 50  $\mu$ L dos sobrenadantes obtidos da cultura celular. O reagente de Griess é constituído pela mistura da solução A (Tabela 5) com a solução B (Tabela 6) na proporção 1:1. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e a curva padrão construída com nitrito de sódio (Sigma-Aldrich Co. LLC) nas seguintes concentrações: 1,5, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu$ M (GREEN et al., 1982).

Tabela 5 – Solução A

Composto químico	Concentração
N-aftil-etilenodiamina (Sigma-Aldrich Co. LLC)	0,1 %
Ácido orto-fosfórico 5 % (Merck KGaA)	q.s.p.

Tabela 6 – Solução B

Composto químico	Concentração
Sulfonamina p-aminobenzeno (Sigma-Aldrich Co. LLC)	1 %
Ácido orto-fosfórico 5 % (Merck KGaA)	q.s.p.

A metodologia descrita por Green et al. (1982) é baseada na mensuração da concentração de nitrito, que é o produto de degradação mais estável entre o óxido nítrico e o oxigênio molecular. O nitrito reage com a sulfonamina p-aminobenzeno em meio ácido, formando o sal de diazônio que reage com a N-aftil-etilenodiamina, formando um composto azo estável de coloração púrpura.

#### 4.4.5 Determinação da influência da piocianina na secreção das citocinas IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$

Para determinar os níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , 50  $\mu$ L dos sobrenadantes obtidos da cultura celular foram utilizados para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

apropriado, de acordo com as informações do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc). As placas de 96 poços para ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF- $\alpha$  e incubadas (4 °C por 18 horas). As placas foram lavadas 5 vezes com PBS contendo 0,05 % de tween 20 (Sigma-Aldrich Co. LLC) (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio. Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBST, as amostras e a curva com os padrões das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram adicionadas e o conjunto foi incubado (4°C por 18 horas). As placas foram lavadas 5 vezes com PBST e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas. Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBST e o complexo enzimático avidina-peroxidase foi adicionado. Após 30 minutos em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 7 vezes com PBST e a solução substrato contendo tetrametilbenzidina e pexóxido de hidrogênio foi adicionada. Após 15 minutos em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com ácido orto-fosfórico na concentração de 1 N e a leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.5 ENSAIOS *IN VIVO*

##### 4.5.1 Preparação da piocianina para os ensaios *in vivo*

As soluções de piocianina foram preparadas a partir da solução-mãe em cloreto de sódio na concentração de 0,9 % filtrado em filtro de 0,22  $\mu$ m imediatamente antes do uso.

##### 4.5.2 Peritonite induzida por zimosan

Os camundongos C57BL-6 (n = 5) foram tratados via intraperitoneal com a piocianina na dose de 5 mg/kg e desafiados ou não via intraperitoneal com 0,5 mL de zimosan (Sigma-Aldrich Co. LLC) na concentração de 2 mg/mL 24 horas após o tratamento com a piocianina. Dois grupos controles também foram avaliados, um com animais apenas desafiados com zimosan e outro com animais apenas desafiados com placebo (PBS). A eutanásia foi efetuada 4 horas após o desafio e os leucócitos peritoneais foram obtidos por lavagem do peritônio com 2 mL de PBS gelado injetados na cavidade peritoneal e recuperados após 30 segundos de massagem. Os leucócitos foram centrifugados (4 °C e 1500 rpm por 5 min) e as células

presentes nos *pellets* foram ressuspensas (DOHERTY et al., 1985). Cada grupo utilizou 5 animais ( $n = 5$ ), com os respectivos ensaios realizados em triplicata para cada animal.

#### 4.5.3 Determinação do efeito da piocianina na migração total e diferencial de células imunes

Para a contagem total dos leucócitos, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foram corados com a solução corante de Turk (Tabela 7) na proporção 1:10 e as células contadas em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer.

Tabela 7 – Solução corante de Turk

Composto químico	Concentração
Violeta genciana (Quimibras Indústrias Químicas S/A)	0,01 %
Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich Co. LLC)	1,5 %
Água Milli-Q (Merck Millipore Corporation)	q.s.p.

Para a contagem diferencial dos leucócitos, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foram centrifugados em citocentrífuga Cytospin (1500 rpm por 10 min). As lâminas foram coradas com o corante rápido (panótico) (Renylab Química e Farmacêutica), lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Os macrófagos, linfócitos e neutrófilos foram identificados segundo a coloração e as características morfológicas, sendo contadas 100 células por lâmina em microscópio óptico. O kit panótico é composto por um agente fixador, uma solução corante de hemácias e uma solução corante de leucócitos e plaquetas e as lâminas permaneceram imersas em cada corante por 10, 13 e 16 segundos, respectivamente.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

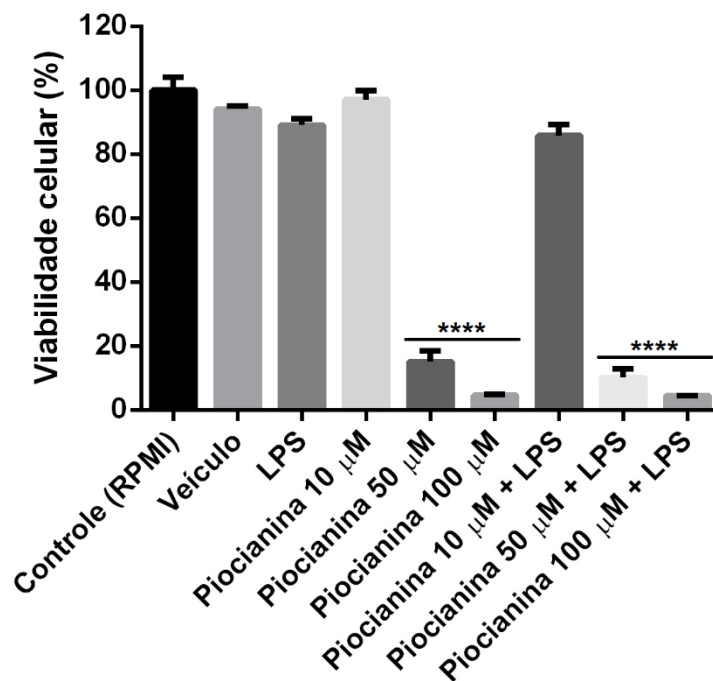
Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e a análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi realizada utilizando o software GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), considerando significativos  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DA PIOCIANINA NA VIABILIDADE CELULAR

A piocianina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  associada ou não ao lipopolissacarídeo, o veículo e a ativação por lipopolissacarídeo não foram capazes de alterar a viabilidade dos macrófagos peritoneais, enquanto a piocianina nas concentrações de 50 ou 100  $\mu\text{M}$  reduziu a viabilidade celular em 84,86 e 95,39 % ( $p < 0,0001$ ), respectivamente. As células tratadas concomitantemente com a piocianina e o lipopolissacarídeo apresentaram o perfil citotóxico semelhante às células tratadas apenas com a piocianina, com redução de 89,88 e 95,48 % ( $p < 0,0001$ ) da viabilidade das células tratadas com a piocianina nas concentrações de 50 ou 100  $\mu\text{M}$  associada ao lipopolissacarídeo, respectivamente. Além disso, não foi observada diferença significativa da viabilidade celular com a piocianina nas concentrações de 10, 50 ou 100  $\mu\text{M}$  e os grupos correlatos associados ao lipopolissacarídeo, respectivamente (Figura 4).

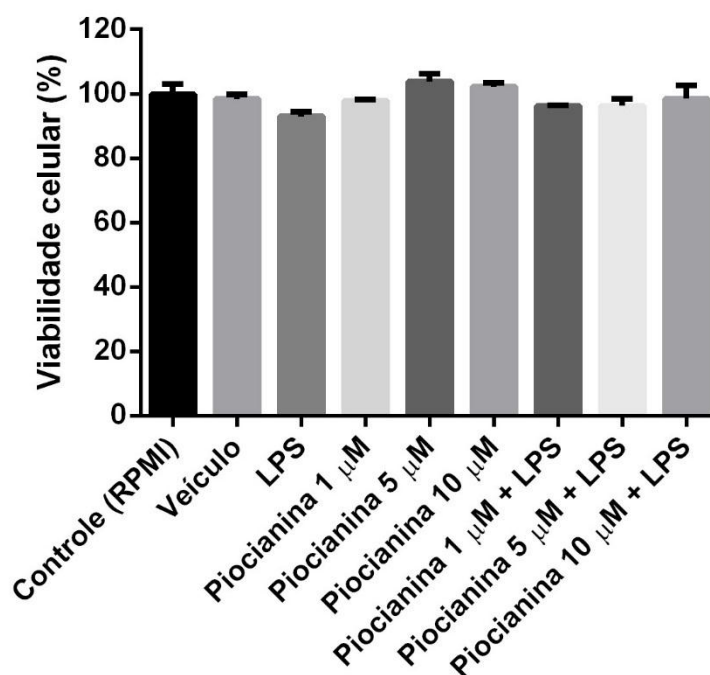
Figura 4 – Efeito da piocianina na viabilidade dos macrófagos peritoneais



Macrófagos peritoneais murinos ( $n = 3$ ) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com a adição ou não de piocianina nas concentrações de 10, 50 ou 100  $\mu\text{M}$ . A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da viabilidade celular e, para a comparação do grupo controle (RPMI) vs. tratamento, a significância estatística foi definida como  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Diferentemente das concentrações de 50 ou 100  $\mu\text{M}$ , a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  não afetou a viabilidade dos macrófagos peritoneais, assim como o veículo, a ativação por lipopolissacarídeo e as associações entre essas concentrações de piocianina com o lipopolissacarídeo. Além disso, não foi observada diferença significativa da viabilidade celular com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  e os grupos correlatos associados ao lipopolissacarídeo (Figura 5). Essas concentrações de piocianina foram utilizadas como padrão para mensurar a produção do óxido nítrico, da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  nos experimentos *in vitro* por não ter interferido no nível basal de morte celular.

Figura 5 – Efeito da piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  na viabilidade de macrófagos peritoneais

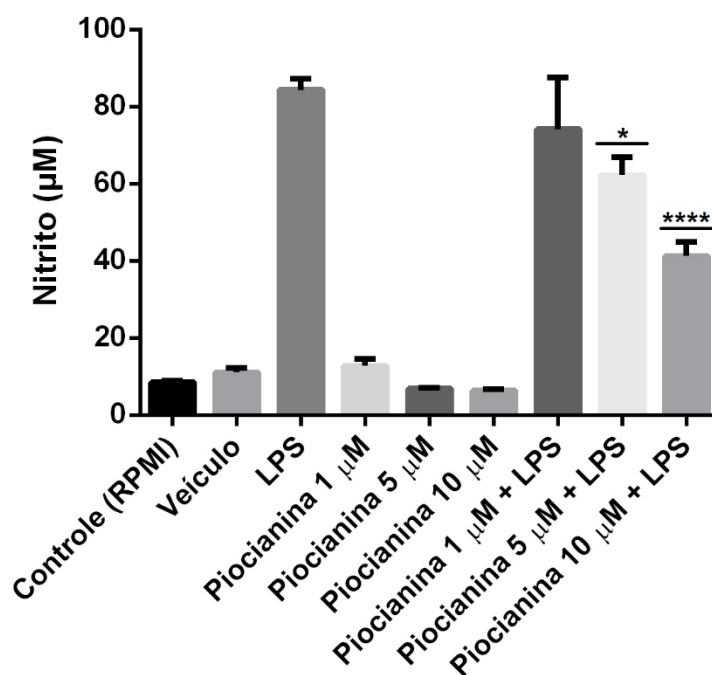


Macrófagos peritoneais murinos ( $n = 3$ ) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  com a adição ou não de piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$ . A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da viabilidade celular, considerando significativos  $p < 0,05$ .

## 5.2 INFLUÊNCIA DA PIOCIANINA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O veículo e a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  não interferiram na produção basal do óxido nítrico, enquanto a ativação por lipopolissacarídeo aumentou a produção desse mediador inflamatório, mostrando que o modelo foi funcional. Adicionalmente, a piocianina nas concentrações de 5 ou 10  $\mu\text{M}$  reduziu a produção do óxido nítrico induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos peritoneais em 26,13 % (22,04  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,05$ ) e 51,02 % (43,03  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$ ). Além disso, foi observada a diferença de 24,88 % (20,98  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,05$ ) na produção do óxido nítrico entre a piocianina na concentração de 5  $\mu\text{M}$  associada ao lipopolissacarídeo e a piocianina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  também associada ao lipopolissacarídeo (Figura 6).

Figura 6 – Efeito da piocianina na produção do óxido nítrico por macrófagos peritoneais

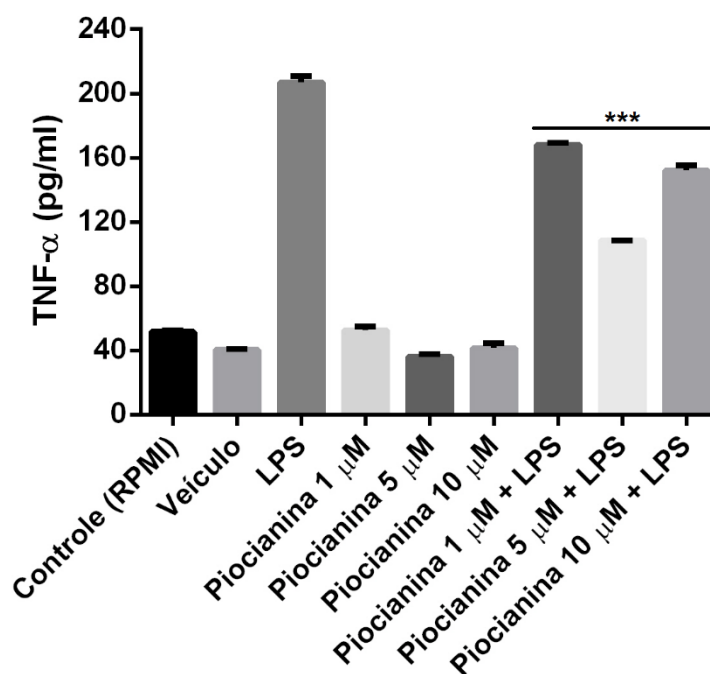


Macrófagos peritoneais murinos ( $n = 3$ ) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com a adição ou não de piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$ . A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da produção do óxido nítrico e, para a comparação do grupo LPS vs. tratamento, a significância estatística foi definida como  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.3 INFLUÊNCIA DA PIOCIANINA NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$

O grupo controle (RPMI) representa a produção basal do TNF- $\alpha$ , que não foi alterada pelo veículo ou pelo tratamento com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M. Como esperado, a ativação dos macrófagos peritoneais por lipopolissacarídeo elevou a produção do TNF- $\alpha$  e a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M foi capaz de reduzir a produção do TNF- $\alpha$  induzida por lipopolissacarídeo em 18,82 % (38,97 pg/mL,  $p < 0,001$ ), 47,63 % (98,64 pg/mL,  $p < 0,001$ ) e 26,48 % (54,83 pg/mL,  $p < 0,001$ ), respectivamente. Embora a piocianina tenha reduzido significativamente a produção do TNF- $\alpha$ , a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M não foi capaz de reduzir a produção do TNF- $\alpha$  até os níveis basais nas células ativadas ( $p < 0,001$ ). Além disso, foi observada a diferença de 28,81 % (59,67 pg/mL,  $p < 0,001$ ) na produção do TNF- $\alpha$  entre a piocianina nas concentrações de 1 e 5  $\mu$ M associada ao lipopolissacarídeo e foi observada a diferença de 21,16 % (43,81 pg/mL,  $p < 0,001$ ) na produção do TNF- $\alpha$  entre a piocianina na concentração de 5 e 10  $\mu$ M associada ao lipopolissacarídeo (Figura 7).

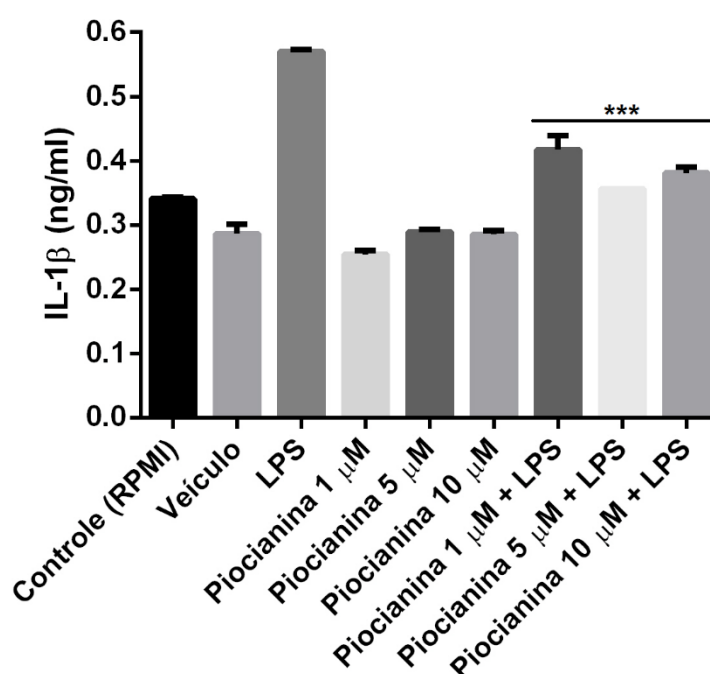
Figura 7 – Efeito da piocianina na produção do TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais



Macrófagos peritoneais murinos ( $n = 3$ ) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu$ g/mL com a adição ou não de piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da produção do TNF- $\alpha$  e, para a comparação do grupo LPS vs. tratamento, a significância estatística foi definida como  $p < 0,001$  (\*\*\*)

De forma semelhante ao efeito da piocianina na produção do TNF- $\alpha$ , a produção basal da IL-1 $\beta$  também não foi alterada pelo veículo ou pelo tratamento com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M e foi superior aos níveis basais após a ativação dos macrófagos peritoneais por lipopolissacarídeo. A piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M reduziu a produção da IL-1 $\beta$  induzida por lipopolissacarídeo em 26,80 % (0,1529 ng/mL,  $p < 0,001$ ), 37,53 % (0,2141 ng/mL,  $p < 0,001$ ) e 33,18 % (0,1893 ng/mL,  $p < 0,001$ ), respectivamente. Além disso, a piocianina nas concentrações de 5 ou 10  $\mu$ M reduziu a produção da IL-1 $\beta$  até os níveis basais nas células ativadas (Figura 8).

Figura 8 – Efeito da piocianina na produção da IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais



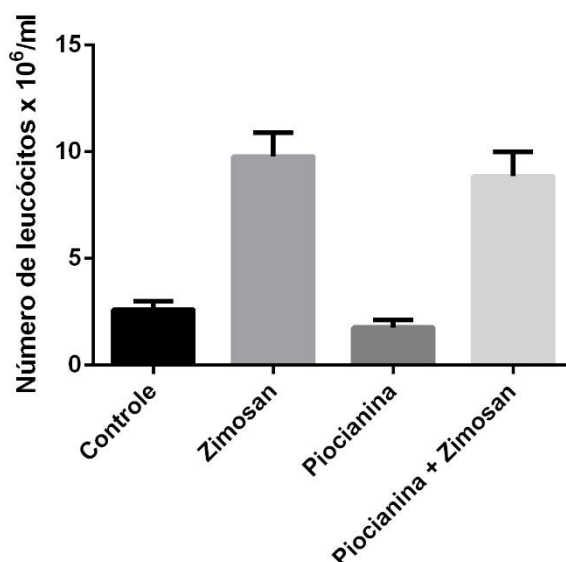
Macrófagos peritoneais murinos ( $n = 3$ ) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu$ g/mL com a adição ou não de piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da produção da citocina IL-1 $\beta$  e, para a comparação do grupo LPS vs. tratamento, a significância estatística foi definida como  $p < 0,001$  (\*\*\*)

#### 5.4 EFEITO DA PIOCIANINA NA MIGRAÇÃO TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS IMUNES

O número basal de leucócitos presentes no peritônio dos animais, que é o grupo controle, não foi afetado pelo tratamento com a piocianina na dose de 5 mg/kg, enquanto o desafio com o zimosan promoveu o influxo dos leucócitos totais, mais especificamente dos neutrófilos,

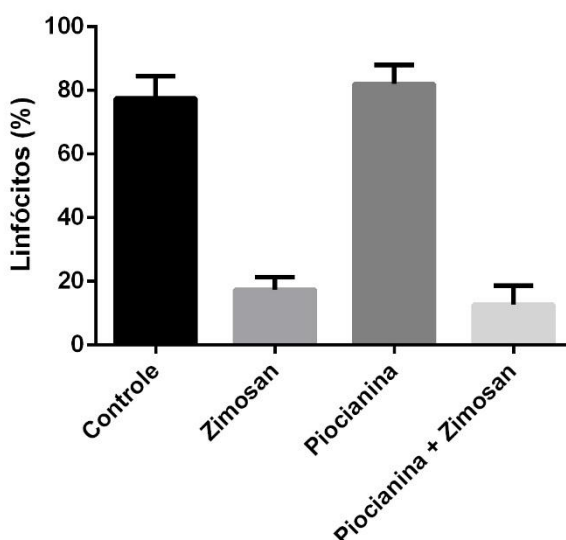
para o sítio da inflamação ( $7,602 \times 10^6$  neutrófilos/mL,  $p < 0,001$ ). A piocianina na dose de 5 mg/kg também não afetou a migração dos leucócitos totais, linfócitos, macrófagos e neutrófilos induzida por zimosan (Figura 9, 10, 11 e 12).

Figura 9 – Efeito da piocianina na migração dos leucócitos totais murinos



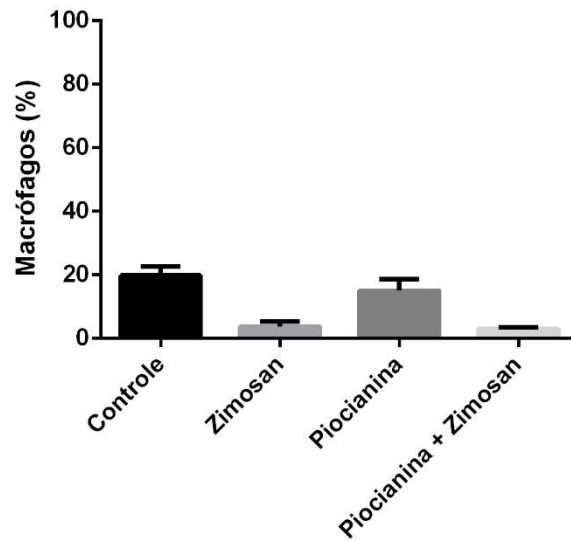
Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados via intraperitoneal com piocianina na dose de 5 mg/kg e desafiados ou não via intraperitoneal com zimosan 24 horas após o tratamento com a piocianina, com eutanásia efetuada 4 horas após o desafio. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da migração dos leucócitos totais, considerando significativos  $p < 0,05$ .

Figura 10 – Efeito da piocianina na migração dos linfócitos murinos



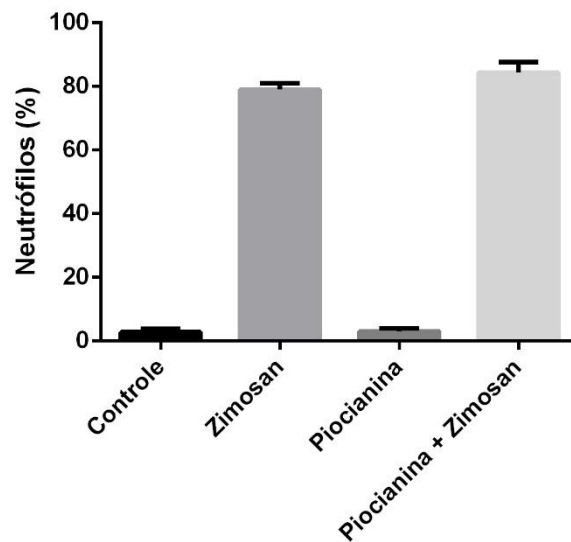
Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados via intraperitoneal com piocianina na dose de 5 mg/kg e desafiados ou não via intraperitoneal com zimosan 24 horas após o tratamento com a piocianina, com eutanásia efetuada 4 horas após o desafio. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da migração dos linfócitos, considerando significativos  $p < 0,05$ .

Figura 11 – Efeito da piocianina na migração dos macrófagos murinos



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados via intraperitoneal com piocianina na dose de 5 mg/kg e desafiados ou não via intraperitoneal com zimosan 24 horas após o tratamento com a piocianina, com eutanásia efetuada 4 horas após o desafio. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da migração dos macrófagos, considerando significativos  $p < 0,05$ .

Figura 12 – Efeito da piocianina na migração dos neutrófilos murinos



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados via intraperitoneal com piocianina na dose de 5 mg/kg e desafiados ou não via intraperitoneal com zimosan 24 horas após o tratamento com a piocianina, com eutanásia efetuada 4 horas após o desafio. A análise de variância *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar os dados da migração dos neutrófilos, considerando significativos  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a piocianina modulou a produção do óxido nítrico, da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais, que são mediadores envolvidos na inflamação. Devido à importância da piocianina no processo de infecção pela *P. aeruginosa* (RADA; LETO, 2013), o papel desse pigmento vem sendo estudado em diversos modelos animais, tanto *in vitro* (DENNING et al., 1998a, 1998b; FORBES et al., 2014; MCCASLIN et al., 2015; MULLER, 2006; MULLER; LI; MAITZ, 2009; PAN et al., 2006; USHER et al., 2002) quanto *in vivo* (ALLEN et al., 2005; HAO et al., 2012; LAUREDO et al., 1998).

Para avaliar o efeito imunomodulador da piocianina, foi utilizado o modelo de cultura de macrófagos peritoneais murinos ativados por lipopolissacarídeo, que é amplamente utilizado na biologia celular e na biologia molecular, como os estudos que investigam a atividade fisiológica e a atividade farmacológica de determinados compostos (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015; GHOSN et al., 2010).

Os macrófagos apresentam alta heterogeneidade, com adaptações aos diferentes tecidos e especializações para desenvolverem funções específicas, que não são expressas constitutivamente (SCHWACHA, 2003). Entre as subpopulações de macrófagos, os macrófagos peritoneais de camundongos constituem uma das subpopulações mais estudadas na biologia celular e no desenvolvimento celular, bem como na resposta inflamatória. Os macrófagos peritoneais são fundamentais no controle da inflamação e mantêm a resposta imunológica robusta, produzindo citocinas e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015).

No presente estudo, o metabolismo dos macrófagos peritoneais foi modulado em função da concentração de piocianina utilizada no tratamento das células. A viabilidade dos macrófagos peritoneais reduziu significativamente após o tratamento com a piocianina em concentrações acima de 50  $\mu$ M (Figura 4), enquanto não houve quaisquer alterações em relação à viabilidade dos macrófagos quando as células foram tratadas com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M (Figura 5). Por outro lado, Shellito, Nelson e Sorensen (1992) verificaram que a viabilidade de macrófagos alveolares cultivados *in vitro* não foi afetada pelo tratamento com a piocianina na concentração de 50  $\mu$ M. Esse conjunto de dados evidencia a heterogeneidade em relação ao metabolismo dos macrófagos em diferentes tecidos e sugere que os macrófagos peritoneais sejam menos resistentes ao tratamento com a piocianina quando comparados aos macrófagos alveolares. De fato, os macrófagos alveolares possuem um desempenho superior em termos de potencial microbicida, enquanto os macrófagos

peritoneais possuem maior habilidade para produzir citocinas e espécies reativas de nitrogênio (FRIEDLANDER et al., 1994).

Como os macrófagos estão presentes na inflamação, realizando a fagocitose de neutrófilos, células mortas do hospedeiro e patógenos, produzindo citocinas, ativando os mecanismos antimicrobianos e produzindo as espécies reativas de nitrogênio, entre outras funções, os efeitos gerados pela piocianina nessa população podem afetar a resposta inflamatória, que inclui, além dos macrófagos, diversas outras células, como os neutrófilos e os linfócitos (ALVAREZ et al., 1996; JOHNSTON, 1978; TASAT et al., 2003).

Em outro estudo, células da linhagem celular A549 tratadas com a piocianina por 24 horas mostraram que o pigmento nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  diminuiu a viabilidade celular, além de ter estimulado a produção de peróxido de hidrogênio (GLOYNE et al., 2011). Muller (2006), ao investigar essa mesma linhagem celular, observou que o tratamento das células com a piocianina na concentração de 25  $\mu\text{M}$  por 24 horas reduziu a aderência das células à placa de cultura e o volume celular, que são as características morfológicas da apoptose. Em fibroblastos diploides humanos, o tratamento com a piocianina em concentrações acima de 25  $\mu\text{M}$  por 24 horas foi tóxico (MULLER; LI; MAITZ, 2009).

A piocianina é fundamental para manter a virulência da *P. aeruginosa* em modelos animais e é detectada em fluidos corporais, como as secreções de vias aéreas, de pacientes infectados pela *P. aeruginosa* (FICK, 1989; FICK; HATA, 1989; MULLER; LI; MAITZ, 2009). A concentração de piocianina em fluidos corporais de pacientes infectados pela *P. aeruginosa* pode chegar a 30  $\mu\text{M}$  no esputo (SORENSEN; WALLER; KLINGER, 1991) e 130  $\mu\text{M}$  no sobrenadante obtido da centrifugação do esputo (WILSON et al., 1988), mostrando que as concentrações de piocianina adotadas *in vitro* no presente estudo, 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , são relevantes para os estudos de infecções pela *P. aeruginosa* por estarem dentro da faixa de piocianina detectada em casos clínicos.

Há duas linhas principais que explicam o efeito citotóxico da piocianina, que são a geração de espécies reativas de oxigênio induzida pelo pigmento e a depleção de mecanismos antioxidantes do hospedeiro (GLOYNE et al., 2011). A piocianina promove o estresse oxidativo, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (O'MALLEY et al., 2003a, 2003b). Na maioria dos casos, o estresse oxidativo está associado à geração de peróxido de hidrogênio, com a piocianina sendo reduzida diretamente por dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido ou por fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, gerando espécies reativas de oxigênio (GARDNER, 1996; HASSAN; FRIDOVICH, 1980).

Além das espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico, possuem papel fisiológico importante para o hospedeiro. O óxido nítrico modula a inflamação, que é um dos mecanismos efetores do sistema imunológico (BABIOR, 2000; SCHWACHA, 2003), além de atuar como neurotransmissor e agente antimicrobiano (NATHAN; XIE, 1994). O óxido nítrico pode ser produzido por macrófagos, promovendo a inflamação, com a estimulação da produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, que ocorre pela ativação da cicloxigenase-2 (DUDHGAONKAR et al., 2004).

Baseado na importância da produção do óxido nítrico na inflamação, foi investigada a influência da piocianina na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais, no qual, o tratamento com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  não promoveu o aumento na produção do óxido nítrico, bem como a diminuição na produção basal do óxido nítrico. Entretanto, o tratamento com a piocianina nas concentrações de 5 ou 10  $\mu\text{M}$  diminuiu a produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais ativados por lipopolissacarídeo (Figura 6).

Os dados sugerem que a piocianina pode atuar negativamente na inflamação por reduzir a produção do óxido nítrico. Esse efeito pode ser gerado por inibição do reconhecimento do lipopolissacarídeo por seu receptor cognato, que é o receptor do tipo *toll* 4. Além disso, levando em consideração que a piocianina atravessa livremente as membranas plasmáticas sem a utilização de receptores de membrana (RAWLINGSON, 2003), esse efeito pode ainda ser gerado por inibição da óxido nítrico sintase induzível, como por competição pelo sítio catalítico.

Os eventos que iniciam e mantêm a resposta inflamatória ativa envolvem a produção de óxido nítrico (ELDER et al., 2000), que pode ser induzida por vários estímulos, como o lipopolissacarídeo (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI et al., 2015; HANSEN et al., 2015). O lipopolissacarídeo é o mais potente ativador de macrófagos, além de indutor da geração de óxido nítrico utilizando a óxido nítrico sintase induzível (KLIMP et al., 2002).

O óxido nítrico produzido por macrófagos está associado à susceptibilidade de micro-organismos ao sistema imunológico (TASAT et al., 2003), sendo utilizado para inibir o crescimento bacteriano (FRIEDLANDER et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2002). Dessa forma, a redução da produção de óxido nítrico gerada pela piocianina pode dificultar a depuração bacteriana e aumentar a virulência da *P. aeruginosa*.

A redução, induzida pela piocianina nas concentrações de 5 ou 10  $\mu\text{M}$ , na produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais ativados por lipopolissacarídeo (Figura 6) corrobora

a redução, induzida por piocianina, na produção de óxido nítrico em macrófagos alveolares ativados por interferon- $\gamma$ , que mostrou redução parcial com a piocianina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e inibição total com a piocianina na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , efeito que persistiu após a lavagem das células, com a retirada completa da piocianina do meio extracelular, e novo estímulo com o interferon- $\gamma$ , seguido de cultivo por 24 horas (SHELLITO; NELSON; SORENSEN, 1992).

Baseado nesses dados, pode-se propor um mecanismo de fuga do patógeno ao sistema imunológico do hospedeiro, que interfere na inflamação por modular a produção de óxido nítrico durante o processo inflamatório. O efeito imunossupressor gerado pela redução da produção de óxido nítrico pode ser direto, com a redução da produção de óxido nítrico, que atua como mecanismo efetor da depuração bacteriana, ou indireta, atenuando a inflamação, que também é envolvida na depuração de micro-organismos. No entanto, novos protocolos para a confirmação dessa hipótese são necessários.

A literatura também reporta outro tipo de redução. Allen et al. (2005) mostraram que a piocianina reduziu a produção de quimiocinas derivadas de queratinócitos, proteína inflamatória de macrófagos-2, IL-1 $\beta$  e IL-6, atenuando a resposta inflamatória local e dificultando a depuração bacteriana no pulmão de camundongos C57BL-6 desafiados por instilação intratraqueal da *P. aeruginosa*.

Outras citocinas, como o TNF- $\alpha$ , que é produzido principalmente por macrófagos ativados (SINGH; BORSE; NIVSARKAR, 2016), são essenciais para a geração e a manutenção da inflamação (CATAL et al., 2015; ŠTOFILOVÁ et al., 2015). Em um estudo com macrófagos alveolares ativados por lipopolissacarídeo e tratados com a piocianina por 24 horas, o pigmento nas concentrações de 5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  não reduziu a produção de TNF- $\alpha$  (SHELLITO; NELSON; SORENSEN, 1992).

Por outro lado, no presente estudo, o tratamento com a piocianina nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  reduziu a produção do TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais ativados por lipopolissacarídeo. Além disso, a redução na produção do TNF- $\alpha$  nos macrófagos peritoneais foi maior com a piocianina na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , quando comparado ao efeito gerado pela piocianina nas concentrações de 1 ou 10  $\mu\text{M}$  na produção do TNF- $\alpha$  (Figura 7).

Baseado nesse conjunto de dados, pode-se propor que as diferentes populações de macrófagos respondem de forma distinta à presença da piocianina em relação à produção do TNF- $\alpha$  e que a piocianina exibe um efeito bifásico na produção do TNF- $\alpha$ , com o platô de ação em torno de 5  $\mu\text{M}$ .

A redução dos níveis de TNF- $\alpha$  induzida por piocianina está associada à atenuação da resposta inflamatória, favorecendo a proliferação bacteriana. Os agentes que inibem a expressão do TNF- $\alpha$  têm sido associados à modulação da inflamação em modelos animais (ELLIOTT. et al., 1993; RENZETTI et al., 1996; ZUANY-AMORIM et al., 1995) e, além da inibição da expressão do TNF- $\alpha$ , o bloqueio da atividade do TNF- $\alpha$  pode modular negativamente a inflamação, presente em várias doenças, como a doença de Crohn, artrite reumatoide e asma (NAM et al., 2009). Modelos animais mostraram que a expressão do TNF- $\alpha$  aumenta no sítio da inflamação em quadros de inflamação crônica, sendo essencial na sua manutenção (HANAUER et al., 2006; HOWARTH et al., 2005; KIM et al., 2006).

Durante a inflamação, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  podem ativar o NF- $\kappa$ B, um dos principais moduladores da inflamação, que regula a expressão de genes envolvidos na inflamação, como os genes que codificam as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e TNF- $\alpha$  (DMITRIEVA et al., 2016), além de regular a migração de leucócitos para o sítio da inflamação (ISSEKUTZ; ISSEKUTZ, 1993).

No presente estudo, a produção do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  em macrófagos peritoneais não foi afetada em função da concentração de piocianina utilizada no tratamento, 1, 5 ou 10  $\mu$ M. Os níveis do TNF- $\alpha$  (Figura 7) e da IL-1 $\beta$  (Figura 8) permaneceram em condições basais mesmo após o tratamento com a piocianina por 24 horas. Entretanto, a piocianina reduziu a produção do TNF- $\alpha$  (Figura 7) e da IL-1 $\beta$  (Figura 8) em macrófagos peritoneais ativados por lipopolissacarídeo.

Os dados sugerem que a piocianina não possui ação inflamatória em macrófagos peritoneais em relação à produção do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ . Adicionalmente, pode-se propor que a piocianina atua como modulador da inflamação, agindo negativamente na inflamação pela redução da produção do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , além de ter modulado negativamente a produção do óxido nítrico, ou seja, com efeito anti-inflamatório (Figura 6, 7 e 8). A redução da produção do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  induzida por piocianina pode ser gerada por inibição da expressão dessas citocinas e por bloqueio da atividade do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ . Além disso, essa redução induzida por piocianina é similar ao efeito gerado por outros fatores de virulência produzidos pela *P. aeruginosa*, como os efetores citotóxicos do tipo III ExoU e ExoT, que interrompem a resposta imunológica do hospedeiro, elevando a capacidade infecciosa da *P. aeruginosa* (FRANK, 1997; MIYATA et al., 2003).

Em outros estudos, a piocianina aumentou a patogenicidade da *P. aeruginosa* em modelo animal de sepse em camundongo, bem como a mortalidade (CAO et al., 2001; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999), inibiu a respiração celular (SORENSEN; KLINGER,

1987; WILSON et al., 1988), reduziu a produção de prostaciclina em células endoteliais da artéria pulmonar de suínos (KAMATH et al., 1995), alterou a homeostase do cálcio (DENNING et al., 1998b), inativou a catalase (O'MALLEY et al., 2003b) e induziu a apoptose em neutrófilos (MCCASLIN et al., 2015; WEBSTER et al., 2014; WU et al., 2015).

Esse conjunto de dados corrobora a redução, induzida por piocianina, na produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  no presente estudo, corroborando também a hipótese de um mecanismo de fuga do patógeno ao sistema imunológico do hospedeiro. Baseado na redução da produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  induzida por piocianina, pode-se propor um efeito anti-inflamatório da piocianina, que envolve a atenuação da inflamação, que é um mecanismo efetor do sistema imunológico do hospedeiro envolvido na depuração bacteriana, com consequente manutenção da infecção. A hipótese sugere que a piocianina possui papel fisiológico modulador da inflamação, atuando negativamente nos eventos que envolvem o aumento da produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ .

Para os ensaios de determinação da influência da piocianina na produção do óxido nítrico, bem como da determinação da influência da piocianina na produção do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , a piocianina foi utilizada nas concentrações de 1, 5 ou 10  $\mu$ M porque essas concentrações não interferiram no nível basal de morte celular. Concentrações que causassem morte celular elevada poderiam gerar um resultado falso positivo, uma vez que o processo de morte celular envolve a produção de óxido nítrico.

Além dos modelos *in vitro*, os modelos *in vivo* têm sido utilizados para esclarecer eventos envolvidos na inflamação, como o acúmulo de neutrófilos no sítio da inflamação (WATZLAWICK et al., 2015) e a expressão da proteína do grupo de alta mobilidade B1, que é mediador inflamatório sistêmico e ativador de macrófagos (MAZUR-BIALY; POCHEC, 2016).

Entre os modelos *in vivo*, o modelo de inflamação peritoneal pode ser usado como ferramenta farmacológica para estudos que investiguem a atividade inflamatória e anti-inflamatória de determinados compostos. No modelo de inflamação peritoneal em camundongos, o zimosan pode ser utilizado para estimular o processo inflamatório e estudar os mecanismos envolvidos na inflamação. A inflamação peritoneal induzida por zimosan é um modelo de inflamação aguda, resolvida entre 24 e 72 horas (KOLACZKOWSKA et al., 2010; NAVARRO-XAVIER et al., 2010).

O zimosan é um polissacarídeo insolúvel componente da parede de *Sacharomyces cerevisiae*. O zimosan é composto principalmente por  $\beta$ -glucana em combinação com quitina, manana e lipídios e é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões, como os

receptores do tipo *toll 2* e *dectina-1*, presentes em células do sistema imunológico, ativando vários processos envolvidos na inflamação, como a produção de citocinas e moléculas de adesão (REID; GOW; BROWN, 2009).

No modelo de inflamação peritoneal, o zimosan induz o aumento na permeabilidade vascular após 30 minutos, um dos primeiros sinais da inflamação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). O aumento na permeabilidade inclui a produção da histamina, da prostaglandina  $E_2$ , da prostaglandina  $F_{1\alpha}$  e do leucotrieno (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001a; 2001b; KOLACZKOWSKA et al., 2002). O aumento da permeabilidade é necessário para a formação do exsudato inflamatório e a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, induzindo a ativação de macrófagos e a degranulação de mastócitos (DOHERTY et al., 1985).

Os fagócitos, como os neutrófilos e os monócitos, englobam as partículas de zimosan e produzem substâncias antimicrobianas, como espécies reativas de nitrogênio, tais como o óxido nítrico, além de estimular a síntese e a liberação de outros mediadores inflamatórios, como citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e enzimas proteolíticas (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; NATHAN, 2002; SERHAN; SAVILL, 2005).

Além da produção de mediadores inflamatórios, há a ativação de componentes envolvidos na inflamação, como a cicloxigenase e a lipoxigenase, e a apoptose espontânea da população transiente de neutrófilos em poucas horas, que são fagocitados posteriormente por macrófagos, com o influxo de linfócitos B e de linfócitos T para o sítio da inflamação, desencadeando a resolução da resposta inflamatória. A resolução da inflamação é importante para não ocasionar danos aos tecidos e para evitar o desenvolvimento de autoimunidade (KOLACZKOWSKA et al., 2010; NAVARRO-XAVIER et al., 2010).

A regulação da diapedese e da posterior depuração é fundamental na inflamação (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006), na qual há o rápido influxo de leucócitos polimorfonucleares e a ativação da via alternativa do sistema complemento, promovendo a formação de anafilatoxinas, como os fragmentos  $C4a$  e  $C5a$  do sistema complemento, com ação quimiotática para os leucócitos polimorfonucleares (KIMURA et al., 2008). O fragmento  $C5a$  do sistema complemento induz a expressão, direta e indireta, da P-selectina, que é uma proteína de adesão envolvida na diapedese, em células endoteliais. Além disso, o zimosan induz a produção de citocinas, como o  $TNF-\alpha$  e a  $IL-1\beta$ , que também promovem a expressão de selectinas em células endoteliais (FOREMAN et al., 1994; BISCHOFF; BRASEL, 1995; BYRUM et al., 1999).

A diapedese envolve a produção de diversas citocinas, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , quimiotaxinas, como o leucotrieno C4 e a prostaglandina E<sub>2</sub>, que são mediadores do influxo de leucócitos polimorfonucleares no modelo de peritonite induzida por zimosan (BYRUM et al., 1999; RAO et al., 1994). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  participam do processo de migração de leucócitos, ativando células migratórias e vias de sinalização em células endoteliais e regulando a expressão de moléculas de adesão (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Visto a redução, induzida por piocianina, da produção do TNF- $\alpha$  (Figura 7) e da IL-1 $\beta$  (Figura 8) em macrófagos peritoneais ativados por lipopolissacarídeo e o papel dessas citocinas no processo de migração de leucócitos (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), foi utilizado, no presente estudo, o modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan para verificar o efeito da piocianina na migração celular. No ensaio de inflamação peritoneal, o tratamento com o pigmento na dose de 5 mg/kg, em dose única via intraperitoneal, não alterou o número basal dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal (Figura 9, 10, 11 e 12). Os dados sugerem que a piocianina, no modelo e nas condições experimentais utilizados, não induz a inflamação, corroborando os dados obtidos *in vitro* no presente estudo (Figura 6, 7 e 8).

A piocianina, em um estudo com camundongos C57BL-6 e Stat6<sup>-/-</sup>, na dose de 1 mg/kg administrada via intranasal por 3 semanas gerou o fenótipo da fibrose cística (HAO et al., 2012). Em outro estudo, a instilação concomitantemente da piocianina na dose de 0,3 mg/kg com o 1-hidroxi-fenazina 24 horas antes da eutanásia iniciou a resposta inflamatória em vias aéreas de ovelhas, com neutrófila pulmonar. No estudo supracitado, a resposta inflamatória induzida por piocianina envolveu a estimulação da produção das quimiotaxinas para neutrófilos IL-8 e do leucotrieno B<sub>4</sub> em macrófagos alveolares, além do aumento dos níveis de albumina na lavagem broncoalveolar, que é frequentemente associada ao aumento da permeabilidade vascular de vias aéreas e a danos teciduais (LAUREDO et al., 1998).

Baseado nesse conjunto de dados, pode-se propor que a diferença entre o efeito da piocianina nos modelos animais pode envolver diferenças no metabolismo dos leucócitos, como os macrófagos, que modulam a migração de neutrófilos durante as fases iniciais da inflamação.

O lavado peritoneal de um animal não estimulado com o zimosan é composto principalmente por linfócitos, mastócitos e macrófagos, presentes em maior quantidade, pois a maioria das células são MAC-3<sup>+</sup>. Após o estímulo com o zimosan, o número de leucócitos polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos, aumenta consideravelmente, iniciando o

aumento em 2 horas, com o pico em 4 horas e mantendo-se ainda elevado às 24 horas (LEITE et al., 2007), enquanto o número de leucócitos mononucleares diminuiu, devido ao desaparecimento dos macrófagos (BARTH et al., 1995).

No presente estudo, o tratamento com a piocianina na dose de 5 mg/kg não atenuou a migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal após o desafio com o zimosan, ou seja, a piocianina não atenuou a inflamação (Figura 12), diferentemente do observado nos ensaios *in vitro*, com a redução da produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  induzida por piocianina (Figura 6, 7 e 8). A discrepância da influência da piocianina *in vitro* e *in vivo* em relação à inflamação pode estar relacionada ao estímulo utilizado. No modelo *in vitro* foi o lipopolissacarídeo, que é reconhecido pelo receptor do tipo *toll* 4, enquanto, no modelo *in vivo* foi utilizado o zimosan, que é reconhecido pelos receptores do tipo *toll* 2 e dectina-1. De qualquer forma, o conjunto de dados obtidos nos ensaios *in vivo* corroboram os obtidos *in vitro* com respeito à piocianina sozinha não induzir a inflamação nos modelos e nas condições experimentais utilizados.

Baseado nos dados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, pode-se propor que a redução nos níveis do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  induzida por piocianina pode ser um mecanismo de fuga favorável ao patógeno não envolvido na migração celular e supressor da resposta imunológica do hospedeiro nas concentrações avaliadas nesse trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

A piocianina modulou de forma negativa a produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  em macrófagos peritoneais *in vitro* ativados por lipopolissacarídeo, sugerindo uma ação anti-inflamatória da piocianina no modelo e nas condições experimentais utilizados. Adicionalmente, a piocianina sozinha não induziu a inflamação, não promovendo o aumento da produção do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , embora outros constituintes da *P. aeruginosa* possam modular esses mediadores inflamatórios.

Nos ensaios *in vivo*, a piocianina não alterou o número basal dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal e não atenuou a inflamação induzida por zimosan, sugerindo que a redução dos níveis do óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  induzida por piocianina pode ser um mecanismo de fuga favorável ao patógeno não envolvido na migração celular e supressor da resposta imunológica do hospedeiro nas concentrações avaliadas nesse trabalho. Os demais constituintes da *P. aeruginosa* podem apresentar efeito distinto do observado com a piocianina e investigações futuras, incluindo ensaios utilizando outras doses, podem elucidar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, L.; DOCKRELL, D. H.; PATTERY, T.; LEE, D. G.; CORNELIS, P.; HELLEWELL, P. G; WHYTE, M. K. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses *in vivo*. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 6, p. 3643-3649, 2005.
- ALVAREZ, E.; MACHADO, A.; SOBRINO, F.; SANTA-MARIA, C. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. *Cellular Immunology*, v. 169, n. 1, p. 152-155, 1996.
- ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 9, p.679-692, 2013.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
- BARTH, M. W.; HENDRZAK, J. A.; MELNICOFF, M. J.; MORAHAN, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 57, n. 3, p. 361-367, 1995.
- BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 2008.
- BISCHOFF, J.; BRASEL, C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 210, n. 1, p. 174-180, 1995.
- BLANKENFELDT, W.; PARSONS, J. F. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Current opinion in structural biology*, v. 29, n. 1, p. 26-33, 2014.
- BORN, W. K.; HUANG, Y.; ZENG, W.; TORRES, R. M.; O'BRIEN, R. L. A Special connection between  $\gamma\delta$  T cells and natural antibodies? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 64, n. 6, p. 455-462, 2016.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. *Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA*. Brasília, 2003.
- BYRUM, R. S.; GOULET, J. L.; SNOUWAERT, J. N.; GRIFFITHS, R. J.; KOLLER, B. H. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B<sub>4</sub> in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase-deficient mice. *The Journal of Immunology*, v. 163, n. 12, p. 6810-6819, 1999.
- CALDAS, R. R.; BOISRAMÉ, S. Upper aero-digestive contamination by *Pseudomonas aeruginosa* and implications in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 14, n. 1, p. 6-15, 2015.
- CANTÓN, R.; MÁIZ, L.; ESCRIBANO, A.; OLVEIRA, C.; OLIVER, A.; ASENSIO, O.; GARTNER, S.; ROMA, E.; QUINTANA-GALLEGU, E.; SALCEDO, A.; GIRÓN, R.; BARRIO, M. I.; PASTOR, M. D.; PRADOS, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M. T.; BARBERÁN, J.; CASTÓN, J. J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; POVEDA, J. L.; VÁZQUEZ, C.; DE GRACIA, J.; SOLÉ, A. Spanish consensus on the prevention and treatment of

*Pseudomonas aeruginosa* bronchial infections in cystic fibrosis patients. *Archivos de Bronconeumología*, v. 51, n. 3, p. 140-150, 2015.

CAO, H.; KRISHNAN, G.; GOUMNEROV, B.; TSONGALIS, J.; TOMPKINS, R.; RAHME, L. G. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 25, p. 14613-14618, 2001.

CASSADO, A. A.; LIMA, M. R. D.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.

CATAL, F.; METE, E.; TAYMAN, C.; TOPAL, E.; ALBAYRAK, A.; SERT, H. A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, v. 43, n. 1, p. 14-18, 2015.

CHANG, H. F.; BZEIH, H.; CHITIRALA, P.; RAVICHANDRAN, K.; SLEIMAN, M.; KRAUSE, E.; HAHN, U.; PATTU, V.; RETTIG, J. Preparing the lethal hit: interplay between exo- and endocytic pathways in cytotoxic T lymphocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016. No prelo.

CHEN, L.; ZOU, Y.; SHE, P.; WU, Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, v. 172, n. 1, p. 19-25, 2015.

CHIANG, W. et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 5, p. 2352-2361, 2013.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular Cell*, v. 54, n. 2, p. 281-288, 2014.

COLUCCI, D. G.; PUIG, N. R.; HERNANDEZ-PANDO, R. Influence of anaesthetic drugs on immune response: from inflammation to immunosuppression. *OA Anaesthetics*, v. 1, n. 3, p. 1-7, 2013.

DAS, T.; KUTTY, S. K.; KUMAR, N.; MANEFIELD, M. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.

DENNING, G. M.; RAILSBACK, M. A.; RASMUSSEN, G. T.; COX, C. D.; BRITIGAN, B. E. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *The American Journal of Physiology*, v. 274, n. 6, p. L893-L900, 1998.

DENNING, G. M.; WOLLENWEBER, L. A.; RAILSBACK, M. A.; COX, C. D.; STOLL, L. L.; BRITIGAN, B. E. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 12, p. 5777-5784, 1998.

DIETRICH, L. E.; PRICE-WHELAN, A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v. 61, n. 5, p. 1308-1321, 2006.

- DMITRIEVA, O. S.; SHILOVSKIY, I. P.; KHAITOV, M. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. *Biochemistry*, v. 81, n. 2, p. 80-90, 2016.
- DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins*, v. 30, n. 5, p. 769-89, 1985.
- DUDHGAONKAR, S. P.; KUMAR, D.; NAIK, A.; DEVI, A. R.; BAWANKULE, D. U.; TANDAN, S. K. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 492, n. 2-3, p. 117-122, 2004.
- ELDER, A. C. P.; FINKELSTEIN, J.; JOHNSTON, C.; GELEIN, R.; OBERDORSTER, G. Induction of adaptation to inhaled lipopolysaccharide in young and old rats and mice. *Inhalation Toxicology*, v. 12, n. 3, p. 225-243, 2000.
- EL-FOULY, M. Z.; SHARAF, A. M.; SHAHIN, A. A. M.; EL-BIALY, H. A.; OMARA, A. M. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 8, n. 1, p. 36-48, 2015.
- ELLIOTT, M. J.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; LONG-FOX, A.; CHARLES, P.; KATSIKIS, P.; BRENNAN, F. M.; WALKER, J.; BIJL, H.; GHAYEB, J.; WOODY, J. N. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis & Rheumatism*, v. 36, n. 12, p. 1681-1690, 1993.
- FAN, L.; HU, C.; CHEN, J.; CEN, P.; WANG, J.; LI, L. Interaction between mesenchymal stem cells and B-cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 1-17, 2016.
- FARO, M. L.; FOX, B.; WHATMORE, J. L.; WINYARD, P. G.; WHITEMAN, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*, v. 41, n. 1, p. 38-47, 2014.
- FERRONI, A.; NGUYEN, L.; PRON, B.; QUESNE, G.; BRUSSET, M. C.; BERCHE, P. Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *Journal of Hospital Infection*, v. 39, n. 4, p. 301-307, 1998.
- FICK, R. B. Pathogenesis of the *Pseudomonas* lung lesion in cystic fibrosis. *Chest*, v. 96, n. 1, p. 158-164, 1989.
- FICK, R. B.; HATA, J. S. Pathogenetic mechanisms in lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, v. 95, n. 3, p. 206S-213S, 1989.
- FORBES, A.; DAVEY, A. K.; PERKINS, A. V.; GRANT, G. D.; MCFARLAND, A. J.; MCDERMOTT, C. M.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. ERK1/2 activation modulates pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory epithelial cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 208, n. 1, p. 58-63, 2014.

- FOREMAN, K. E.; VAPORCIYAN, A. A.; BONISH, B. K.; JONES, M. L.; JOHNSON, K. J.; GLOVSKY, M. M.; EDDY, S. M.; WARD, P. A. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 94, n. 3, p. 1147, 1994.
- FRANK, D. W. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 621-629, 1997.
- FRIEDLANDER, M. A.; HILBERT, C. M.; WU, Y. C.; FINEGAN, C. K.; RICH, E. A. Disparate cytochemical characteristics and production of cytokines and prostaglandin E2 by human mononuclear phagocytes from the blood, lung, and peritoneal cavity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 123, n. 4, p. 574-584, 1994.
- FUCHS, A. ILC1s in tissue inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.
- FUSE, K.; FUJIMURA, S.; KIKUCHI, T.; GOMI, K.; IIDA, Y.; NUKIWA, T.; WATANABE, A. Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 19, n. 1, p. 82-88, 2013.
- GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. Molecular dynamics simulations of CXCL-8 and its interactions with a receptor peptide, heparin fragments, and sulfated linked cyclitols. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 51, n. 2, p. 335-358, 2011.
- GARDNER, P. R. Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 333, n. 1, p. 267-274, 1996.
- GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.
- GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 168, n. 8, p. 918-951, 2003.
- GLOYNE, L. S.; GRANT, G. D.; PERKINS, A. V.; POWELL, K. L.; MCDERMOTT, C. M.; JOHNSON, P. V.; ANDERSON, G. J.; KIEFEL, M.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 7, p. 1353-1358, 2011.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>n]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- HANAUER, S. B.; SANDBORN, W. J.; RUTGEERTS, P.; FEDORAK, R. N.; LUKAS, M.; MACINTOSH, D.; PANACCIONE, R.; WOLF, D.; POLLACK, P. Human antitumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*, v. 130, n. 2, p. 323-333, 2006.

- HANSEN, S.; BAPTISTE, K. E.; FJELDBORG, J.; HOROHOV, D. W. A review of the equine age-related changes in the immune system: comparisons between human and equine aging, with focus on lung-specific immune-aging. *Ageing Research Reviews*, v. 20, n. 1, p. 11-23, 2015.
- HAO, Y.; KUANG, Z.; WALLING, B. E.; BHATIA, S.; SIVAGURU, M.; CHEN, Y.; GASKINS, H. R.; LAU, G. W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2. *Cellular Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 401-415, 2012.
- HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *British Medical Bulletin*, v. 53, n. 3, p. 669-683, 1997.
- HASLETT, C.; SAVILL, J. S.; WHYTE, M. K.; STERN, M.; DRANSFIELD, I.; MEAGHER, L. C. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 345, n. 1313, p. 327-333, 1994.
- HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *Journal of Bacteriology*, v. 141, n. 1, p. 156-163, 1980.
- HASSANI, H. H.; HASAN, H. M.; AL-SAAD, A.; ALI, A. M.; MUHAMMAD, M. H. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, v. 2, n. 5, p. 1389-1394, 2012.
- HENSLEY, K. F.; FLOYD, R. Reactive oxygen species and protein oxidation in ageing: a look back, a look ahead. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 397, n. 2, p. 377-383, 2002.
- HOWARTH, P. H.; BABU, K. S.; ARSHAD, H. S.; LAU, L.; BUCKLEY, M.; MCCONNELL, W.; BECKETT, P.; AL-ALI, M.; CHAUHAN, A.; WILSON, S. J.; REYNOLDS, A.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T. Tumour necrosis factor (TNF alpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*, v. 60, n. 12, p. 1012-1018, 2005.
- IMPERI, F.; LEONI, L.; VISCA, P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2007.
- ISSEKUTZ, A. C., ISSEKUTZ, T. B. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 4, p. 2105-2115, 1993.
- JACKOWSKI, J. T.; SZEPEFALUSI, Z.; WANNER, D. A.; SEYBOLD, Z.; SIELCZAK, M. W.; LAUREDO, I. T.; ADAMS, T.; ABRAHAM, W. M.; WANNER, A. Effects of *P. aeruginosa*-derived bacterial products on tracheal ciliary function: role of O<sub>2</sub> radicals. *The American Journal of Physiology*, v. 260, n. 2, p. L61-L67, 1991.
- JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v. 20, n. 1, p.197-216, 2002.

- JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 30, n. 4, p. 1159-1168, 2014.
- JOHNSTON, R. B. J. Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages. *Federation Proceedings*, v. 37, n. 13, p. 2759-2764, 1978.
- KAMATH, J. M.; BRITIGAN, B. E.; COX, C. D.; SHASBY, D. M. Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 12, p. 4921-4923, 1995.
- KANG, S. H.; CHESS-WILLIAMS, R.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; MCDERMOTT, C. Induction of inflammatory cytokines and alteration of urothelial ATP, acetylcholine and prostaglandin E<sub>2</sub> release by doxorubicin. *European Journal of Pharmacology*, v. 700, n. 1-3, p. 102-109, 2013.
- KARANTANOS, T.; CHISTOFIDES, A.; BARHDAN, K.; LI, L.; BOUSSIOTIS, V. A. Regulation of T cell differentiation and function by EZH2. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2016.
- KHALIFA, A. B. H.; MOISSENET, D.; THIEN, H. V.; M. KHEDHER. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*, v. 69, n. 4, p. 393-403, 2011.
- KIM, J.; MCKINLEY, L.; NATARAJAN, S.; BOLGOS, G. L.; SIDDIQUI, J.; COPELAND, S.; REMICK, D. G. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by housedust. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 36, n. 1, p. 122-132, 2006.
- KIM, Y. G.; LEE, J. H.; KIM, S. I.; BAEK, K. H.; LEE, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 195, n. 1, p. 30-39, 2015.
- KIMURA, Y.; MIWA, T.; ZHOU, L.; SONG, W. C. Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. *Blood*, v. 111, n. 2, p. 732-740, 2008.
- KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.
- KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. *Immunobiology*, v. 215, n. 6, p. 492-504, 2010.
- KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. *Inflammation Research*, v. 50, n. 8, p. 415-421, 2001.
- KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *The Journal of Leukocyte Biology*, v. 69, n. 1, p. 33-42, 2001.

- KOLACZKOWSKA, E.; SHAHZIDI, S.; SELJELID, R.; VAN ROOIJEN, N.; PLYTYCZ, B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation*, v. 26, n. 2, p. 61-71, 2002.
- KUMAR, P.; MISRA, S.; KUMAR, A.; PANDIT, A. K.; CHAKRAVARTY, K.; PRASAD, K. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  (-238G/A and -308G/A) gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Pulse*, v. 3, n. 3-4, p. 217-228, 2016.
- LAMAS, S.; PÉREZ-SALA, D.; MONCADA, S. Nitric oxide: from discovery to the clinic. *Juan March Foundation*, v. 19, n. 11, p. 436-438, 1998.
- LAU, G. W.; HASSETT, D. J.; RAN, H.; KONG, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS in Molecular Medicine*, v.10, n. 12, p. 599-606, 2004.
- LAUREDO, I. T.; SABATER, J. R.; AHMED, A.; BOTVINNIKOVA, Y.; ABRAHAM, W. M. Mechanism of pyocyanin- and 1-hydroxyphenazine-induced lung neutrophilia in sheep airways. *Journal of Applied Physiology*, v. 85, n. 6, p. 2298-2304, 1998.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.
- LEE, H. K.; IWASAKI, A. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Seminars in Immunology*, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2007.
- LEITE, D. F.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 82, n. 3, p. 630-637, 2007.
- LORENZO, F.; SILIPO, A.; BIANCONI, I.; LORE', N. I.; SCAMPORRINO, A.; STURIALE, L.; GAROZZO, D.; LANZETTA, R.; PARRILLI, M.; BRAGONZI, A.; MOLINARO, A. Persistent cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa* strain RP73 exhibits an under-acylated LPS structure responsible of its low inflammatory activity. *Molecular Immunology*, v. 63, n. 2, p. 166-175, 2015.
- LOVEDAY, H. P.; WILSON, J. A.; KERR, K.; PITCHERS, R.; WALKER, J. T.; BROWNE, J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *Journal of Hospital Infection*, v. 86, n. 1, p. 7-15, 2014.
- LOWE, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Current Opinion in Cell Biology*, v.15, n. 5, p. 531-538, 2003.
- LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1182-1190, 2005.
- MA, K.; ZHANG, H.; BALOCH, Z. Pathogenetic and therapeutic applications of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in major depressive disorder: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 1-21, 2016.

- MAHAJAN-MIKLOS, S.; TAN, M. W.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, v. 96, n. 1, p. 47-56, 1999.
- MANNA, S. K.; SREENIVASAN, Y.; SARKAR, A. Cardiac glycoside inhibits IL-8-induced biological responses by downregulating IL-8 receptors through altering membrane fluidity. *Journal of Cellular Physiology*, v. 207, n. 1, p. 195-207, 2006.
- MAUCH, R. M.; LEVY, C. E. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis as a diagnostic tool: a systematic review. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 13, n. 5, p. 499-507, 2014.
- MAZUR-BIALY, A. I.; POCHEC, E. HMGB1 inhibition during zymosan-induced inflammation: the potential therapeutic action of riboflavin. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, v. 64, n. 2, p. 171-176, 2016.
- MCCAFFERTY, D. M.; MUDGETT, J. S.; SWAIN, M. G.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology*, v. 112, n. 3, p. 1022-1027, 1997.
- MCCASLIN, C. A.; PETRUSCA, D. N.; POIRIER, C.; SERBAN, K. A.; ANDERSON, G. G.; PETRACHE, I. Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 14, n. 1, p. 70-77, 2015.
- MÉAR, J. B.; KIPNIS, E.; FAURE, E.; DESSEIN, R.; SCHURTZ, G.; FAURE, K.; GUERY, B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 43, n. 4, p. 146-151, 2013.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.
- MIYATA, S.; CASEY, M.; FRANK, D. W.; AUSUBEL, F. M.; DRENKARD, E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 5, p. 2404-2413, 2003.
- MOORE, K. L.; PATEL, K. D.; BRUEHL, R. E.; LI, F.; JOHNSON, D. A.; LICHENSTEIN, H. S.; CUMMINGS, R. D.; BAINTON, D. F.; MCEVER, R. P. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on p-selectin. *The Journal of Cell Biology*, v. 128, n. 4, p. 661-671, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MULLER, M. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, n. 11, p. 1670-1677, 2006.
- MULLER, M.; LI, Z.; MAITZ, P. K. *Pseudomonas* pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Burns*, v. 35, n. 4, p. 500-508, 2009.

- NAM, H. S.; LEE, S. Y.; KIM, S. J.; KIM, J. S.; KWON, S. S.; KIM, Y. K.; KIM, K. H.; MOON, H. S.; SONG, J. S.; PARK, S. H.; KIM, S. C. The soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor suppresses airway inflammation in a murine model of acute asthma. *Yonsei Medical Journal*, v. 50, n. 4, p. 569-575, 2009.
- NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.
- NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994.
- NAVARRO-XAVIER, R. A.; NEWSON, J.; SILVEIRA, V. L.; FARROW, S. N.; GILROY, D. W.; BYSTROM, J. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 3, p. 1516-1525, 2010.
- NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; LATZ, E.; MILLS, K. H. G.; NATOLI, G.; STUNNENBERG, H. G.; O'NEILL, L. A. J.; XAVIER, R. J. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, v. 352, n. 6284, p. 427-437, 2016.
- NGUYEN, A. T.; OGLESBY-SHERROUSE, A. G. Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-cultivations and polymicrobial infections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 14, p. 6141-6148, 2016.
- NINIO, J.; AMIGORENA, S. How B cells and dendritic cells may cooperate in antigen purification. *Journal of Theoretical Biology*, v. 231, n. 3, p. 309-317, 2004.
- OCHOA, S. A.; CRUZ-CÓRDOVA, A.; RODEA, G. E.; CÁZARES-DOMÍNGUEZ, V.; ESCALONA, G.; ARELLANO-GALINDO, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; REYES-LÓPEZ, A.; XICOHTENCATL-CORTES, J. Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from pediatric patients associated to biofilm formation. *Microbiological Research*, v. 172, n. 1, p. 68-78, 2015.
- OEHADIAN, A.; KOIDE, N.; MU, M. M.; HASSAN, F.; ISLAM, S.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. Interferon (IFN)- $\beta$  induces apoptotic cell death in DHL-4 diffuse large B cell lymphoma cells through tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cancer Letters*, v. 225, n. 1, p. 85-92, 2005.
- O'MALLEY, Y. Q.; ABDALLA, M. Y.; MCCORMICK, M. L.; RESZKA, K. J.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E. Subcellular localization of *Pseudomonas* pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 284, n. 2, p. L420-L430, 2003.
- O'MALLEY, Y. Q.; RESZKA, K. J.; RASMUSSEN, G. T.; ABDALLA, M. Y.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 285, n. 5, p. L1077-L1086, 2003.

PAN, N. Y.; HUI, W. S.; TIPOE, G. L.; TAYLOR, G. W.; LEUNG, R. Y.; LAM, W. K.; TSANG, K. W.; MAK, J. C. Inhibition of pyocyanin-potentiated IL-8 release by steroids in bronchial epithelial cells. *Respiratory Medicine*, v. 100, n. 9, p. 1614-1622, 2006.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, n. 1, p. 70-76, 2015.

PARISH, C. R.; HINDMARSH, E. J.; BARTLETT, M. R.; STAYKOVA, M. A.; COWDEN, W. B.; WILLENBORG, D. O. Treatment of central nervous system inflammation with inhibitors of basement membrane degradation. *Immunology and Cell Biology*, v. 76, n. 1, p. 104-113, 1998.

POMIN, V. H. Biological findings from the recent nmr-based studies of glycosaminoglycan-protein interactions. *Glycobiology*, v. 24, n. 11, p. 991-1003, 2014.

PRIYA, J. L.; PRAJNA, L.; MOHANKUMAR, V. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from post-cataract endophthalmitis patients. *Microbial Pathogenesis*, v. 78, n. 1, p. 67-73, 2015.

RADA, B.; LEKSTROM, K.; DAMIAN, S.; DUPUY, C.; LETO, T. L. The *Pseudomonas* toxin pyocyanin inhibits the Dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 7, p. 4883-4893, 2008.

RADA, B.; LETO, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 2, p. 73-81, 2013.

RAMÍREZ-ESTRADA, S.; BORGATTA, B.; RELLO, J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infection and Drug Resistance*, v. 9, n. 1, p. 7-18, 2016.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 269, n. 3, p. 917-925, 1994.

RASAMIRAVAKA, T.; JAZIRI, M. *Quorum-sensing* mechanisms and bacterial response to antibiotics in *P. aeruginosa*. *Current Microbiology*, v. 73, n. 5, p. 747-753, 2016.

RAWLINGSON, A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns*, v. 29, n. 7, p. 631-640, 2003.

RAY, A.; RENTAS, C.; CALDWELL, G. A.; CALDWELL, K. A. Phenazine derivatives cause proteotoxicity and stress in *C. elegans*. *Neuroscience Letters*, v. 584, n. 1, p. 23-27, 2015.

REID, D. M.; GOW, N. A.; BROWN, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology*, v. 21, n. 1, p. 30-37, 2009.

REILLY, T. P.; BELLEVUE III, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.

- RENZETTI, L. M.; PACIOREK, P. M.; TANNU, S. A.; RINALDI, N. C.; TOCKER, J. E.; WASSERMAN, M. A.; GATER, P. R. Pharmacological evidence for tumor necrosis factor as a mediator of allergic inflammation in the airways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.278, n. 2, p. 847-853, 1996.
- ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 9, n. 2, p. 180-186, 1997.
- ROCK, K. L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The sterile inflammatory response. *Annual Review of Immunology*, v. 28, n. 1, p. 321-42, 2010.
- SCHWACHA, M. G. Macrophages and post-burn immune dysfunc. *Burns*, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2003.
- SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986.
- SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation. *The American Journal of Pathology*, v. 177, n. 4, p. 1576-1591, 2010.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.
- SHELLITO, J.; NELSON, S.; SORENSEN, R. U. Effect of pyocyanine, a pigment of *Pseudomonas aeruginosa*, on production of reactive nitrogen intermediates by murine alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 9, p. 3913-3915, 1992.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.
- SINGH, D. R.; BORSE, S. P.; NIVSARKAR, M. Clinical importance of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy: the relevance of tumor necrosis factor as a promising target. *Translational Research*, v. 175, n. 1, p. 76-91, 2016.
- SORENSEN, R. U.; KLINGER, J. D. Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. *Antibiotics and Chemotherapy*, v. 39, n. 1, 113-124, 1987.
- SORENSEN, R. U.; WALLER, R. L.; KLINGER, J. D. Infection and immunity to *Pseudomonas*. *Clinical Reviews in Allergy*, v. 9, n. 1, p. 47-74, 1991.
- SPITZNAGEL, J. K. Antibiotic proteins of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 86, n. 5, p. 1381-1386, 1990.
- STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunologic Research*, v. 22, n. 2-3, p. 299-317, 2000.
- ŠTOFILOVÁ, J.; SZABADOSOVÁ, V.; HRČKOVÁ, G.; SALAJ, R.; BERTKOVÁ, I.; HIJOVÁ, E.; STROJNÝ, L.; BOMBA, A. Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to n,n-dimethylhydrazine. *International Immunopharmacology*, v. 24, n. 2, p. 361-368, 2015.

- TAN, Q.; HU, J.; YU, X.; GUAN, W.; LU, H.; YU, Y.; YU, Y.; ZANG, G.; TANG, Z. The role of IL-1 family members and kupffer cells in liver regeneration. *BioMed Research International*, v. 2016, n. 1, p. 1-6, 2016.
- TASAT, D. R.; MANCUSO, R.; O'CONNOR, S.; MOLINARI, B. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. *Aging Cell*, v. 2, n. 3, p. 159-164, 2003.
- THOMASSEN, M. J.; DEMKO, C.A.; BOXERBAUM, B.; STERN, R. C.; KUCHENBROD, P. J. Multiple of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 140, n. 6, p. 873-80, 1979.
- TOUPKANLOU, S. P.; PEERAYEH, S. N.; MAHABADI, R. P. Class A and D extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 8, n. 8, p. 1-5, 2015.
- USHER, L. R.; LAWSON, R. A.; GEARY, I.; TAYLOR, C. J.; BINGLE, C. D.; TAYLOR, G. W.; WHYTE, M. K. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 4, p. 1861-1868, 2002.
- VASCONCELOS, U.; LIMA, M. A. G. A.; CALAZANS, G. M. T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Canadian Journal of Pure & Applied Sciences*, v. 4, n. 2, p. 1133-1139, 2010.
- WALKER, J.; MOORE, G. *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *Journal of Hospital Infection*, v. 89, n. 4, p. 324-327, 2015.
- WANG, Z.; QU, Z.; FU, C.; XU, F.; CHEN, Y.; WANG, Z.; LIU, Y. Interleukin 1 polymorphisms contribute to intervertebral disc degeneration risk: a meta-analysis. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1-12, 2016.
- WATZLAWICK, R.; KENNGOTT, E. E.; LIU, F. D. M.; SCHWAB, J. M.; HAMANN, A. Anti-Inflammatory Effects of IL-27 in zymosan-induced peritonitis: inhibition of neutrophil recruitment partially explained by impaired mobilization from bone marrow and reduced chemokine levels. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2015.
- WEBB, L. M.; EHRENGRUBER, M. U.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M.; ROT, A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 15, p. 7158-7162, 1993.
- WEBSTER, T. A.; SISMAET, H. J.; CONTE, J. L.; CHAN, I. P.; GOLUCH, E. D. Electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* in human fluid samples via pyocyanin. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 60, n. 1, p. 265-270, 2014.
- WILSON, R.; SYKES, D. A.; WATSON, D.; RUTMAN, A.; TAYLOR, G. W.; COLE, P. J. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, v. 56, n. 9, p. 2515-2517, 1988.

WU, B.; WALKER, J.; SPUR, B.; RODRIGUEZ, A.; YIN, K. Effects of Lipoxin A<sub>4</sub> on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 94, n. 1, p. 55-64, 2015.

WU, F.; XU, J.; HUANG, Q.; HAN, J.; DUAN, L.; FAN, J.; LV, Z.; GUO, M.; HU, G.; CHEN, L.; ZHANG, S.; TAO, X.; MA, W.; JIN, Y. The Role of Interleukin-17 in Lung Cancer. *Mediators of inflammation*, 2016. No prelo.

ZUANY-AMORIM, C.; HAILÉ, S.; LEDUC, D.; DUMAREY, C.; HUERRE, M.; VARGAFTIG, B. B.; PRETOLANI, M. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 6, p. 2644-2651, 1995.

# APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA N°

099/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)



## PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

### I. DADOS DO PROJETO

#### 1. Título do projeto:

PIOCIANINA: AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS E OCORRÊNCIA DE LINHAGENS PRODUTORAS

#### 2. Pesquisador responsável:

Sandra Rodrigues Mascarenhas

#### 3. Centro (Sigla):

CBIOTEC/UFPB

#### 4. Departamento:

Departamento de Biologia Celular e Molecular

#### 5. Número de protocolo:

099/2015

#### 6. Data de submissão:

22/05/2015

#### 7. Data da relatoria:

29/05/2015

#### 8. Apresentação do projeto:

O presente projeto de mestrado tem como objetivo elucidar interações entre a piocianina e processos inflamatórios agudos. Para isso, será avaliado o efeito da piocianina, nas concentrações de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, e 100  $\mu$ M, sobre a viabilidade e a influência na produção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais in vitro.

#### 9. Adequação com legislação vigente:

Adequado

Inadequado

#### 9.1 Comentários:

#### 10. Substituição de metodologia:

SIM

NÃO

#### 10.1 Comentários:

*(Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia para redução do número de animais)*

### II. INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS

#### 1. Espécie:

*Mus musculus*

#### 2. Número amostral:

90

#### 3. Justificativa do número amostral:

Adequado

Inadequado

#### 3.1 Comentários:

A quantidade de animais refere-se aos grupos experimentais detalhados em projeto, necessária para a confiabilidade estatística e ainda tem um número de animais a mais como reserva, caso haja perda de animais ou intempéries estruturais.

#### 4. Acomodação e manutenção:

Adequado

Inadequado

#### 4.1 Comentários:

Os animais serão mantidos conforme o Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFPB.

**5. Manipulação dos animais:**  Adequado  Inadequado

**4.1 Comentários:**

**6. Analgesia dos animais (se aplicável):**  Adequado  Inadequado

**6.1 Comentários:**

**7. Anestesia dos animais (se aplicável):**  Adequado  Inadequado

**7.1 Comentários:**

**8. Eutanásia dos animais (se aplicável):**  Adequado  Inadequado

**8.1 Comentários:**

O procedimento de eutanásia apresentado no projeto é o deslocamento cervical, compatível com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília-DF (2013), que recomenda este tipo de eutanásia para animais com peso inferior a 200 gramas como método aceito com restrição quando justificado que os métodos aceitáveis de eutanásia interferem nos resultados.

### III. SITUAÇÃO DO PROJETO

**Aprovado**  **Aprovado com recomendações**  **Com pendência**  **Negado**

#### 1. Considerações sobre o parecer:

Este Projeto é composto por título, forma de contato com os pesquisadores, local de realização da pesquisa, sumário, introdução, revisão da literatura, justificativa, objetivos, metodologia, viabilidade técnica e de execução, cronograma, cálculo do tamanho da amostra, planejamento de medidas para diminuir dor, estresse ou outro sofrimento e referências. Apresenta fundamentação teórica, clareza de ideias, objetividade e adequação da metodologia aos objetivos propostos. Tem importância científica, uma vez que estuda uma droga que pode tratar uma bactéria que tem causado sérios danos à saúde humana e animal. Com base nestes argumentos, sou de parecer favorável e recomendo o desenvolvimento deste projeto, salvo melhor juízo deste conselho.

João Pessoa, 29 de Maio de 2015.  
Comissão de Ética no Uso de Animais.