



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



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

LUMA DA COSTA LOUREIRO

MANAUS – AMAZONAS

2017



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



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

LUMA DA COSTA LOUREIRO

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

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ARTERIO SORGI

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

MANAUS – AMAZONAS

2017

Ficha Catalográfica

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia dos macrófagos e funções nas infecções bacterianas

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

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

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

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

2.2. Infecções por *Klebsiella pneumoniae*

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

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

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

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

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

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

2.3. Resposta imunológica na infecção por *Klebsiella pneumoniae*

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

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

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

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

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

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

2.4. Os lipídios e a Imunidade inata

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

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

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

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

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

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

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

2.5. Fosfolipídios do líquido surfactante

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

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

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

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

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

3. OBJETIVO

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

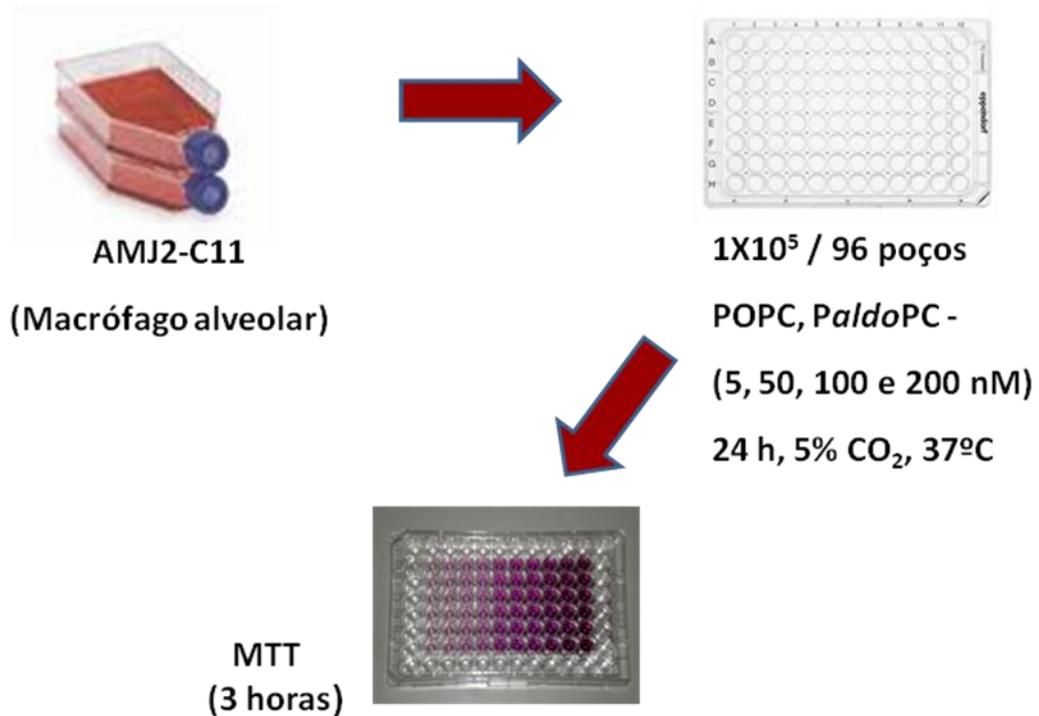
Objetivos específicos:

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

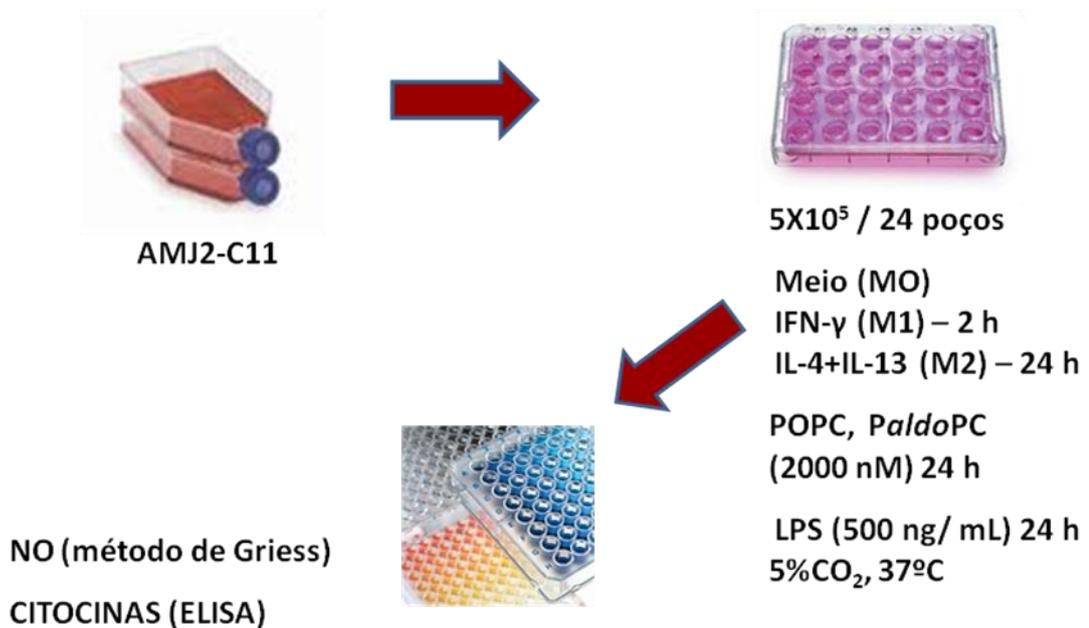
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fluxograma metodológico

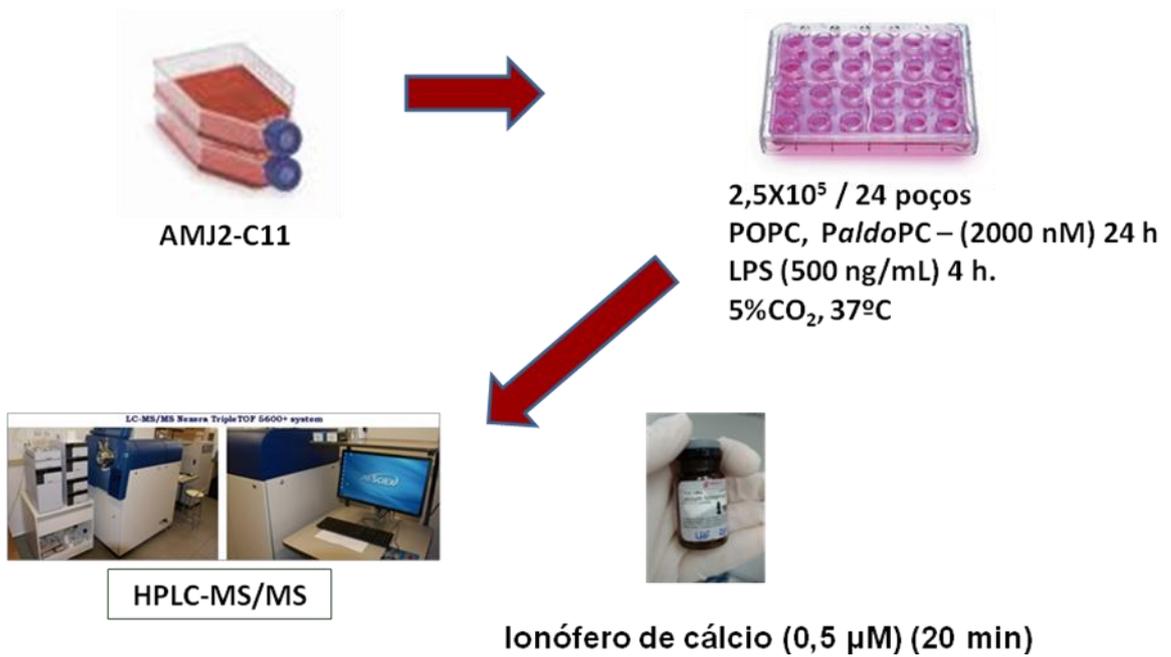
- Analisar a citotoxicidade do tratamento com fosfatidilcolinas nos macrófagos alveolares (AMJ2-C11).



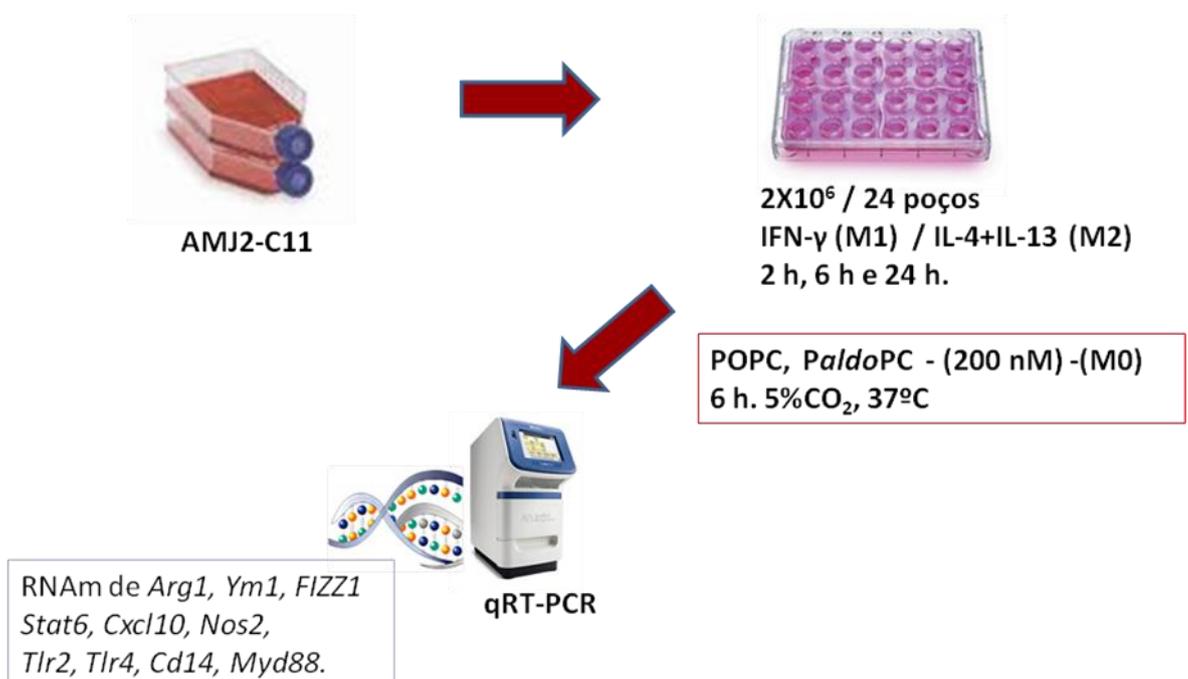
- Identificar o padrão de produção de mediadores inflamatórios (Óxido nítrico, citocinas), em macrófagos polarizados e tratados com fosfatidilcolinas *in vitro*.



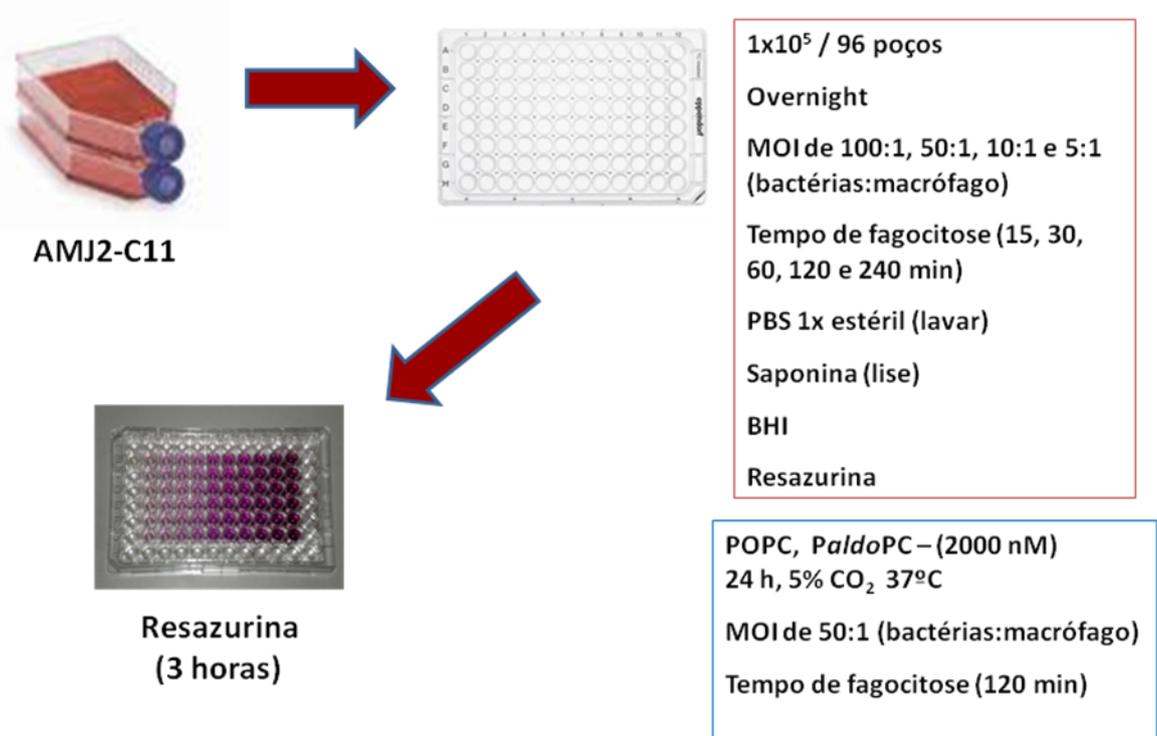
- Identificar o padrão de produção de mediadores inflamatórios (eicosanoides), em macrófagos polarizados e tratados com fosfatidilcolinas *in vitro*.



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



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



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

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

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

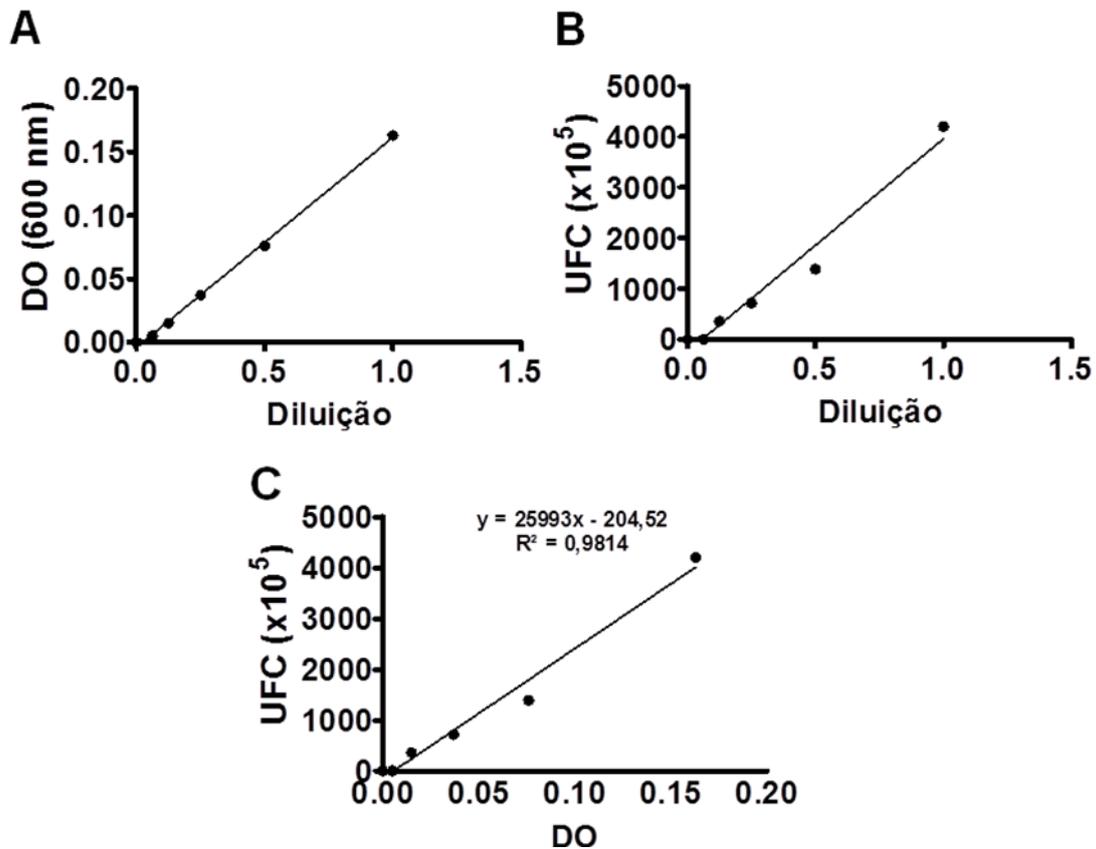


Figura 1. Diluições de *Klebsiella pneumoniae* e equação da reta para experimentos *in vitro*. (A). A partir de uma suspensão, foram realizadas diluições sucessivas com o fator de diluição igual a 2, e determinada densidade óptica (DO) em 600 nm (SpectraMax- Molecular Devices, EUA). **(B).** Em seguida,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

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

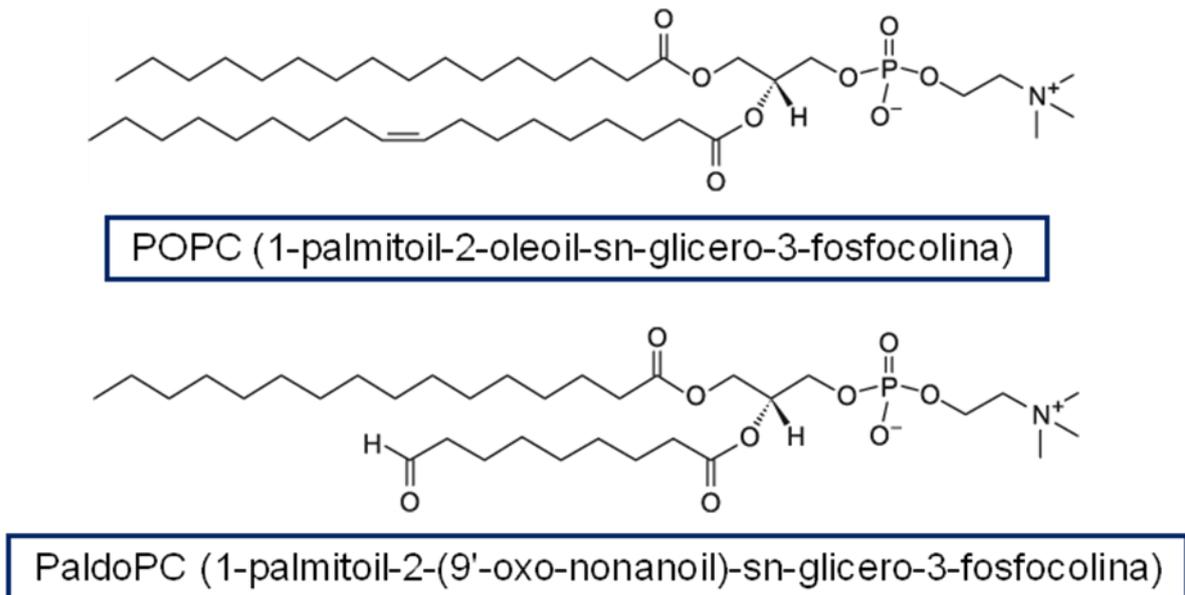


Figura 2. Estrutura química dos fosfolipídios derivados do surfactante. Fosfolipídios utilizados nos tratamentos de MA *in vitro* foram as fosfatidilcolinas POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), onde sua composição de ácido graxo se dá por uma cadeia saturada na posição sn-1 e uma cadeia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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

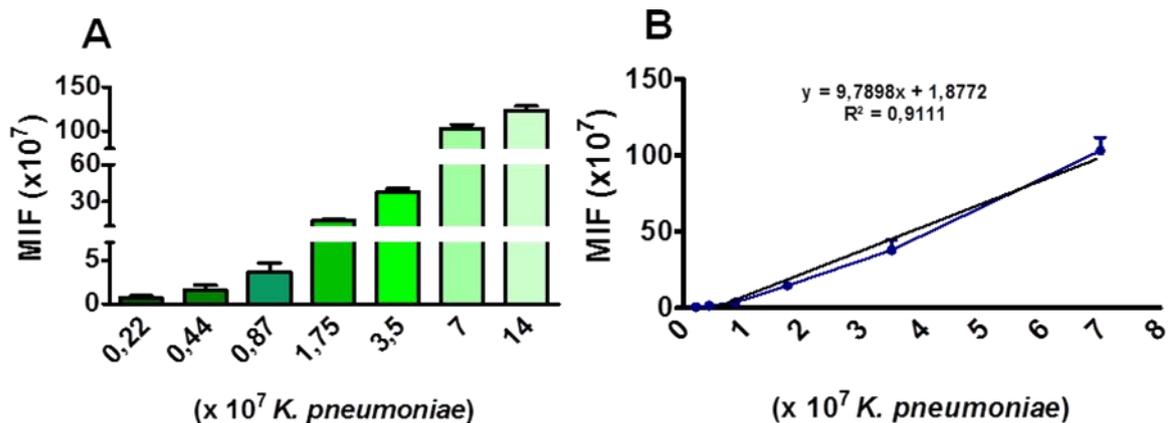


Figura 3. Padronização da técnica da contagem de UFCs de *Klebsiella pneumoniae* pela técnica de resazurina. A partir de uma suspensão conhecida de *K. pneumoniae*, foi realizada uma diluição de base 10, e em seguida várias diluições na base 2. Assim, as bactérias foram plaqueadas em placas de 96 poços,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

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

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

$$\text{IF} = \frac{\text{MIF de bactérias fagocitadas com tratamento} \times 100}{\text{pela média do MIF de bactérias fagocitadas sem tratamento.}}$$

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

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

4.13. Soluções e Meios utilizados nos procedimentos experimentais.

- BHI (BD)

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

- MacConkey – (Himedia – 081 – 500g)

MacConkey51,5 g
 Água destilada ou Milli-Q q.s.p..... 1 L

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

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

- Solução PBS (Solução 10x concentrada)

| | |
|--|---------|
| NaCl | 80 g |
| KCL | 2,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 g |
| H ₂ O Milli-Q (q.s.p) | 1000 mL |

Solução de uso: PBS 1x - Diluir 1:10

- Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco)**- Solução de Saponina 0,05% (Sigma)**

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

- Solução de Resazurina (Sigma)

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

- Solução de Lise

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

- MTT (Corante) (Sigma Aldrich)

| | |
|------------------------|--------|
| MTT | 100 mg |
| PBS (1x) estéril | 20 mL |

- Meio de Cultura DMEM-I

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

- Meio de Cultura DMEM-C

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

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

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

5. RESULTADOS

5.1. Citotoxicidade de fosfolipídios do líquido surfactante para macrófagos da linhagem AMJ2-C11.

Para determinar o efeito dos fosfolipídios do líquido surfactante (POPC e *PaldoPC*) na ativação de macrófagos, primeiramente realizamos ensaio de citotoxicidade. Para isso foram plaqueados 1×10^5 de macrófagos, e baseado em dados da literatura (UHLSON et al., 2002), tratamos ou não com os fosfolipídios POPC ou *PaldoPC* em diferentes concentrações (5, 50, 100, 200 nM) por 24 horas, descrito no item (4.6). Como mostrado na Figura 4, as células AMJ2-C11 após tratamento com os fosfolipídios, independente da concentração, não demonstraram diferenças na metabolização de MTT em relação ao controle não tratado (meio). O controle positivo de citotoxicidade (DMSO) demonstrou ação na diminuição da metabolização de MTT, conseqüentemente indicando morte celular.

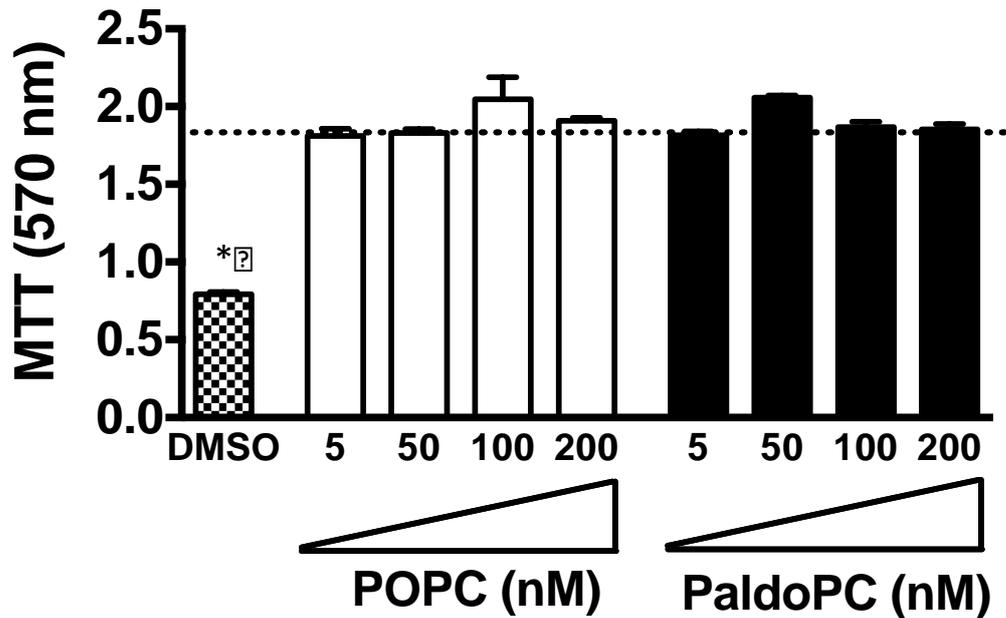


Figura 4. Fosfolipídios não apresentam citotoxicidade em macrófagos de linhagem AMJ2-C11. Macrófagos alveolares foram tratados com POPC e *PaldoPC* em diferentes concentrações por 24 horas. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de metabolização de MTT e determinado a absorbância em 570 nm. Como controle negativo foi utilizado apenas meio (linha tracejada). O controle positivo de morte foi utilizado DMSO (30%). Experimento representativo de duas repetições (n=4). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupos tratados versus controle (meio).

5.2. Produção de NO por macrófagos tratados com fosfolipídios do líquido surfactante e estimulados com LPS.

De acordo com os resultados apresentados no item anterior, no qual ficou evidenciado que os fosfolipídios não apresentam citotoxicidade, optamos por utilizar nos demais experimentos uma concentração maior (2000 nM) de POPC e *Paldo*PC por 24 horas, onde também não foi tóxica para os MA. Sendo isto, importante em nossos experimentos, pois o foco não era observar a morte destas células. Além disso, tivemos como propósito investigar o efeito dos fosfolipídios na modulação de macrófagos alveolares polarizados. Na Figura 5 observamos que a produção basal de NO pelos AMJ2-C11 polarizados foi diferenciada de acordo com o fenótipo (Figura 5A, 5B e 5C). Na ativação por via clássica (perfil M1 - Figura 5B), a produção basal de NO (sem estimulação com LPS) foi em números absolutos maiores que a produção basal de M0 (Figura 5A) ou da via de ativação alternativa (perfil M2 – Figura 5C). No entanto, POPC e *Paldo*PC diminuíram significativamente a produção basal de NO nos AMJ2-C11 polarizados para M1. Quando estimulamos com LPS (500 ng/mL) por 24 horas, os macrófagos alveolares polarizados para M1 e M2 aumentaram significativamente a produção de NO quando comparado ao grupo não estimulado. Contudo, os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC tiveram efeito no aumento da produção de NO apenas nos macrófagos M1, pós-estimulados com LPS. Esses resultados sugerem que os fosfolipídios possuem efeito sinérgico na resposta de macrófagos M0 e polarizados para M1, porém não mudam as características fenotípicas dos M2.

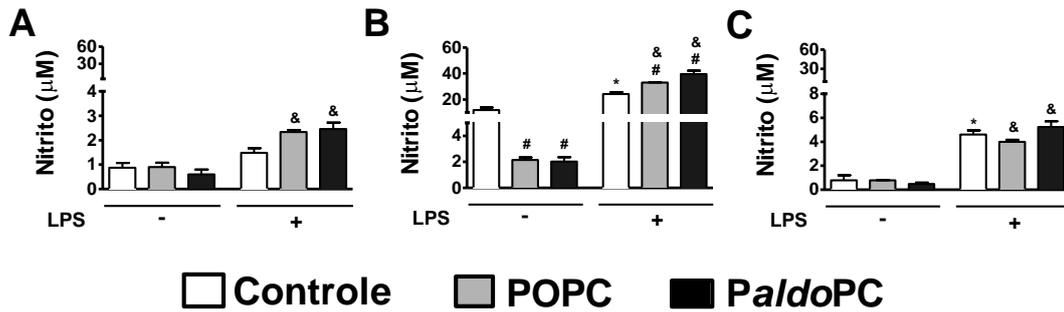


Figura 5. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de NO por macrófagos M0 e M1 (AMJ2-C11) pós-estimulados com LPS. Macrófagos foram plaqueados e considerados como (A) M0, ou (B) ativados pela via clássica com IFN- γ (M1) 100 ng/mL por 2 horas, ou (C) ativação alternativa com IL-4 + IL-13 (M2) 10 ng/mL por 24 horas. Após ativação, os macrófagos foram tratados ou não com POPC ou *PaldoPC* (2000 nM) por 24 horas. Posteriormente, os macrófagos foram estimulados ou não com 500 ng/mL de LPS por 24 horas. As quantidades de NO nos sobrenadantes foram determinadas indiretamente pela formação de nitrito pelo Método de Griess. Os dados representam média \pm desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=9). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupo estimulado com LPS versus controle. #Grupos de macrófagos tratados versus macrófagos não tratados. &Grupos de macrófagos tratados e estimulados com LPS versus grupos tratados e não estimulados.

5.3. Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos alveolares não polarizados (M0), e pós-estimulados com LPS.

A polarização da resposta de macrófagos é importante para determinar sua função no microambiente inflamado. Dessa forma, investigamos qual é a influência do tratamento com POPC e *Paldo*PC na modulação da produção de citocinas por AMJ2-C11, estimulados ou não com LPS. Para isso, 5×10^5 MA alveolares, foram tratados ou não com os fosfolipídios (2000 nM) por 24 horas, e estimulamos ou não com LPS (500 ng/mL) por 24 horas. Observamos que para macrófagos não estimulados, os fosfolipídios não tiveram efeito na produção de TNF- α (Figura 6A), IL-6 (Figura 6B) e MCP-1 (Figura 6C). Porém, *Paldo*PC aumentou a produção de KC (Figura 6D), quando comparados com os M0 não tratados com fosfolipídios. Salientamos que nestes experimentos com AMJ2-C11, independente da polarização celular, estímulos e tratamentos, não detectamos produção de IL-10. Para os macrófagos (M0) estimulados com LPS, a produção de TNF- α (Figura 6A), IL-6 (Figura 6B) e MCP-1 (Figura 6C) estavam aumentadas em relação ao MA não estimulados, mas, não observamos variação na formação de KC (Figura 6D) após estimulação com LPS. POPC ou *Paldo*PC aumentaram a produção de todos os metabólitos proteicos estudados, em relação aos M0 estimulados com LPS e não tratado com os fosfolipídios. Porém, *Paldo*PC teve efeito significativamente maior na produção de TNF- α , IL-6 e KC nos MA estimulados com LPS, em relação aos MA estimulados com LPS e tratados com POPC. Dessa forma, podemos considerar que os fosfolipídios do líquido surfactante apresentam efeito sinérgico na função inflamatória dos MA, mas não é um agente inflamatório natural.

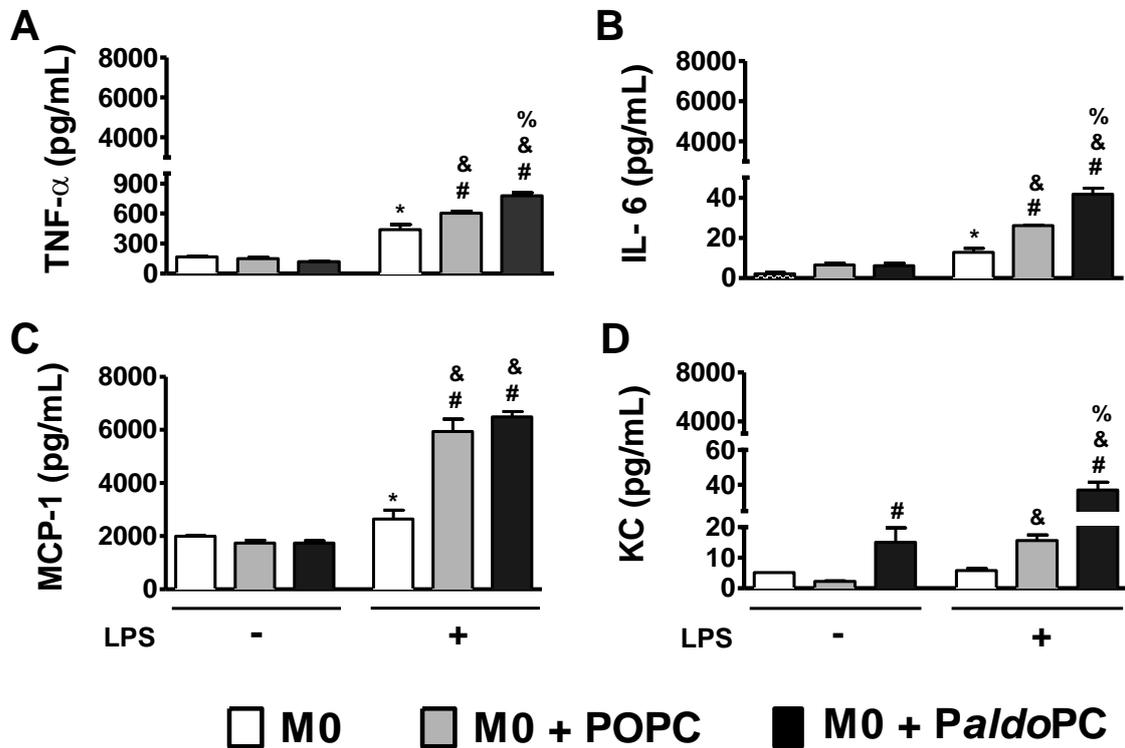


Figura 6. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de citocinas e quimiocinas por M0, pós-estimulados com LPS. AMJ2-C11 foram cultivados e tratados ou não com POPC ou *PaldoPC* (2000 nM) durante 24 horas. Em seguida, foram estimulados com LPS (500 ng/mL) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- α , **(B)** IL-6, **(C)** MCP-1 e **(D)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. Os dados representam média \pm desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupo estimulado com LPS versus controle. #Grupos de M0 tratados versus M0 não tratados. &Grupos de M0 tratados e estimulados com LPS versus grupos tratados e não estimulados. %Grupos tratados com *PaldoPC* versus tratados com POPC.

5.4. Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos ativados pela via clássica (M1), e pós-estimulados com LPS.

Os macrófagos possuem características de plasticidade, podendo mudar seu fenótipo ou atividade de acordo com a influência do microambiente. Os M1 são considerados como macrófagos inflamatórios. Dessa forma, investigamos a influência dos fosfolipídios POPC e *Paldo*PC na modulação da produção de mediadores inflamatórios proteicos por AMJ2-C11 ativados com IFN- γ (M1), pós-estimulados ou não com LPS. Nossos resultados demonstraram que para M1 não estimulados com LPS, os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC diminuíram significativamente a produção de MCP-1 (Figura 7C). Porém, *Paldo*PC aumentou a produção de IL-6 (Figura 7B), quando comparados com M1 não tratados. Também, não observamos modulação da produção de TNF- α (Figura 7A) e KC (Figura 7D) por AMJ2-C11 tratados com os fosfolipídios e não tratados com LPS. Em experimentos com pós-estimulação de M1 com LPS, demonstramos que a produção de TNF- α (Figura 7A), IL-6 (Figura 7B), MCP-1 (Figura 7C) estavam significativamente maior em relação aos M1 não estimulados com LPS. Nesse sentido, os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC tiveram efeito no aumento da produção de TNF- α (Figura 7A), IL-6 (Figura 7B) e MCP-1 (Figura 7C), mas apenas o *Paldo*PC modulou positivamente a produção de KC (Figura 7D), em relação aos M1 estimulados com LPS e não tratados. Entretanto, *Paldo*PC teve efeito significativamente maior na produção de TNF- α e KC, quando comparados com M1 tratados com POPC e pós-estimulados com LPS.

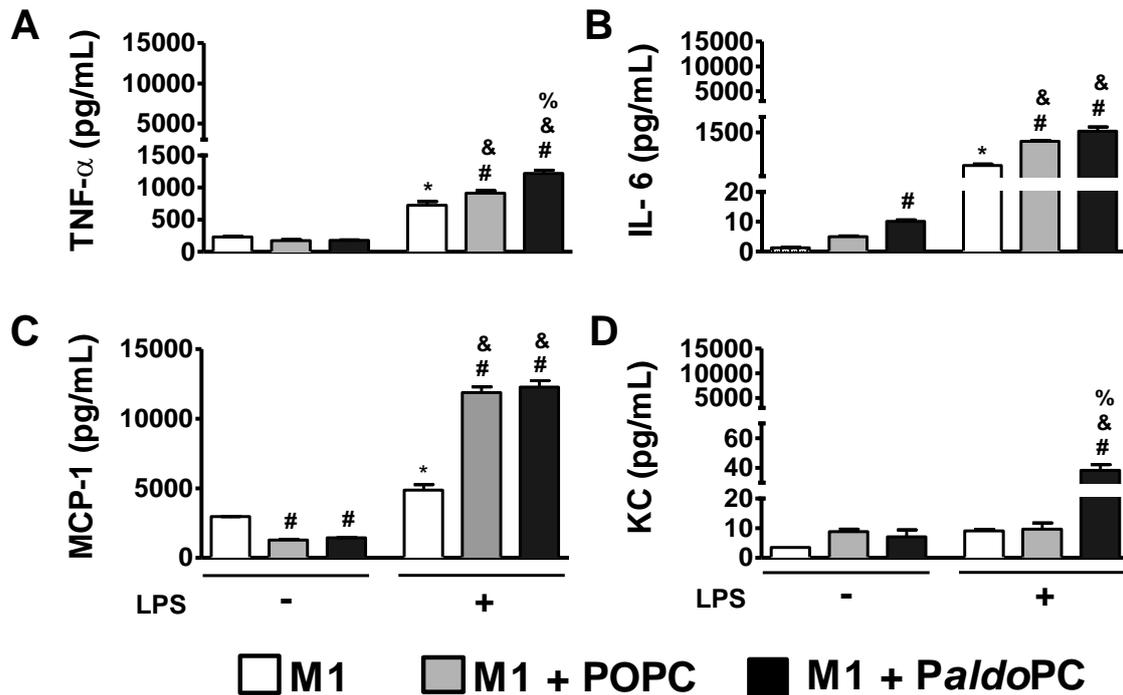


Figura 7. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de citocinas e quimiocinas por M1, pós-estimulados com LPS. AMJ2-C11 foram polarizados para M1 com incubação com IFN- γ (100 ng/mL) por 2 horas, e tratados ou não com POPC ou *PaldoPC* (2000 nM) durante 24 horas. Em seguida, foram estimulados com LPS (500 ng/mL) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- α , **(B)** IL-6, **(C)** MCP-1 e **(D)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. Os dados representam média \pm desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupo estimulado com LPS versus controle. #Grupos de M1 tratados versus M1 não tratados. &Grupos de M1 tratados e estimulados com LPS versus grupos tratados e não estimulados. %Grupos tratados com *PaldoPC* versus tratados com POPC.

5.5. Efeito dos fosfolipídios na produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos ativados pela via alternativa (M2), e pós-estimulados com LPS.

Os M2 são considerados como macrófagos reguladores ou auxiliar de cicatrização e regeneração de tecidos, em geral, é o principal fenótipo de macrófagos anti-inflamatórios. Baseado nesta informação, o M2 seria o fenótipo em uma situação de resolução da inflamação. Dessa forma, investigamos a influência dos fosfolipídios POPC e *Paldo*PC na modulação da produção de citocinas e quimiocinas produzidos por AMJ2-C11 ativados com IL-4 + IL-13 (M2), pós-estimulados ou não com LPS. Nossos resultados demonstraram que para M2 não estimulados com LPS, os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC, tiveram efeito no aumento da produção de TNF- α (Figura 8A), IL-6 (Figura 8B) e MCP-1 (Figura 8C). Porém, não modificaram a produção de KC (Figura 8D). Nos grupos pós-estimulados com LPS, demonstramos que a produção de TNF- α (Figura 8A), IL-6 (Figura 8B) e MCP-1 (Figura 8C) estavam significativamente aumentadas em relação aos M2 não estimulados com LPS. Porém, não modificou a produção de KC (Figura 8D). Neste caso, a baixa produção de KC pode ser uma característica destas células polarizadas para M2, independente de tratamento e estimulação. POPC não demonstrou efeito na produção de TNF- α , IL-6 e KC, mas, diminuiu a produção de MCP-1, quando comparado com os M2 estimulados com LPS e não tratados com os fosfolipídios. No entanto, *Paldo*PC nos M2 pós-estimulados com LPS, apresentou pouca influência na modulação da produção de TNF- α e MCP-1. Salientamos, o efeito de *Paldo*PC no aumento da produção de IL-6 e na diminuição da produção de KC, em relação aos M2 estimulados com LPS e não tratados. Consideramos que os fosfolipídios modificaram o estado basal inflamatório de M2, porém, esse efeito não foi somatório ao estímulo inflamatório do LPS.

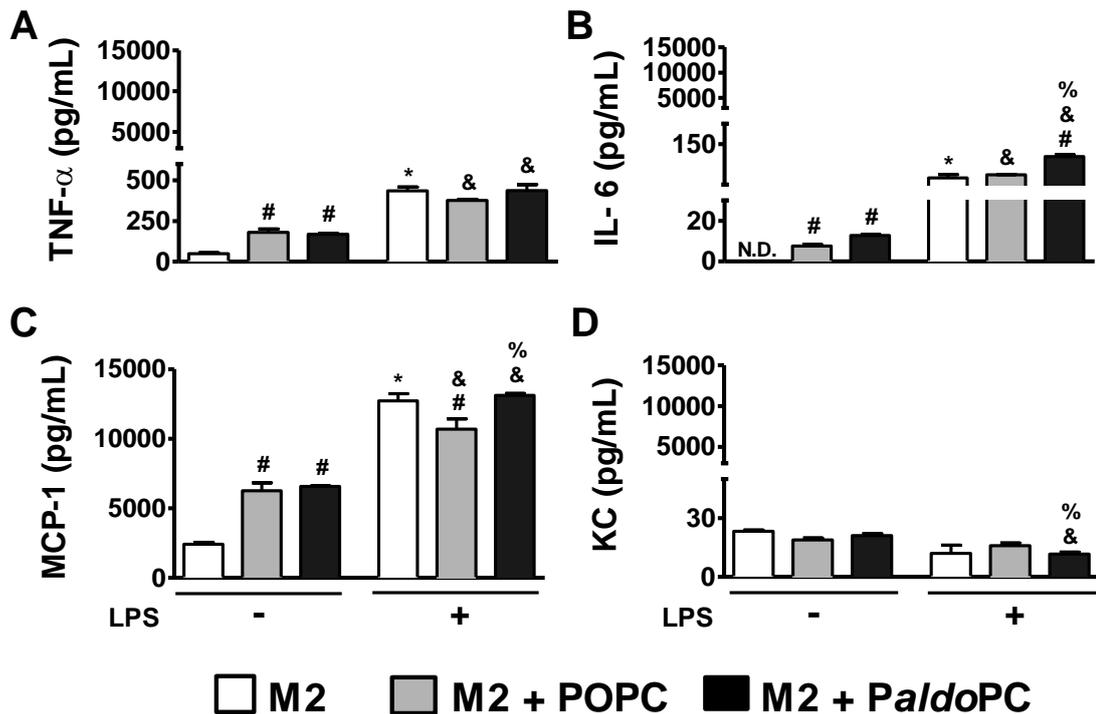


Figura 8. Fosfolipídios possuem efeito sinérgico na produção de citocinas e quimiocinas por M2 não estimulados com LPS. AMJ2-C11 foram polarizados para M2 com incubação com IL-4 + IL-13 (10 ng/mL) por 24 horas, e tratados ou não com POPC ou *Paldo*PC (2000 nM) durante 24 horas. Em seguida, foram estimulados com LPS (500 ng/mL) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinados pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- α , **(B)** IL-6, **(C)** MCP-1 e **(D)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. Os dados representam média \pm desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupo estimulado com LPS versus controle. #Grupos de M2 tratados versus M2 não tratados. &Grupos de M2 tratados e estimulados com LPS versus grupos tratados e não estimulados. %Grupos tratados com *Paldo*PC versus tratados com POPC.

5.6. Determinação da expressão gênica de marcadores dos fenótipos M1 e M2 para células AMJ2-C11.

Para elucidar os mecanismos envolvidos no tratamento com fosfolipídios e ativação de macrófagos, primeiramente demonstramos a capacidade plástica natural dos AMJ2-C11 quando estimulados com citocinas do padrão Th1 (IFN- γ), ou do padrão Th2 (IL-4 + IL-13). Para isso, 2×10^6 AMJ2-C11/poço foram incubados ou não com as citocinas de polarização (como descrito nos Materiais e Métodos), e analisamos a expressão gênica ao longo do tempo (2, 6 e 24 horas). Nesse sentido, para avaliar a polarização de AMJ2-C11 para o perfil M2, utilizamos a expressão de RNAm para a enzima arginase-1 (Figura 9A), as moléculas YM-1 (Figura 9B) e FIZZ-1 (Figura 9C). Assim também, para avaliar a polarização de AMJ2-C11 para o perfil M1, utilizamos a expressão de RNAm para a enzima iNOS (Figura 9D) e a quimiocina CXCL10 (Figura 9E). Através do experimento de qRT-PCR, demonstramos que após 6 horas de estimulação do AMJ2-C11 com IFN- γ , ocorreu a maior expressão dos genes *Nos2* (Figura 9D) e *Cxcl10* (Figura 9E), em relação aos AMJ2-C11 não polarizados (M0). Contudo, as expressões aumentadas destes genes continuaram até 24 horas de polarização. Em relação aos genes de marcação do perfil M2, o primeiro a ser expresso foi o *Arg1* (Figura 9A) em 2 horas de polarização com IL-4 + IL-13, e continuou aumentando sua expressão até 24 horas de polarização, comparando com o M0. A expressão do gene *Chil3* (Figura 9B) obteve seu máximo de expressão em 6 horas e continuou expresso até 24 horas. Entretanto, a expressão do gene *Retnla* (Figura 9C) foi significativamente maior somente após 24 horas de polarização. O controle endógeno de expressão gênica utilizado foi o *Actb*.

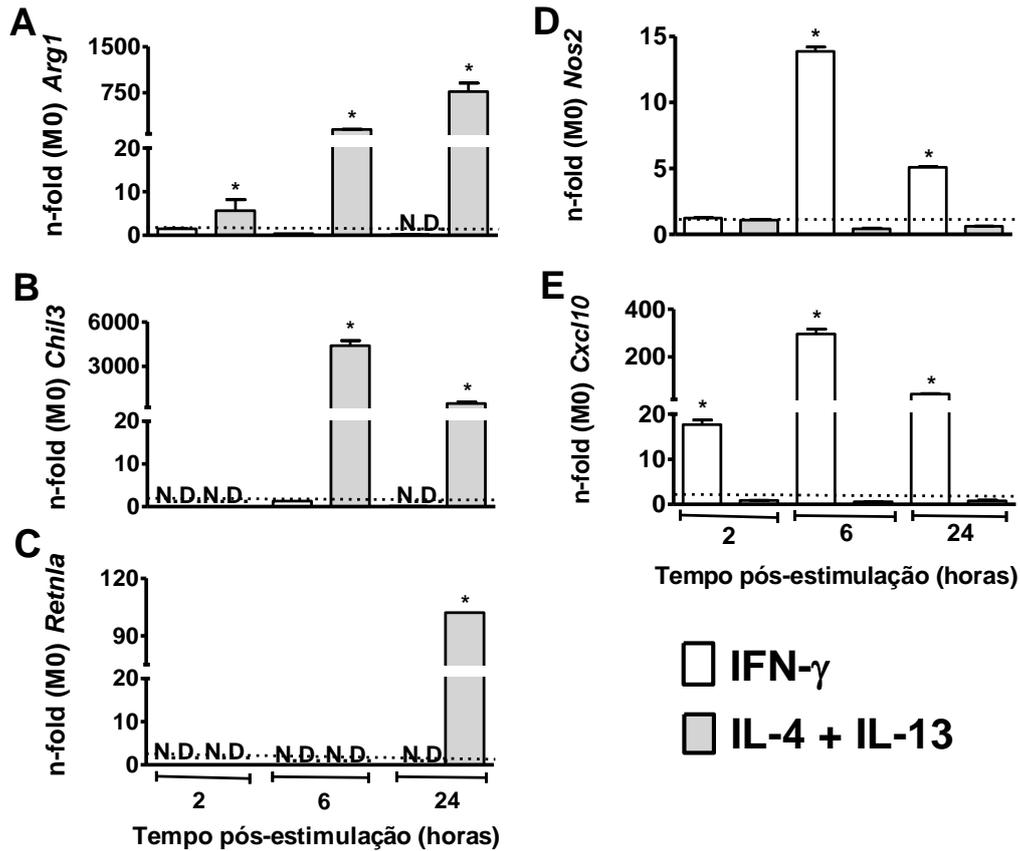


Figura 9. A linguagem AMJ2-C11 possui plasticidade celular. Macrófagos (AMJ2-C11) foram cultivados (M0) e polarizados para o perfil M1 (IFN- γ) e M2 (IL-4 + IL-13) por 2, 6 e 24 horas. Após, seu RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e analisado a expressão relativa ($\Delta\Delta Ct$) por qRT-PCR. Transcritos que codificam para **(A)** Arginase-1, **(B)** YM-1, **(C)** FIZZ-1, **(D)** iNOS e **(E)** CXCL10 foram quantificados no lisado de AMJ2-C11, e comparados com a produção de M0 (linha tracejada). Os resultados foram normalizados para a expressão endógena do controle interno *Actb*. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão médio de dois experimentos independentes em duplicata ($n = 2$). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Comparando grupos polarizados versus controle de referência. (N.D. = não detectado).

5.7. Efeitos dos fosfolipídios na expressão gênica de marcadores de fenótipos e receptores da imunidade inata nos macrófagos AMJ2-C11.

M1 e M2 são fenótipos de macrófagos bem polarizados e distintos em suas funções, devido em grande parte, às diferentes expressões de receptores de membranas, enzimas relacionadas ao metabolismo celular e produção de mediadores solúveis. Desta forma, utilizamos da técnica de qRT-PCR para determinar se os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC teriam efeito na polarização de macrófagos (M0) e na expressão de receptores celulares. Para isso, AMJ2-C11 (M0) 2×10^6 de células, foram tratados com POPC ou *Paldo*PC (200 nM) por 6 horas e o RNAm obtido. Como controle, utilizamos a polarização de MA com citocinas do padrão Th1 (IFN- γ – 100 ng/mL) obtendo perfil M1, ou do padrão Th2 (IL-4 + IL-13 - 10 ng/mL) obtendo perfil M2.

Nossos resultados demonstraram que a expressão gênica de marcadores de perfil M1, como *Nos2* (Figura 10A) e *Cxcl10* (Figura 10B) estava aumentada no grupo controle tratado com IFN- γ . Porém, os fosfolipídios não modificaram a expressão de *Nos2* e *Cxcl10*, quando comparados com a expressão basal de M0. A expressão de *Arg1* (Figura 10C), marcador de perfil M2, estava aumentada no grupo tratado com IL-4 +IL-13, mas novamente, os fosfolipídios não modificaram a expressão de *Arg1*, em relação ao M0. Dessa forma, podemos observar que POPC ou *Paldo*PC não tiveram efeito na polarização de macrófagos.

A resposta inflamatória de macrófagos é dependente do reconhecimento de PAMPs de microrganismos (como o LPS) por PRRs (como receptores do tipo Toll). Assim, demonstramos a expressão gênica de receptores da imunidade inata e moléculas adaptadoras da resposta inflamatória, nos AMJ2-C11 tratados com POPC ou *Paldo*PC. Na Figura 10D, observamos que a expressão de *Tlr2* está menor nos M2, mas POPC aumentou a expressão de *Tlr2* em relação ao M0. A expressão de *Tlr4* (Figura 10E) estava aumentada nos M2 em relação ao M1 e M0. Porém, os fosfolipídios POPC ou *Paldo*PC, também modularam positivamente a expressão de *Tlr4*, em relação ao M0. Do mesmo modo, a expressão da molécula adaptadora *Myd88* (Figura 10F) estava aumentada nos M1, em relação ao M0 e M2; e os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC também aumentaram significativamente a expressão de *Myd88*, este aumento foi significativo em relação a expressão de M1 e M2. Neste

contexto, avaliamos a expressão de *Cd14* (Figura 10G), que é um cofator auxiliar da resposta de TLRs. Contudo, os fosfolipídios não modificaram a expressão de *Cd14*, quando comparados com o M0. Ainda, avaliamos a expressão de *Stat6* (Figura 10H), que está relacionado com a regulação da resposta inflamatória em macrófagos, atuando como um fator de transcrição. Demonstramos que os fosfolipídios também não modificaram a expressão de *Stat6*, em relação ao M0. Porém, salientamos que os M1 e M2 regularam negativamente a expressão de *Cd14* e *Stat6*, quando comparados com M0. Assim, os fosfolipídios apresentaram efeito sinérgico na resposta inflamatória dos M0, devido ao aumento da expressão de receptores da imunidade inata e moléculas adaptadoras, e de modo independente da polarização dos macrófagos.

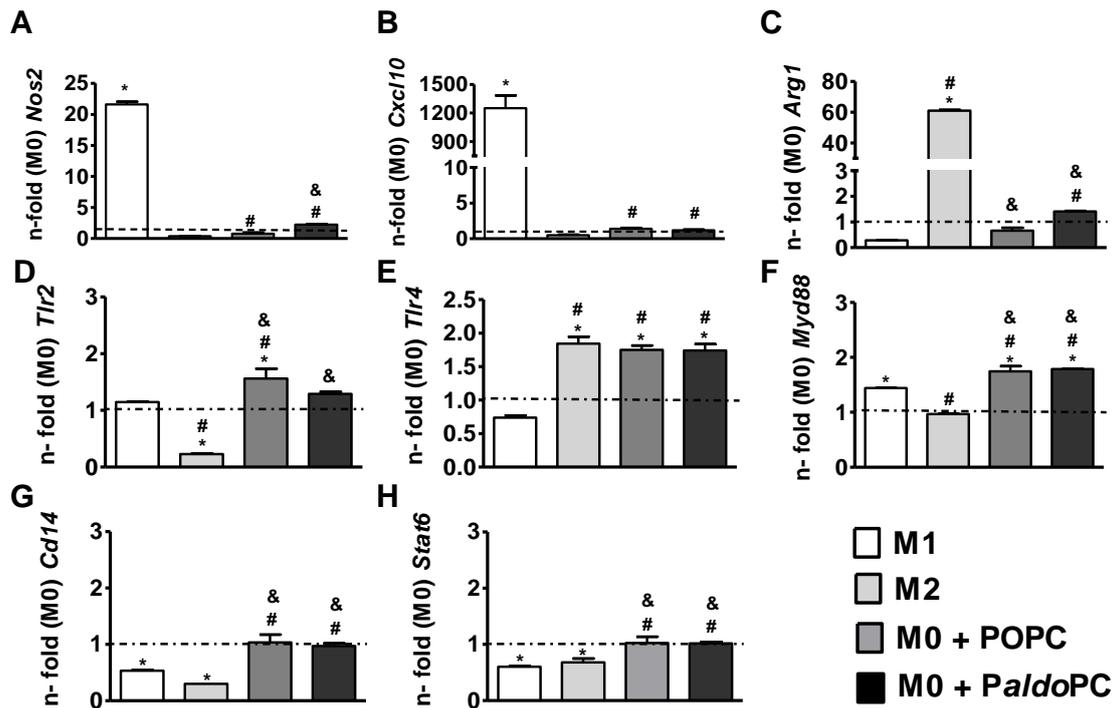


Figura 10. Fosfolipídios modulam a expressão de receptores da Imunidade Inata em AMJ2-C11. Macrófagos (AMJ2-C11) foram cultivados (M0) e polarizados para o perfil M1 (IFN- γ) e M2 (IL-4 + IL-13). Além disso, M0 foram tratados com POPC ou *Paldo*PC (200 nM) durante 6 h. Seguinte, o RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e analisado a expressão relativa ($\Delta\Delta C_t$) por qRT-PCR. A expressão gênica de (A) *Nos2*, (B) *Cxcl10*, (C) *Arg1*, (D) *Tlr2*, (E) *Tlr4*, (F) *Myd88*, (G) *Cd14* e (H) *Stat6* foram quantificados no lisado de AMJ2-C11, e comparados com a produção de M0 (linha tracejada). Os resultados foram normalizados para a expressão endógena do controle interno *Actb*. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão médio de dois experimentos independentes em duplicata (n = 2). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Comparando grupos tratados versus M0. #Grupos tratados versus M1. &Grupos tratados versus M2.

5.8. Produção de prostaglandinas por AMJ2-C11 (M0) tratados com fosfolípidios do líquido surfactante.

Os mediadores lipídicos são moléculas importantes na regulação das funções efetoras de macrófagos, atuando na iniciação da resposta imune. Desta forma, as prostaglandinas podem estar envolvidas nos processos de fagocitose, morte de microrganismo e regulação da produção de citocinas. Em nossos experimentos, através da espectrometria de massas, observamos a produção das prostaglandinas PGE_2 (Figura 11A) e PGD_2 (Figura 11B) nos AMJ2-C11 (M0), após tratamento ou não com POPC e *Paldo*PC, e pós-estimulados ou não com LPS. Para obter a informação da capacidade celular de produção de mediadores lipídicos, fizemos um pós-tratamento dos AMJ2-C11 com ionóforo de cálcio ($0,5 \mu M$) por 20 minutos, que ativa a liberação de cálcio intracelular e sinaliza positivamente para a ação das enzimas do metabolismo de lipídios.

No perfil M0 (Figura 11A), os fosfolípidios POPC e *Paldo*PC diminuíram significativamente a produção de PGE_2 basal nos macrófagos não estimulados com LPS. Porém, a estimulação com LPS não aumentou a produção de PGE_2 nos M0, e os fosfolípidios não tiveram efeito na modulação da produção de PGE_2 nos AMJ2-C11 estimulados com LPS, quando comparados com os macrófagos estimulados com LPS e não tratados com os fosfolípidios. Contudo, na produção de PGD_2 (Figura 11B), POPC teve efeito positivo na produção de PGD_2 , enquanto que *Paldo*PC diminuiu significativamente a produção de PGD_2 , quando comparados com POPC. Interessante, após estímulo com LPS, os fosfolípidios tiveram efeito semelhante na produção de PGD_2 ao observado para os M0 não estimulados com LPS.

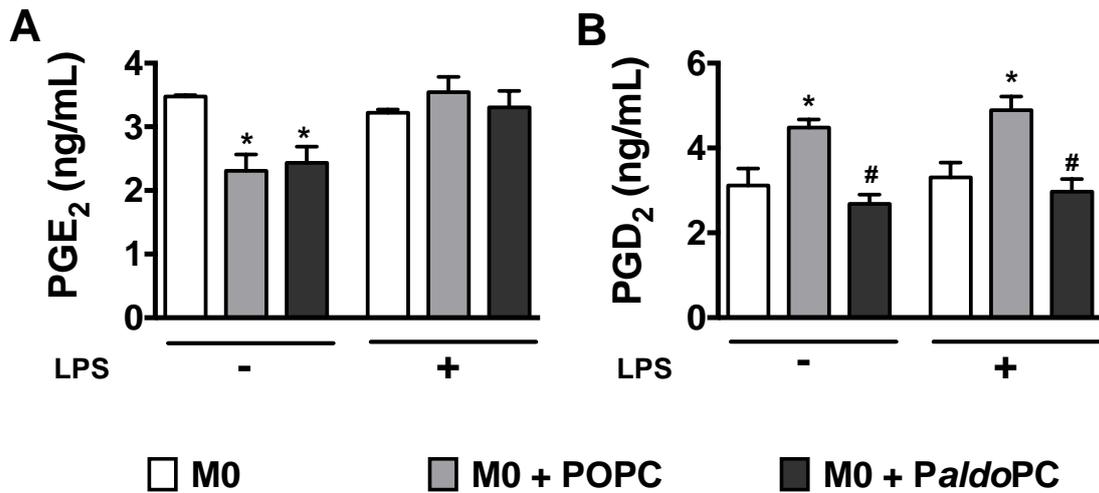


Figura 11. Produção de PGE₂ e PGD₂ por AMJ2-C11 tratados com fosfolipídios, e pós-estimulados com LPS. Macrófagos (M0) foram cultivados e tratados ou não com 2000 nM dos fosfolipídios POPC e *PaldoPC* por 24 h, e estimulados ou não com 500 ng/mL de LPS por 4 h. Em seguida, as células foram estimuladas com Ionófero de cálcio (0,5 μM) durante 20 minutos à 37°C. A quantificação de **(A)** PGE₂ e **(B)** PGD₂ foi realizada por espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) em modo quantitativo, com fonte de ionização no modo negativo e os dados adquiridos no modo MRN (Monitoramento de Reações Múltiplas). Os dados representam média ± desvio padrão médio (n=5). Diferenças estatísticas foram consideradas para p < 0,05. *Grupos tratados com fosfolipídios versus controles não tratados. #Grupos tratados com *PaldoPC* versus tratados com POPC.

5.9. Avaliação do efeito dos fosfolipídios na atividade fagocítica de AMJ2-C11 contra *K. pneumoniae*.

No ensaio de fagocitose de *K. pneumoniae* por AMJ2-C11 utilizamos da padronização do método colorimétrico (fluorescência) com rezazurina, como descrito nos Materiais e Métodos. Dessa forma, consideramos que a metabolização de rezazurina é diretamente proporcional ao número de bactérias viáveis. Dessa maneira, padronizamos o ensaio de fagocitose por AMJ2-C11, levando em conta o tempo e a proporção de bactérias (Figura 12A); como também os limites de detecção do método de rezazurina. Para isso, macrófagos foram aderidos em placas de cultura e acrescentado *K. pneumoniae* (não opsonizadas) nas proporções de 100:1, 50:1, 10:1 e 5:1 (bactérias:macrófagos). A fagocitose das bactérias foi analisada por 15, 30, 60, 120 e 240 minutos.

Os resultados desta padronização da fagocitose (Figura 12A) demonstraram que o evento é dependente da quantidade de bactérias e do tempo. Assim, o melhor tempo de fagocitose foi de 240 minutos, para todas as proporções de bactérias. Porém, quando a proporção de bactéria foi de 100:1 (bactérias:macrófagos), conseguimos identificar fagocitose à partir de 30 minutos de incubação. Na proporção de 50:1 (bactérias:macrófagos), a fagocitose de *K. pneumoniae* foi identificada somente à partir de 120 minutos. Assim, com base em nossas padronizações, decidimos utilizar para os demais experimentos, proporção de 50:1 (bactérias:macrófago) no tempo de 120 minutos; justificado por ser um ponto médio de detecção da fagocitose, permitindo que os fosfolipídios modulem esse evento de modo positivo ou negativo. Então, nosso próximo passo foi verificar o efeito dos fosfolipídios POPC e *Paldo*PC na fagocitose de *K. pneumoniae* por AMJ2-C11. Como demonstrado na Figura 12B, POPC aumentou significativamente a fagocitose de bactérias, quando comparado com o controle não tratado. Entretanto, *Paldo*PC diminuiu a fagocitose de *K. pneumoniae*, em relação controle e ao efeito de POPC. A fagocitose é um evento dependente da estrutura de membrana, e o tratamento com POPC pode estar envolvido com sua incorporação e remodelação da membrana plasmática.

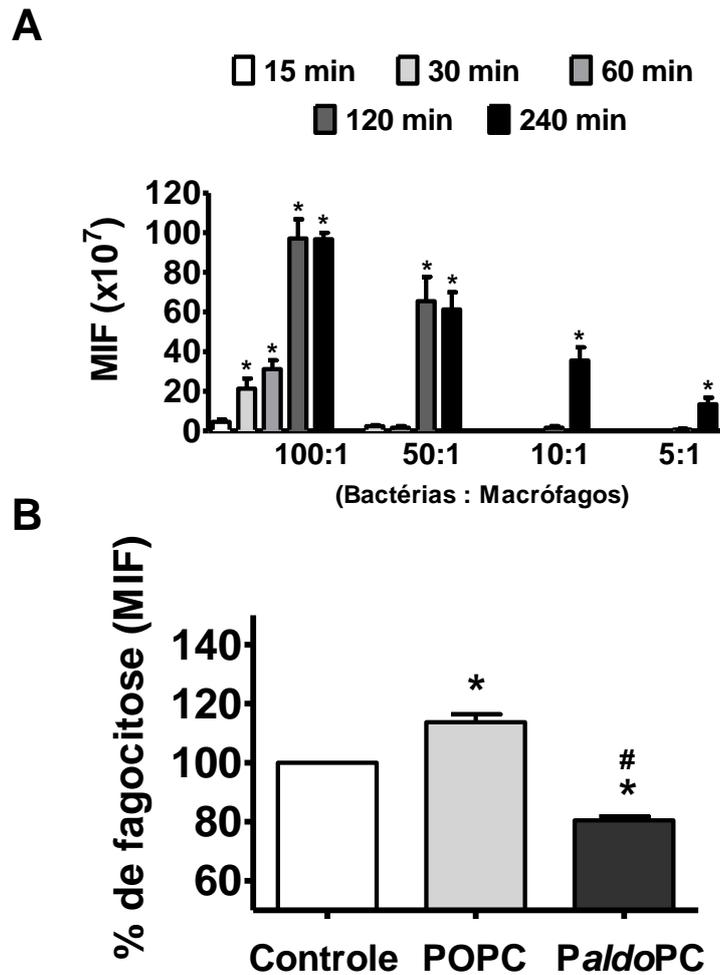


Figura 12. Fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* por AMJ2-C11 tratados com fosfolipídios. Macrófagos foram incubados por **(A)** 15, 30, 60, 120 e 240 minutos com diferentes proporções de *K. pneumoniae* 100:1; 50:1; 10:1 e 5:1 (bactérias:macrófagos). As bactérias não fagocitadas foram retiradas por lavagem dos poços, e as bactérias fagocitadas foram determinadas por método de metabolização de resazurina em espectrofotômetro (560 nm de emissão/590 nm de excitação). **(B)** Macrófagos foram tratados ou não com 2000 nM de POPC ou PaldoPC por 24 horas. A seguir, foram incubados com *K. pneumoniae* na proporção de 50:1 (bactérias:macrófagos) por 120 minutos. A porcentagem de fagocitose foi obtida a partir do índice fagocítico (IF) = MIF de bactérias fagocitadas por AMJ2-C11 tratados x 100/ média de MIF de bactérias fagocitadas por AMJ2-C11 sem tratamento. Experimento representativo de dois experimentos independentes (n=6). Os dados representam média \pm desvio padrão médio. Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. *Grupos experimentais versus controles. #Grupos tratados com PaldoPC versus tratados com POPC.

6. DISCUSSÃO

A inflamação é um processo importante na defesa do hospedeiro, sendo a resposta dos tecidos vascularizados após danos físicos, químicos, e presença de microrganismos (STABLES; GILROY, 2011). O LPS, principal componente da membrana de bactérias Gram-negativas, desencadeia este processo através do reconhecimento por células do sistema imune do hospedeiro, como os macrófagos, iniciando assim uma sinalização intracelular para a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e metabólitos derivados do ácido araquidônico (AA), também chamados de eicosanoides, como prostaglandinas e leucotrienos (FAN et al., 2008; HANADA; YOSHIMURA, 2002; SIBILLE; REYNOLDS, 1990). A pneumonia, como a causada por *Klebsiella pneumoniae*, é caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada, associada com o excesso de infiltração de macrófagos e neutrófilos, e alta produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a injúria pulmonar severa (SOARES et al., 2006).

Alterações das quantidades e dos tipos de lipídios na composição das membranas têm sido relatadas em várias patologias humanas, como doenças pulmonares (PALESTINI et al., 2003; PINOT et al., 2000). Assim, a TLM tem como foco criar estratégias para o desenvolvimento de fármacos, que atuem na organização dos lipídios pela sua estrutura-função, levando a modulação da atividade celular, podendo interferir no estado patológico (ESCRIBÁ, 2006).

A classe das PC, como POPC e seu oxidado *PaldoPC* são a classe de fosfolipídios (PLs) mais abundantes do líquido surfactante (ALMSTRAND; VOELKER; MURPHY, 2015). Com isso, nosso objetivo foi entender como esses PLs participam dos processos inflamatórios de macrófagos induzidos por bactérias Gram-negativas, como *K. pneumoniae*. Inicialmente, nossos resultados mostram que POPC e *PaldoPC* não apresentaram toxicidade para os macrófagos (AMJ2-C11) nas concentrações máximas utilizadas (200 nM), o que para nosso trabalho é relevante. Por outro lado, trabalhos utilizando *PaldoPC* na concentração de 6 µM induziu necrose em macrófagos peritoneais de camundongos (UHLSON et al., 2002). Em outros trabalhos, POPG não foi tóxico para células epiteliais tratadas com 1000 µg/mL (NUMATA et al., 2012).

Os MA alveolares estão localizados na interface ar-tecido dos alvéolos e dos ductos alveolares, tornando-se assim, as primeiras células que encontram antígenos e patógenos inalados no trato respiratório inferior. Eles não são somente fagócitos profissionais, mas também potentes células secretoras de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e eicosanoides (BROUG-HOLUB et al., 1997). Os macrófagos polarizados são classificados em macrófagos M1 e M2. Enquanto que os macrófagos M1 são microbicidas e inflamatórios, os macrófagos M2 são imunomoduladores, e pouco microbicidas (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). M1 secretam mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-12, TNF- α , IL-6, como também, a expressão de iNOS que ocasiona a liberação de óxido nítrico (NO) (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Em contraste, M2 secretam IL-10, TGF- β , e expressam arginase e receptores de manose (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MARTINEZ et al., 2008). Assim, decidimos avaliar o efeito do tratamento das PC do líquido surfactante sobre a produção de citocinas, como TNF- α , IL-6, KC e MCP-1, pelos diferentes perfis de MA, sabendo da importância do perfil M1 em infecções bacterianas, e do perfil M2 na imunomodulação e reparo tecidual.

Nossos resultados demonstraram que os fosfolípidios POPC e *Paldo*PC aumentaram a produção de NO no perfil M1, e de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e MCP-1, principalmente nos perfis M0 e M1, quando estimulados com LPS. No entanto, para o perfil M2 os fosfolípidios POPC e *Paldo*PC aumentaram a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e MCP-1 em macrófagos não estimulados com LPS, quando comparados aos macrófagos não tratados com os fosfolípidios. E isto pode ser relevante no tratamento da asma, pois pacientes com asma menos grave tem uma maior população de M1, sendo estes os produtores de citocinas inflamatórias, possuindo assim propriedades antialérgicas (DRAIJER et al., 2013). A asma é uma doença caracterizada por inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas (BALHARAS; GOUNNI, 2012), e os macrófagos M2, principalmente os M2a, são conhecidos por induzir a asma alérgica, polarizando também as células para um perfil Th2 (JIANG; ZHU, 2016).

Por outro lado, o fosfolipídio POPG diminuiu a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e IL-8 (KC) em modelo de infecções pulmonares, como a infecção pelo vírus sincicial respiratório (VSR) e Influenza A. A ação do POPG nestes modelos estavam correlacionadas ao fato do fosfolipídio ligar-se ao vírus com alta afinidade, impedindo que este se ligue as células epiteliais brônquicas (NUMATA et al., 2012, 2013). PI tem o mesmo efeito de POPG, inibindo a infecção pelo VSR e diminuindo as citocinas inflamatórias, IFN- γ e IL-8. Por outro lado, POPC, PA e PS tem o efeito contrário, não impedem a ligação do VSR às células epiteliais (NUMATA et al., 2015). Em macrófagos alveolares humanos (células U937) e de ratos estimulados *in vitro* com LPS, POPG e PI inibem a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e KC, pois estes fosfolipídios se ligam com alta afinidade no local de ligação do LPS ao CD14 (KORONUMA et al., 2009). Neste mesmo estudo os autores concluem que, dependendo do grupo do fosfolipídio e dos tipos de ácidos graxos que estes são compostos, os fosfolipídios podem atuar ou não como um potente antagonista do LPS (KURONUMA et al., 2009). Nesse sentido, concluímos que dependendo do grupo de fosfolipídios, estes podem exercer mecanismos diferentes na resposta imune, sendo ligantes de patógenos virais ou antagonista de LPS, como POPG e PI, e assim, diminuindo citocinas inflamatórias. Ou podem, como demonstrado no nosso estudo, ter efeito sinérgico a ação inflamatória induzida pelo LPS, como POPC e *Paldo*PC, pela maior produção de NO, citocinas e quimiocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, MCP-1 e KC .

Além dos M1 e M2 distinguirem na produção de citocinas e quimiocinas, são diferenciados também na expressão de marcadores celulares (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Os macrófagos do perfil M1 expressam marcadores como, iNOS, CXCL10 (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; YANG et al., 2016). Já os macrófagos do perfil M2 expressam arginase-1, FIZZ-1 e YM1 (NAIR et al., 2009; NAIR; COCHRANE; ALLEN, 2003; RAES et al., 2002). Sabendo disso, avaliamos a expressão de marcadores dos perfis M1 e M2 nas células AMJ2-C11. Nossos resultados mostram que após o tempo de 6 horas, observamos a maior expressão destes marcadores, iNOS, CXCL10, arginase-1, FIZZ-1 e YM1, nos MA alveolares de linhagem, sugerindo assim que estes MA apresentam plasticidade, sendo

polarizados para M1 ou M2 dependendo do estímulo. Assim, após verificarmos o tempo para a expressão dos marcadores dos fenótipos M1 e M2 nas células AMJ2-C11, decidimos investigar a influência dos PLs na expressão destes marcadores. Como também, avaliar se o efeito sinérgico na inflamação era devido a modulação desses marcadores. Nossos resultados demonstraram que os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC, não influenciaram na expressão dos marcadores relacionados aos fenótipos M1 e M2 de macrófagos, a exemplo de ARG, iNOS e CXCL10, como também, de STAT6, um fator de transcrição que está relacionado à regulação de genes que envolvem o perfil M2 (GORDON; MARTINEZ, 2010; LIU; YANG, 2013). Com isso, decidimos avaliar se a resposta inflamatória estava aumentada devido à modulação da expressão de receptores da imunidade inata.

A imunidade inata possui um papel bastante relevante na defesa do hospedeiro, pois constitui a primeira linha de defesa contra os micro-organismos (LAWRENCE; NATOLI, 2011). E ela depende para isso, dentre outros, de receptores de reconhecimento de padrões, tais como os receptores Toll-like (TLRs) e as proteínas de domínios de oligomerização de ligação a nucleótidos (receptores NOD-like, NLRs) (LAWRENCE; NATOLI, 2011). Estes reconhecem micro-organismos específicos, e utilizam de diversas moléculas adaptadoras que ativam vias de sinalizações, para assim iniciar uma resposta inflamatória e imediata (ALBIGER et al., 2007). O TLR4 é o mais estudado, e é bem conhecido por reconhecer LPS (ALBIGER et al., 2007; TOSHCHAKOV et al., 2002). Em contraste, TLR2 reconhece ácido lipoproteico, peptidoglicano, e também LPS atípicos de algumas bactérias gram-negativas (ALBIGER et al., 2007; TOSHCHAKOV et al., 2002). Para que a sinalização celular de TLR4 ocorra é necessária a participação de várias proteínas acessórias. Quando o TLR4 reconhece o LPS, este se liga a proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP), e então LBP se liga ao coreceptor CD14, expresso na superfície da célula. Em seguida, o LPS é transferido para a proteína solúvel MD-2, que faz parte do complexo receptor TLR4. Após isso, dará início a ativação de vias de sinalizações que podem ser dependentes ou independentes da proteína adaptadora MYD88, que induzirá a produção de citocinas pró-inflamatórias (LU; YEH; OHASHI, 2008). Em nossos resultados demonstramos que os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC atuam no aumento da expressão dos receptores TLR2, TLR4 e da proteína

adaptadora MYD88, mas não influenciam na expressão de CD14. Trabalhos com lisofosfatidilcolina LPC relatam que este ativa a sinalização de NF- κ B mediada por TLR2 e TLR4, mas na presença do estímulo de LPS este fosfolípido tem o efeito contrário, inibe a translocação de NF- κ B, a expressão iNOS, e produção de NO. Segundo os autores, esse efeito divergente de LPC na presença ou ausência do LPS pode ser devido a presença de diferentes receptores vizinhos ou por uma interferência entre as rotas intracelulares (CARNEIRO et al., 2013). Estudos com Ácido lisofosfatídico (LPA) demonstraram que há inibição das moléculas de sinalização NF- κ B e p38, e assim, inibição da expressão de iNOS e também da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS (CHIEN et al., 2015). Concluímos assim, que nossos dados são contrários a esses trabalhos, pois nossos fosfolípidos POPC e *Paldo*PC possuem efeito sinérgico ao do LPS, como visto pelo maior aumento de NO, e das citocinas e quimiocinas inflamatórias, TNF- α , IL-6, MCP-1 e KC, e este efeito não se dá pela modulação dos perfis de MA, mas pelo aumento da expressão dos receptores da imunidade inata TLR2, TLR4 e da proteína adaptadora MYDD8.

Além da produção de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos, estes produzem também os eicosanoides, que são mediadores lipídicos inflamatórios, produzidos a partir do AA liberado das membranas plasmáticas pela ação das enzimas fosfolipases (PLA₂), sendo estas ativadas pelo aumento do Ca²⁺ intracelular (STABLES; GILROY, 2011). As cicloxigenases (COX) são enzimas que regulam a produção das prostaglandinas (FUNK, 2001; STABLES; GILROY, 2011). Existem dois tipos de cicloxigenases, a COX-1 (constitutiva), e a COX-2 que é induzida por diversos estímulos, como citocinas, fatores de crescimento e endotoxinas bacterianas (FUNK, 2001; TSATSANIS et al., 2006). A produção de PGE₂ possui ações anti-inflamatórias e imunossupressoras (ARONOFF et al., 2012). Gauvreau e colaboradores relatam este efeito protetor nas vias aéreas em resposta a inflamação e a alérgenos (GAUVREAU; WATSON; O'BYRNE, 1999). Em infecções fúngicas inibe a fagocitose (RODRIGUEZ et al., 2013), e em infecções bacterianas, Soares e colaboradores relatam que PGE₂ inibe a fagocitose de *Streptococcus pyogenes* por células THP-1, diferenciadas para macrófagos com PMA (SOARES et al., 2013), ou de *K. pneumoniae* e *E. coli* por macrófagos

alveolares de ratos (ARONOFF; CANETTI; PETERS-GOLDEN, 2004). O efeito de PGD_2 na inflamação é complexo, porque pode induzir ou suprimir a inflamação dependendo do meio inflamatório (JOO; SADIKOT, 2012). PGD_2 funciona como um mediador derivado de mastócitos desencadeando a asma (MATSUOKA et al., 2000). No entanto, Gilroy e colaboradores relatam que em modelo de pleurite experimental, PGD_2 atenua a inflamação (GILROY et al., 1999), semelhante em modelo de colite experimental (AJUEBOR; SINGH; WALLACE, 2000). Como também PGD_2 aumenta a fagocitose por fagócitos profissionais (GÓMEZ-ABELLÁN et al., 2015).

Nossos resultados, demonstraram que os fosfolipídios POPC e *Paldo*PC não têm efeito na produção de PGE_2 pelos macrófagos quando estes são estimulados com LPS. Já POPC é o único que aumenta a produção de PGD_2 , quando os macrófagos são estimulados ou não com LPS. Estudos com Ácido lisofosfatídico (LPA) demonstraram que ele inibe a expressão de COX-2, bem como a produção de PGE_2 por macrófagos estimulados com LPS (CHIEN et al., 2015). Kandasamy e colaboradores, evidenciaram que POPG também inibe a expressão de COX-2, como a produção de PGE_2 e PGD_2 , que foram estimulados por *M. pneumoniae* ou lipoproteína bacteriana (LPP) em células RAW264.7 ou macrófagos alveolares humanos, no entanto, utilizando a fosfatidilcolina POPC, não houve efeito inibitório sobre a expressão de COX-2 (KANDASAMY et al., 2011). Estes dados sugerem que dependendo da classe de fosfolipídios, estes podem exercer um papel de inibição da via da COX, e assim de seus derivados, PGE_2 e PGD_2 , como visto para Ácido lisofosfatídico (LPA) e POPG, ou não exercer inibição desta via, como vimos para a classe das PC. E isso é relevante, pois, PGE_2 e PGD_2 , possuem papéis opostos no processo de fagocitose. Nossos dados demonstraram que POPC atua no aumento da fagocitose, sendo correlacionado assim, ao aumento de PGD_2 . Por outro lado, a inibição da fagocitose proporcionada por *Paldo*PC está relacionada ao aumento de PGE_2 , quando comparado a produção de PGD_2 . Estes dados nos sugerem que a oxidação ou não de um fosfolipídio pode estar diretamente relacionada à diversidade da produção de PGs, como também na mediação da fagocitose por macrófagos alveolares.

7. CONCLUSÃO

Como conclusões do presente trabalho, temos:

- Os fosfolipídios potencializaram a resposta de macrófagos M0 e polarizados para M1 na produção de NO, porém não mudam as características fenotípicas dos M2.
- POPC e *Paldo*PC apresentaram efeito sinérgico na função inflamatória dos M0 e M1 (citocinas e quimiocinas), mas não são agentes inflamatórios naturais. Para o perfil M2 os fosfolipídios modificaram o estado basal inflamatório, porém esse efeito não foi somatório ao estímulo inflamatório do LPS.
- Os macrófagos AMJ2-C11 apresentaram plasticidade, sendo polarizados para M1 ou M2 dependendo do estímulo.
- Os fosfolipídios apresentaram efeito sinérgico na resposta inflamatória dos M0, devido ao aumento da expressão de receptores da imunidade inata e moléculas adaptadoras, e de modo independente da polarização dos macrófagos.
- POPC aumentou a produção de PGD₂ e está correlacionado ao aumento da fagocitose de *Klebsiella pneumoniae*.

8. REFERÊNCIAS

- AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 1, p. G238-44, jul. 2000.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 4, n. July, p. 88–88, 2004.
- ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 6, p. 511–528, 2007.
- ALMSTRAND, A.-C.; VOELKER, D.; MURPHY, R. C. Identification of oxidized phospholipids in bronchoalveolar lavage exposed to low ozone levels using multivariate analysis. **Analytical biochemistry**, v. 474, p. 50–8, 1 abr. 2015.
- ARONOFF, D. M. et al. E-prostanoid 2 receptor signaling suppresses lung innate immunity against *Streptococcus pneumoniae*. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 98, n. 1–2, p. 23–30, maio 2012.
- ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 1, p. 559–65, 1 jul. 2004.
- BAILEY, P. The reactions of ozone with organic compounds. **Chemical Reviews**, v. 58, n. 5, p. 925–1010, 1958.
- BAILIE, M. B. et al. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 12, p. 5221–4, 15 dez. 1996.
- BALHARA, J.; GOUNNI, A S. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. **Mucosal immunology**, v. 5, n. 6, p. 605–9, 2012.
- BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 15 set. 2008.

- BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 652–657, dez. 2007.
- BHAN, U. et al. Cooperative interactions between TLR4 and TLR9 regulate interleukin 23 and 17 production in a murine model of Gram negative bacterial pneumonia. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. 1-11, 2010.
- BOWERS, D. R.; HUANG, V. Emerging Issues and Treatment Strategies in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE). **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 12, p. 48, 2016.
- BROUG-HOLUB, E. et al. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. **Infection and immunity**, v. 65, n. 4, p. 1139–46, abr. 1997.
- CAI, S. et al. Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 10, p. 6629–38, 2009.
- CAI, S. et al. NLR4 Inflammasome-Mediated Production of IL-1 Modulates Mucosal Immunity in the Lung against Gram-Negative Bacterial Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5623–5635, 1 jun. 2012.
- CANETTI, C. et al. Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1877- 1883, 2003.
- CARNEIRO, A. B. et al. Lysophosphatidylcholine Triggers TLR2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways but Counteracts LPS-Induced NO Synthesis in Peritoneal Macrophages by Inhibiting NF- κ B Translocation and MAPK/ERK Phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–9, 2013.
- CHACON-SALINAS, R. et al. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, n. 3, p. 443–449, jun. 2005.
- CHIEN, H.-Y. et al. Attenuation of LPS-induced cyclooxygenase-2 and inducible NO synthase expression by lysophosphatidic acid in macrophages. **Innate immunity**, v. 21, n. 6, p. 635–46, ago. 2015.

- CRIEGEE, R. Mechanism of Ozonolysis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 14, n. 11, p. 745–752, 1975.
- DAVICINO, R. C. et al. Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1457-1463, 2011.
- DAVIES, S. S. et al. Oxidized Alkyl Phospholipids are Specific, High Affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Ligands and Agonists. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16015-23, 2001.
- DEMITSU, T. et al. Demitsu et al, 1989 Phagocytosis and bactericidal action. **International journal of immunopharmacology**, v. 11, n. 7, p. 801–8, 1989.
- DENG, J. C. et al. STAT4 is a critical mediator of early innate immune responses against pulmonary Klebsiella infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 6, p. 4075–83, 15 set. 2004.
- DOORDUIJN, D. J. et al. Complement resistance mechanisms of Klebsiella pneumoniae. **Immunobiology**, v. 221, n. 10, p. 1102–1109, 2016.
- DRAIJER, C. et al. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–73, set. 1998.
- EDWARDS, C. K. et al. Edwards et al, 1986 Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 5, p. 1820–7, 1 mar. 1986.
- ENHORNING, G.; HOLM, B. A. Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube. **J Appl Physiol**, v. 74, n. 6, p. 2922–2927, 1 jun. 1993.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21–35, jul. 2014.
- ESCRIBÁ, P. V. Membrane-lipid therapy: A new approach in molecular medicine. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 34-43, 2006.

- ESCRIBÁ, P. V. et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 38–53, 2015.
- ESCRIBÁ, P. V et al. Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: Nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 21, p. 11375–11380, 1997.
- FACCIOLI, L. H. et al. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. **Immunology**, v. 73, n. 2, p. 222–7, jun. 1991.
- FAN, H. et al. Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 14, n. 7–8, p. 422–8, 2008.
- FLAMAND, L. et al. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 11, p. 2001–9, 1 jun. 2004.
- FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: Receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 193–215, 2014.
- FU, P.; BIRUKOV, K. G. Oxidized phospholipids in control of inflammation and endothelial barrier. **Translational Research**, v. 153, n. 4, p. 166–176, abr. 2009.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 30 nov. 2001.
- GAUVREAU, G. M.; WATSON, R. M.; O'BYRNE, P. M. Protective effects of inhaled PGE2 on allergen-induced airway responses and airway inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 1, p. 31–6, jan. 1999.
- GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 698–701, 1999.
- GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 813–21, 2008.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56–8, 3 abr. 1981.
- HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4, p. 413–421, 2002.
- HAPPEL, K. I. et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 6, p. 761–769, 2005.
- HASHIMOTO, M.; ASAI, Y.; OGAWA, T. Treponemal Phospholipids Inhibit Innate Immune Responses Induced by Pathogen-associated Molecular Patterns. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44205-44213, 2003.
- ISHII, M. et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3244–3254, 8 out. 2009.
- ITO, N. Ito et al, 2002 Requirement of Phosphatidylinositol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44898–44904, 15 nov. 2002.
- JANDA, J. M. The Genus *Klebsiella*: An Ever-Expanding Panorama of Infections, Disease-Associated Syndromes, and Problems for Clinical Microbiologists. **Clinical Microbiology & Case Reports**, v. 1, n. 4, p. 1–7, 2015.
- JIANG, Z.; ZHU, L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. **Journal of asthma and allergy**, v. 9, p. 101–7, 2016.
- JOO, M. et al. Induction and Function of Lipocalin Prostaglandin D Synthase in Host Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2565–2575, 15 ago. 2007.
- JOO, M.; SADIKOT, R. T. PGD synthase and PGD2 in immune response. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 503128, 2012.
- KAFOURY, R. M. et al. Lipid ozonation products activate phospholipases A2, C, and D. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 338–49, jun. 1998.
- KAFOURY, R. M. et al. Induction of inflammatory mediators in human airway epithelial cells by lipid ozonation products. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 6, p. 1934-42, 1999.
- KANDASAMY, P. et al. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits *Mycoplasma pneumoniae*-stimulated eicosanoid production from human and mouse macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 7841-53, 2011.

- KISZEWSKI, A. E. et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 143, n. 3, p. 445-51, 2006.
- KOVACH, M. A. et al. IL-36 γ is a crucial proximal component of protective type-1-mediated lung mucosal immunity in Gram-positive and -negative bacterial pneumonia. **Mucosal Immunology**, n. February, p. 1–15, 2017.
- KURONUMA, K. et al. Anionic pulmonary surfactant phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide-interacting proteins CD14 and MD-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25488-500, 2009.
- LANDMAN, D. et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 78–82, 1 jul. 2007.
- LÄRFARS, G. et al. Larfars et, 1999 Activation of Nitric Oxide Release and Oxidative Metabolism. **Blood**, v. 93, n. 4, p. 1399–405, 15 fev. 1999.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–761, 2011.
- LEE, A. G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1666, n. (1-2), p. 62-87. 2004.
- LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. **Current opinion in critical care**, v. 7, n. 1, p. 1–7, fev. 2001.
- LEWIS, J. F.; JOBE, A. H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **The American review of respiratory disease**, v. 147, n. 1, p. 218–33, 1993.
- LINDSAY, M. A. et al. Lindsay et al, 1998 Leukotriene B4 activates the NADPH oxidase. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 9, p. 4526–34, 1 maio 1998.
- LIU, G.; YANG, H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 3, p. 502–512, mar. 2013.
- LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/klebsiella.html>. Acessado: 17 de novembro de 2015.
- MANCUSO, P. et al. 5-lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 1998.

- MANCUSO, P.; PETERS-GOLDEN, M. Mancuso e Peters, 2000 Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 23, n. 6, p. 727–33, dez. 2000.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.
- MARATHE, G. K. et al. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28395-404, 1999.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–61, 1 jan. 2008.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451–483, abr. 2009.
- MARTÍNEZ, J. et al. Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of Minerval. **Molecular pharmacology**, v. 67, n. 2, p. 531–40, 2005.
- MATSUOKA, T. et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5460, p. 2013–7, 17 mar. 2000.
- MOORE, T. A et al. Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic *Klebsiella pneumoniae* Infection. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 11, p. 6310–6318, 2002.
- MOORE, T. A. et al. Increased mortality and dysregulated cytokine production in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice following systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4891-4900, 2003.
- MORENO, J. R. et al. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 257-66, 2002.
- MORRISSETTE, N.; GOLD, E.; ADEREM, A. The macrophage – a cell for all seasons. **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 199–201, maio 1999.
- 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.

MOTA, L. A. M. **Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro homólogo apresentam grande número de corpos lipídicos e ação microbicida reduzida contra o *Toxoplasma gondii***. 2009. 57 f. *Dissertação* (Mestre em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ.

MURATA, T. et al. Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5205–5210, 2013.

NAIR, M. G. et al. Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 4, p. 937–952, 2009.

NAIR, M. G.; COCHRANE, D. W.; ALLEN, J. E. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 173–180, 2003.

NIEMAN, G. F. et al. Alveolar function following surfactant deactivation. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 51, n. 4, p. 895–904, out. 1981.

NUMATA, M. et al. Phosphatidylglycerol suppresses influenza A virus infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 4, p. 479–87, 2012.

NUMATA, M. et al. Phosphatidylglycerol provides short-term prophylaxis against respiratory syncytial virus infection. **The Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 8, p. 2133–2143, 2013.

NUMATA, M. et al. Phosphatidylinositol inhibits respiratory syncytial virus infection. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 3, p. 578–587, 2015.

NUMATA, M.; KANDASAMY, P.; VOELKER, D. R. Anionic pulmonary surfactant lipid regulation of innate immunity. **Expert review of respiratory medicine**, v. 6, n. 3, p. 243–6, 2012.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–61. 2016.

- PALESTINI, P. et al. Compositional changes in lipid microdomains of air-blood barrier plasma membranes in pulmonary interstitial edema. **J Appl Physiol**, v. 95, n. 10, p. 1446–1452, 2003.
- PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5 SUPPL., p. 20–28, 2006.
- PETERS-GOLDEN, M. et al. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 589–594, 15 jan. 2005.
- PFEFFER, K. et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 457–467, maio 1993.
- PINOT, F. et al. Curosurf modulates cAMP accumulation in human monocytes through a membrane-controlled mechanism. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 278, n. 1, p. L99–L104, 2000.
- PODSCHUN, R. et al. Incidence of Klebsiella Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 1–4, 2001.
- PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481–489, 2005.
- RAES, G. et al. FIZZ1 and Ym as Tools to Discriminate between Differentially Activated Macrophages. **Developmental Immunology**, v. 9, n. 3, p. 151–159, 2002.
- RODRIGUEZ, M. et al. Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E2: A Puzzle of Receptors and Signals. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 187–197, 2013.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 9, p. 1138–43, 1 maio 2011.
- SAMUELSSON, B.; FUNK, C. D. Enzymes Involved in the biosynthesis of leukotriene b4. **Thejournal of biological chemistry**, v. 254, n. 33, p. 19469–19472, 1989.

- SANTROCK, J.; GORSKI, R. A.; O'GARA, J. F. Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Res. Toxicol**, v. 5, n. 1, p. 134-141, 1992.
- SAVOV, J. D. et al. Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 5, p. L952–L962, 1 nov. 2002.
- SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. **J Investig Med**, v. 57, n. 6, p. 703–708, 2009.
- SCHMIDT, R. et al. Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 5, p. L1079–L1085, 2002.
- SCHURR, J. R. et al. Central role of toll-like receptor 4 signaling and host defense in experimental pneumonia caused by gram-negative bacteria. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 532-45, 2005.
- SEREZANI, C. H. et al. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, n. 5, p. 562-70, 2007.
- SHAUGHNESSY, L. M.; SWANSON, J. A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, n. 1, p. 2683–2692, 2007.
- SIBILLE, Y.; REYNOLDS, H. Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **The American review of respiratory disease**, v. 141, n. 2, p. 471–501, mar. 1990.
- SOARES, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1321–1329, abr. 2006.
- SOARES, E. M. et al. Leukotriene B4 Enhances Innate Immune Defense against the Puerperal Sepsis Agent *Streptococcus pyogenes*. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 4, p. 1614–1622, 15 fev. 2013.
- SQUADRITO, G. L.; SALGO, M. G.; FRONCZEK, F. R.; Pryor, W. Synthesis of inflammatory signal transduction species formed during ozonation and/or peroxidation of tissue lipids. **Methods Enzymol**, 319, p. 570-582, 2000.

- STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 35–51, jan. 2011.
- TAKAO, S. et al. Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 4 Pt 1, p. C1278-84, 1 out. 1996.
- TALVANI, A. et al. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4247-53, 2002.
- TAUBER, A. I. Timeline: Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897–901, 2003.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed. 10° Ed. 2012.
- TOSHCHAKOV, V. et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. **Nature Immunology**, v. 3, n. 4, p. 392–398, 2002.
- TSATSANIS, C. et al. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 10, p. 1654–1661, jan. 2006.
- UHLSON, C. et al. Oxidized Phospholipids Derived from Ozone-Treated Lung Surfactant Extract Reduce Macrophage and Epithelial Cell Viability. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 7, p. 896–906, jul. 2002.
- VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p. 227–36, 17 jul. 2000.
- VIEIRA, A. T. et al. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 3, p. 180–189, mar. 2016.
- VOGLER, O. et al. The G $\beta\gamma$ dimer drives the interaction of heterotrimeric G proteins with nonlamellar membrane structures. **J. Biol. Chem**, v. 279, n. 35, p. 36540–36545. 2004.

- WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334–49, 4 maio 2000.
- WEAVER, C. T. et al. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 677-88, 2006.
- WEAVER, C. T. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 821–852, abr. 2007.
- WEBSTER, S. J. et al. Distinct Cell Death Programs in Monocytes Regulate Innate Responses Following Challenge with Common Causes of Invasive Bacterial Disease. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 2968–2979, 1 set. 2010.
- WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance global report on surveillance**. 2014.
- WILLINGHAM, S. B. et al. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) Facilitates In Vivo Caspase-1 Activation, Necrosis, and HMGB1 Release via Inflammasome-Dependent and -Independent Pathways. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2008–2015, 1 ago. 2009.
- WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 134, n. 3, p. 1989–93, mar. 1985a.
- WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, abr. 1985b.
- WRIGHT, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 1, p. 58–68, 2005.
- WRIGHT, S. M. et al. Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 89, n. 4, p. 1283–1292, 2000.
- YANG, Q. et al. Influence of the Membrane Lipid Structure on Signal Processing via G Protein-Coupled Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 210–217, 2005.
- YANG, Y. et al. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30933, 4 nov. 2016.

YE, P. et al. Interleukin-17 and Lung Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* Infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 335–340, set. 2001.

ZENG, X. et al. Interferon-Inducible Protein 10, but Not Monokine Induced by Gamma Interferon, Promotes Protective Type 1 Immunity in Murine *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8226–8236, 1 dez. 2005.