

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

POLYANE POLY MARQUES DE LIMA

EFEITO IMUNOMODULADOR DO ÁCIDO PALMITOLEICO 16:1 n-9 NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Klebsiella pneumoniae*

MANAUS

2018

POLYANE POLY MARQUES DE LIMA

EFEITO IMUNOMODULADOR DO ÁCIDO PALMITOLEICO 16:1 n-9 NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Amazonas para
obtenção do título de mestre em Imunologia

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Carlos Arterio Sorgi

Co-orientadora: Dr.^a Lucia Helena Faccioli

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

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

L732e Lima, Polyane Poly Marques de
Efeito imunomodulador do ácido palmitoleico 16:1 n-9 na infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae* / Polyane Poly Marques de Lima. 2018
112 f.: il.; 31 cm.

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

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. palmitoleico. 3. resolução. 4. inflamação. I. Sorgi, Carlos Arterio II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Nome: Polyane Poly Marques de Lima

Título: Efeito imunomodulador do Ácido palmitoleico 16:1 n-9 na infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de mestre em Imunologia

Aprovado em: __/__/____

Banca Examinadora

- Dr. Carlos Arterio Sorgi

ICB/UFAM

Julgamento:_____

Assinatura:_____

- Dr. Aya Sadahiro

UFAM/ICB

Julgamento:_____

Assinatura:_____

- Dr. Stefanie Costa Pinto Lopes

FIOCRUZ/AM

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivanete e José, aos meus irmãos, sobrinhos e a todos os familiares e amigos que sempre estiveram comigo, me dando palavras de ânimo para eu continuar essa longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado, protegido, ter me dado sustento e coragem para seguir em frente.

Aos meus pais e familiares, por toda a ajuda, oração e palavras de encorajamento para que eu pudesse me manter firme frente as batalhas.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Arterio Sorgi, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, pelo carinho e acolhida, permitindo meu crescimento profissional e enriquecendo minhas experiências pessoais.

A minha coorientadora, Dr^a Lucia Helena Faccioli, por possibilitar a realização desse trabalho em seu laboratório, por todos os ensinamentos e estímulos.

A Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini, por gentilmente ceder a cepa bacteriana para que este trabalho fosse realizado, assim como agradeço a técnica Joseane Cristina Ferreira por todo auxilio e paciência.

A Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e sua aluna doutoranda Ana Carolina Salina, ambas da UNESP-Araraquara, cuja colaboração foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos valiosos companheiros do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), ,Mouzarlem (Mouzard), as gêmeas ,Luma e Luana, Jefferson (Jeff), Morgana (Morgs), Karina (Ká), Gisele (Gi), Mirella (Mi), Luana (Lu), Fabiana (Fabi), Priscilla Tartari (Pri), Prof^a. Dr^a. Fabiani, Edson, Marcella, Ricardo, Nadiele (Nadi), Luana, Rayanne, Ana Paula, Carol e Alyne. Muito obrigada pela alegria constante e participação nas descobertas.

A Dr^a. Morgana Prado, a quem tenho grande admiração, não media esforços para ajudar o próximo, competente e sempre me ajudou enormemente nos experimentos *in vivo*.

Ao querido amigo e mestrando Jefferson Elias, por quem tenho um carinho especial, pessoa dedica, organizada e competente, pelo apoio e incentivo constante.

A pos-doc, Dr^a. Ana Paula, a quem tenho uma grande admiração e carinho. Uma grande amiga a quem sempre esteve disposta a me ouvir e me ajudou muito nessa reta final.

As gêmeas, Luma e Luana, por terem a preocupação de me ensinar tudo sobre os experimentos *in vitro*, mesmo quando estavam finalizando o mestrado, assim como pelas conversas e pela amizade.

A todos meus amigos de Manaus que mesmo longe sempre estavam dispostos a me ajudar com as conversas por videoconferência.

A todos os amigos que fiz em Ribeirão Preto, vocês foram as pessoas que Deus colocou na minha vida, no momento certo.

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

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

*“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Sabino

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa, oportunistas, podendo causar pneumonia, consequentemente lesão pulmonar intensa e mortalidade correlacionadas com exacerbação da resposta inflamatória. Estudos buscam terapias alternativas para controlar os eventos envolvidos na inflamação, aumentando a resolução e reduzindo o risco de lesão tecidual. Recentemente, um isômero do Ácido palmitoleico, 16:1 n-9 foi descrito em monócitos circulantes e em macrófagos derivados de monócitos, com potencial anti-inflamatório. Dessa forma, investigamos o efeito imunomodulador de 16:1 n-9 na infecção experimental por *K. pneumoniae*. Neste estudo, realizamos experimentos *in vitro*, com estímulo de LPS e tratamento com 16:1 n-9 em macrófagos de linhagem AMJ2-C11 e macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) e observamos que apesar da biologia dos macrófagos serem diferentes, o tratamento diminui a produção de mediadores inflamatórios, como NO, IL-6, KC, MCP-1 nos MDMO. No processo de eferocitose de neutrófilos infectados com *K. pneumoniae*, o tratamento com 16:1 n-9, aumentou a fagocitose por MDMO e potencializou a produção de IL-1 β e diminuiu IL-10. Nos nossos experimentos *in vivo*, camundongos infectados com dose-letal de *K. pneumoniae* e tratados com 16:1 n-9 (100 μ g/mL) tiveram sobrevivência aumentada. Quando analisamos os efeitos imunomoduladores do 16:1 n-9 durante a infecção experimental por *K. pneumoniae*, observamos a diminuição no recrutamento de neutrófilos na fase aguda da infecção, e aumento das células mononucleares na fase tardia da infecção, que nos indicaram ação na resolução da inflamação. O efeito na produção dos mediadores inflamatórios, proteicos e lipídicos também foram descritos, e os dados colaboram com o efeito de resolução, apesar de não ser eficiente na eliminação do agente infeccioso. Por outro lado, o tratamento com 16:1 n-9 teve grande influência no metabolismo de eicosanoides. Assim, sugerimos que o tratamento com 16:1 n-9 na pneumonia apresenta-se com capacidade de resolução em processo inflamatório, não sendo imunossupressor, mas podendo ser utilizado apenas como um adjuvante de outras terapias farmacológicas.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, palmitoleico, resolução, inflamação.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a pathogenic and opportunistic Gram-negative bacterium, which can cause pneumonia, consequently lung injury and mortality according to the exacerbation of inflammatory response. Therefore, many efforts have been made to discover alternative therapies to control the events involved in inflammation, increasing resolution and reducing the risk of tissue injury. Recently studies described such as potential anti-inflammatory the isomer of palmitoleic acid 16:1 n-9 in humans circulating monocytes and in macrophages derived from monocytes in humans. Thus, we investigated the immunomodulatory effect of 16:1 n-9 on experimental infection with *K. pneumoniae*. In this study, we performed *in vitro* LPS stimulation and 16:1 n-9 treatment using AMJ2-C11 lineage macrophages and bone marrow derived macrophages (BMDM). Although both macrophages presented different biology, we observed for BMDM the decrease production of inflammatory mediators such as NO, IL-6, KC, MCP-1 after the treatment with 16:1 n-9. In efferocytosis process of neutrophils infected with *K. pneumoniae*, the treatment with 16:1 n-9 increased phagocytosis by MDMO and IL-1 β production, and decreased IL-10. *In vivo* experiments, mice infected with lethal dose of *K. pneumoniae* and treated with 16: 1 n-9 (100 μ g/mL) had increased survival. The immunomodulatory effects of 16:1 n-9 during the experimental infection by *K. pneumoniae* were characterized for decrease in neutrophil recruitment in the acute phase of infection, and increased mononuclear cells in the chronic phase, indicating action on resolution of inflammation. The effect on the production of inflammatory, proteic and lipid mediators has also been described, and the data contribute to the resolution effect, however it is not efficient in eliminating the infectious agent. In addition, treatment with 16:1 n-9 had a great influence on the metabolism of eicosanoids. Thereby, we suggest that 16:1 n-9 treatment in pneumonia is potential in resolving an inflammatory process, without immunosuppressive effects, and can be used only as an adjuvant of other pharmacological therapies.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, palmitoleic, resolution, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC- Kp	Célula Apoptótica (Apototic Cell) infectada com <i>K. pneumoniae</i>
AGMI	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
AGS	Ácido Graxo Saturado
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ALA	Ácido alfa-linolênico
AMJ2-C11	Linhagens de macrófagos alveolares derivados de camundongos
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Albumina Bovina Sérica
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CD	Cluster of differentiation
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal

CFU	Colony forming unit (UFC)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-1 e 2	Ciclo-oxigenases 1 e 2
CXCL-1	C-X-C motif ligand 1
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
Cys-LTs	Cisteinil-leucotrienos
DHA	Ácido Docosaheptaenóico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EICs	Eicosanóides
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EP	Receptor de Prostaglandina tipo E
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FLAP	Proteína ativadora de 5-LO
Fc	Fragmento Cristalizável

IFN- γ	Interferon- gama
IL	Interleucina
I.n	Intranasal
I.t	Intratraqueal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase-induzível
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Media
HCL	Ácido Clorídrico
H ₂ SO	Ácido Sulfúrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
L-929	Linhagem celular: fibroblasto de camundongo
LBA	Lavado Broncoalveolar
5-LO	5-lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
Lt	Leucotrieno
LX	Lipoxina

MA	Macrófago
M1	Macrófago ativado pela via clássica
M2	Macrófago ativado pela via alternativa
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MAPKs	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MaRs	Maresinas
MDMO	Macrófago Derivado da Medula Óssea
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos (Macrophage Inflammatory Proteins)
MOI	Multiplicidade de infecção (Multiplicity of infection)
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MyD88	Fator de diferenciação mielóide-88
NADPH	NADPH oxidase
NK	Natural Killer
NO ⁻²	Nitrito
NO	Óxido Nítrico

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Dicloridrato de o- fenilenodiamina
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógeno
PBS	Salina tamponada com fosfato
PD	Protectina
PG	Prostaglandina
PLA	Fosfolipase
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrão
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive oxygen species)
Rv	Resolvina
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPM	Mediadores de pró-resolução (<i>Pro-resolving mediators</i>)
STAT	Transdutores de sinais e Ativadores de Transcrição
Th	Linfócito T Helper
TLM	Terapia de Lipídio de Membrana

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TLR	Receptores Toll-like
Tr	Tempo de Retenção
Tx	Tromboxano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
U.V	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 : Composição atual de espécies e subespécies do gênero <i>Klebsiella</i>	26
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura de Ácidos graxos saturados e insaturados mais comuns.	33
Figura 2- Tratamento com Ácidos graxos palmitoleicos não induziram citotoxicidade em MA da linhagem AMJ2-C11	56
Figura 3- O tratamento com os Ácidos graxos palmitoleicos diminuem a produção de NO, mas não de TNF- α por AMJ2-C11 estimulados LPS	58
Figura 4- O tratamento com 16:1 n-9 diminuiu a produção Nitrito em MDMO estimulados com LPS.....	59
Figura 5- O tratamento com 16:1 n-9 diminuiu produção de mediadores inflamatórios em MDMO estimulados com LPS	61
Figura 6- O tratamento com 16:1 n-9 aumenta eferocitose por MDMO e modula a produção de citocinas para resolução da infecção por <i>K. pneumoniae</i>	63
Figura 7- Ambiguidade do efeito do tratamento com 16:1 n-9 na sobrevida de animais infectados com <i>K. pneumoniae</i>	65
Figura 8- O tratamento com 16:1 n-9 reduz migração celular para o espaço broncoalveolar de animais infectados com <i>K. pneumoniae</i> em fase aguda.....	67
Figura 9- Concentração de proteínas e nitrito no LBA de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados ou não com 16:1 n-9.....	69
Figura 10- Recuperação de UFC nos pulmões de animais infectados com <i>K. pneumoniae</i> tratados ou não com 16:1 n-9 e o efeito de 16:1 n-9 na viabilidade de <i>K. pneumoniae</i>	71
Figura 11- Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na modulação da produção de citocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i>	73
Figura 12- Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na modulação da produção de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i>	75
Figura 13- A produção de mediadores lipídicos derivados da via da 5-Lipoxigenase são modulados pelo tratamento com 16:1 n-9 na infecção com <i>K. pneumoniae</i>	78

Figura 14- A produção de mediadores lipídicos derivados da via da 5-Lipoxigenase são modulados pelo tratamento com 16:1 n-9 na infecção com *K. pneumoniae*..... 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
2.2 Resposta imunológica na infecção por <i>K. pneumoniae</i>	27
2.3 Bioquímica dos Ácidos graxos	31
2.4 Influências dos mediadores lipídicos na resposta imune.....	33
2.5 Participação do Ácido palmitoleico na resposta imunológica	36
3. OBJETIVO GERAL.....	39
3.1 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Animais.....	40
4.2 Obtenção e cultivo das células AMJ2-C11	40
4.3 Obtenção e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)	41
4.4 Tratamento e estimulação de MA.....	41
4.5 Ensaio de citotoxicidade celular	42
4.6 Obtenção e cultivo de <i>K. pneumoniae</i>	43
4.7 Preparação do inóculo de <i>K. pneumoniae</i> para infecção	43
4.8 Análise de viabilidade de <i>K. pneumoniae</i> tratadas com Ácido palmitoleico	43
4.9 Ensaio de eferocitose	44
a) Geração de células apoptóticas infectadas (Ac-Kp).....	44
b) Fagocitose de células apoptóticas	45
c) Produção de mediadores inflamatórios na eferocitose	45
4.10 Infecção pulmonar por <i>K. pneumoniae</i> e tratamentos	49
4.11 Lavado broncoalveolar	49
4.12 Contagem total e diferencial das células do LBA	50
4.13 Quantificação de proteínas do LBA	50
4.14 Homogenato de pulmão	50
4.15 Avaliação da carga bacteriana (UFC) em pulmões de camundongos infectados.....	51

4.16 Dosagem de citocinas e quimiocinas por ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	52
4.17 Dosagem de Nitrito.....	52
4.18 Análise quantitativa da produção de eicosanóides (EICs).....	53
a) Extração e Purificação de lipídios	53
b) Análise dos EICs por espectrometria de massas	53
4.19 Análise estatística	54
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Citotoxicidade de Ácidos graxos para MA da linhagem AMJ2-C11.....	55
5.2 Produção de mediadores inflamatórios (NO e TNF- α) por MA da linhagem AMJ2-C11 tratados com Ácido graxos palmitoleicos e estimulados com LPS.....	56
5.3 Comparação da liberação de NO por AMJ2-C11 e MDMO tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS.....	58
5.4 Produção de citocinas e quimiocinas por MDMO tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS.....	60
5.5 Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados com <i>K. pneumoniae</i> (eferocitose) e produção de mediadores inflamatórios	62
5.6 Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na sobrevivência de animais infectados com <i>K.pneumoniae</i>	64
5.7 Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados ou não com 16:1 n-9	66
5.8 Quantificação de proteínas e nitrito no LBA de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i> tratados ou não com 16:1 n-9.....	68
5.9 Cargas bacteriana recuperada dos pulmões de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados ou não com 16:1 n-9.....	69
5.10 Concentração de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados ou não com 16:1 n-9	72

5.11 Produção de mediadores lipídicos das vias da 5-lipoxigenase e ciclooxigenase no homogenato pulmonar de com <i>K. pneumoniae</i> e tratados ou não com 16:1 n-9	77
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	91
ANEXO 1- AUTORIZAÇÃO DA Comissão de ética no uso de animais	111

1. Introdução

A inflamação é um processo fundamental de defesa do hospedeiro que garante a eliminação adequada e oportuna de patógenos invasores assim como o reparo de tecidos danificados, possibilitando a recuperação da função do órgão/tecido, que caracteriza a homeostase (MAJNO G; JORIS I., 2004). Por muito tempo, relatavam que a dissipação de sinais inflamatórios explicava a resolução da inflamação. Porém, com estudos bioquímicos, elucidaram estruturas de mediadores previamente desconhecidos e destacaram que a resolução da inflamação é um processo molecularmente ativo (HONG et al. 2003; SERHAN et al. 2000, 2002; LEVY et al. 2001).

As funções das células do sistema imunológico que medeiam as resposta pró-/anti-inflamatória ou de resolução, são coordenadas e controladas pelos componentes solúveis presente no microambiente tecidual (FULLERTON; GILROY, 2016). Embora seja comum pensar em proteínas, como citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, como os principais mediadores solúveis na defesa do hospedeiro contra patógenos, uma variedade de mediadores lipídicos também possuem funções importantes na regulação da função imune inata e adaptativa (MARTINEZ; MOORE, 2017). Assim, também demonstraram que os lipídios de membrana controlam inúmeras funções celulares, principalmente por meio da regulação da atividade e localização de proteínas (YEAGLE, 2005; LEE, 2004; VÖGLER et al., 2004). Isso traz um novo conceito farmacológico sendo o motivo da Terapia de Lipídios de Membrana (TLM), possibilitando a criação de fármacos eficazes em influenciar a organização dos lipídios pela sua estrutura-função, levando a modulação da atividade celular (ESCRIBÁ et al., 2006).

As moléculas sinalizadoras lipídicas derivadas do Ácido araquidônico (AA) podem ter funções pró-inflamatórias, de imunomodulação e de resolução (por exemplo, por meio da produção de leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos e lipoxinas), e os lipídios derivados do Ácido eicosapentaenóico (EPA) tal como resolvinas da série E e os derivados do Ácido docosahexaenóico (DHA), tal como resolvinas da série D, protectinas e maresinas são geralmente considerados mediadores anti-inflamatórios e de

resolução (DENNIS & NORRIS, 2015; WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al., 2015; SERHAN et al., 2014).

Em geral, os lipídios insaturados tem o papel de mediar a resposta inflamatória ou de resolução, sendo considerados melhores que os saturados (CALDER et al., 1990). A suplementação de macrófagos (MA) com Ácidos graxos insaturados aumenta a fagocitose e restringe a sobrevivência intracelular de patógenos microbianos como *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi* e *Pseudomonas aeruginosa* (ADOLPH et al., 2012a; ZHENG et al., 1999). O Ácido palmitoleico 16:1 n-7 atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (SOUZA et al., 2014; CAO et al., 2008). Guijas e colaboradores (2016), demonstraram que o 16:1 n-9 tem função de diminuir a expressão de genes pró-inflamatórios para IL-6, IL-12a, IL-1 β , TNF- α , iNOS₂, IL-23.

Sabendo da importância da TLM na modulação das funções das células imunes, produção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. Desperta o interesse de compreender o efeito dessa terapia utilizando o Ácido palmitoleico 16:1 n-9 no modelo de pneumonia, por infecção causada por *K. pneumoniae*. Desta forma, esse Ácido graxo poderá ser de grande importância para o tratamento de processos inflamatórios exacerbados ocasionados por bactérias e diminuir os danos teciduais.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* ganha cada vez mais notoriedade como agente infeccioso, devido ao aumento do número de infecções graves e crescente escassez de tratamentos eficazes. Circunstâncias essas que derivam do surgimento de cepas que adquirem características genéticas adicionais e tornaram-se hipervirulentas ou resistente a antibióticos (PACZOSA; MECSAS, 2016). Devido ao surgimento de bactérias multirresistente a OMS lançou o Sistema Mundial de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos para que seja padronizado a coleta de dados dos países e mostrar um panorama mais completo dos padrões e tendências referente ao assunto (OMS, 2018). Assim, o sistema de saúde destes países poderão se antecipar e enfrentar adequadamente estas ameaças de doenças (OMS, 2018).

O gênero *Klebsiella* pertence a família Enterobacteriaceae juntamente com os outros gêneros que estão relacionados em infecções humanas, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Morganella* e *Providencia* (BOWERS.; HUANG, 2016; BRENNER, 2006; BARROW; FELTHAM, 2003). Atualmente, no gênero *Klebsiella* foram descritas e catalogadas 10 espécies, incluindo subespécies, segundo (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) (DSMZ, 2017- Quadro 1). Dentre as 10 espécies, duas se destacam como importantes patógenos humanos, sendo *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (JANDA, 2015).

A *K. pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa, encapsulada, não-móvel, que reside no meio ambiente, incluindo-se no solo, águas superficiais e em instrumentos médicos (ROCK et al., 2015; BAGLEY, 1985). *In vitro*, apresenta melhor crescimento em condições aeróbicas, produzindo colônias grandes e mucoides, quando cultivadas em meio de cultura sólido. No meio Ágar MacConkey, que é um meio de cultura para isolamento, são formadas colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado (ROCK et al., 2015; BAGLEY, 1985).

Quadro 1: Composição atual de espécies e subespécies do gênero *Klebsiella*. Fonte: DSMZ, 2017.

Espécies
<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae subsp.ozaenae</i>
<i>K. pneumoniae subsp.pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae subsp.rhinoscleromatis</i>
<i>K. quasipneumoniae</i>
<i>K. quasipneumoniae subsp.quasipneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae subsp.similipneumoniae</i>
<i>K. michiganensis</i>
<i>K. variicola</i>
<i>K. oxytoca</i>

Esse gênero está associado com infecções hospitalares grave, tais como infecção na corrente sanguínea, no trato respiratório, como pneumonia, e infecção no trato urinário (FOXMAN, 2014; PELEG; HOOPER, 2010). As populações de risco de infecção por *K. pneumoniae* são em geral os neonatos e idosos. Os recém-nascidos, particularmente aqueles pré-maturos ou em UTI, estão em risco devido a deficiência do sistema imunológico, a falta de microbiota estabelecida e a relativamente alta permeabilidade da mucosa no trato gastrointestinal (COLLADO et al., 2015; PODSCHUN, 1998). Outros grupos de riscos são 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 causada pelo vírus HIV (WHO, 2014).

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). Nas últimas décadas, aumentaram a ocorrência de infecções de cepas derivada de *K. pneumoniae* com resistência a uma ampla gama de antibióticos (OMS, 2017).

Os mecanismos de resistência mais comuns aos antibióticos observados em cepas de *K. pneumoniae* são: (1) envolvendo a expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que tornam as bactérias resistentes a cefalosporinas e monobactamas e (2) resistência à expressão de carbapenemases, que tornam as bactérias resistentes a quase todos os β -Lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenem (CDC, 2015). Estes fatos levaram a Organização mundial de Saúde (OMS) a publicar uma lista de patógenos prioritários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e antibióticos, no qual a família Enterobacteriaceae em que o gênero *Klebsiella* pertence, segue neste grupo crítico (WHO, 2017).

Devido a este panorama, considera-se 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*, assim como controlar a resposta inflamatória, como por exemplo na pneumonia que associada a resposta imunológica ao excesso do infiltrado de neutrófilos e macrófagos (MA), alta produção de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando uma resposta inflamatória exacerbada e levando a injúria pulmonar grave.

2.2 Resposta imunológica na infecção por *K. pneumoniae*

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção por *K. pneumoniae*, incluem as barreiras mecânicas no trato respiratório, a defesa celular e a humoral (PACZOSA, MECSA, 2016). Vários estudos sobre a infecção por *K. pneumoniae* tem focado principalmente no papel dos componentes do sistema imune inato envolvidos na resposta do hospedeiro na infecção das vias aéreas e os mecanismos de evasão da resposta imune pela *K. pneumoniae* (PARKER et al, 2016). A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores e os principais tipos celulares que compõem o sistema imune inato são principalmente os neutrófilos, os MA e as células dendríticas (AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDAI, 2003).

Apesar da *K. pneumoniae* ser considerada um patógeno extracelular, existem trabalhos mostrando que esta bactéria pode ser internalizada por diferentes células fagocitárias, sendo capaz de persistir intracelularmente (OELSCHLAEGER; TALL, 1997). Os MA desempenham papel central na resposta imune inata, sendo no pulmão as células efetoras contra patógenos, como os MA alveolares residentes (SHINGADIA; SYROGIANNOPOULOS, 2017). Os MA residentes são distribuídos constitutivamente pelo organismo na ausência de sinais inflamatórios e são adaptados ao ambiente tecidual para efetuar funções específicas, como na homeostase (MOTA, 2009; MORRISSETTE; GOLD; ADEREM, 1999). Estes MA são gerados a partir de células embriogênicas dos órgãos residentes e não diferenciam de progenitores da medula óssea (CASSADO; D' IMPERIO, BORTOLUCI, 2015). Também atuam na fagocitose de patógenos invasores, e na eliminação de restos celulares e corpos apoptóticos, favorecendo a homeostase do organismo (MOTA, 2009).

Os MAs possuem alta capacidade fagocítica e de morte microbiana (*killing*) e participam da amplificação e/ou resolução da resposta imune por meio da produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores solúveis (SHINGADIA; SYROGIANNOPOULOS, 2017). Os MAs inflamatórios, derivados de monócitos circulantes, originados na medula óssea a partir de células tronco hematopoiética sob influência de estímulos quimiotáticos, são recrutados para o tecido pulmonar durante uma infecção e dependendo do microambiente inflamatório e da presença de mediadores inflamatórios, estes podem adquirir fenótipos distintos de polarização como M1 e M2 (MARTINEZ et al., 2014, BISWAS, 2010; GORDO, TAYLOR, 2005; SERBINA et al., 2003). Para que ocorra a ativação destes MA, são essenciais dois sinais: (1) o reconhecimento de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) pelos PRRs (*Pattern recognition receptors*), e (2) a estimulação por citocinas do padrão de resposta de linfócito T (Th1 ou Th2). Desta forma, os MA podem ser submetidos à ativação clássica (M1) ou ativação alternativa (M2). Esses fenótipos celulares de MA estão associados a diferentes padrões de resposta inflamatória (DAS et al., 2015).

Para o fenótipo M1, são necessários estímulos específicos, como por exemplo, o IFN- γ , que é o principal produto de linfócito Th1. Além do IFN- γ , o lipopolissacarídeo (LPS) é um sinal importante para o direcionamento de M1 (PACZOSA; MECSA, 2016). Com a ativação clássica (M1) os MA adquirem perfil de produtores de IL-2, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e várias outras moléculas pró-inflamatórias. Também aumentam a expressão da enzima iNOS, que participa da produção de óxido nítrico (NO), sendo um importante mediador no processo oxidativo e de morte de microrganismos (BOSSCHAERTS et al., 2010; SERBINA et al., 2003).

A polarização de MA para o fenótipo M2 é devido a estimulação com citocinas do padrão Th2. Estas citocinas podem ser produzidas por linfócitos como também por eosinófilos, basófilos ou MA, como a IL-4 e IL-13. Além disso, PAMPs de helmintos/parasitas também colaboram para a polarização de M2 (DAVICINO et al., 2011). A ativação alternativa (M2) leva a uma resposta de MA para a expressão de arginase-1, fibronectina, prolina, produção de IL-10, e receptores de manose (MARTINEZ et al., 2008). Essas diferenças na expressão de receptores, produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas, refletem nas funções efectoras dos MA polarizados. Com isso, considera-se que os M1 são pró-inflamatórios e microbicidas, medeiam a defesa do hospedeiro contra uma ampla variedade de bactérias, protozoários e vírus, e desempenham papel importante na resposta imune antitumoral (DAS et al., 2015). Enquanto os M2 atuam como imunomoduladores, ou seja, de forma anti-inflamatória, e regulam o processo de cicatrização (LOKE et al., 2007; GORDON et al., 2003).

A resposta dos MA às infecções bacterianas envolve principalmente a regulação dos genes envolvidos na polarização de M1, incluindo a produção de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β . Estas citocinas geralmente estão associadas com a proteção do hospedeiro durante infecções agudas, como na infecção por *Salmonella typhi* e *Salmonella typhimurium*, que também induzem a polarização de M1 (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Outros gêneros bacterianos, como *Listeria monocytogenes*, também induzem o perfil M1, evitando assim o escape da bactéria do fagossoma e estimulando a morte intracelular das bactérias (SHAUGHNESSY; SWANSON, 2007). Durante a

infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, os MA também são polarizados para M1 (CHACON-SALINAS et al., 2005). No entanto, a polarização para M2 está associada com a fase crônica das infecções por micobactérias (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; KISZEWSKI et al., 2006).

A ativação do sistema imune inato tem sido um fator importante no hospedeiro para eliminar a *K. pneumoniae* (OHAMA, et al., 2015). A presença de CXCL10 (IP-10) secretada no pulmão com o intuito de amplificar a resposta imune através do recrutamento de MA e células T, foi muito relevante para a eliminação da *K. pneumoniae* (ZENG et al., 2005). Outros estudos com camundongos tratados com GM-CSF, mostraram a estimulação e polarização de MA para o fenótipo M1, intensificando o processo de fagocitose e aumentando a eliminação de *K. pneumoniae* (STANDIFORD et al., 2012).

As citocinas pró-inflamatórias são necessárias no mecanismo de eliminação de *K. pneumoniae*, e os receptores do tipo Toll (TLR) 4 e TLR9 são responsáveis pela sinalização que induzem esta resposta pró-inflamatória nas células inatas contra *K. pneumoniae*, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , IL-17, CXCL1 (KC) (CAI et al., 2012; SCHURR et al., 2005). A citocina IL-1 β induz a propagação da inflamação por meio da ativação de NF- κ B, MAPKs e indução de CXCL2 e CXCL5 (CAI et al., 2010; GREENBERGER et al., 1996). Outros estudos relatam que camundongos deficientes para expressão do receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) ou dos fatores de transcrição MYD88/TRIF ou STAT4 e infectados por *K. pneumoniae*, apresentaram maior mortalidade, devido a alta carga bacteriana no pulmão e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (CAI et al., 2009; DENG et al., 2004; MOORE et al., 2003).

Entre as citocinas produzidas pelos MA na defesa contra patógenos intracelulares, o TNF- α e IFN- γ tem função reconhecida no mecanismo de morte de microrganismos (XIONG et al., 2016). Em estudos com infecção pulmonar de camundongos com *K. pneumoniae*, demonstrou-se um rápido recrutamento de MA para o pulmão e elevada produção de TNF- α acentuando também as respostas de linfócitos como as células T $\gamma\delta$, células TCD4⁺, células TCD8⁺, células NK e células Th17 (CAI, S et al., 2012; PRICE et al., 2012). Outros estudos demonstraram, que a estimulação por IL-23 produzidas por MA

alveolares e células dendríticas em resposta a infecção por *K. pneumoniae*, induziu produção de IL-17 e IFN- γ por linfócitos (PARKER et al., 2017). Além disso, na presença de IL-12 existe um aumento da produção de IFN- γ por linfócitos Th1 e células NK e ativa MA e promove a morte da bactéria fagocitada (HAPPEL et al., 2005).

Apesar da ação dos MA para combater a invasão de microorganismos e da montagem da resposta imune, muitos microrganismos evoluíram desenvolvendo mecanismos de escape. A *K. pneumoniae*, por exemplo, possui uma cápsula que protege contra a resposta imunológica do hospedeiro por meio de múltiplos mecanismos, incluindo inibição da fagocitose, prevenção da ativação da resposta imunológica precoce e anulação da lise por complemento e peptídeos antimicrobianos (CLEMENTS et al, 2008; FANH et al, 2004; CAMPOS et al, 2004, ALBERTI et al, 1993; MERINO et al, 1992; SIMOONS et al, 1986; TOMAS et al., 1986). Neste cenário, novos estudos devem ser direcionados para entender como induzir uma resposta imune efetiva no combate a infecção por *K.pneumoniae*.

2.3. Bioquímica dos Ácidos graxos

Os Ácidos graxos são cadeias de carbono com um grupo metila (designado como carbono ω) em uma das extremidades da cadeia e um grupo carboxil na outra extremidade. O termo Ácido graxo livre refere-se ao Ácido graxo que não está esterificado em fosfolipídios de membrana ou ligados a triacilgliceróis (RETNAYAKE; GALLI, 2009).

O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre eles diferenciam os tipos de Ácidos graxos (HARDMAN, 2002). A nomenclatura dos Ácidos graxos refere-se ao número de átomos de carbono: a) Ácidos graxos de cadeia curta – contendo de 3 a 7 carbonos na cadeia, b) cadeia média- contendo de 8 a 13 carbonos, c) cadeia longa- contendo de 14 a 20 carbonos e d) cadeia muito longa- contendo acima de 21 carbonos na cadeia (RETNAYAKE; GALLI, 2009); pela ausência ou presença de duplas ligações (quantidade) em relação ao grupo metila: i) Ácidos graxos saturados (AGS), que não contém duplas ligações; ii) Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI),

que contêm apenas uma dupla ligação e iii) Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que contêm pelo menos duas duplas ligações (LEGRAND-POELS et al., 2014). Na nomenclatura, o termo “n” refere-se a posição da primeira dupla ligação do Ácido graxo relativa ao grupo metila da molécula de hidrocarbonetos (CHILTON et al., 2008). Na maioria dos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração *cis* e normalmente estão na posição do n-3 (Omega-3), n-6 (Omega-6) e n-9 (Omega-9) em relação ao carbono do grupo metila (RETNAYAKE; GALLI, 2009).

Os Ácidos graxos essenciais são aqueles que os mamíferos, incluindo os seres humanos, não conseguem sintetizar, como exemplo os Ácidos graxos com ligação dupla no carbono (n) 6 ou 3, que incluem o Ácido graxo linoléico (18:2n-6) e seu derivado o Ácido araquidônico (AA) (20:4 n-6); Ácido graxo α -linolênico (ALA) (18:3 n-3); Ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n-3) e o Ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (22:6n-3), que estão presentes em óleos vegetais e carnes, principalmente em peixes (CALDER, 2007; SIMOPOULOS, 2006; YAQ'OOB, 2004; HARDMAN, 2004) (Quadro 2).

Os Ácidos graxos não essenciais são aqueles que podem ser sintetizados pelo nosso organismo. Os AGS e AGMi podem ser obtidos pela dieta ou, podem ser sintetizado pela síntese “de novo” do metabolismo de Ácido graxo. Os AGMi podem sofrer dessaturação pela enzima $\Delta 9$ -dessaturase e metabolizados a AGMi n-9, como o Ácido oleico (18:1n-9); ou podem ser metabolizados por β -oxidação de Ácido oléico dando origem ao Ácido palmitoleico (16:1n-9) (GUIJAS et al., 2016)

As propriedades biológicas dos Ácidos graxos são amplas e tem sido bem descritas na literatura. As três funções principais dos Ácidos graxos são: elementos que compõem os fosfolipídios, que são componentes das membranas celulares; podem ser armazenados na forma de triacilgliceróis, sendo importantes moléculas fornecedores de energia; e como mensageiros intracelulares, modulando funções celulares incluindo a resposta imune (CALDER, 2008). Desta forma, podem estimular e/ou inibir a produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, ROS e mediadores lipídicos (HUWILER et al, 2007; MARTINS et al, 2007).

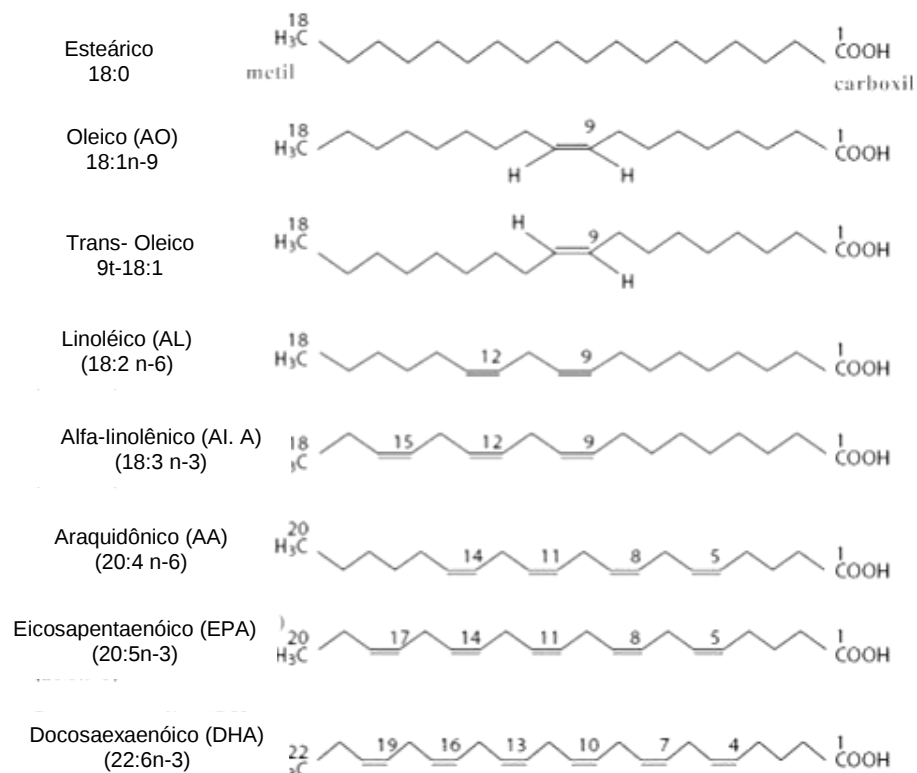


Figura 1: Estrutura de Ácidos graxos saturados e insaturados mais comuns.
Fonte: RATNAYAKE, 2009

2.4 Influências dos mediadores lipídicos na resposta imune

Os Ácidos graxos insaturados possuem papel central na resposta imunológica, sendo ativos desde o início de uma inflamação, por exemplo, recrutando leucócito e estimulando-os para a produção de mediadores inflamatórios; até a fase de resolução, que é o resultado ideal da proteção do hospedeiro para o retorno à homeostase (SERHAN et al. 2014). Os AGPI com 20 átomos de carbono, especialmente o AA (ω -6), EPA (ω -3) e DHA (ω -3), são precursores dos eicosanóides, que são os mediadores lipídicos mais estudados. Esses metabólitos lipídicos modulam inúmeros processos

fisiológicos e bioquímicos, apresentando importantes propriedades imunoregulatórias (KENDAL; NICOLAOU, 2013; LE et al., 2009).

Em resposta a diversos estímulos de ativação celular, os AA que se encontram na porção sn-2 dos fosfolipídios de membrana é liberado pela ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Assim, os AA livres podem ser metabolizado pelas COXs, tanto a COX-1 (constitutiva) ou a COX-2 (induzível) catalisando a formação de prostaglandina (PG) H₂. Este intermediário PGH₂ é instável e rapidamente convertido por sintases específicas em outros prostanóides como PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} ou tromboxanos (TXB₂) (BITTO et al, 2012; UENO et al, 2005; NARABA et al, 1998). A indução da produção de PGE₂ pela infecção de *Staphylococcus aureus* possibilitou resposta favorável para o crescimento e sobrevivência desse patógeno nos estádios iniciais da infecção (DEJANI et al., 2016). Entretanto, nos estágios finais desta infecção a síntese de PGE₂ foi benéfica, aumentando a liberação de IL-17 e melhorando a sobrevida nas infecções crônicas (DEJANI et al., 2016). PGE₂ também tem função correlacionada com a capacidade de inibir a fagocitose e morte de microrganismos por MA (DOMINGO-GONZALEZ, et al., 2013; SEREZANI, et al., 2007). A PGE₂ liberada durante a fagocitose via receptor Fc promove aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (ARONOFF et al., 2005, 2004; BREYER et al., 2001; NATARAJ al., 2001). PGE₂ endógena e exógena suprimem a capacidade microbicida de MA alveolares infectados *K.pneumoniae* opsonizadas com IgG (CANETTI et al., 2004). A inibição da COX-2 em estudo *in vitro* com *Histoplasma capsulatum* promoveu o aumento da síntese de NO, IFN- γ e LTB₄. Além disso, aumentou a capacidade fagocitária de MA alveolares (TARTARI, et al., 2013). Em experimentos *in vivo* aumentou a sobrevivência de camundongos após a infecção por *H. capsulatum*. Os efeitos antagônicos (anti-inflamatório ou pró-inflamatório) de PGE₂ estão diretamente relacionados à expressão de receptores específicos na superfície celular, podendo ser EP1, EP2, EP3 ou EP4 (SALINA, 2017).

A ação de 5-lipoxigenase (5-LO) constitui outra via para a síntese de eicosanóides a partir de AA livre. O aumento de cálcio intracelular faz com que a enzima 5-LO transloque do citoplasma para a membrana nuclear, onde em conjunto com uma proteína ancorada, denominada proteína ativadora de 5-LO

(FLAP) vai metabolizar o AA em leucotrieno (LT) A₄. LTA₄ é depois convertido em LTB₄ por LTA₄ hidrolase ou em LTC₄ por LTC₄ sintase, que junto com LTD₄ e LTE₄ irá constituir os cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs) (MANDAL et al, 2008). Os LTs atuam como potentes mediadores quimioatraentes para células inatas, degranulação de neutrófilos, produção de NO e favorecem a fagocitose e morte de microrganismos (PETERS-GOLDEN et al., 2005; FACCIOLI et al., 1991). Além disso, foi demonstrado que LTB₄ induz a expressão de α -defensina durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*, essencial para o mecanismo de morte de microrganismos extracelulares rompendo a parede celular da bactéria (PRADO et al., 2017). LTs exógenos modularam a ativação de NADPHox durante a infecção de MA com *K. pneumoniae*, aumentando a morte de microrganismo por mecanismo dependente da geração de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (SEREZANI et al., 2005). Camundongos deficientes na enzima 5-LO apresentaram aumento na mortalidade durante a pneumonia causada por *K. pneumoniae* em associação com atividade fagocítica e microbicida diminuída (BAILIE et al., 1996). Por outro lado, a administração de LTB₄ em camundongos deficientes de CXCL1 na infecção por *Klebsiella sp*, restaurou o recrutamento de neutrófilos, produção de citocinas e quimiocinas (TNF- α , IL-6, MIP-2) e a expressão de componente de NADPH oxidase e iNOS (BATRA et al., 2012).

A resposta inflamatória atua inicialmente para neutralizar patógenos, mas podem gerar lesões teciduais que são resultantes de maior recrutamento de leucócitos e produção de mediadores pró-inflamatórios que induzem a exacerbação da inflamação (SERHAN, 2017). Com isso, outra classe de mediadores lipídicos que vem sendo muito estudada são os denominados mediadores de pró-resolução (SPM, do inglês *Pro-resolving mediators*), que promovem a resolução da inflamação e a regeneração tecidual, levando a homeostase tecidual (DALLI; SERHAN., 2017). Estudos pioneiros de Metchnikoff, E. abriram caminhos para o papel dos MA nesse processo de resolução, mostrando que os SPM aumentam a atividade de MA em fagocitar bactérias, como também eliminar detritos e células apoptóticas, denominado de eferocitose (SERHAN et al., 2015),

Na classe dos SPM podemos incluir as lipoxinas (LX) biossintetizadas a partir de AA; as resolvinas da série E derivadas do Ácido eicosapentaenoico (EPA) (RvE₁, RvE₂ e RvE₃); as resolvinas da série D derivadas do Ácido docosahexaenóico (DHA) (RvD₁, RvD₂, RvD₃, RvD₄, RvD₅ e RvD₆), como também as protectinas PD₁ e as maresinas MaR₁ e MaR₂, que são derivados do DHA (SERHAN, 2017; CALDER, 2013). O papel da RvE₁ na pneumonia bacteriana e na lesão pulmonar aguda foi de reduzir o infiltrado de neutrófilos pulmonares, aumentar a eliminação da bactéria e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 β e IL-6) presentes nos homogenatos do tecido pulmonar (HIROYUKI et al., 2010). Em contrapartida, a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por MA aumenta a biossíntese de SPM, principalmente RvD₁, RvD₂ e LXB₄ (DALLI et al., 2012). A administração de LXA₄ aumentou a sobrevivência da pneumosepse tardia induzida por *K. pneumoniae* (SORDI et al., 2013). Assim como, camundongos tratados com RvD₅ e RvD₁ reduziram significativamente a produção de mediadores pró-inflamatórias como KC, TNF- α e IL-1 β , e também aumentaram a sobrevivência de camundongos infectados com *E.coli* (CHIANG et al., 2012).

2.5 Participação do Ácido palmitoleico na resposta imunológica

Os Ácidos graxos monoinsaturados são reconhecidos como benéficos na dieta humana (PEREZ, 2017). O Ácido palmitoleico (16:1) e seus isômeros são relatados como importantes mediadores lipídicos com efeitos anti-inflamatórios sistêmicos, principalmente em respostas aos transtornos metabólicos (CAO, 2008). A importância do Ácido palmitoleico, em específico o 16:1 n-7 foi observada por Cao e colaboradores em 2008. Esse Ácido graxo monoinsaturado está presente em tecidos de mamíferos e é proveniente da síntese do Ácido palmítico (16:0) (HODSON; KARPE, 2013; GUILLOU et al., 2010). De fato, o Ácido palmítico é considerado o principal marcador de ativação da síntese *de novo* de Ácidos graxos (MOZAFFARIAN et al., 2010).

Desta forma, o 16:1n-7 foi considerado também como um mediador lipídico (Cao et al., 2008). Após ser sintetizado pelo tecido adiposo o 16:1 n-7 é

liberado na corrente sanguínea e atua em tecidos periféricos como hormônio. Assim, esse Ácido graxo apresentou função no fígado, suprimindo a esteatose hepática e melhorando a sensibilidade a insulina nos músculos (CAO, 2008). Em estudos *in vitro*, demonstraram que MDMO (macrófago derivado da medula óssea) proveniente de camundongos obesos apresentavam resposta inflamatória aumentada, com expressão gênica e protéica de iNOS₂, CXCL1, IL-6 e TNF- α , e este fenômeno era revertido parcialmente com o tratamento exógeno de 16:1 n-7 (CHAN et al., 2015). Neste sentido, outros autores sugeriram que o efeito do Ácido palmitoleico no microambiente inflamatório poderia ser via polarização de MA para o fenótipo M2 (CHAN et al., 2015; TALBOT et al., 2014; SICA; MANTOVANI, 2012). Outros isômeros posicionais de 16:1, tais como 16:1 n-10, secretados por glândulas sebáceas, são descritos como potentes agentes antimicrobianos para bactérias gram-negativas, como *S.aureus* (FISCHER et al., 2014; ARSIC et al., 2012; DRAKE et al., 2008;).

Em um estudo realizado por GUIJAS et al (2016), demonstrou-se a presença do Ácido graxo palmitoleico 16:1n-9 (cis-7-hexadecenoico), que estava presente em corpúsculos lipídicos de monócitos circulantes em modelo de aterosclerose. Os resultados indicaram que esse novo isômero de palmitoleico (16:1 n-9) possuía funções anti-inflamatórias. MA peritoneais de camundongos tratados com os Ácidos palmitoleicos subtipos 16:1n-9 ou 16:1n-7 e estimulados com LPS, apresentaram diminuição na expressão de genes para IL-6, IL-12a, IL-1 β , TNF- α , iNos₂ e IL-23, sendo o tratamento com o Ácido palmitoleico 16:1n-9 significativamente mais potente do que o 16:1n-7 neste fenômeno (GUIJAS et al., 2016). Ainda, estes autores sugerem que a origem do 16:1 n-9 ocorra pelo processo de β -oxidação parcial do Ácido oléico (18:1 n-9) na matriz mitocondrial, sendo um processo que está acelerado em células estimuladas e ativadas (GUIJAS et al., 2016).

Os lipídios podem atuar via receptores, como ocorre com os mediadores lipídicos citados no item anterior, ou podem influenciar a resposta celular por mudanças na conformação de membranas celulares (ESCRIBÁ, 2006). Assim, mudanças na composição dos fosfolipídios das membranas celulares por incorporação de Ácidos graxos podem influenciar a função da célula, onde a fluidez da membrana pode ser alterada e afetar a atividade de proteínas da

membrana e consequentemente a sinalização celular (HUWILER et al., 2007). Assim, foi demonstrado que alterações na composição de Ácidos graxos de membrana de MA estavam relacionadas com a capacidade fagocítica, onde aumento no teor de Ácidos graxos insaturados na membrana correlacionou com aumento na taxa de fagocitose (ADOLPH et al., 2012; LECCHI et al., 2011; FUHRMANN et al., 2007; ZHENG et al., 1999, DAVIDSON et al., 1998; CALDER et al., 1990; SCHROIT, GALLILY, 1979). Ainda, a suplementação com Ácidos graxos insaturados, restringiu a sobrevivência celular de patógenos microbianos como *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi* e *Pseudomonas aeruginosa* (ADOLPH et al., 2012; ZHENG et al., 1999). Como também, inibiu a replicação bacteriana em MA (ADOLPH et al., 2012). Dessa forma, estudar os efeitos do Ácido palmitoleico 16:1n-9 na modulação da resposta imune durante a infecção pulmonar causada por *K. pneumoniae* indica novas perspectivas para terapias mais efetivas ou coadjuvantes à quimioterapia tradicional.

3. Objetivo Geral

Avaliar o efeito imunomodulador do tratamento com Ácido palmitoleico 16:1 n-9 em camundongos infectados por *Klebsiella pneumoniae*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com Ácido palmitoleico 16:1 n-9 e 16:1 n-7 nos MA alveolar (AMJ2-C11) e derivados da medula óssea (MDMO) estimulados com LPS, na produção de mediadores inflamatórios;
- Avaliar a atividade de MDMO (M0) na fagocitose de células apoptóticas infectadas com *K. pneumoniae* (eferocitose) quando tratadas com 16:1 n-9;
- Verificar o efeito do tratamento com 16:1 n-9 na sobrevivência de camundongos infectados com *K. pneumoniae*;
- Avaliar o efeito do tratamento com 16:1 n-9 na resposta imune inata pulmonar em camundongos infectados por *K. pneumoniae*: recrutamento celular para o espaço bronco-alveolar; formação de edema; recuperação de unidades formadoras de colônias (UFCs); produção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos (6 semanas, 20-22 g), da linhagem C57BL/6, proveniente do Biotério Unidade I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Após a infecção, os camundongos foram mantidos com livre acesso a água e alimento. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e a Comissão de Ética no Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEUA FCFRP (certificado nº 17.1.451.60.4).

4.2 Obtenção e cultivo das células AMJ2-C11

A linhagem de MA alveolar AMJ2-C11 (oriundas de camundongos) 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, EUA) 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 x g, 10 min, à 4°C, o sobrenadante foi retirado, e o pellet de células foi ressuspensionado em meio de DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA) para avaliação da viabilidade celular em microscópio óptico (Zeiss, EUA). A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com o corante Azul de Tripán (Gibco, EUA).

4.3 Obtenção e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)

Camundongos foram anestesiados com 75 mg/kg de Cetamina em associação com 10 mg/kg de Xilasina seguido de deslocamento cervical para completar a eutanásia. Em seguida, foram extraídos o fêmur e a tíbia para a obtenção das células da medula óssea. As células foram centrifugadas por 10 min. a 400 x g, o sobrenadante foi retirado e o sedimento de células resuspendidos em 3 mL de DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA). As células de medula óssea foram semeadas e cultivadas (6×10^6 células/placa) em placas de Petri (90 x 15, Prolab, BR) contendo meio DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 20% de soro de cavalo (Gibco-Aldrich, EUA)+ 10% de sobrenadante de cultura da linhagem L-929, incubadas à 37°C e 5% de CO₂ durante 7 dias. No sétimo dia, as células já diferenciadas, foram lavadas com PBS (gelado) pH 7,2 para a remoção das células aderentes. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com o corante Azul de Tripán (Gibco, EUA). Após, os MDMO foram utilizados nos ensaios *in vitro*.

4.4 Tratamento e estimulação de MA

Os AMJ2-C11 foram aderidos em placas de microcultivo de 96 poços (Kasvi, EUA), na densidade de 1×10^5 células/poço, em meio DMEM-C, primados ou não com IFN- γ (100 ng/mL – Sigma-Aldrich, EUA), incubadas por 18 h à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para o tratamento profilático, as células foram incubadas ou não com os Ácidos graxos 16:1 n-9 e 16:1 n-7 (Cayman Chemical, EUA) em diferentes concentrações (20 μ M, 10 μ M e 5 μ M) diluídas em DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA) por 2 h. Após este período, os MA foram estimuladas com 500 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, EUA) por mais 24h à 37°C, com 5% de CO₂. Para o tratamento terapêutico, as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) por 2h à 37°C com 5% de CO₂. Após, os MA foram tratadas ou não com adição dos Ácidos graxos 16:1 n-9 e 16:1 n-7 em diferentes concentrações (20 μ M, 10 μ M e 5 μ M) e incubadas por 24 h em estufa à 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes dos dois

tratamentos foram obtidos e armazenados a -20°C, para análise de produção mediadores inflamatórios.

Em experimentos independentes, as células AMJ2-C11 e MDMO foram aderidas em placas de microcultivo de 48 poços (Kasvi, EUA), nas quantidades de 2×10^5 e 5×10^5 células/poço, respectivamente, em meio DMEM-C, sendo a células AMJ2/C11 primada com IFN- γ (100 ng/mL – Sigma-Aldrich, EUA), como descrito anteriormente e ambos MA foram incubados por 18 h à 37°C em 5% de CO₂. Os MA foram tratados ou não com o Ácido graxo 16:1 n-9 na concentração de 20 μ M, por diferentes tempos 30, 60, 120 e 360 min. Após, foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) por 24 h à 37°C, com 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram obtidos e armazenados a -20°C, para análise comparativa de produção de mediadores inflamatórios.

4.5 Ensaio de citotoxicidade celular

O efeito citotóxico dos tratamentos com os Ácidos graxos 16:1n-9 e 16:1n-7 nas células AMJ2/C11 foram determinados de acordo com o método de Mosmann, com modificações (MOSMANN, 1983). O método utiliza o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio) e avalia a viabilidade celular pela medida indireta de atividade de enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. É um teste colorimétrico, no qual a enzima é responsável por reduzir o MTT, de cor amarelada, a azul de formazan nas células viáveis, sendo sua absorbância diretamente proporcional ao número de células vivas presentes. Resumidamente, as células (1×10^5 células/poço) foram aderidas em cultivo por 18 h em placas de 96 poços (Kasvi, EUA) em meio DMEM-C, primadas ou não com IFN- γ (100 ng/mL – Sigma-Aldrich, EUA). Após, os MA foram estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) por 2 h à 37°C, com 5% de CO₂. Após o período de estimulação, as células foram tratadas ou não com os Ácidos graxos 16:1 n-9 e 16:1 n-7 em diferentes concentrações (20 μ M, 10 μ M e 5 μ M) por mais 24 h nas mesmas condições de estufa. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram obtidos e foram adicionados nos poços de cultura 150 μ L de meio DMEM-I e 10 μ L de MTT (5mg/mL) (SIGMA, EUA). As placas foram incubadas por 3 h à 37°C e em seguida foi adicionado 50 μ L de

SDS 20% (SIGMA, EUA) em HCL 0,01M. A absorbância referente a cada poço foi determinada em comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (SpectraMax - Molecular Device, EUA).

4.6 Obtenção e cultivo de *K. pneumoniae*

Foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (Schroeter) Trevisan, da American Type Culture Collection – ATCC 13883, tipo 3), gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Ana Lucia da Costa Darini, do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - FCFRP- USP. A cepa de 1º passagem foi cultivada em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (Acumedia, EUA) acrescido de 15% de glicerol e estocada em freezer a -80°C. 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 h à 37°C.

4.7 Preparação do inoculo de *K. pneumoniae* para infecção

As bactérias isoladas em meio Ágar *MacConkey* (Acumedia, EUA) foram utilizadas para obter suspensões. Com auxílio de uma alça descartável estéril, as colônias isoladas foram ressuspensas em 25 mL de PBS e homogeneizado vigorosamente. A partir dessa suspensão, foram transferidos 1 mL para poços de placas (Kasvi, EUA) e realizada leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. Cálculos e diluições foram realizadas baseadas em curva padrão prévia para obter MOI de $2,1 \times 10^8$ bactérias.

4.8 Análise de viabilidade de *K. pneumoniae* tratadas com ácido palmitoleico

Suspensão de *K. pneumoniae* (MOI 1×10^7) em PBS foi adicionado em todos os poços da placa de 96 poços (Kasvi, EUA), acrescido de meio de cultura BHI (Acumedia, 7116A) e seguido de tratamento com o Ácido graxo

16:1 n-9 nas concentrações de 50 µM, 25 µM, 12,5 µM e 6,5 µM, incubados por 24 h à 37°C em 5% de CO₂. Como controle de morte bacteriana foi utilizado antibiótico Gentamicina (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e controle positivo de crescimento foi considerado o grupo sem tratamento de Ácido graxo e antibiótico. O branco experimental foi os poços com o protocolo de tratamentos em adição de bactéria. Após 24 h foi adicionado em todos os poços de cultura 10 µL de Resazurina (10 mg/mL) (Sigma, EUA) e as placas foram incubadas à 37°C por 3 horas. Em seguida, foi realizada leitura de fluorescência em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm de excitação/ 590nm de emissão.

4.9 Ensaio de eferocitose

a) Geração de células apoptóticas infectadas (Ac-Kp)

Células HL-60 (ATCC® CCL-240™), são caracterizadas como promieloblasto, podem entrar em estágio de diferenciação pela adição de compostos indutores, como dimetilsulfóxido (DMSO), tornando-se neutrófilos bastonetes e segmentados, não aderentes. Essas células foram cultivadas na densidade de 1×10^6 /mL em garrafas de cultura de células em meio IMDM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 10% SBF + DMSO 1,2% por 72 h, à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, a suspensão de células foi centrifugada a 400 x g por 7 min à 4°C. As células obtidas foram incubadas com CFSE (5 µM) (CellTrace™ CFSE, Life Technologies) diluídos em PBS, incubadas por 15 min à 37°C, 5 % de CO₂. Após, foram centrifugadas novamente e lavadas com PBS. Assim, as células obtidas foram ressuspensas em 7 mL de meio IMDM com 5% de SBF. A seguir, as células foram infectadas ou não com *K. pneumoniae* na proporção de MOI de 1:100 (célula:bactéria) e incubadas por 2 h à 37°C com 5% de CO₂ para fagocitose. Após, as células infectadas com *K. pneumoniae* foram induzidas a apoptose por radiação U.V.C (1mJ). O meio foi retirado e as células lavadas com PBS acrescido de antibióticos Gentamicina (10 mg/mL; Penicilina (10.000 u); Estreptomicina (10.000 µg/mL) e Ceftazidima (50 µg/mL) para eliminar as

bactérias não fagocitadas e centrifugadas como anteriormente. Assim, as células foram ressuspensas com 10 mL de meio IMDM e incubadas em Placas de Petri (90 x 15) por mais 4 h à 37°C , 5 % de CO₂, para repouso e recuperação metabólica após o processo de irradiação. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas e ressuspensas com meio IMDM, e consideradas como células apoptóticas segundo trabalho prévio (SALINA, 2015).

b) Fagocitose de células apoptóticas

MDMO (1 x 10⁶ células/poço) foram cultivados em DMEM-C em placas de 6 poços por 18 h à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, foi retirado o meio de cultura e adicionado os tratamentos com o Ácido graxo 16:1 n-9 nas concentrações de 20 e 5 µM por 30 min à 37°C, 5% de CO₂. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Então, AC-Kp, foram co-cultivadas com os MDMO em MOI de 1:3 (M0: AC-Kp) por 2 h à 37°C, 5% de CO₂ (Medeiros, Al. et al., 2009). Após esse período, as células foram coletadas e fixadas com formaldeído 4% por 15 min, centrifugadas e ressuspensas em PBS. A seguir, foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto™ - EUA) para determinação do índice de fagocitose de células apoptóticas.

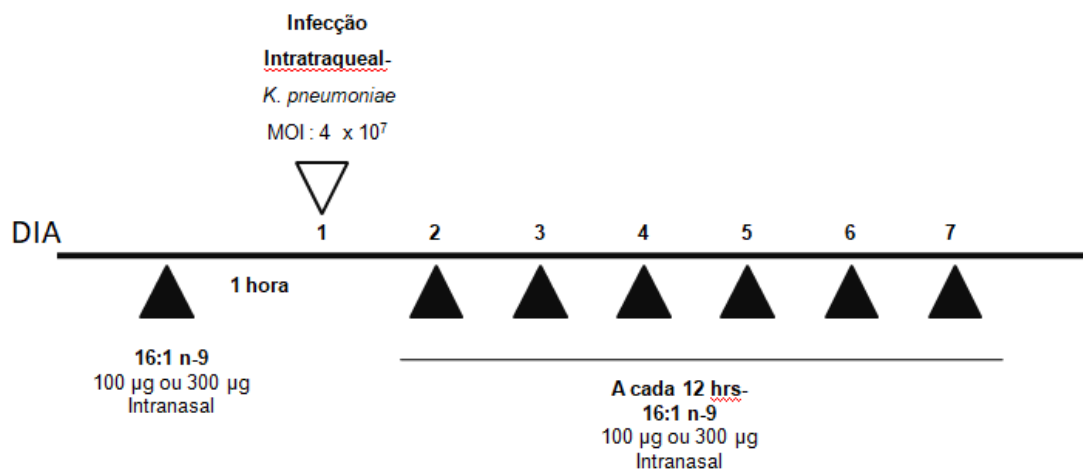
c) Produção de mediadores inflamatórios na eferocitose

Para dosagem de mediadores inflamatórios, MDMO (1 x 10⁶ células/poço) em meio DMEM-C foram cultivados em placa de 6 poços e cultivadas por 18 h à 37°C com 5% de CO₂. Como controle de polarização, MA foram primados *in vitro* para M1: 500 ng/mL de LPS + 200 ng/mL de IFN-γ; M2: 30 ng/mL de IL-4 + 30 ng/mL de IL-10 + 50 ng/mL de M-CSF. Em outro grupo experimental, nos poços de cultura de MDMO (M0) foram adicionados os tratamentos com o Ácido graxo 16:1 n-9 nas mesmas condições experimentais de fagocitose citado acima. Após o período de fagocitose de AC-Kp (2 h), o sobrenadante foi retirado e adicionado nos poços DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA

) com 10% de SBF (Gibco, EUA) com gentamicina (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) por 24 h. Os sobrenadantes de cultura foram obtidos e armazenados à - 20 °C para posterior dosagens de mediadores solúveis.

Fluxograma experimental- *in vivo*-

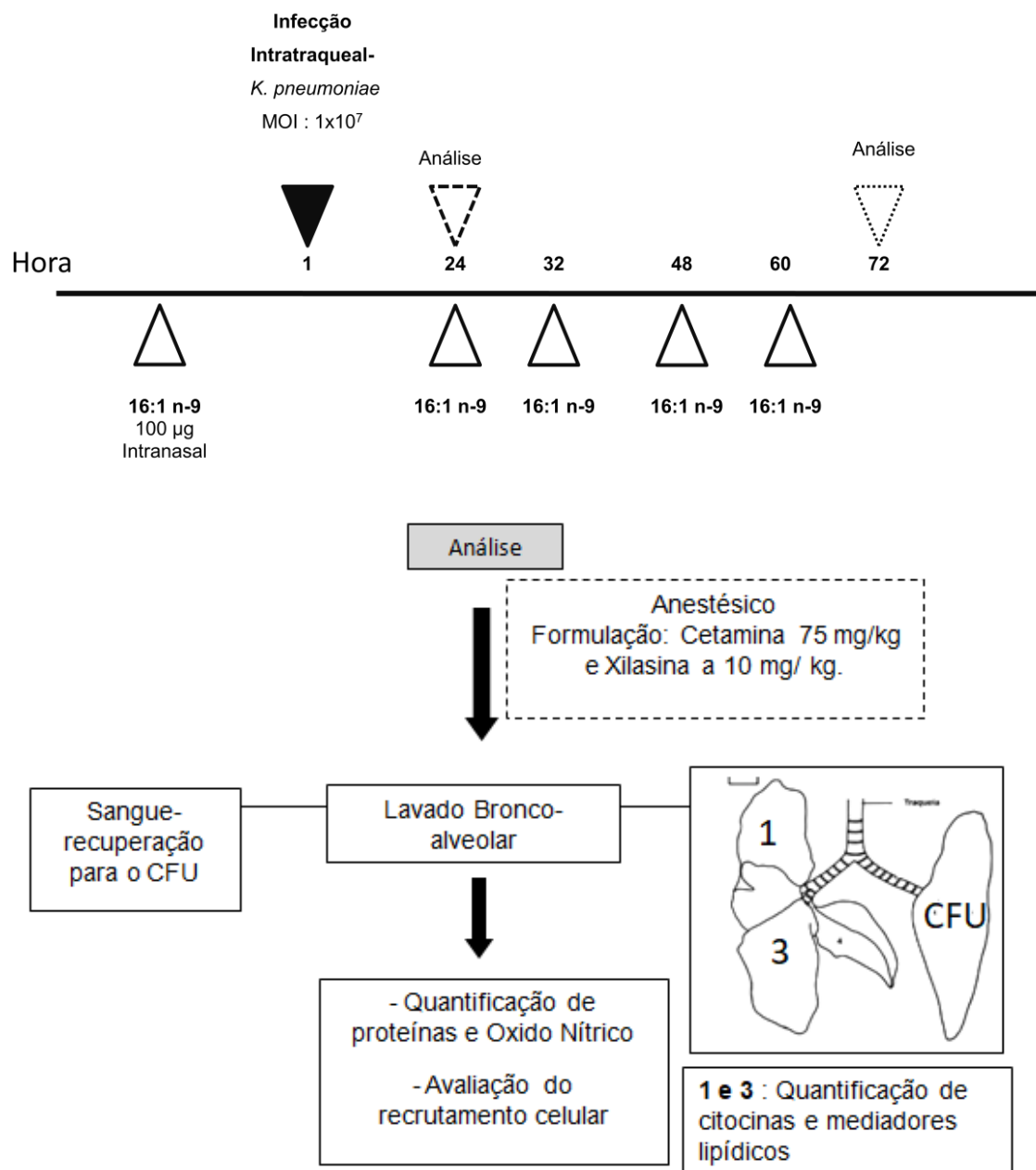
- Análise de sobrevivência (Letal)



Fluxograma experimental *in vivo*

- Cinética de infecção (Não-Letal)

Os procedimentos abaixo também foram feitos para o grupo controle, ou seja, aqueles tratados com o Ácido palmítoleico 16:1 n-9 e PBS 1x, com exceção do CFU.



4.10 Infecção pulmonar por *K.pneumoniae* e tratamentos

Camundongos foram anestesiados com 100 μ L (i.p) com Cetamina (75 mg/Kg) (Sigma, EUA) e Xilasina (10 mg/Kg) (Sigma, EUA) via i.p (intraperitonealmente). A seguir, os animais tiveram suas traquéias expostas e com o auxílio de uma seringa de insulina foram inoculados 100 μ L i.t (intratraquealmente) de suspensões bacterianas de *K. pneumoniae* no MOI letal de 4×10^7 , determinado previamente em nosso grupo. Em outro grupo experimental, animais infectados com *K. pneumoniae*, foram tratados i.n. (intranasalmente) com 20 μ L (10 μ L em cada narina) de solução com Ácido palmitoleico (16:1 n-9) nas concentrações de 100 e 300 μ g/mL. O tratamento foi diário, começando 1 hora antes da infecção e a cada 12 horas até a mortalidade dos animais ou até 7 dias. Neste período os animais foram acompanhados para análise de sobrevivência. A incisão na pele do camundongo foi fechada com fio de sutura.

Em experimentos independentes, animais infectados com *K. pneumoniae*, MOI 1×10^7 , considerado como inóculo não letal, foram tratados com Ácido palmitoleico 16:1 n-9 na concentração de 100 μ g/mL como no esquema anterior, e eutanasiados nos tempos de 24 e 72 h após a infecção, para assim analisar parâmetros da resposta imunológica pulmonar. Os pulmões e os lavados broncoalveolares (LBA) foram obtidos e processados de acordo com a metodologia a seguir.

4.11 Lavado broncoalveolar (LBA)

Após a eutanásia dos animais, o lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado por meio da exposição da traquéia e seguido da inserção de um cateter acoplado a uma seringa. Foi instilado para os pulmões 1 ml de PBS, repetido por 3 vezes. Após, as células em suspensão foram utilizadas em contagem total e diferencial. Ainda, o LBA foi centrifugado a $800 \times g$ por 10 min e os sobrenadantes de LBA foram obtidos e armazenados à -20°C para posterior análise.

4.12 Contagem total e diferencial das células do LBA

A contagem de células totais presentes nos LBA foi realizada empregando a solução de Turk (grupos tratados ou controle foram utilizadas diluições de 1:5; e grupos infectados com *K. pneumoniae* tratados ou não, foram diluídos em 1:10). Câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 10x foram utilizados para determinação do número de células totais. As contagens diferenciais das células do LBA foram feitas a partir de lâminas empregadas em citocentrifugas e submetidas à coloração por Panótico Rápido (Laborclin, BR). Foram contadas 100 células consecutivas em microscópio de campo claro, com objetiva no aumento de 100 x (em imersão com óleo). As porcentagens de cada tipo celular no LBA foi determinada e o número total de cada tipo celular foi calculado.

4.13 Quantificação de proteínas do LBA

O extravasamento de proteínas no LBA foi avaliado por dosagem pelo método de Bradford, empregando o Kit comercial (Pierce – Rockford, USA), conforme especificações do fabricante. Foi considerando como curva padrão, diluições seriadas de albumina bovina sérica (BSA) 200 µg/mL em placa de 96 poços. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax - Molecular Device, EUA) em comprimento de onda de 595 nm.

4.14 Homogenato de pulmão

Para a obtenção do homogenato pulmonar, foram obtidos pulmões sem LBA prévio, e os lóbulos destinados para quantificação de citocinas e mediadores lipídicos (específicos, ver no fluxograma) foram homogeneizados com 2 mL de água ultrapura com auxílio de um homogeneizador Turrax (Sigma-Aldrich). Após a homogeneização, 1 mL do homogenato foi transferido para outro tubo e então adicionado 1 mL de metanol gelado e destinados para a extração e purificação de lipídeos. No outro 1 mL restante foram adicionados 10 µL de inibidor de protease, 1 pastilha diluída em 500 µL de água Milli-Q- 1, 6

mM (Complete -ROCHE, EUA), homogeneizado em vórtex e centrifugado a 1500x *g* por 15 min a 4°C, após o sobrenadante foi obtido e guardado à -20 °C para posterior dosagem de citocinas.

4.15 Avaliação da carga bacteriana (UFC) em pulmões de camundongos infectados

Após a infecção com *K. pneumoniae*, os pulmões dos camundongos infectados, tratados ou não com 16:1 n-9, foram processados como descrito por MEDEIROS et al., (2004). Para a obtenção do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de pulmão, cada animal (sem LBA prévio) teve o lobo pulmonar superior esquerdo removido e pesado em placa de Petri estéril contendo 3 mL de meio RPMI-I sem antibiótico (Himedia, EUA). Para a recuperação das UFC bacterianas o órgão foi processado em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi estéril e condicionados em tubos de polietileno (Falcon) de 50 mL contendo 7 mL de RPMI-I acrescido de 0,5 µg/mL de enzima Liberase (Roche, Germany). Os tubos foram mantidos sob agitação no shaker por 45 min em 150 rpm à 37°C. Após esse tempo a homogeneização da solução foi realizada nos tubos com auxílio de uma seringa. Diluições seriadas, na proporção 1:10, 1:100 e 1:1000 foram realizadas e 100 µL de cada diluição foram adicionadas em placas de Petri (Kasvi, EUA) contendo Ágar MacConkey. As placas foram incubadas por 18-24 horas em estufa bacteriológica à 37°C e as UFC contadas por determinação visual.

4.16 Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes de cultura de MA ou homogenatos de pulmões foram utilizados para quantificação de IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, GM-CSF, KC (CxCL1) e MCP-1 (CCL2) por método de ELISA. Placas de 96 poços, específicas para o ensaio de ELISA (Kasvi, EUA), foram revestidas com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais (anticorpos primário) específicos de captura (R&D, EUA) diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura

ambiente. Após isso, as placas foram lavadas 2 vezes com solução de lavagem (PBS + Tween 0,05%), seguido de 1 lavagem com PBS. Após, os poços foram bloqueados com adição de 200 µL/poço de Tampão Bloqueio (PBS + BSA 1%) e incubadas por 1h em temperatura ambiente. Depois de lavadas novamente, 50 µl das amostras ou curva padrão foram adicionadas aos poços e incubadas por mais 2h em temperatura ambiente. Em seguida, nova lavagem foi realizada e 100 µL/poço de anticorpo de detecção (secundário) conjugado com biotina (R&D, EUA) foram adicionados aos poços, e as placas foram incubadas novamente por 2h. Após nova lavagem, foram adicionados 100 µL/poço da enzima (peroxidase) (R&D, EUA) e as placas foram incubadas por 20 min. Após isso, as placas foram lavadas novamente e o substrato (OPD- Dicloridrato de o- fenilenodiamina) (Thermo Scientific Pierce, USA) diluídos em água Milli-Q foi adicionado (100 µL/poço) para reação colorimétrica. A parada de reação (enzima - substrato) foi feita com a adição de 50 µL/poço de Ácido sulfúrico (H₂SO₄ -1M). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax- Molecular Device, EUA) em comprimento de onda de 450 nm. Os dados quantitativos foram obtidos por comparação com a equação da reta da curva padrão.

4.17 Dosagem de Nitrito

Os sobrenadantes de cultura de MA, ou do LBA foram utilizados para dosagem de NO através de um método colorimétrico indireto por dosagem de nitrito (NO⁻²) com reagente de Griess (GREEN et al., 1982). Para isso, 50 µL do sobrenadante de cultura ou LBA foi misturado com volume igual de reagente Griess (NEED 0,1% (Sigma, EUA) e Sulfanilamida 1% (Sigma, EUA) 1:1v/v) em placa de 96 poços, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Uma curva padrão em diluição seriada (base 2) a partir de 200 µM de NO⁻² foi utilizada para quantificação. A leitura de absorbância foi feita em leitor de placa de ELISA (SpectraMax - Molecular Device, EUA) no comprimento de onda de 540 nm.

4.18 Análise quantitativa da produção de eicosanóides (EICs)

a. Extração e Purificação de lipídios

A extração de lipídios nos homogenatos de pulmão foram realizadas em fase sólida (do inglês *solid phase extraction*, SPE) em cartucho de sílica C18, 500 mg (HyperSep™ -ThermoScientific, USA). Para isso, foram eluídos pelo cartucho sequência de 4 mL de metanol (Merck, USA) e 4 mL de água Milli-Q. Após esta preparação do cartucho, foi adicionado e eluído as amostras. Seguido de lavagens do cartucho com água Milli-Q. Ao término desta etapa, foi adicionado 1 mL de metanol para recuperação da fração lipídica que estava adsorvida na fase sólida (C18) e coletados em tubos plásticos (Eppendorf, BR). Após, foi realizada a secagem do solvente em centrifuga à vácuo (Thermo Scientific Savant, USA) por média de 4-5 horas e a massa sólida contendo os EICs foram recuperadas. Então, a massa seca contendo os EICs foram dissolvidos em 100 µL de solução água/metanol (70:30 v/v) e armazenados à -80°C para posterior análise por HPLC-MS/MS.

b. Análise dos EICs por espectrometria de massas

O método de HPLC-MS/MS para identificação e quantificação dos EICs 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 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 foi operada no modo negativo e os dados foram adquiridos no modo MRM

(Monitoramento de Reações Múltiplas). As transições de MRM para EICs (incluindo padrões internos deuterados), bem como as energias de cone e de colisão foram otimizados infundindo soluções padrões individuais dos EICs a 50 ng/mL em um fluxo de 10 μ L/min, para se obter uma maior sensibilidade do método. As demais condições experimentais de operação do Espectrômetro de Massas (TripleTOF 5600+ – Sciex, EUA) foram: energia do capilar a 2.30 V e temperatura da fonte a 550°C. O gás de dessolvatação e colisão utilizado foi o nitrogênio, com ciclo de tempo de transição de MRM (*dwell time*) de 3 ms. Os critérios adotados para a identificação de um EIC específico incluíram o tempo de retenção (*Tr*) conjuntamente com a transição de MRM. Após a identificação de um determinado EIC 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. O processamento dos dados foi realizado pelo programa Analyst™ (Sciex, EUA), e a quantificação de cada EICsfoirealizada com o auxílio dos softwares Peakview™ (Sciex, EUA) e Multiquant™ (Sciex, EUA).

4.19 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA (não paramétrico) seguido de Tukey comparações múltiplas. Para análise de sobrevivência foi realizado o teste de Log-Ranktest e Mantel-Cox no pós-teste. $P < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPadPrism® (GraphPadPrism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software, EUA).

5. Resultados

5.1 Citotoxicidade dos Ácidos graxos palmitoleicos para MA da linhagem AMJ2-C11.

Para determinar o efeito dos Ácidos graxos na ativação de MA, primeiramente realizamos ensaios de citotoxicidade como padronização da cultura celular. Para isso foram plaqueados 1×10^5 AMJ2-C11/poço primados ou não com IFN- γ , estimulados com LPS e em seguida tratados ou não com os Ácidos graxos (16:1 n-7 e 16:1 n-9) em diferentes concentrações (20, 10, 5 μ M), descrito no item 5.4. Como demonstrado na Figura 2, células AMJ2-C11 não primadas com IFN- γ (Figura 2A) após tratamento com os Ácidos graxos, não demonstraram diferenças na metabolização de MTT em relação ao controle não tratado (meio). Porém, quando primadas com IFN- γ (Figura 2B), as células metabolizaram mais MTT, sugerindo uma proliferação celular ou atividade elevada de mitocôndrias. Nos grupos estimulados com LPS e tratadas com os Ácidos graxos não observamos diferenças significativas na metabolização do MTT em relação ao controle não tratado (meio). O controle positivo de citotoxicidade (DMSO) demonstrou ação na diminuição da metabolização de MTT, consequentemente indicando morte celular.

A utilização de IFN- γ , como ativador de células, foi necessário a partir da observação de que MA da linhagem AMJ2-C11, respondiam muito pouco ao estímulo com LPS em relação a produção de nitrito, que é um mediador necessário na resposta pró-inflamatória. Após ativação das AMJ2-C11 com IFN- γ por 2 horas, seguido da estimulação com LPS, foi observado na Figura 2C que estes MA começaram a responder ao estímulo inflamatório com aumento significativo na produção de nitrito em relação aos controles não estimulados (meio).

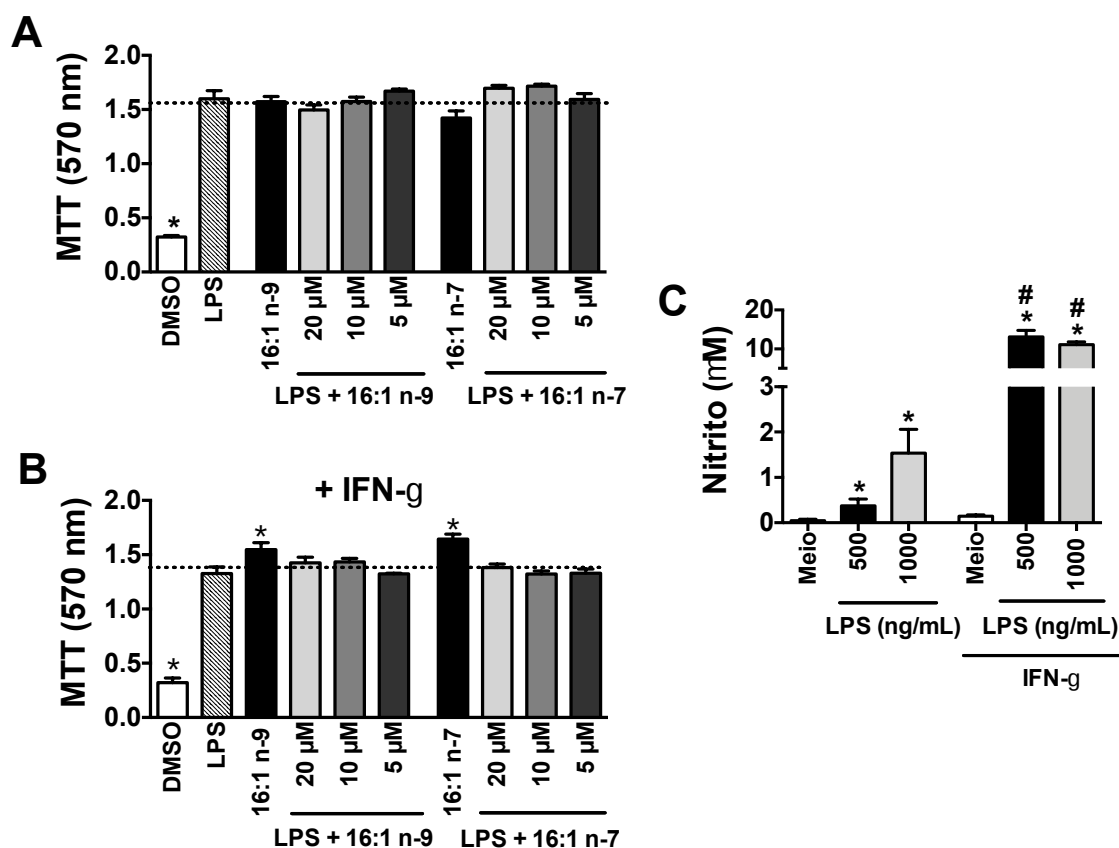


Figura 2. Tratamento com Ácidos graxos palmitoleicos não induziram citotoxicidade em MA da linhagem AMJ2-C11. MA alveolares (AMJ2-C11) foram estimulados com LPS e tratados com 16:1 n-9 e 16:1 n-7 em diferentes concentrações por 24 horas. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de metabolização de MTT e determinado a absorbância em 570 nm. A citotoxicidade foi observada para **A)** MA não primados e **B)** MA primados com IFN- γ , pós-estimulados com LPS e tratados com Ácidos graxos palmitoleicos. Como controle negativo de citotoxicidade foi utilizado apenas meio (linha tracejada) e controle positivo de morte foi utilizado DMSO (30%). A determinação da produção de **C)** NO por AMJ2-C11 primados ou não com IFN- γ e estimulados com LPS foi determinada por método de Griess. Experimentos representativos de duas repetições (n=8). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. * versus controle (meio), #primados com IFN- γ versus grupos não primados.

5.2 Produção de mediadores inflamatórios (NO e TNF- α) por MA da linhagem AMJ2-C11 tratados com os Ácidos graxos palmitoleicos e estimulados com LPS

De acordo com os resultados apresentados no item anterior, no qual ficou evidenciado que os Ácidos graxos palmitoleicos (16:1 n-9 e 16:1 n-7) não apresentam citotoxicidade para a cultura de AMJ2-C11, determinamos confiável o tratamento com os Ácidos graxos até 24 horas. Assim, tivemos propósito de investigar o efeito concentração-resposta do tratamento com Ácidos graxos palmitoleicos na modulação da resposta de MA. Para isso, foram plaqueados 1×10^5 células de AMJ2-C11/poço, primados ou não com IFN- γ . Em seguida os MA foram tratados com os Ácidos graxos 16:1n-9 e 16:1n-7 em diferentes concentrações (20, 10 e 5 μ M) em duas condições experimentais: (1) Profilático, onde os Ácidos graxos foram adicionados ao meio de cultura 2 h antes do estímulo com LPS (500ng/mL - por 24 horas); (2) Terapêutico, em que as culturas de MA foram estimuladas com LPS (500ng/mL por 2 h), seguido de tratamento com os Ácidos graxos por mais 24 h. Na Figuras 3, observamos que MA produziram grande quantidade de nitrito e TNF- α após a estimulação com LPS. Assim, em relação ao tratamento profilático e terapêutico, observamos que os MA estimulados com LPS e tratados com 16:1 n-9 e 16:1 n-7 tiveram diminuição significativa na liberação de nitrito, em todas as concentrações utilizadas, exceto para 16:1 n-7 (5 μ M) no esquema terapêutico em relação ao controle estimulado e não tratado (Figura 3A e 3C).

Entretanto, não observamos efeito inibitório na produção de TNF- α (Figuras 3B e 3D) nos MA estimulados com LPS e tratados com 16:1 n-9 e 16:1 n-7, em ambos esquemas de tratamento *in vitro*. O tratamento com os Ácidos graxos palmitoleicos em MA não estimulados com LPS, não induziu formação de nitrito e TNF- α . Demonstrando, que estes Ácidos graxos não possuem ação pró-inflamatória individualmente. Dessa forma, nos próximos experimentos utilizaremos apenas o Ácido graxo 16:1 n-9 como modelo farmacológico, que é nosso foco de estudos.

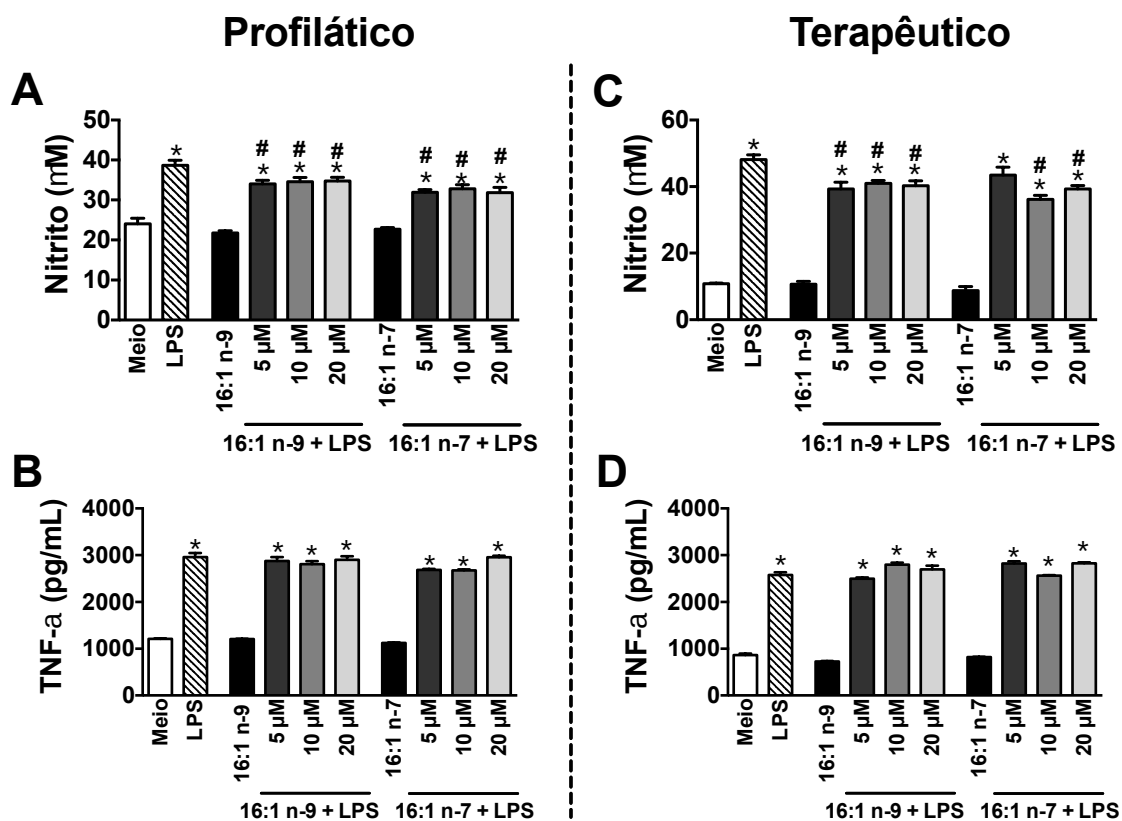


Figura 3. O tratamento com os Ácidos graxos palmitoleicos diminuem a produção de NO, mas não de TNF-α por AMJ2-C11 estimulados LPS. AMJ2/C11 primados com IFN-γ foram tratados com diferentes concentrações (20, 10 e 5 μM) de 16:1 n-9 e 16:1 n-7 em dois esquemas de tratamento e estimulados com LPS (500 ng/mL). Foram observados no modo profilático, a liberação de **(A)** nitrito e **(B)** produção de TNF-α; no modo terapêutico, a liberação de **(C)** nitrito e **(D)** produção de TNF-α. As quantidades de NO nos sobrenadantes foram determinadas indiretamente pela formação de nitrito pelo método de Griess e a produção de TNF-α pelo método de ELISA. Os dados representam média ± SEM (n=8) de dois experimentos. Diferenças estatísticas foram consideradas quando p<0,05. *versus grupo controle (meio), #versus grupo estimulado com LPS e não tratados.

5.3 Comparação da liberação de NO por AMJ2-C11 e MDMO tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS

Devido ao fenômeno observado no item anterior, em que os tratamentos com os Ácidos graxos palmitoleicos não foram eficazes na inibição da

formação de TNF- α em AMJ2-C11 estimuladas com LPS, e sabendo da necessidade de primar estas células com IFN- γ para responder adequadamente ao estímulo com LPS, decidimos utilizar outra linhagem de MA primários (MDMO) em que não fosse necessário o pré-estímulo com IFN- γ . Assim, analisamos o efeito do tratamento com 16:1 n-9 em diferentes tempos (30, 60, 120 e 360 min), na concentração de 20 μ M, nas diferentes linhagens de MA estimulados com LPS.

Na Figura 4, diferente das células AMJ2-C11, os MDMO estimulados com LPS (não primados com IFN- γ) produziram quantidades significativas de nitrito. Enquanto isso, o mesmo efeito foi observado para AMJ2-C11 somente após pré-estimulação com IFN- γ .

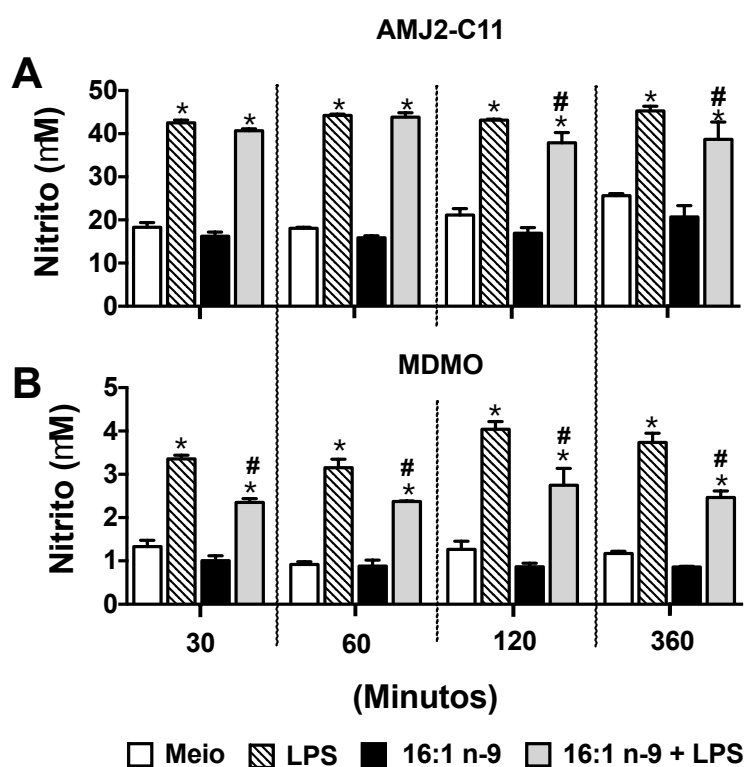


Figura 4: O tratamento com 16:1 n-9 diminuiu a produção Nitrito em MDMO estimulados com LPS. AMJ2/C11 (primados com IFN- γ) e MDMO (não primados com IFN- γ) foram tratados com 16:1 n-9 (20 μ M) por 30, 60, 120 e 360 min antes de estimulação com LPS (500 ng/mL). Após 24 horas de estimulação foi determinada no sobrenadante de cultura as quantidades de Nitrito produzidos por (A) AMJ2-C11 e (B) MDMO. As quantidades de nitrito nos sobrenadantes foram determinadas indiretamente pela formação de nitrito pelo método de Griess. Os resultados foram

expressos como média $\pm$ SEM (n=8) de dois experimentos. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$. *versus controle (meio), #versus grupo estimulado com LPS e não tratado.

Em relação ao tratamento com 16:1 n-9, observamos que as células AMJ2-C11 apresentaram diminuição na liberação de NO apenas nos tempos 120 e 360 min de tratamento profilático, em comparação com o grupo estimulado com LPS e não tratado (Figura 4A). Porém, os MDMO apresentaram maior sensibilidade ao tratamento profilático com 16:1 n-9 na inibição da liberação de NO após estímulo com LPS. Em todos os tempos foram observadas diminuição na liberação de NO nos MDMO tratados e estimulados com LPS em relação ao controle estimulado e não tratado (Figura 4B). Ainda, as porcentagens de inibição da liberação de NO foram maiores nos MDMO do que as observadas para AMJ2-C11 no mesmo protocolo experimental.

5.4 Produção de citocinas e quimiocinas por MDMO tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS

Sabendo que o microambiente no qual os MA se encontram, há influência no seu fenótipo e conseqüentemente na sua função, investigamos qual é o efeito do tratamento com 16:1 n-9 na modulação da produção de citocinas e quimiocinas por MDMO, estimulados com LPS. Para isso, 5×10^5 MDMO/poço foram tratados ou não com o Ácido graxo (20 μ M) por 6h em modo profilático e então estimulamos com LPS (500 ng/mL) por 24 horas.

Como demonstrado na Figura 5, os MDMO estimulados com LPS aumentaram a produção de TNF- α (Figura 5A), IL-6 (Figura 5B), KC (Figura 5C), MCP-1 (Figura 5D), mas não observamos aumento significativo de IL-10 (Figura 5E). Em fato, o LPS induz ativação clássica M1, onde os MDMO tendem a produzir mais citocinas pró-inflamatórias e menor quantidade de IL-10. Após o tratamento com 16:1 n-9, observamos diminuição significativa na

produção de TNF- α , IL-6, KC e MCP-1 (Figura 5 A-D). Ainda, observamos que MDMO não estimulados com LPS e tratados com 16:1 n-9, não teve efeito na modulação da produção de TNF- α , IL-6, KC, MCP-1 e IL-10 (Figura 5A-E), enfatizando que esse Ácido graxo não possui ação pró-inflamatória ou modula o fenótipo celular dos MA.

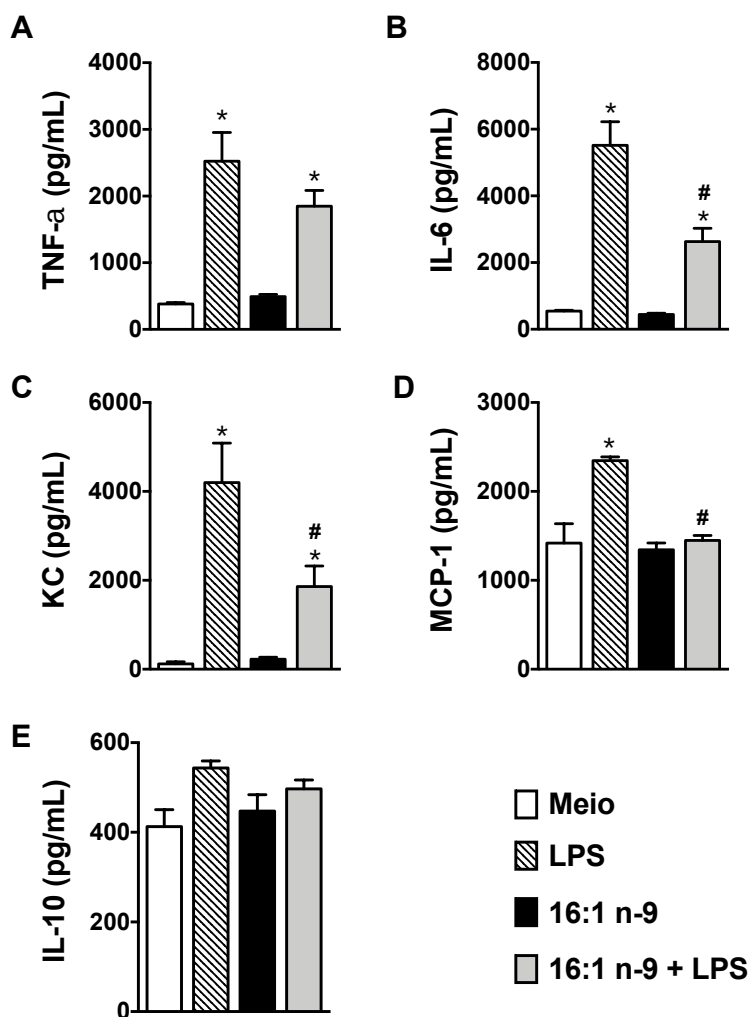


Figura 5. O tratamento com 16:1 n-9 diminuiu produção de mediadores inflamatórios em MDMO estimulados com LPS. MDMO foram tratados ou não com o Ácido graxo (20 μ M) por 6h, no modo profilático, e estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) por 24 horas. Os sobrenadantes de cultura foram obtidos para mensurar quantidades de (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) KC, (D) MCP-1 e (E) IL-10. A produção de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método de ELISA. Os dados representam média $\pm$ SEM. Experimento representativo

de duas repetições (n=8). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$.
*versus controle (Meio). #versus grupo estimulado com LPS e não tratado.

5.5 Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados com *K. pneumoniae* (eferocitose) e produção de mediadores inflamatórios

A fagocitose de células apoptóticas induz formação de mediadores solúveis distintos no microambiente inflamatório, tornando-se um mecanismo necessário para a resolução da inflamação e estabelecimento da homeostase tecidual (TORCHINSKY, GARAUDE et al., 2010). Dessa forma, avaliamos se o tratamento com 16:1 n-9 estava apenas relacionado ao efeito anti-inflamatório, diminuindo produção de mediadores pró-inflamatórios, como descrito no item anterior, ou se este tratamento poderia participar da montagem de uma resposta de resolução da inflamação.

Assim, utilizamos experimento de fagocitose de neutrófilos apoptóticos (Ac) infectados por *K. pneumoniae* (iAc-Kp) por MDMO. Também, avaliamos a produção de mediadores inflamatórios por MDMO na eferocitose. Na Figura 6 A, observamos através de histograma representativo e de gráfico de citometria de fluxo, que o tratamento com 16:1 n-9 nas concentrações de 5 e 20 μM aumentaram a fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados. Os MDMO não tratados com 16:1 n-9 tiveram porcentagem de fagocitose de iAc-Kp de aproximadamente 46%, após tratamento profilático com 5 μM de 16:1 n-9 a quantidade de fagocitose de iAc-Kp aumentou para 76% e para 80% após tratamento de MDMO com 20 μM de 16:1 n-9. Este experimento representativo indica o fenômeno observado em outras repetições.

Além disso, comparamos a produção de mediadores inflamatórios de MDMO (M0) submetidos a eferocitose com MDMO polarizados pela via clássica (M1) ou alternativa (M2). Como esperado, os M1 foram maiores produtores de $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 6B) e os M2 maiores produtores de IL-10 (Figura 6D). Entretanto, o perfil M0 não produziu citocinas em condições de repouso.

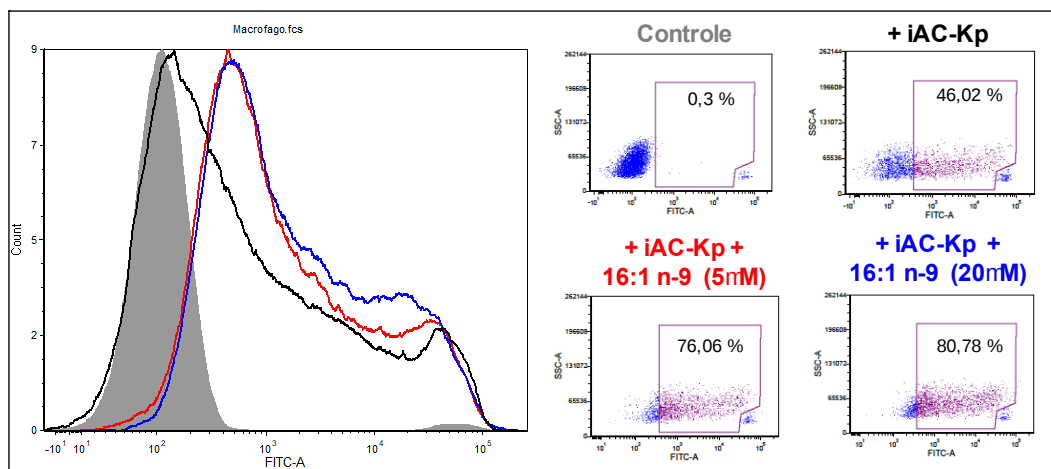
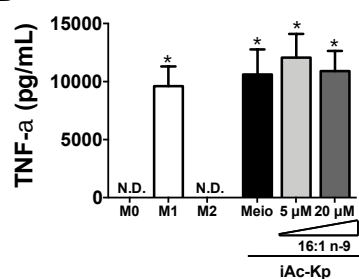
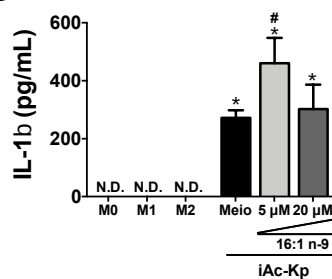
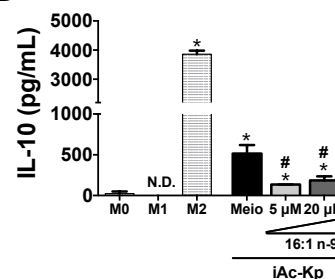
A**B****C****D**

Figura 6. O tratamento com 16:1 n-9 aumenta eferocitose por MDMO e modula a produção de citocinas para resolução da infecção por *K. pneumoniae*. MDMO foram co-cultivados com células apoptóticas infectadas com *K. pneumoniae*, tratados ou não com 16:1 n-9 e a eferocitose foi analisada por citometria de fluxo, **(A)** demonstrando a porcentagem de marcação por CSFE. Citocinas foram determinadas no sobrenadante de cultura celular de MDMO na presença de iAc- Kp, tratados ou não com 16:1 n-9 nas concentrações de 20 e 5 μM por 30 min , assim como em condições polarizantes para macrófagos M1 e M2, sendo representadas em **B)** TNF-α, **C)** IL-1β e **D)** IL-10. Experimento representativo de dois experimentos individuais (n=3). Diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. * versus MDMO (M0), #Grupos tratados com 16:1n-9 versus não tratados (meio).

Após a fagocitose de iAc-Kp os MDMO (M0) produziram quantidade significativas de TNF-α, IL-1β e IL-10 (Figura 6B-D). Nos grupos tratados com 16:1 n-9 na presença de células apoptóticas infectadas com *K. pneumoniae*

(iAc-Kp) observamos aumento na produção de IL-1 β (concentração de 5 μ M) (Figura 6C), e diminuição da produção de IL-10 nas concentrações de 5 e 20 μ M de 16:1 n-9 (Figura 6D). Também, não observamos diferenças significativas na produção de TNF- α após o tratamento com 16:1 n-9 na eferocitose. Comparando nossos dados de ativação de MDMO após fagocitose de iAc-Kp com a polarização de fenótipo de MA, podemos sugerir que a eferocitose destas células infectadas induziram perfil semelhante ao M1, apesar de uma pequena formação de IL-10. No entanto, o tratamento com 16:1 n-9 não diminuiu a produção destes mediadores inflamatórios, e sim, aumentou a produção de IL-1 β e diminuiu a produção de IL-10 na eferocitose de neutrófilos infectados com *K. pneumoniae*.

Dessa forma, podemos supor que apesar do caráter anti-inflamatório do tratamento com 16:1 n-9 em MDMO estimulados com LPS *in vitro*, no modelo com infecção bacteriana, o tratamento com 16:1 n-9 está induzindo um microambiente favorável para eliminação do patógeno, aumentando citocinas envolvidas na ação microbicida, como o IL-1 β , e diminuindo citocina moduladoras como a IL-10 que está envolvida com um pior prognóstico de infecção. Esses resultados enfatizam a participação do 16:1 n-9 na resolução da infecção por *K. pneumoniae*.

5.6 Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na sobrevivência de animais infectados com *K. pneumoniae*

Como demonstrado em nossos experimentos *in vitro*, o tratamento com 16:1 n-9 foi colaborativo para criar um microambiente favorável para a resolução da infecção por *K. pneumoniae* e também demonstrou potencial anti-inflamatório em MA estimulados com PAMPS bacterianos (LPS). Assim, avaliaremos o efeito do tratamento com 16:1 n-9 na infecção experimental de camundongos com *K. pneumoniae*, onde o cenário celular e de mediadores inflamatórios são muito mais amplos e complexos.

Para isso, os animais foram infectados com *K. pneumoniae* e o tratamento com 16:1 n-9 foi administrado intranasal. Para observar a sobrevida

dos animais, utilizamos inóculo letal (4×10^7 bactérias/ animal) de *K. pneumoniae* infectados *i.t* e os camundongos foram tratados ou não com 16:1 n-9 nas concentrações de 100 µg/mL e 300 µg/mL, uma hora antes da infecção, seguido do tratamento a cada 12 hrs até a mortalidade. Como demonstrado na Figura 6, os camundongos infectados que receberam o tratamento com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL tiveram aumento significativo na sobrevida em relação ao grupo infectado e não tratado. Porém, o tratamento com 300 µg/mL de 16:1 n-9 aumentou a mortalidade dos animais infectados. Dessa forma, os resultados sugerem que existe uma regulação específica da resposta imunológica pulmonar nos animais infectados e tratados com 16:1 n-9 e que uma dosagem maior (300µg/mL) pode ter efeito imunossupressor.

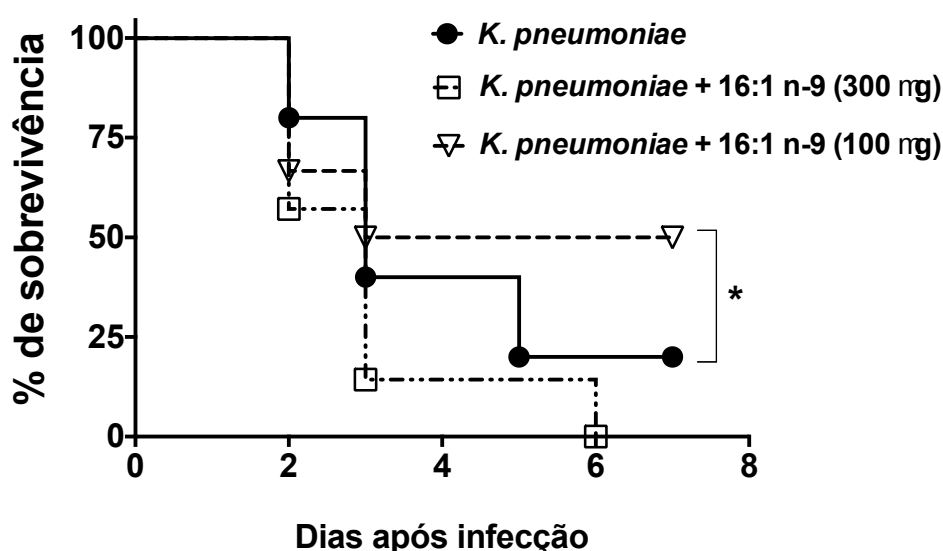


Figura 7. Ambiguidade do efeito do tratamento com 16:1 n-9 na sobrevida de animais infectados com *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 nas concentrações de 100 e 300 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (*i.t*) com suspensão bacteriana (inóculo letal) 4×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. A sobrevivência dos animais foi acompanhada até 7 dias após infecção. Dados representativos de um experimento (n=6). Teste estatístico: Long-Ranktest (Mantel-Cox) $p < 0,05$. * Grupo infectado versus Grupo infectado e tratados com 16:1 n-9.

5.7 Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de camundongos infectados com *K. pneumoniae* e tratados ou não com 16:1 n-9

Sabendo que o tratamento com o 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL teve efeito no aumento da sobrevivência dos camundongos, passamos a utilizar este protocolo farmacológico para os demais experimentos *in vivo*. Assim, avaliamos alguns parâmetros imunológicos pulmonares relacionados a infecção por *K. pneumoniae*. Para isso, os camundongos foram infectados i.t com o inóculo sub-letal (1×10^7 bactérias/100 µL/animal) de *K. pneumoniae* e foram tratados ou não com 16:1 n-9 nas concentrações de 100 µg/mL, uma hora antes da infecção, seguido do tratamento a cada 12 h. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e então realizados o lavado broncoalveolar (LBA). Primeiramente, avaliamos o recrutamento de células para o espaço broncoalveolar durante a infecção por *K. pneumoniae*.

Na figura 8, observamos que a infecção por *K. pneumoniae* aumenta o infiltrado de células totais, neutrófilos e células mononucleares em 24h e 72 h após infecção, quando comparados ao controle não infectado (Figura 8 A-C). O tratamento com 16:1 n-9 nos animais infectados diminuíram significativamente o infiltrado de células totais, neutrófilos e mononucleares no tempo de 24 h de infecção, quando comparado ao grupo infectado e não tratado. Demonstrando uma possível ação anti-inflamatória do tratamento com 16:1 n-9 nesse tempo de infecção. Porém, no tempo de infecção de 72 h, não observamos diminuição de células totais e neutrófilos no LBA de camundongos infectados com *K. pneumoniae* e tratados com 16:1 n-9, em relação ao grupo infectado e não tratado. Interessante, constatamos aumento significativo da migração de células mononucleares para o espaço broncoalveolar de camundongos infectados com *K. pneumoniae* e tratados com 16:1 n-9 após 72h de infecção. Este fenômeno sugere uma ação de resolução de inflamação do tratamento com 16:1 n-9, onde nas fases tardias de infecção ocorre a migração de MA para fagocitar restos de neutrófilos e outras células apoptóticas. Outras células como eosinófilos e mastócitos foram avaliados nestes experimentos, mas não foram

observados seu recrutamento para o espaço broncoalveolar destes animais infectados com *K. pneumoniae* e tratados com 16:1 n-9.

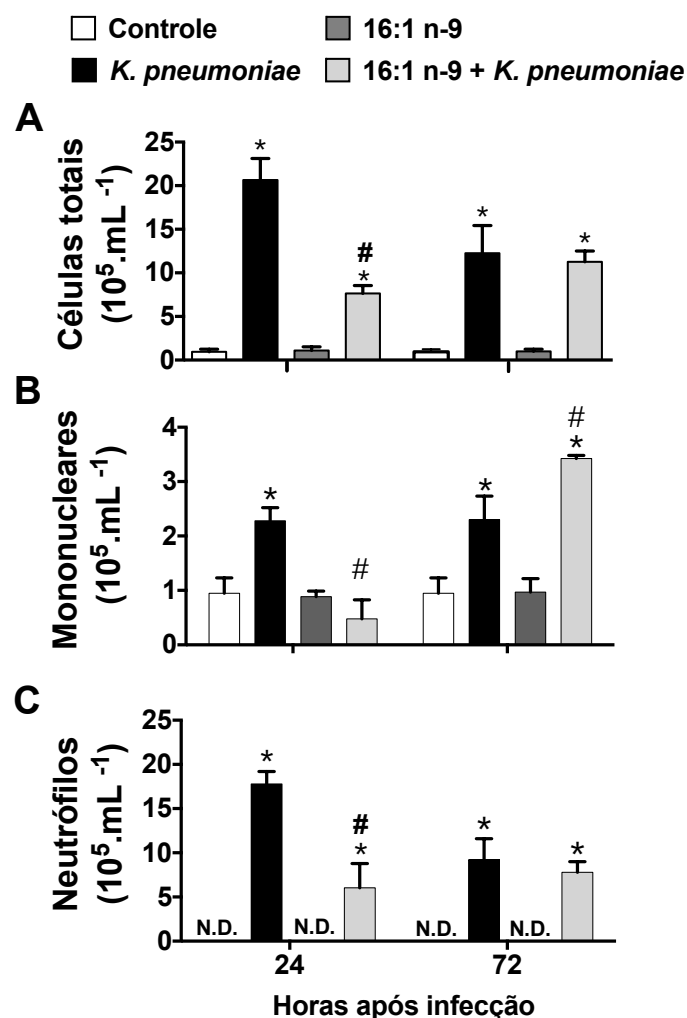


Figura 8. O tratamento com 16:1 n-9 reduz migração celular para o espaço broncoalveolar de animais infectados com *K. pneumoniae* na fase aguda. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculo não-letal) com 1×10^7 bactérias/100 μL /animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e foi realizado o LBA. **(A)** Células totais, **(B)** Células Mononucleares e **(C)** Neutrófilos. As células totais foram contadas em solução TURK e a contagem diferencial de células foi realizada em lâminas coradas com Panótico. Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test. $n = 4$, $p < 0,05$. *versus grupo não infectado, #versus grupo infectado e não tratado.

5.8 Quantificação de proteínas e nitrito no LBA de camundongos infectados com *K. pneumoniae*, tratados ou não com 16:1 n-9

Visto que o processo inflamatório é característico de aumento da permeabilidade vascular, que conseqüentemente ocorre extravasamento de líquido plasmático e aumento do infiltrado de células. Avaliamos em seguida se o tratamento com 16:1 n-9 poderia modular a formação de edema, por meio da quantificação de extravasamento de proteínas no LBA de camundongos infectados. Para isso, os camundongos foram infectados com *K. pneumoniae* (não letal) e tratados via i.n. com 16:1 n-9 na concentração 100 µg/mL, como descrito anteriormente.

Na Figura 9A, observamos que a infecção por *K. pneumoniae* aumentou o extravasamento de proteínas para o LBA dos camundongos em 24 h e 72 h após a infecção. Mas o tratamento com 16:1 n-9 nestes animais infectados, não diminui significativamente a quantidade de proteínas no LBA, apesar de apresentar tendência para isso. No entanto, observamos que somente o tratamento com 16:1 n-9 nos animais não infectados foi suficiente para aumentar o extravasamento de proteínas para o LBA, provavelmente produzindo outros mediadores indutores de edema, como as prostaglandinas.

Outro mediador importante na resolução de infecções bacterianas é o NO produzido por células fagocitárias, nesse sentido, dosamos a quantidade de nitrito no LBA de animais infectados com *K. pneumoniae* tratados ou não com 16:1 n-9. Surpreendentemente, não detectamos quantidades significativas de nitrito no LBA destes animais infectados ou infectados e tratados em ambos os tempos de 24h e 72 h após infecção (Figura 9B). Esse resultado pode refletir a ação dos mecanismos de escape da *K. pneumoniae* na resposta imunológica do hospedeiro contra o patógeno.

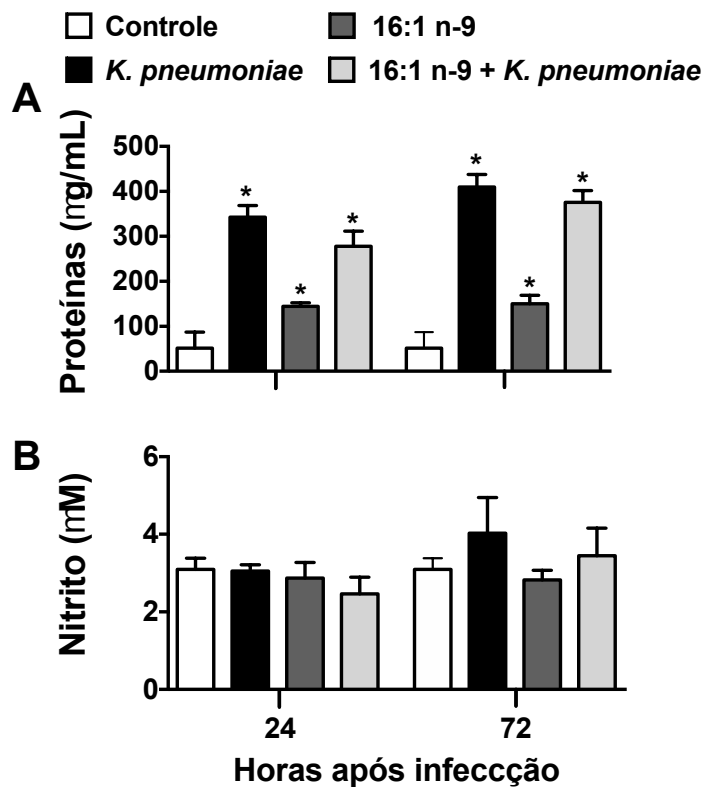


Figura 9. Concentração de proteínas e nitrito no LBA de camundongos infectados com *K. pneumoniae* e tratados ou não com 16:1 n-9. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana não letal de 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e foi realizado o LBA. **(A)** Proteínas totais foram quantificada pelo método colorimétrico de Bradford e **(B)** Nitrito foi quantificado pelo método de Griess. (n=4). Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test. $p < 0,05$. *Grupo infectado versus grupo não infectado.

5.9 Carga bacteriana recuperada dos pulmões de camundongos infectados com *K. pneumoniae* e tratados ou não com 16:1 n-9

Para avaliar se o efeito do tratamento com 16:1 n-9 no aumento da sobrevivência dos camundongos infectados por *K. pneumoniae* era devido a melhor resolução da infecção pulmonar, determinamos a carga bacteriana presente nos pulmões desses animais infectados e tratados. Para isso, os

camundongos foram infectados com *K. pneumoniae* (1×10^7 bactérias/animal) e tratados ou não i.n com 16:1 n-9 (100 µg/mL) como demonstrado anteriormente. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e o lobo esquerdo do pulmão foi retirado, macerado e plaqueado em Agar MacConkey para posterior contagem de UFC. Como demonstrado na Figura 10 A, não observamos diferenças estatísticas na recuperação de UFC de animais infectados e tratados com 16:1 n-9 quando comparados ao grupo infectado (controle). Estes resultados também sugerem que existem mecanismos de escape da *K. pneumoniae* que independem da estimulação do sistema imunológico.

Outros trabalhos relataram o efeito de Ácidos graxos insaturados na ação bactericida (ADOLPHO et al, 2012; WILLE; KYDONEUS, 2003). Assim, verificamos em ensaio *in vitro*, se o tratamento com 16:1 n-9 teria ação direta na viabilidade de *K. pneumoniae*. Para isso, foi utilizado 1×10^7 de *K. pneumoniae*/poço, suspenso em PBS e adicionado em placas de cultura células, juntamente com o meio de cultura BHI e tratamento com o 16:1 n-9 nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,5 µM, incubados por 18 horas a 37°C. Para o controle positivo de morte foi utilizado o antibiótico Gentamicina (100 mg/mL), e como controle positivo de crescimento foi utilizado meio de cultivo sem tratamento e antibiótico. Após, foi adicionado Resazurina em todos os poços, então as placas foram incubadas a 37°C por 3 horas, seguido de leitura no espectrofotômetro. Segundo PALOMINO et al. (2002) e MONTEJANO, (2005) a resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana. Assim, observamos que o tratamento com 16:1 n-9 não influencia a morte bacteriana em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 10B).

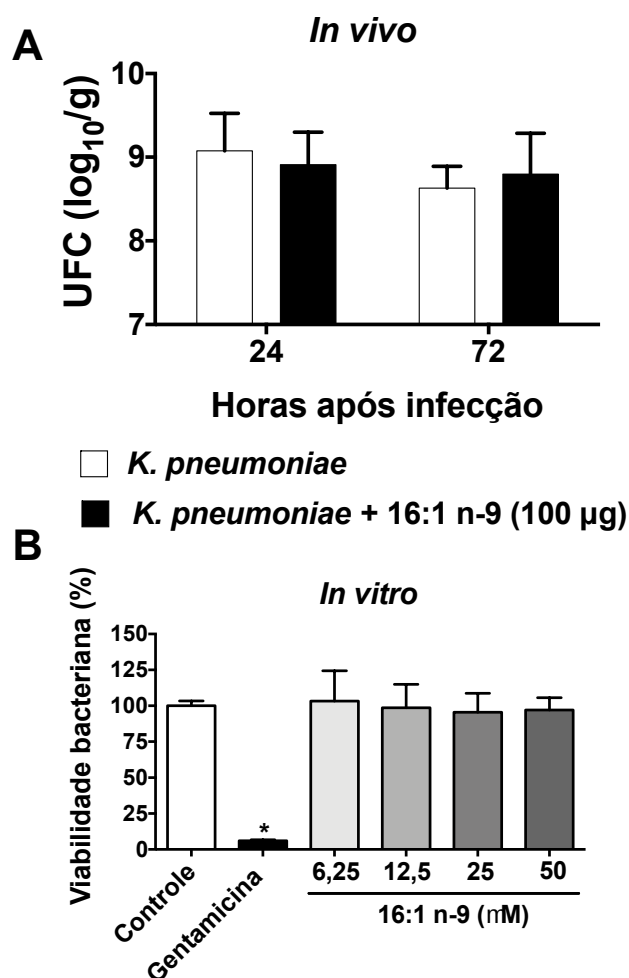


Figura 10. Recuperação de UFC nos pulmões de animais infectados com *K. pneumoniae* tratados ou não com 16:1 n-9 e o efeito de 16:1 n-9 na viabilidade de *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculo não-lethal) com 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e o lobo esquerdo do pulmão foi retirado, macerado e plaqueado em Agar MacConkey para **(A)** contagem de UFC(n=4) **(B)** *K.pneumoniae* foram tratadas ou não com 16:1 n-9 *in vitro* por 18 horas à 37°C. A viabilidade celular bacteriana foi determinada pelo método de metabolização de resazurina em espectrofotômetro (560 nm de emissão/590 nm de excitação). A porcentagem de crescimento bacteriano foi determinada por relatividade (Controle – 100%) (n= 6). Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test. $p < 0,05$. *versus grupo não tratado.

5.10 Concentração de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com *K. pneumoniae* tratados ou não com 16:1 n-9

Após verificarmos que o tratamento com 16:1 n-9 não teve efeito direto na viabilidade de *K.pneumoniae* e que esta bactéria, possivelmente, evade aos mecanismos efetores do sistema imunológico para morte de microrganismos. O nosso próximo passo foi investigar se o tratamento com 16:1 n-9 tinha efeito modulador na resposta inflamatória, por meio da produção de mediadores solúveis, como quimiocinas e citocinas durante a infecção com *K. pneumoniae*. Para isso, camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t com o inoculo subletal (1×10^7 bactérias/animal) de *K. pneumoniae* e tratados ou não (i.n.) com 16:1 n-9 (100 µg/mL) como demonstrado anteriormente. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e os lobos superior e inferior do pulmão direito foram retirados, homogeneizados e utilizados para a quantificação de citocinas e quimiocinas.

Dessa forma, demonstramos que a infecção por *K. pneumoniae* induz a produção de citocinas pró-inflamatórias pulmonares, como IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β (Figuras 11A-D) nos tempos de 24 e 72h após infecção, quando comparados ao controle não infectados. Nos animais infectados e tratados com 16:1 n-9, observamos diminuição na produção de IL-6 em 24 e 72 h após infecção, quando comparado ao grupo infectado e não tratado (Figura 11 A). Porém, a produção de TNF- α não foi afetada no tratamento com 16:1 n-9 em ambos os tempos observados de infecção com *K. pneumoniae* (Figura 11B). A citocina IFN- γ , que é uma importante citocina de padrão Th1 e polarizadora para fenótipo M1 de MA, não teve a produção alterada em 24h após infecção nos grupos tratados com 16:1 n-9 em relação aos grupos infectados e não tratados. Mas, no tempo de 72 h após infecção com *K. pneumoniae*, o tratamento com 16:1 n-9 diminuiu a produção de IFN- γ pulmonar, mesmo com dados mostrando que neste tempo, o grupo apenas tratado com 16:1 n-9 apresentava aumento significativo da produção de IFN- γ em relação ao grupo controle (não infectado e não tratado) (Figura 11C). A produção de IL-1 β

diminuiu no tratamento com 16:1 n-9 no tempo de 24 h após infecção, quando comparado ao grupo infectado. Porém, esse efeito não foi observado no tempo de 72h após a infecção (Figura 11D).

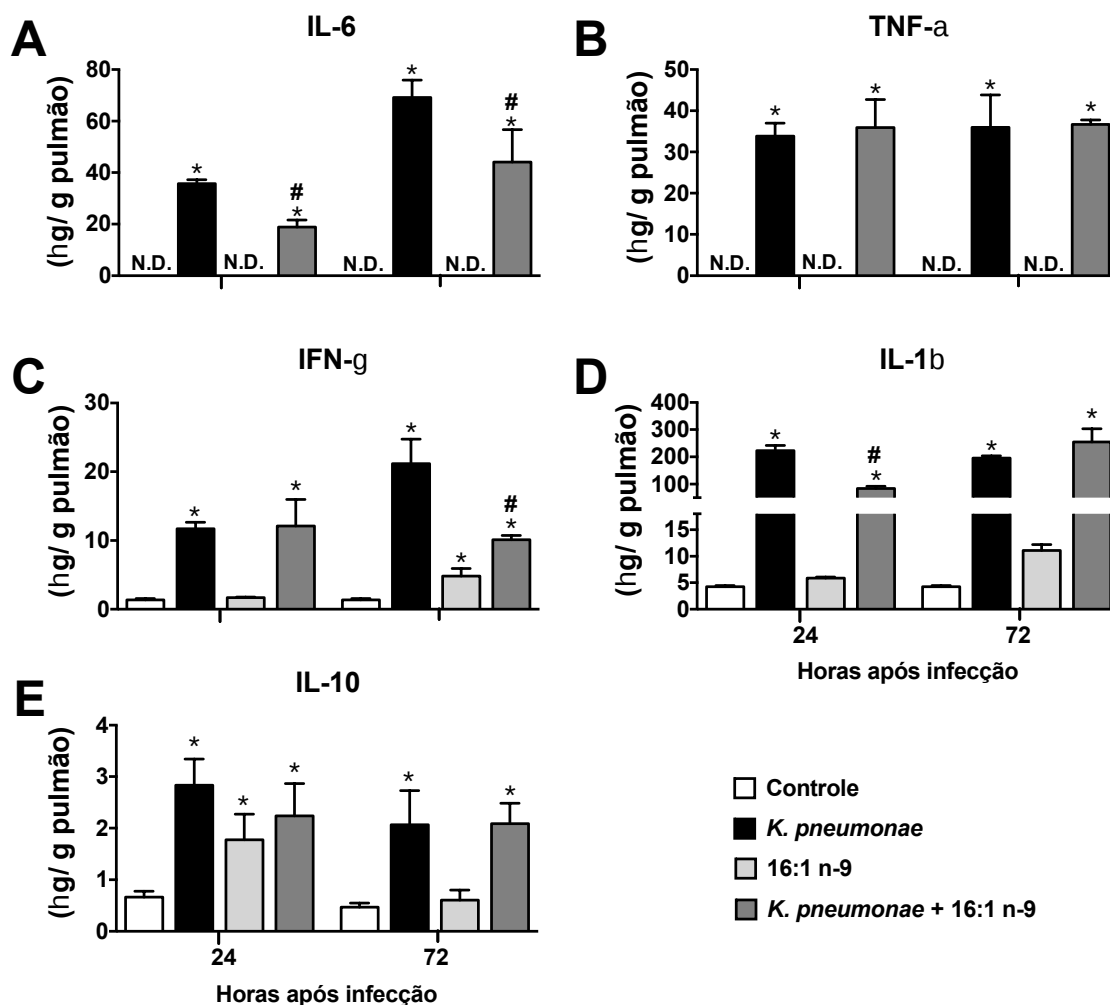


Figura 11. Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na modulação da produção de citocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculonão-letal) com 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado a produção de **(A)** IL-6, **(B)** TNF-α, **(C)** IFN-γ, **(D)** IL-1β e **(E)** IL-10 pelo método de ELISA sanduíche. Teste

ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test. (n=4) $p < 0,05$. *versus grupos não infectados, #versus grupos infectados não tratados.

Além destas citocinas inflamatórias, observamos também a produção de IL-10, que é uma citocina moduladora (Figura 11E). A produção de IL-10 aumentou nos homogenatos de pulmão dos grupos infectados com *K. pneumoniae* em ambos os tempos de infecção. O grupo tratado com 16:1 n-9 e não infectado, também demonstrou aumento na produção IL-10 no tempo de 24 h, quando comparado com o grupo controle. No entanto, o tratamento com 16:1 n-9 não modificou a produção de IL-10 nos grupos infectados nos tempos de 24 h e 72 h após infecção, comparados com os infectados e não tratados (Figura 11E). Estes resultados sugerem que o tratamento com 16:1 n-9 modula diferentemente a produção de citocinas durante a infecção por *K. pneumoniae*, tendo efeito na diminuição da inflamação no microambiente e provavelmente menor dano tecidual.

Em relação às quimiocinas, observamos que a infecção por *K. pneumoniae* aumentou a produção de GM-CSF, KC e MCP-1 nos homogenatos de pulmão dos camundongos em 24 e 72 h após infecção (Figura 12 A-C). Entretanto, o tratamento com 16:1 n-9 nos animais infectados aumentou significativamente a produção de GM-CSF no tempo de 24 h, após infecção, e o mesmo fenômeno não foi observado após 72 h de infecção (Figura 12A). Ainda, o tratamento com 16:1 n-9 não levou a diferenças significativas na produção de KC do homogenato pulmonar de camundongos infectados com *K. pneumoniae* após 24 ou 72 h de infecção (Figura 12B). Porém, o tratamento com 16:1 n-9 aumentou significativamente a produção de MCP-1 nos pulmões de animais infectados, quando comparados com os grupos infectados e não tratados (Figura 12C). Esse aumento na produção de MCP-1 pode ser importante para um maior recrutamento de mononucleares para o microambiente pulmonar inflamado, e assim, aumentando o *clearance* de células apoptóticas e acelerando a resolução da inflamação.

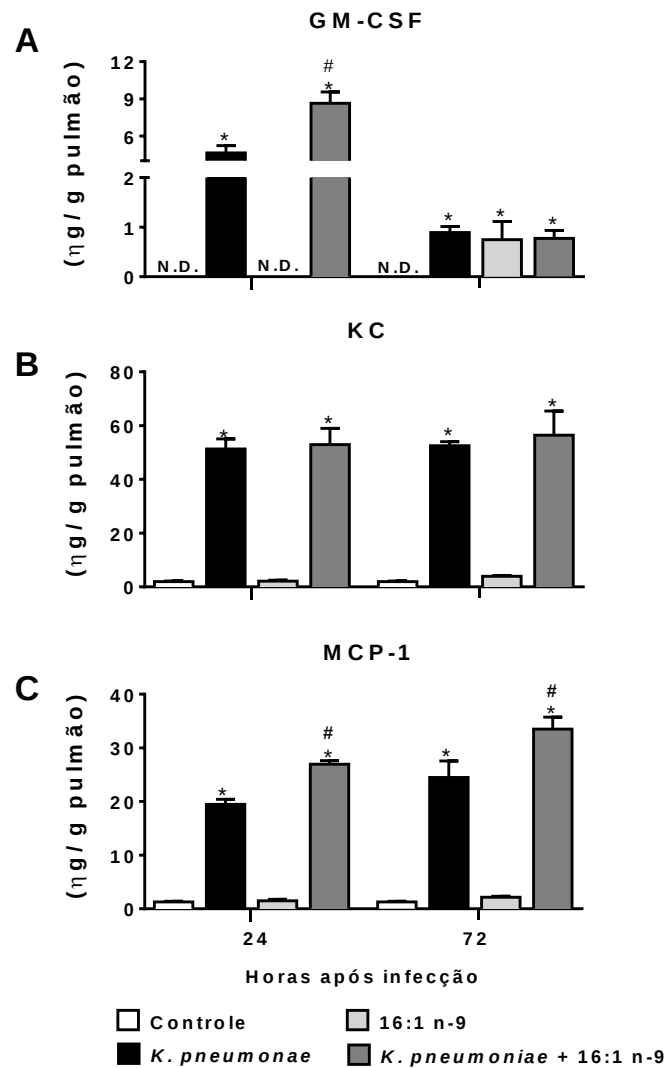


Figura 12. Efeito do tratamento com 16:1 n-9 na modulação da produção de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculo não-letal) com 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado quanto a produção de **(A)** GM-CSF, **(B)** KC e **(C)** MCP-1 pelo método de ELISA sanduíche. Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test (n=4). $p < 0,05$. * versus grupo não infectado, #versus grupos infectados não tratados

5.11 Produção de mediadores lipídicos das vias da 5-Lipoxigenase e Ciclooxygenases no homogenato pulmonar de camundongos infectados com *K. pneumoniae* tratados ou não com 16:1 n-9

Os mediadores lipídicos são importantes moléculas que medeiam a resposta imune, regulando as funções efetoras de diversas células. Neste contexto, para entender o cenário feito pelo tratamento com 16:1 n-9 na resposta imunológica pulmonar contra a infecção de *K. pneumoniae*, investigamos a produção de prostanóides e leucotrienos. Para isso, os camundongos foram infectados i.t com o inóculo não-letal (1×10^7 bactérias/100 μ L/animal) de *K. pneumoniae* e foram tratados ou não (i.n) com 16:1 n-9 (100 μ g/mL), como demonstrado anteriormente. Após 24 h e 72 h de infecção os animais foram eutanasiados e os lobos superior e inferior dos pulmões foram retirados, processados e feito a extração/purificação de lipídios conforme descrito no Material e Métodos. A seguir, a análise dos lipídios foram feitas por espectrometria de massas de alta resolução (LC-TOF-MS/MS) e os dados analisados em softwares de bioinformática para identificação e quantificação de analíticos (alvos) determinados. A concentração final de lipídios foi normalizada e representada por massa total de lipídios por grama de tecido pulmonar.

Para os mediadores lipídicos dependentes da metabolização pela via da 5-Lipoxigenase (Figura 13), observamos que a infecção por *K. pneumoniae* aumentou levemente a produção de LTB₄ nos homogenato de pulmões. Contudo, a infecção foi suficiente para aumentar significativamente a produção de 6-*trans*-LTB₄, 5-HETE, 5-oxo-ETE e 5,6-DiHETE nos pulmões nos tempos de 24h e 72h após infecção (Figura 13 A-E). De modo interessante, os homogenatos de pulmões de animais tratados com 16:1 n-9 e não infectados, apresentaram produção significativa de LTB₄ e 6-*trans*-LTB₄ após 24h de tratamento, quando comparados com os homogenatos pulmonares do grupo controle (não infectado e não tratado) (Figura 13 A e B). No tempo de tratamento de 72 h observamos aumento também na produção de LTB₄, 6-*trans*-LTB₄, 5-HETE, 5-oxo-ETE, nos homogenatos pulmonares de animais tratados com 16:1 n-9 e não

infectados (Figura 13 A-D). Esses resultados indicam que o tratamento com 16:1 n-9 ativa ou regula positivamente o metabolismo de lipídios da via 5-Lipoxigenase. Ainda, os homogenatos de pulmões de animais infectados com *K. pneumoniae* e tratados com 16:1 n-9 apresentaram elevada produção destes mediadores lipídicos derivados do metabolismo via 5-Lipoxigenase, sendo significativo este aumento tanto em 24 h como em 72 h, quando comparados com os animais infectados e não tratados (Figura 13 A – E).

Em relação aos mediadores derivados do metabolismo da via ciclooxigenase (prostanóides), observamos que a infecção por *K. pneumoniae* aumentou a produção de PGE₂ e PGD₂ e TXB₂ nos homogenatos de pulmão após 24 h de infecção, quando comparados com controle não infectado (Figura 14 A-C). Entretanto, no tempo de infecção de 72h, observamos diminuição significativa na produção de todos os prostanóides analisados, exceto TXB₂, nos homogenatos pulmonares de animais infectados e não tratados (Figura 14 A – E).

Essa mudança na formação de prostanóides no microambiente pulmonar infectado em relação ao tempo de infecção, pode ser explicado pelas diferenças de células recrutadas. Os homogenatos de pulmões de animais tratados com 16:1 n-9 e não infectados, apresentaram produção aumentada significativamente de PGE₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} (representativo de Prostaciclina – PGI₂) e PGF_{2α} após 24h de tratamento, quando comparados com os homogenatos pulmonares do grupo controle (não infectado e não tratado) (Figura 14 A, C, D e E). No tempo de tratamento de 72 h observamos aumento na produção de todos os prostanóides identificados nos homogenatos pulmonares de animais tratados com 16:1 n-9 e não infectados (Figura 14 A-E). Esses resultados indicam que o tratamento com 16:1 n-9 também ativa ou regula positivamente o metabolismo de lipídios da via Ciclooxigenases. Nos grupos de animais infectados e tratados com 16:1 n-9, não observamos diferenças significativas na produção de prostanóides nos homogenatos de pulmão após 24 h de infecção, quando comparados com os animais infectados e não tratados. No entanto, após 72h de infecção, o grupo de animais

infectados e tratados com 16:1 n-9 apresentaram aumento significativo da produção de todos os prostanoídes identificados nos homogenatos pulmonares em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 14 A – E).

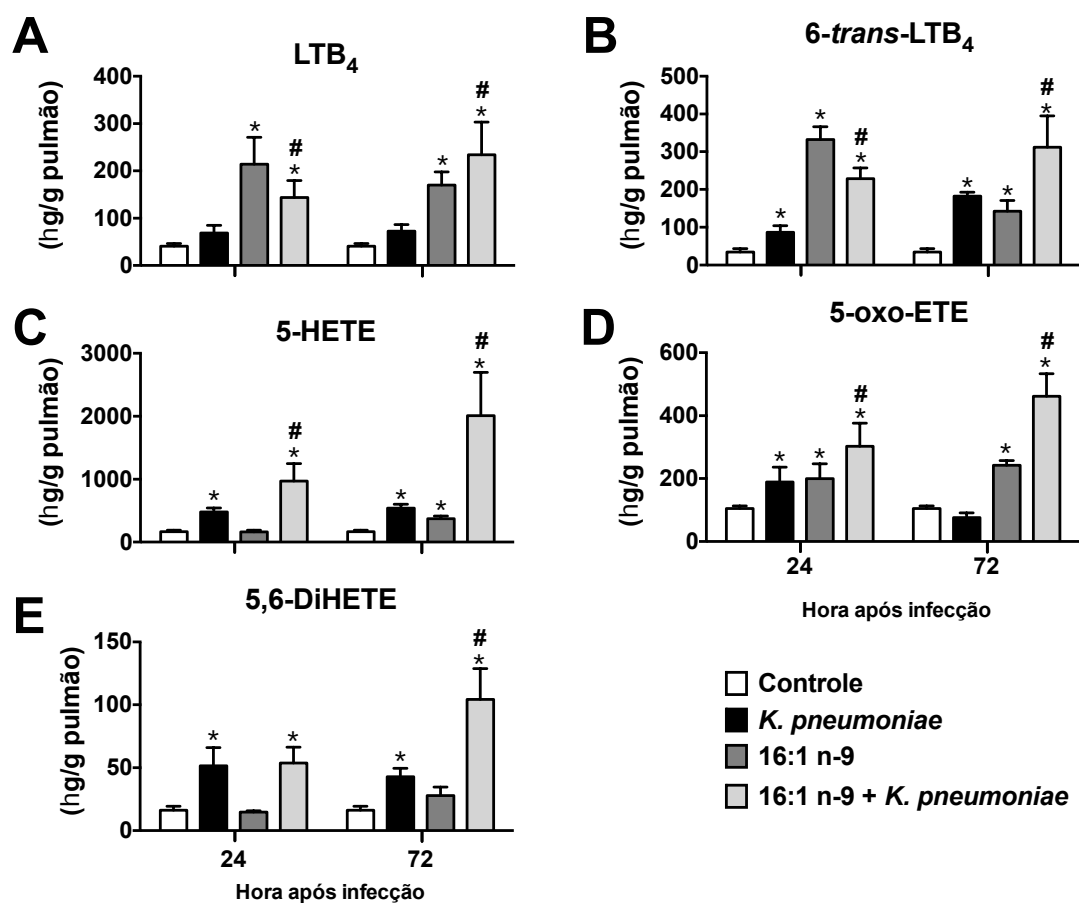


Figura 13. A produção de mediadores lipídicos derivados da via da 5-Lipoxigenase são modulados pelo tratamento com 16:1 n-9 na infecção com *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculonão-letal) com 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 hrs e 72 hrs de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado quanto a produção de (A) LTB₄, (B) 6-trans-LTB₄, (C) 5-HETE, (D) 5-oxo-ETE e (E) 5,6-DiHETE 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). Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test (n=4). p<0,05. * versus grupo controle (não infectado e não tratado), # versus grupo infectado e não tratado.

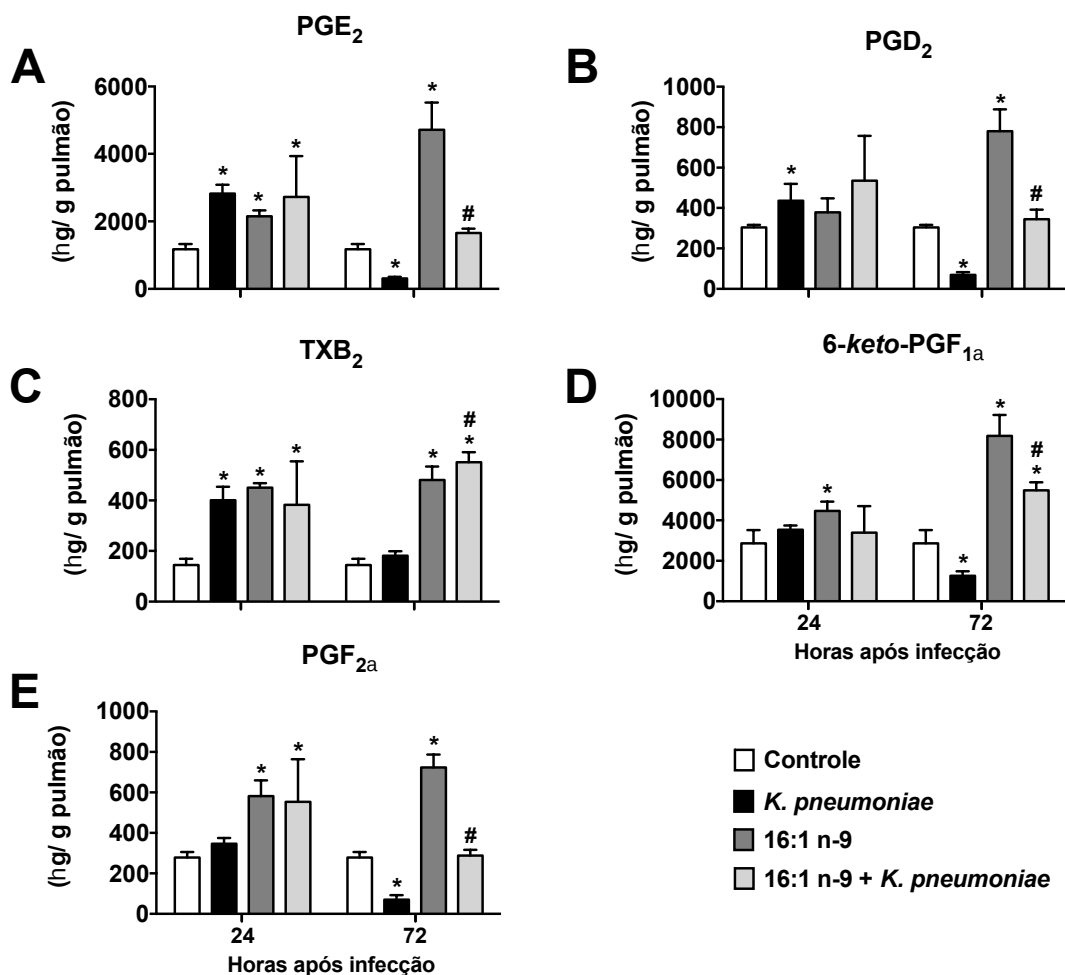


Figura 14. A produção de mediadores lipídicos derivados da via da ciclooxigenase são modulados pelo tratamento com 16:1 n-9 na infecção com *K. pneumoniae*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com 16:1 n-9 na concentração de 100 µg/mL, uma hora antes de serem infectado (i.t) com suspensão bacteriana (inoculação-letal) com 1×10^7 bactérias/100 µL/animal, seguido com o tratamento a cada 12 horas. Após 24 hrs e 72 hrs de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado quanto a produção de (A) PGE₂, (B) PGD₂, (C) TXB₂, (D) 6-keto-PGF_{1α} e (E) PGF_{2α} 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). Teste ANOVA, pós-teste Tukey's Multiple Comparisons Test

(n=4). $p < 0,05$. * versus grupo controle (não infectado e não tratado), # versus grupo infectado e não tratado.

6. Discussão

A inflamação é um processo natural e essencial na defesa do hospedeiro frente as injúrias teciduais, que podem ser causados por agente físicos, químicos ou por invasão de microrganismos, mas que deve ser autolimitada (AHMED, 2011, STABLES; GILROY, 2011). Acreditava-se inicialmente que a ausência de estímulos inflamatórios eram característicos do processo de resolução da inflamação, considerado como um fenômeno passivo (BYSTROM et al., 2008; SERHAN et al, 2007). Novas evidências indicam que a resolução é um processo induzido por mediadores solúveis, pois, durante o processo inflamatório, existem mecanismos endógenos que controlam a intensidade e duração da inflamação (SERHAN, 2007). Desta forma, compreende-se que o processo de resolução seja capaz de controlar e reduzir o risco da lesão tecidual, por intermédio da otimização dos eventos envolvidos na inflamação (WATSON, 2012).

A invasão de microrganismos desencadeiam processo inflamatório que é coordenado por uma sequência de eventos envolvendo moléculas, células e alterações fisiológicas (FULLERTON; GILROY, 2016). As reações envolvidas nesse processo são iniciadas após o reconhecimento de um patógeno pelas células do sistema imune. Assim também, são coordenadas pela liberação de proteínas plasmáticas, produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos derivados do Ácido araquidônico (AA), docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA), denominados eicosanoides (FULLERTON; GILROY, 2016). Bactérias gram-negativa, tal como *K. pneumoniae* possuem o LPS (lipopolissacarídeo) como principal componente em sua parede celular. O LPS é um potente estimulador microbiano do sistema imune, e por isso é extensivamente usado no estudo dos mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro em infecções bacterianas, tanto *in vitro* como *in vivo* (HAYNES et al. 2001). Também, o modelo de infecção pulmonar induzido por *K. pneumoniae* é utilizados para compreender os mecanismos de resposta imune contra patógeno, e entender a resposta inflamatória exacerbada induzida pela infecção bacteriana. Dessa forma, estes modelos agregam perspectivas para pesquisas que envolvem o

estudo de novas terapias que possam agir nos componentes da resposta inflamatória, na tentativa de modular a inflamação e que sejam mais efetivas no combate à infecções de bactérias resistentes. Assim, essas propostas de modelo experimental norteou o desenvolvimento desta dissertação.

O estudo e a aplicação de estratégias terapêuticas de pró-resolução para o tratamento de inflamações crônicas, que possibilitam eliminar os estímulos pró-inflamatório e levar à homeostase do hospedeiro, são motivos de pesquisas recentes (FULLERTON; GILROY, 2016; PERRETTI et al., 2015). As funções que qualificam um agonista pró-resolução incluem: (1) inibição da infiltração de granulócitos; (2) aumento da migração de monócitos; (3) indução da apoptose de granulócitos; (4) aumento de fagocitose (contenção de bactérias) e eferocitose; (5) plasticidade do fenótipo de células residentes (por exemplo, mudança de macrófagos M1 para M2) e (6) promoção da regeneração e reparo tecidual (cicatrização) (SERHAN, 2014; ORTEGA et al., 2013; TITOS et al., 2011; MONTESINOS et al., 1997). Além disso, os lipídios são alvos de estudo para desenvolvimento de novas terapias farmacológicas, como a Terapia de Lipídios de Membrana (TLM), com foco no desenvolvimento de fármacos que atuem na organização dos lipídios pela sua estrutura-função, levando a modulação da atividade celular e podendo interferir no estado patológico inflamatório (ESCRIBÁ, 2006). Pois, alterações das quantidades e dos tipos de lipídios na composição das membranas e mediadores solúveis originados de lipídios de membrana, têm sido relatadas em várias patologias humanas, como as doenças pulmonares (PALESTINI et al., 2003; PINOT et al., 2000).

A literatura sugere que os ácidos graxos insaturados são benéficos para a dieta humana, como da classe dos ômega-3 (SCHWINGSHACKL, HOFFMANN, 2012). A proporção de Ácidos graxos saturados para insaturados constitui uma propriedade importante da composição de fosfolipídios de membranas biológicas (ASTUDILLO et al., 2017). Nesse sentido, os Ácidos graxos monoinsaturados como o ácido palmitoleico e seus isômeros (16:1 n-10, 16:1 n-9, 16:1 n-7) estão despertando interesse de estudos mecanísticos (ASTUDILLO et al., 2017; GUIJAS et al., 2016; CAO et al., 2008). Outros autores, demonstraram que 16:1n-9 possui funções anti-inflamatórias *in vitro* e

in vivo, e que este fenômeno é distinguível das funções do 16:1n-7. No entanto, comparáveis em magnitude com as ações exercidas pelos ácidos graxos ômega-3 (GUIJAS et al., 2016). Com isso, neste trabalho buscamos entender como o 16:1 n-9 participa dos processos inflamatórios de MA induzidos por LPS e na modulação da resposta inflamatória no modelo de infecção pulmonar induzido por *K. pneumoniae*.

Inicialmente, nossos resultados mostram que o 16:1 n-9 e 16:1 n-7 não possuem citotoxicidade para as células AMJ2-C11 nas concentrações máximas utilizadas (20 µM) *in vitro*. Também, outros trabalhos demonstraram que o tratamento com 16:1 n-7 não foi citotóxico para MA peritoneais, tratados na concentração de 600 µM (SOUZA et al., 2017) e que o tratamento com 16:1 n-9 (10 µM) também não tinham efeito citotóxico em monócitos humanos e MA peritoneais (GUIJAS, et al., 2016). O efeito citotóxico é a principal análise no desenvolvimento de novas terapias confiáveis e com funções intrínsecas, e neste quesito os isômeros de ácido palmitoleicos são seguros para a experimentação.

A resposta inflamatória é composta por eventos vasculares, celulares e que envolvem os componentes da matriz extracelular (CONSOLARO, 2009). A primeira alteração vascular consiste no aumento do calibre do vaso sanguíneo, ou seja, a vasodilatação, gerando aumento do fluxo sanguíneo e de permeabilidade vascular, causando o extravasamento do plasma sanguíneo, rico em proteínas e células para fora do vaso, levando à formação de edema no microambiente inflamado (CONSOLARO, 2009). Devido a esse extravasamento do exsudato, o fluxo dos vasos ficam lentos e os leucócitos se aproximam da parede endotelial e passam por processo de rolamento (CRUVINEL et al., 2010). Uma vez aderidos, os leucócitos sofrem diapedese e migram até o local danificado em resposta à quimiotaxia (CRUVINEL et al., 2010). As primeiras células sanguíneas a migrarem para o foco da infecção são os neutrófilos (LIBBY, 2007). Na fase inicial da pneumonia bacteriana é notório a inflamação mediada por neutrófilos (MIZGERD, 2006, 2008), onde eles são atraídos por fator quimiotático, como CXCL1/KC (DE MENDONÇA et al., 2009). Nos resultados *in vitro*, o tratamento com 16:1 n-9 diminuiu KC, em quanto que modelo de infecção por *K. pneumoniae*, o tratamento não teve nenhum efeito

nessa quimiocina, porém, o recrutamento de neutrófilos nos camundongos infectados e tratados nas primeiras 24 hs da infecção diminuiu. Os neutrófilos têm por função clássica a atividade fagocítica e microbicida, mediada pela ativação de NADPH oxidase, liberando espécies reativas de oxigênio, peptídeos antimicrobianos e produção de mediadores inflamatórios (SEGAL et al., 2010; MOLDOVEANU et al., 2009). A diminuição do recrutamento de neutrófilos nas primeiras 24 hs, pode ser um potencial para permitir o crescimento microbiano, assim como um acúmulo extremo de neutrófilos, por mais que auxilie na morte de microrganismos, pode resultar em lesão pulmonar excessiva associada à inflamação.

Após 24-48h de início do processo inflamatório, os neutrófilos começam a entrar em apoptose. Na medida em que essas células morrem, os monócitos infiltram no local da infecção em resposta a estímulos quimiotáticos gerados por quimiocinas, como CCL2/MCP1, se tornando MA. No modelo de infecção por *K. pneumoniae*, o tratamento diminuiu a produção em 24 hs após a infecção e aumentou após 72 hs. A administração de MCP-1 em camundongos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*, reduziu significativamente a infiltração de neutrófilos para os alvéolos, assim como recrutou e ativou macrófagos para fagocitarem neutrófilos apoptóticos, melhorando a lesão do tecido pulmonar (AMANO et al, 2004). Este fenômeno sugere uma ação de resolução de inflamação do tratamento com 16:1 n-9, onde nas fases tardias de infecção ocorre a migração de MA para fagocitar restos de neutrófilos e outras células apoptóticas.

Esses MA podem sofrer mudanças fenotípicas dependendo dos estímulos presentes no ambiente, se tornando do fenótipo M1, secretando 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 comparação com M2 (anti-inflamatórios), que secretam IL-10, TGF- β e possuem função fundamental na resolução, fagocitando os detritos de neutrófilos apoptóticos (BYSTROM., 2008; BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MARTINEZ et al., 2008).

Os nossos resultados *in vivo*, com camundongos infectados e tratados com 16:1 n-9, apresentou diminuição da produção de IL-6, como também nos MDMO estimulados com LPS e tratadas com 16:1 n-9 *in vitro*. A diminuição de IL-6 foi observada em plasma de camundongos tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS (GUIJAS et al., 2016). No tratamento com 16:1 n-7 em MA peritoneais estimulados com LPS, ocorreu a diminuição de IL-6 e IL-1 β (SOUZA et al., 2017). Sugere-se que os efeitos anti-inflamatórios do Ácido graxo 16:1 n-9 podem ser específicos para condições estimuladoras de LPS, como uma interferência nos sinais decorrentes no envolvimento de sinalização por TLR4. Uma vez que o 16:1 n-9 diminuiu a fosforilação das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) p42/p44 (DONG et al., 2002). No entanto, não verificamos diferença nas quantidades de KC *in vivo*, apesar de ter observado diminuição na produção desta quimiocina nos MDMO tratados com 16:1 n-9 e estimulados com LPS, para explicar a diminuição de neutrófilos na fase inicial da infecção por *K. pneumoniae*. Em modelo de infecção por *Haemophilus influenzae*, bactéria gram-negativa, o tratamento com RvD1 diminui a produção de KC, contribuindo para a diminuição do infiltrado de neutrófilos nos pulmões dos camundongos (CROASDELL et al., 2016). Em modelos de inflamação, a RvE1 foi protetora na colite, diminuindo a infiltração tecidual de neutrófilos, expressão gênica de citocinas pró-inflamatória e melhora da sobrevida (ARITA et al., 2005). Porém, no nosso modelo de infecção por *K. pneumoniae* observamos diminuição na produção de IL-1B em 24 h após a infecção. Em trabalho recente do nosso grupo, foi demonstrado que o bloqueio da formação de IL-1B no envenenamento por escorpião diminuiu o infiltrado de neutrófilo para o pulmão, assim como a intensidade de edema (ZOCCAL et al., 2016). Demonstrando que além de quimiocinas, a IL-1B é uma importante citocina no recrutamento e ativação de neutrófilos (FACCIOLI et al., 1990).

Já se tem descrito que o GM-CSF, um fator estimulador de granulócito-macrófago tem um importante papel na ativação e diferenciação de macrófagos alveolares, efeitos necessários para manter uma resposta efetiva, assim como a homeostase do pulmão (STANDIFORD et al., 2011). No modelo de infecção por *K. pneumoniae*, o tratamento aumentou a produção de GM-CSF após 24 hs

da infecção. Camundongos GM-CSF^{-/-}, aumentaram a suscetibilidade à infecção por bactérias Gram-negativa in vivo (BALLINGER et al., 2006). A ativação de TLR4 por *K. pneumoniae* mostrou regular positivamente a produção de GM-CSF, protegendo o epitélio das vias aéreas de lesões (STANDIFORD et al., 2011). Macrófago alveolares (AM) proveniente de camundongos GM-CSF^{-/-}, possuem a fagocitose, *killing* e produção de H₂O₂ prejudicadas, assim como diminuição na expressão de IFN- γ e TNF- α , sendo mais suscetível a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* (BALLINGER et al., 2006). A citocina IFN- γ , que é uma importante citocina de padrão Th1 e polarizadora para fenótipo M1 de MA (SHTRICHMAN; SAMUELL, 2001), nos nossos resultados do modelo de infecção por *K. pneumoniae*, não teve a produção alterada em 24h após infecção nos grupos tratados com 16:1 n-9 e infectados, mas 72 h após infecção com *K. pneumoniae*, o tratamento com 16:1 n-9 diminuiu a produção de IFN- γ . Com isso podemos propor que o tratamento tem a tendência de não ser imunossupressor, pois, não atenua a resposta microbicida necessária na fase aguda, assim como tem efeito na fase de resolução da inflamação com a diminuição de IFN- γ .

Diversos trabalhos buscam intervenções terapêuticas para estimular a resolução da inflamação, pois, o aumento da apoptose de neutrófilos sem uma estratégia de eliminação (ou seja, eferocitose) pode perpetuar a inflamação (ORTEGA-GOMEZ et al., 2013). Nossos resultados mostram que o tratamento com 16:1 n-9 aumentaram a fagocitose de células apoptóticas infectadas com *K. pneumoniae in vitro*, como também, nossos resultados indicaram que o tratamento com 16:1 n-9 na eferocitose de células infectadas não modificou o fenótipo de MA, mantendo o estado pró-inflamatório dos MA com TNF- α e IL-1 β elevados e diminuindo a produção de IL-10. Essas citocinas pró-inflamatórias são necessárias para ativação dos MA para a contenção das bactérias e morte, enquanto a IL-10 está envolvida com pior prognóstico de infecção (REF). Esses dados nos instigam, pois temos dois mecanismos de ação do tratamento com 16:1 n-9: (1) modelo de infecção celular, que precisa da ativação de MA para o *clearance* do ambiente inflamatório, como na eferocitose; (2) na diminuição da inflamação exacerbada após a contenção do crescimento bacteriano, como o modelo de estimulação com LPS *in vitro*. Em modelo de obesidade foi

observado aumento no conteúdo de Ácidos graxos saturados e diminuição de DHA e EPA, em comparação com controles, na composição lipídica de membrana de MA, o que provocou diminuição na capacidade de fagocitar células apoptóticas, que foi revertido com o tratamento com EPA (LI et al., 2009). Nesse mesmo trabalho, foi utilizado também tratamento com Ácido palmitoleico, mas este não diminuiu a eferocitose de MA, quando comparado com o efeito dos outros ácidos graxos saturados utilizados no estudo. Com isso, podemos propor que a suplementação/tratamento com Ácido graxo insaturado 16:1 n-9 pode ser benéfico no processo de eferocitose e na resolução da inflamação no microambiente infectado.

Além de citocinas e quimiocinas, os mediadores lipídicos (eicosanoides) desempenham papel fundamental na regulação da inflamação e no processo de resolução (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY., 2002). Os eicosanoides são 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 ciclooxigenases (COX) são enzimas que regulam a produção das PGs, enquanto a 5-LO produz os LTs (FUNK, 2001; STABLES; GILROY, 2011). Tem-se demonstrado que LTB₄ aumenta a atividade microbicida de MA por via de ativação da NADPH oxidase em modelo de infecção *in vitro* por *K. pneumoniae* (SEREZANI et al., 2005). Como também, nosso grupo demonstrou recentemente que o LTB₄ aumentou a produção de α-defensinas-1, que possui uma potente atividade antimicrobiana, essencial para romper a parede celular na infecção por *A. xylosoxidans* (PRADO et al., 2017). Nossos resultados mostraram que o tratamento com 16:1 n-9 aumentou a produção de LTB₄ nos pulmões de animais não infectados. Durante a infecção de *K. pneumoniae* não foi observado produção significativa de LTs, que sugere a ação do mecanismo de escape da bactéria, porém o tratamento com 16:1 n-9 aumentou a produção de LTB₄ nos animais infectados comparados com os infectados e não tratados. Porém, este aumento de LTB₄ não refletiu na diminuição do UFC recuperados dos pulmões dos animais infectados com *K. pneumoniae*, sugerindo que além dos efeitos benéficos de LTs na eliminação e resolução da infecção, outros mediadores poderiam estar interferindo nesta ativação celular.

A PGE₂ é um mediador lipídico produzido na resposta inflamatória durante infecções agudas e crônicas. Foi demonstrado que a inibição da produção e/ou sinalização de PGE₂ durante uma infecção pode representar alternativa terapêutica para diminuir infecções bacterianas (HARRIS et al, 2002; PHIPPS, STEIN, ROPER, 1991), neste contexto podemos citar os tratamentos com inibidores específicos de COX-2 como os celecoxibes. Após tratamento com PGE₂, a NADPH oxidase é inibida em MA, levando à redução da morte de *K. pneumoniae* (SEREZANI et al., 2007). PGE₂ também suprime a atividade de MA ao inibir a produção de radicais de óxido nítrico (NO) (MAROTTA et al., 1992; ASAKRAH et al., 2013). Além disso, a PGE₂ altera a resposta das citocinas de MA e promove fenótipo imunossupressor, desfavorecendo sua fagocitose e atividade bactericida (AGARD et al., 2013). Do mesmo modo, o tratamento com Celecoxibe reduziu as quantidades pulmonares de PGE₂ e aumentou a sobrevivência de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (PERES-BUZALAF et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 16:1 n-9 aumentou a produção de PGE₂ nos pulmões de animais não infectados. Aparentemente, o tratamento com 16:1 n-9 aumenta a produção de ambas as vias de produção de eicosanoides, esse efeito pode ser não específico pois outros mediadores da mesma via também estão com a produção aumentada, como a PGD₂, TXB₂, Prostacilinas, PGF_{2a} e outros metabólitos derivados da via da 5-Lipoxigenase, como 5-HETE, 5-oxo-ETE e 5,6-DiHETEs. No entanto, a infecção por *K. pneumoniae* também aumentou a produção de prostanoïdes, incluindo a PGE₂, que nesse caso é uma modulação benéfica para a infecção bacteriana. De modo semelhante, o tratamento com 16:1 n-9 em animais infectados com *K. pneumoniae*, aumentaram a produção de prostanoïdes ao longo da infecção. Quando comparamos a massa de eicosanoides produzidos por grama de pulmão nas nossas condições experimentais, notamos que a produção dos produtos derivados de COX-2 é superior a produção de produtos derivados de 5-LO. Na comparação da produção de LTB₄ e PGE₂, que possuem efeitos antagônicos na estimulação do sistema imunológico, podemos verificar um favorecimento na produção de PGE₂ de 10 vezes, ou seja, a pesar

dos efeitos benéficos do LTB₄ na resolução da infecção por *K. pneumoniae* a produção excessiva de PG pode estar contrapondo este efeito.

Neste sentido, os estudos sobre o efeito imunomodulador do tratamento com 16:1 n-9 na infecção por *K. pneumoniae* revela-se como potencial de resolução da inflamação, diminuindo o dano tecidual e o infiltrado inflamatório celular. Entretanto, por excesso de estimulação da produção de eicosanoides o tratamento com 16:1 n-9 não foi eficaz na resolução da infecção e eliminação da bactéria. Assim, sugerimos que o tratamento com 16:1 n-9 seria potencializado como adjuvante a outras estratégias farmacológicas de tratamento de pneumonia, como o uso concomitante com antibióticos ou inibidores de prostaglandinas. Neste cenário farmacológico, os antibióticos teriam influência como bacteriostáticos ou na morte de microrganismos, os celecoxibes iriam diminuir a produção de PGs, que tem efeitos imunossupressores, e o 16:1 n-9 induziria a resolução da inflamação e homeostase tecidual com potencialização dos efeitos benéficos de LTB₄ no combate a infecção por *K. pneumoniae*.

7. Conclusão

O tratamento com 16:1 n-9 apresentou-se com a capacidade de resolução em processo inflamatório induzido por LPS, assim como na eferocitose de células infectadas por *K. pneumoniae*. Na pneumonia, o tratamento com 16:1 n-9 aumentou a sobrevida dos animais e diminuiu parâmetros pró-inflamatórios, mas não teve ação potencializada na resolução da infecção pulmonar de *K. pneumoniae*. Ainda, não demonstrou efeito imunossupressor, pois, aumentou o influxo de MA para o nicho inflamatório e não inibiu completamente a produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inata à infecção.

REFERÊNCIAS

ADOLPH, S.; FUHRMANN, H.; SCHUMANN, J. Unsaturated fatty acids promote the phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 macrophages. **Current Microbiology**, v. 65, p. 649–655, 2012.

AHMED, A.U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274-281, 2011.

ALBERTI, S., et al. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 852–860, 1993.

AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. **Biochemical Society transactions**, v. 31, p. 637-42, 2003.

AMANO, H., et al. Essential Contribution of Monocyte Chemoattractant Protein-1/C-C Chemokine Ligand-2 to Resolution and Repair Processes in Acute Bacterial Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 172, p.398-409; 2018.

ASTUDILLO, A.M., et al. Occurrence and Biological Activity of Palmitoleic Acid Isomers in Phagocytic Cells. **Journal of Lipid Research**, V. 59, p.237-249,2017.

ARITA, M., et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from v-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6- trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.102, p. 7671–7676, 2005.

ARONOFF, D. M., et al. "Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **The Journal of Immunology** , v. 173, p. 559-565, 2004.

ARONOFF, D. M., et al. "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. **The Journal of Immunology** , c. 174, p. 595-599, 2005.

ARSIC, B., Y. , et al. . Induction of the staphylococcal proteolytic cascade by antimicrobial fatty acids in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 7, 2012.

ASAKRAH, S., et al. Post-exposure therapeutic efficacy of COX-2 inhibition against *Burkholderia pseudomallei*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, p. 1-10 , 2013

BAGLEY, S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. **The Journal of Infection Control**, v. 6, p 52–58, 1985.

BAILIE, M.B., et al. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. **The Journal of Immunology**, v.157, p. 5221-5224, 1996.

BALLINGER, M. N., et al. Role of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor during Gram-Negative Lung Infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24,n. 23, p.766- 774, 2006.

BATRA, S., et al. Intrapulmonary Administration of Leukotriene B4 Augments Neutrophil Accumulation and Responses in the Lung to *Klebsiella* Infection in CXCL1 Knockout Mice. **The Journal Immunology**, v. 188, p. 3458-3468, 2012.

BARROW, G.I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria**, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 2008.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v.11, p. 889–896, 2010.

BITTO, A. et al. Flavocoxid, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX of natural origin, attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis. **Critical Care**, v. 16, p.1-12 ,2012.

BRENNER, D. J. Enterobacteriaceae. In: GARRITY, G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 2. New York: Springer, 2006. p. 587-607.

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.

BOSSCHAERTS, T., et al. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN- γ and MyD88 signaling. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 35–36, 2010.

BREYER, R. M., et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** , v. 41, p. 661-690, 2001.

BYSTROM, J., et al Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. **Blood**, v. 112, p. 4117–4127, 2008.

CAI ,S., et al. Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contributed to host defense against pulmonary Klebsiella infection. **The Journal of Immunology** , v. 183, p. 6629–6638, 2009.

CAI, S., et al. CXCL1 regulates pulmonary host defense to Klebsiella infection via CXCL2, CXCL5, NF-kappaB, and MAPKs. **The Journal of Immunology**, v.185, p. 6214–6225, 2010.

CAI, S., et al. NLRC4 inflammasome-mediated production of IL-1beta modulates mucosal immunity in the lung against gram-negative bacterial infection. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 5623– 5635, 2012.

CALDER, P.C. et al. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **The Biochemical Journal**, v. 269, p. 807-814, 1990.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327–335, 2007.

CALDER, P. C. Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** ,v. 79, p. 101–108, 2008.

CAMPOS, M.A., et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7107–7114, 2004.

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

CAO H., et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, p. 933- 944, 2008.

CDC. 2015. CDC works 24/7 to protect US from health, safety and security threats. CDC, Atlanta, GA.

CHAN, K.L., et al. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 16979–16988, 2015.

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. L.: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181, 2015.

CHIANG, N., ET AL. Infection Regulates Pro-Resolving Mediators that Lower Antibiotic Requirements. **Nature** . v. 484, n. 7395, p. 524–528, 2012.

CHILTON, F. H.; RUDEL, L. L.; PARKS, J. S.; ARM, J. P.; SEEDS, M. C. Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 498–503, 2008.

CLEMENTS ,A., et al. The major surface- associated saccharides of Klebsiella pneumoniae contribute to host cell association. **PLoS One** , v. 3, p. 1-10, 2008.

COLLADO, M. C., et al. Factors Influencing Gastrointestinal Tract and Microbiota Immune Interaction in Preterm Infants. **Pediatric Research**, v. 77, n. 6, p. 726–731, 2015.

CROASDELL, A., et al. Resolvin D1 dampens pulmonary inflammation and promotes clearance of Nontypeable Haemophilus influenzae. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 6, p. 2742–2752, 2017.

CRUVINEL, W. M., et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DALLI, J; SERHAN, C.N. Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p. 1–9, 2017.

DALLI, J; SERHAN, C.N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. **Blood Journal**, v. 120, p. 60–72, 2012.

DAO, T. T., et al. *Klebsiella pneumoniae* oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

DAS, A., et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2596–2606, 2015.

DAVICINO, R. C. et al. Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. **International Journal of Immunopharmacology**, v.11, p. 1457–1463, 2011.

DAVIDSON J., et al. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. **Immunology**, v. 94, p. 228–234, 1998.

DENG, J. C., et al. STAT4 is a critical mediator of early innate immune responses against pulmonary *Klebsiella* infection. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 4075–4083, 2004.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Review Immunology**, v.1, p. 511–523, 2015.

DEJANI, N. N., et al. Topical Prostaglandin E Analog Restores Defective Dendritic Cell-Mediated Th17 Host Defense Against Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus in the Skin of Diabetic Mice. **Diabetes Journal**, v. 65, p. 3718-3729, 2016.

DE MENDONÇA et al. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

DIAGO-NAVARRO, E., et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, p. 803–813, 2014.

DOMINGO-GONZALEZ, R., et al. Prostaglandin E2-induced changes in alveolar macrophage scavenger receptor profiles differentially alter phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* post-bone marrow transplant. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 5809-5817, 2013.

DONG, C., et al. MAP kinases in the immune response. **Annu. Rev. Immunol**, v. 20, p. 55–72, 2002.

DRAKE, D. R., et al. . Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. **The Journal of Lipid Research**, v.49, p. 4-11, 2008.

DSMZ, (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/klebsiella.html>. Acessado em 24/03/2018.

ESCRIBA, P Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. **Trends in Molecular Medicine**, v.12, p. 34–43, 2006.

FACCIOLI, L. H., et al.. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, p. 344–349, 1990.

FACCIOLI, L. H., et al. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. **Immunology**, v. 73, p. 222–7, 1991.

FANG, C.T., et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **Journal of experimental medicine**, v. 199, p. 697– 705, 2004.

FISCHER, C. L., D. R., et al. The roles of cutaneous lipids in host defense. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 319-322, 2014.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infect Dis Clin North Am**, v, 28, p. :1-13, 2014.

FUHRMANN, H., et al. . Membrane fatty acids, oxidative burst and phagocytosis after enrichment of P388D1 monocyte/macrophages with essential 18-carbon fatty acids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, p. 155–162, 2007.

FULLERTON, J.N., GILROY , D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews**, v. 15, p. 551-567, 2016.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature*. **Review Immunology**.v.5, p. 953–964, 2005.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Review Immunology**, v.5, p. 953–964, 2005.

GREENBERGER, M. J., et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine Klebsiella pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 159–165, 1996.

GUIJAS, C., et al. Foamy Monocytes Are Enriched in cis -7- Hexadecenoic Fatty Acid (16: 1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Disease. **Cell Chemical Biology**, p. 689–699, 2016.

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.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *J. Nutr.*, v. 134, p. 3427S-3430S, 2004.

HARDMAN, W. E. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3508S–3512S, 2002.

HARRIS. G., et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends of Immunology**, v.23, p. 144–150 , 2002.

HAYNES ,L.M., et al. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. **Jornal of Virology**, v.75, p.10730-7, 2001.

HODSON ,L; F. KARP. Is there something special about palmitoleate? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** , v.16, p. 225–231, 2013

HONG, S. et al . Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti- inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 14677–14687, 2003.

HUWILER A; PFEISCHIFFER J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 124, p.96-112, 2007.

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.

JENKINS, C., et al. Enterobacteriaceae. In: COHEN, J.; POWERDLY, G. W.; OPAL, M. S. **Infectious Diseases**. 4nd ed. Holanda: Elsevier. p. 1565-1577, 2017.

KELLER, W. R; et al. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, p. 337-342, 2013.

KENDALL, A.C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress and Lipid Research**, v.52, p.141-164, 2013

KIM, D. H., et al. Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 3, p. 477–482, 2017.

KISZEWSKI, A. E., et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 143, n. 3, p. 445–451, 2006.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LE, H. D., et al. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, p. 165-170, 2009.

LECCHI, C., et al. In vitro modulation of caprine monocyte immune functions by omega-3 polyunsaturated fatty acids. **The Veterinary Journal**, v. 189, p. 353–355, 2011.

LEE, A.G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** . v. 1666, p. 62–87, 2004

LEGRAND-POELS, S., et al. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. **Biochemical Pharmacology**, v.92, p.131-141, 2014.

LEVY, B.D., et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature Immunology**, v. 2, p. 612–619, 2001.

LI, S., et al. Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophage in atherosclerotic of ob/ob mice and reversal by fish oil diet. **Circulation Research**, v. ;105, p.1072-8, 2009.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition reviews**, v. 65, p. S140-S146, 2007.

LOKE, P., et al. Alternative activation Is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3926–3936, 2007.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology**. 2 ed . New York: Oxford University Press, 2004.

MANDAL, A. K. et al. The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 20434–20439, 2008.

MAROTTA, P., SAUTEBIN, L., DI ROSA, M. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. **Br. J. Pharmacol**, v.107, p. 640–641 1, 1992.

MARTINEZ, F. O., et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–61, 2008.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu. Rev. Immunol**, v.27, p. 451–483, 2009.

MARTINEZ F.O.; GORDON, S. I. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 Prime Reports**, v. 6, p.1-13, 2014.

MARTINEZ, G. J.; MOORE, B. B. NU. Prostaglandin E2 as a Regulator of Immunity to Pathogens. **Pharmacology and Therapeutics**, v.185, p. 135-146, 2017.

MARTINS DE LIMA, T., et al. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. **Clinical science** , v. 113, n. 2, p. 65–77, 2007.

MERINO, S., et al. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infection and Immunity** , v. 60, p. 2529–2535, 1992.

MIZGERD , J.P. . Lung infection – a public health priority. **PLoS Medicine**. v.3, p. 155- 158, 2006.

MONTESINOS, M.C. et al. Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G/s-linked) receptors. **J. Exp. Med**, v.186, p. 1615–1620, 1997.

MOLDOVEANU, B., et al. Inflammatory mechanisms in the lung. **J Inflamm Res**, v.2, p.1–11, 2009.

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, p. 4891–4900, 2003.

MORRISSETTE, N.; GOLD, E.; ADEREM, A. The macrophage – a cell for all seasons. **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 199–201, 1999.

MOZAFFARIAN D, H., et al. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.92, p.1350–1358, 2010.

NARABA, H. et al. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v.160, p. 2974–2982, 1998.

NATARAJ, C., D. W., et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1229-1235, 2001.

OELSCHLAEGGER, T.A.; TALL, B.D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2950–2958, 1997.

OHAMA, H., et al. M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. **The American Journal of Pathology**, v. 185, p. 420–431, 2015.

OMS, 2018. Disponível em:

<https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5592:novos-dados-revelam-niveis-elevados-de-resistencia-aos-antibioticos-em-

todo-o-mundo&Itemid=812. A

ORTEGA-GOMEZ, A. et al. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine** ,v.5, p. 661–674, 2013.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular biology reviews** , v. 80, p. 629–661, 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, p.1446–1452, 2003

PARKER, D., et al. Innate immune signaling activated by mdr .Bacteria in the airway. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 19–53, 2015.

PELEG, A.Y., HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v.362, 1804-1813, 2010.

PEREZ-BUZALAF, C., et al . Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. Prostaglandins Leukot. **Essent. Fatty Acids**, v. 85, p. 75–81, 2011.

PERRETI, M., et al. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, p.737-755 , 2015.

PETERS-GOLDEN., et al. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 589-594, 2005.

PHIIPS, S ,R. P.;STEIN, S. H.; ROPER R. L . A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunology**, v. 12, p. 349–352, 1991.

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, p. L99–L104, 2000.

PODSCHUN, R.; ULLMANN U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 589–603, 1998.

PRADO, M.K.B et al. Leukotriene B₄ is essential for lung host defence and alpha-defensin-1 production during *Achromobacter xylosoxidans* infection. **Scientific Reports** v. 7, p.1-13, 2017.

PRICE, A. E., et al. Marking and quantifying IL-17A-producing cells in vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

RATNAYAKE, W. M. N.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Annals of Nutrition and Metabolism.**, v. 55, p. 08–43, 2009.

ROCK, C., et al. Frequency of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing Klebsiella species contamination of healthcare workers and the environment. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 426–429, 2015.

SALINA, A. C. G., et al. Efferocytosis-induced prostaglandin E₂ production impairs alveolar macrophage effector functions during *Streptococcus pneumoniae* infection. **Innate Immunity**, v. 23, p. 219–227, 2017.

SCHROIT, A.J., GALLILY, R. Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. **Immunology**, v. 36, p. 199–205, 1979.

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, p. 532–545, 2005.

SCHWINGSHACKL, L., HOFFMANN, G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta- analyses. **Nutrients**,v. 4, p. 1989–2007, 2012.

SEGAL ,B.H.,et al. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. **PLoS One**, v. 5, p. 1-14, 2010.

SEKI, H., et al. The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury. **The Journal Immunology**, v. 184,p. 836-843. 2010.

SERBINA, N. V., et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.

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, p. 562-570, 2007.

SEREZANI, C. H. C., et al. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. **Blood Journal**, v. 106, n. 3, p. 1067–1075, 2005.

SERHAN, C.N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing.**Journal of experimental medicine**, v. 192, p. 1197–1204, 2000.

SERHAN, C.N., et al. Hong. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **Journal of experimental medicine**, v. 196, p. 1025–1037, 2002.

SERHAN, C. N., et al. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.7, 2014.

SERBINA, N. V., et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.

SERHAN, C. N., et al. Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**.v. 30, p. 1-38, 2015.

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, p. 2683–2692, 2007.

SHINGADIA, E. D.; SYROGIANNOPOULOS, G. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence , Biofilm and Antimicrobial. **The Pediatric Infectious Disease Journal** , v. 36, p. 1002–1005, 2017.

SCHOENIGER A., et al. The impact of membrane lipid composition on macrophage activation in the immune defense against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 7510–7528, 2011.

SHTRICHMAN, R.; SAMUEL, C. E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p. 251-259, 2001.

SICA, A.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 787-795, 2012.

SIMOPOULOS, A. P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental Biology and Medicine*, v. 235, p. 785–795, 2010.

SIMOONS ,A. M., et al. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 21, p. 133–137, 1986.

STANDIFORD, L. R., et al. TLR4-dependent GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 5, p. L447–L454, 2012.

SOUZA C.O., et al. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARalpha. **Mediators of Inflammation**, v. 2014 , p. 1-12, 2014

SOUZA, C.O.,et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS stimulated macrophages by inhibition of NFkB, independently of PPARs. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, p. 566-575, 2017.

STABLES, M.J, GILROY, D.W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in lipid research**,v. 50,p. 35–51, 2011..

SERHAN, C.N., et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**, v. 21,p. 325–332, 2007.

TARTARI A, P.; et al. Celecoxib Improves Host Defense through Prostaglandin Inhibition during *Histoplasma capsulatum* Infection. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, p. 1-11, 2013.

TITOS, E. et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization

toward an M2-like phenotype. **The Journal of Immunology**, v.187, p. 5408–5418, 2011.

TOMAS, J.M., et al. J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v. p. 54:85–89, 1986.

TORCHINSKY, M. B., et al. "Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger." **Curr Opin Immunol**, v. 22, p. 55-62, 2010.

UN News. UN health agency finds high levels of antibiotic resistance to world's most common infections. **Disponível em:** <https://news.un.org/en/story/2018/01/1001461>

UENO, N., et al. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 70–76, 2005.

VIEIRA, A.T., et al. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5(1A). **Microbes and Infection**, v. 18, p. 180–189, 2016

VÖGLER, O. et al. The G_i dimer drives the interaction of heterotrimeric G_i proteins with nonlamellar membrane structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 36540–36545, 2004.

WATSON, T. Soft tissue repair and healing review, Tissue Repair. 2012. Disponível em: <<http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review>>. Acesso em: 05 de Abril de 2018.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A., BEREZINSKA, M., NOWAK, J. Z. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, p. 931-941, 2015.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em :<<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em : 25/03/2017

XIONG, H., et al. Innate Lymphocyte/Ly6Chi Monocyte Crosstalk Promotes *Klebsiella Pneumoniae* Clearance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 679–689, 2016.

YAQOOB, P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 89–104, 2004.

YEAGLE, P.L. *The Structure of Biological Membranes*. 2 ed. Boca Raton, 540 p. 2005.

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, p. 8226–8236, 2005.

ZHENG, L., et al. Arachidonic acid, but not its metabolites, is essential for Fc gamma R-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. **Immunology**, v. 96, p. 90–97, 1999.

ZOCCAL, K.F., et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7. p. 1-12, 2016.

YEAGLE, P.L. *The Structure of Biological Membranes*. 2 ed. Boca Raton, 540 p. 2005.

ANEXO I



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito imunomodulador do ácido palmitoleico 16:1n-9 na infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae*", registrada sob nº 17.1.451.60.4, sob a responsabilidade de Polyane Poly Marques de Lima e Carlos Arterio Sorgi, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 03/08/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	04/08/17 a 03/08/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	243
Peso/Idade	20 - 22g/ 6 sem
Sexo	Ambos
Origem	Biotério I da FCFRP/USP

Ribeirão Preto, 07 de agosto de 2017.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@cfrrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892