UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Morgana Kelly Borges Prado

Avaliação das prostaglandinas e leucotrienos na infecção pulmonar induzida por
Achromobacter xylosoxidans

Ribeirão Preto - SP

2014

MORGANA KELLY BORGES PRADO

Avaliação das prostaglandinas e leucotrienos na infecção pulmonar induzida por
Achromobacter xylosoxidans

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lúcia Helena Faccioli

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Prado, Morgana Kelly Borges

Avaliação das prostaglandinas e leucotrienos na infecção pulmonar induzida por *Achromobacter xylosoxidans*. Ribeirão Preto, 2013.
91p. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. Mediadores lipídicos.	2. Pneumonia.	3. Prostaglandinas.
4. Leucotrienos.	5. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> .	

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da Aluna: Morgana Kelly Borges Prado

Título do Trabalho: Avaliação das prostaglandinas e leucotrienos na infecção pulmonar induzida por *Achromobacter xylosoxidans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada para obtenção do Título de Mestre em Imunologia

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Lúcia Helena Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Essa dissertação foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo: 130062/2012-0.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Aparecida e Oldenir, a quem devo tudo que sou e tudo que tenho, a minha irmã Katty, pela amizade e carinho e a todos meus familiares e amigos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por fazer em mim segundo tua palavra e por me mostrar o real significado do amor, da misericórdia, da bondade e da fé.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Lúcia Helena Faccioli, pela confiança, pelo incentivo, pela dedicação, pelos ensinamentos, mas, principalmente, pela oportunidade. Oportunidade de estágio que abriu a porta para o meu ingresso no programa, e depois pela oportunidade de ser mais uma de suas alunas. Isto é responsável por todos os sonhos e objetivos profissionais que tenho atualmente. Muito obrigada!

A Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini, por ter gentilmente cedido a cepa bacteriana utilizada neste trabalho e pela disponibilidade em discutir a metodologia e resultados. E a sua técnica de laboratório e atualmente aluna de doutorado Joseane Cristina Ferreira, pela ajuda e paciência. Obrigada!

Agradeço aos Prof(s). membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética) Gisele, Karina, Leonardo, Patrícia, Priscilla, Ana, Luana, Milena, Fabi, Maira, Francisco, Tânia, Alyne, Carol, Thaisa Rafa, Ciça, Gabriel, Fabiana, Carlos e Fabiani. Aos que atualmente estão em outras atividades ou instituições, Adriana, Claudia, Márcio, Elyara, Gabriel e Rodrigo e aos que passaram rapidamente pelo nosso laboratório, Conny, Camila, Aline e Dani. Obrigada a todos pela alegria compartilhada todos os dias, pela amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

Aos meus colaboradores diretos Gisele, Karina e Priscilla. Muito obrigada pela ajuda em cada experimento. Principalmente a Gisele que todos os dias estava sempre pronta a responder as minhas várias dúvidas experimentais. Gi devo muito a você... Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos Aline, Débora, Leandro e Dani... O apoio de vocês foi fundamental em cada etapa. Obrigada pela amizade e pelos momentos de alegria que compartilhamos.

Aos meus familiares e amigos em Jataí que torcem e rezam por mim sempre. Sinto muita falta de vocês. Mãe, pai, Katty, Darllan, Danny, Moara, Dianne, Michel, Léo, Felipe,

Rafaela, Renan, Kassiany, Lazara Suzane, Renata, Ludmila, tia Aninha, tia Messias, tio Márcio, tia Vanda, tio Luziano, Tia Mariuza, tio Valter, Madrinha Rosana, tio Luiz Antônio, Madrinha Divina, tio Antônio, avó Tereza, avó Balbina e tantos outros.

A Universidade que me graduou Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí (UFG/CAJ). Jamais esquecerei minhas origens e os professores que me inspiraram a seguir a carreira acadêmica. Professores: Dr. Alexandre Braoios, Dr. Cleber Douglas Lucínio Ramos, Dr^a Marina Pacheco Miguel, Dr^a Nadya da Silva Castro, Dr. Wagner Gouvêa dos Santos, Dr. Sílvio Luiz de Oliveira, Dr^a Sandra Aparecida Benite Ribeiro, entre outros.

A secretária do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela disponibilidade em ajudar sempre e pela dedicação e empenho.

Ao CNPq (Processo nº 130062/2012-0) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

**“É preciso amar as pessoas como se não
houvesse o amanhã. Porque se você parar para pensar,
na verdade não há.”**

Renato Russo

RESUMO

PRADO, M.K.B. **Avaliação das prostaglandinas e leucotrienos na infecção pulmonar induzida por *Achromobacter xylosoxidans***. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Achromobacter xylosoxidans (*A. xylosoxidans*) é um bacilo gram negativo, aeróbio, móvel, não fermentador de glicose e oxidase positivo, que coloniza habitualmente o trato digestivo e auditivo de humanos. Este bacilo tem sido associado a infecções oportunistas graves, especialmente pneumonia, em indivíduos imunossuprimidos, que em geral, são de difícil controle devido principalmente a fatores de virulência, mecanismos de escape e mutirresistência a antibioticoterapia. Dentre as condições que predis põem o desenvolvimento de infecção pulmonar por *A. xylosoxidans*, o câncer, a fibrose cística (FC) e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são as mais comuns. Essas doenças apresentam produção aumentada de vários mediadores lipídicos, como LTB₄ e PGE₂. A PGE₂ é um lipídeo imunossupressor atuante no sistema imune inato e adaptativo que regula, por exemplo, a liberação de citocinas e quimiocinas, a ativação de células T, além de inibir as funções efetoras dos macrófagos. O LTB₄, por outro lado, está associado ao recrutamento de células para o foco infeccioso, a ativação dos mecanismos efetores dos macrófagos, e aumento de mediadores inflamatórios. Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar se, esses mediadores são liberados durante a infecção pulmonar por *A. xylosoxidans* e o possível papel dos mesmos. Nossos resultados demonstram que os tratamentos com celecoxibe, inibidor da síntese de prostaglandinas (PGs), nas doses de 1mg/kg ou 5mg/kg, não alteram a sobrevida dos animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*. No entanto, o tratamento com MK886, um inibidor da produção de leucotrienos (LTs), resultou em aumento da mortalidade dos animais infectados com inóculos letal ou subletal, redução do recrutamento de neutrófilos no dia 1 após infecção, redução de IL-6 do dia 14 e aumento de TNF- α , IL-1 β e MIP-1 α no dia 7, KC no dia 14 e PGE₂, em todos os períodos estudados. Este tratamento também induziu no lavado broncoalveolar, a diminuição não significativa do extravasamento de proteínas no dia 1, mas aumento significativo no dia 3. Com base nesses dados, podemos sugerimos que o tratamento com MK886 aumenta a mortalidade dos animais, devido ao aumento da permeabilidade vascular, com consequente edema, que leva os animais a insuficiência respiratória. Outros experimentos serão realizados para determinar o papel das prostaglandinas (PGs) e/ou metabolitos do ácido araquidônico neste fenômeno.

Palavras-chave: Mediadores lipídicos; Pneumonia; Prostaglandinas; Leucotrienos; *Achromobacter xylosoxidans*.

ABSTRACT

PRADO, M.K.B. **Evaluation of prostaglandin and leukotrienes in lung infection induced by *Achromobacter xylosoxidans***. 2013. 85 f. Dissertation (Masters degree) – Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Achromobacter xylosoxidans (*A. xylosoxidans*) is a gram negative bacilli, aerobic, mobile, glucose non fermenter and oxidase positive, which normally colonizes the digestive and auditory tract of humans. This bacillus has been associated with severe opportunistic infections, especially pneumonia, in immunocompromised individuals, which are generally difficult to control mainly due to virulence factors, mechanisms and exhaust multidrug resistance to antibiotic therapy. Among the conditions that predispose the development of pulmonary infection by *A. xylosoxidans*, cancer, cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are the most common. These diseases have increased production of various lipid mediators, such as LTB₄ and PGE₂. PGE₂ is an immunosuppressive lipid active in the innate and adaptive immune system that regulates, for example, the release of cytokines and chemokines, activation of T cells and inhibits the effector functions of macrophages. LTB₄, on the other hand, is associated with the recruitment of cells to the infection, and the activation of effector mechanisms of macrophages, and increased production of inflammatory mediators. In this study, our aim was to investigate whether these mediators are released during pulmonary infection by *A. xylosoxidans* and the possible role of the same. Our results demonstrate that treatment with celecoxib, prostaglandin synthesis inhibitor (PGs), at doses of 1mg/kg or 5mg/kg not alter the survival of animals infected with lethal or sublethal inoculum of *A. xylosoxidans*. However, treatment with MK886, an inhibitor of the production of leukotrienes (LTs) resulted in an increased mortality of the animals infected with lethal or sublethal inoculum, reduce the recruitment of neutrophils on day 1 after infection, reduction in IL-6 day 14 and increased TNF- α , IL-1 β and MIP-1 α at day 7, KC in day 14 and PGE₂ in all periods. This treatment also induced in the bronchoalveolar lavage, no significant decrease protein extravasation in the day 1, but significantly increased on day 3. Based on these data, we suggest that treatment with MK886 increases the mortality of animals due to increased vascular permeability, with consequent edema, which leads the animals to respiratory failure. Other experiments will be conducted to determine the role of prostaglandins (PGs) and/or metabolites of arachidonic acid in this phenomenon.

Keywords: Lipid mediators; Pneumonia; Prostaglandins; Leukotrienes; *Achromobacter xylosoxidans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

12-LO:	12-Lipoxigenase
15-LO:	15-Lipoxigenase
5-HPETE:	5-hidroperoxieicosatetraenóico
5-LO:	5-Lipoxigenase
<i>A. xylosoxidans:</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
AA:	Ácido araquidônico
ADH:	Ácido docohexaenóico
AGE+:	Ácido graxos essenciais
AL:	Ácido linoleico
Ax:	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
BHI:	“Brain heart infusion”
<i>C. difficile:</i>	<i>Clostridium difficile</i>
COX-1:	Cicloxigenase-1
COX-2:	Cicloxigenase-2
CSF:	Fator estimulador de colônia
Cys-LTs:	Cisteinil-leucotrienos
DL₅₀:	Dose letal
DPOC:	Doença pulmonar obstrutiva crônica
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
FC:	Fibrose cística
FLAP:	Proteína ativadora da 5-LO
G-CSF:	Fator estimulador de colônia de granulócitos
<i>H. capsulatum:</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
i.p.:	Intraperitoneal

i.t.:	Intratraqueal
IFN-γ:	Interferon- γ
IL-10:	Interleucina-10
IL-1β:	Interleucina 1- β
IL-6:	Interleucina-6
IL-8:	Interleucina-8
<i>K. pneumoniae</i>:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KC:	“keratinocyte chemoattractant”
LPS:	Lipopolissacarídeo
LTA₄:	Leucotrieno A ₄
LTB₄:	Leucotrieno B ₄
LTC₄:	Leucotrieno C ₄
LTD₄:	Leucotrieno D ₄
LTE₄:	Leucotrieno E ₄
LTs:	Leucotrienos
LXs:	Lipoxinas
<i>M. tuberculosis</i>:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MMP-2:	Metaloproteinases de matriz – 2
MMPs:	Metaloproteinases de matriz
NBS2:	Nível de biossegurança 2
NO:	Óxido nítrico
NO₂⁻:	Nitrito
Orn-L:	Ornitina contendo lipídeos
<i>P. aeruginosa</i>:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS:	Solução salina tamponada com fosfato

PGD₂:	Prostaglandina D ₂
PGE₂:	Prostaglandina E ₂
PGF₂α:	Prostaglandina F ₂ α
PGH₂:	Prostaglandina H ₂
PGI₂:	Prostaglandina I ₂
PGs:	Prostaglandinas
PLA₂:	Fosfolipase A ₂
PLC:	Fosfolipase C
PMN:	Polimorfonucleares
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
RVE₁:	Resolvina E ₁
<i>S. pneumoniae</i>:	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>T. cruzi</i>:	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TLR4:	Receptor semelhante a Toll 4
TNF-α:	Fator de necrose tumoral α
TXB₂:	Tromboxano B ₂
TXs:	Tromboxanos
UFCs:	Unidades formadoras de colônia
v.o.:	Via oral
VSR:	Vírus sincicial respiratório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sobrevivência utilizada para determinação do inóculo letal e subletal de <i>A. xylosoxidans</i> em camundongos.....	51
Figura 2: Tratamento com celecoxibe não altera a sobrevida de animais infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	52
Figura 3: Tratamento com MK886 diminui a sobrevida de animais infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	53
Figura 4: Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar em animais infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com celecoxibe ou MK886.....	55
Figura 5: Inibição das prostaglandinas ou leucotrienos não altera a carga bacteriana nos pulmões de animais infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	57
Figura 6: Concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante do homogenato pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	59
Figura 7: Concentração de KC, MIP-1 α e MCP-1 no sobrenadante do homogenato pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	61
Figura 8: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	63
Figura 9: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	65

Figura 10: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	67
Figura 11: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	69
Figura 12: Frequência de células necróticas e apoptóticas recuperadas do LBA de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	80
Figura 13: Concentração de LTB ₄ no tecido pulmonar de camundongos infectados com <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	88
Figura 14: Concentração de PGE ₂ no tecido pulmonar de camundongos infectados com <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	89
Figura 15: Concentração de proteínas no LBA de camundongos infectados com <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	90

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> : Prevalência de infecções e relevância clínica	19
1.2. Mediadores lipídicos e suas funções em imunomodulação	21
1.3. Mediadores lipídicos nas doenças que predisõem a infecção por <i>A. xylosoxidans</i> ..	25
2. Justificativa	28
4. Material e métodos	39
4.1. Animais.....	41
4.2. Obtenção e cultivo de <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	41
4.3. Infecção pulmonar por <i>A. xylosoxidans</i> através de inoculação intratraqueal	41
4.4. Tratamento dos animais infectados com inibidor da COX-2 (celecoxibe).....	42
4.5. Tratamento dos animais infectados com inibidor da FLAP (MK886)	42
4.6. Delineamento experimental	42
4.7. Análise do recrutamento celular para o espaço bronco alveolar.....	43
4.8. Avaliação da carga bacteriana em pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com inibidor da COX-2 (celecoxibe) ou da FLAP (MK886)	44
4.9. Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) em homogenato de pulmão.	44
4.10. Quantificação de PGE ₂ e LTB ₄ por ensaio imunoenzimático (ELISA)	45
4.11. Quantificação de proteínas no LBA.....	45
4.12. Histopatologia dos pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com inibidores de COX-2 (celecoxibe) ou inibidor da FLAP (MK886).....	45
4.13. Análise da proporção de células necróticas e apoptóticas do lavado broncoalveolar.....	46
4.14. Análise estatística	46
5. Resultados	41
5.1. Determinação do inóculo letal e subletal de <i>A. xylosoxidans</i> em camundongos.	49
5.2. Efeito do tratamento com celecoxibe na sobrevivência de animais infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	50
5.3. Efeito do tratamento com MK886 na sobrevivência de animais infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	52
5.4. Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar em animais infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com celecoxibe ou MK886.....	54

5.5. Inibição da síntese de PGs ou LTs não altera a carga bacteriana recuperada dos pulmões de camundongos infectados com inóculo letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i>	56
5.6. Concentração de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	58
5.7. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	61
5.8. Frequência de células necróticas e apoptóticas no LBA de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	66
5.9. Concentração de LTB ₄ no tecido pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	68
5.10. Concentração de PGE ₂ no tecido pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com MK886.....	69
5.11. Concentração de proteínas no LBA de camundongos infectados com <i>A. xylosoxidans</i> e tratados ou não com celecoxibe ou MK886.....	70
6. Discussão	71
7. Conclusão	81
8. Referências Bibliográficas	80
Anexos.....	96

1. Introdução

1.1. *Achromobacter xylosoxidans*: Prevalência de infecções e relevância clínica

Achromobacter xylosoxidans (*A. xylosoxidans*) foi descrito por Yabuuchi e colaboradores em 1971, a partir de isolados de pacientes com otite média (YABUUCHI et al., 1974). Em 1979, as características deste microrganismo foram desvendadas, caracterizando *A. xylosoxidans* como um bacilo aeróbio, gram negativo, não fermentador de glicose, oxidase positivo e móvel, que coloniza habitualmente o trato digestivo e sistema auditivo de humanos (CHESTER; COOPER, 1979). A partir de então, o bacilo *A. xylosoxidans* vem sendo reportado como causador de várias infecções, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (IGRA-SIEGMAN et al., 1980; AISENBERG et al., 2004). O avanço dos métodos de identificação dos microorganismos aliado ao aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos e do número de indivíduos imunossuprimidos, resultou nas últimas décadas, no aumento de notificação de indivíduos infectados por *A. xylosoxidans*, em consequência, maior número de estudos dos seus fatores de virulência e mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro (DUGGAN et al., 1996).

Por se tratar de um bacilo gram-negativo, sua parede celular é composta por lipopolissacarídeo (LPS) e por uma substância anfipática denominada ornitina contendo lipídeos (Orn-L ou OL), cuja função biológica se assemelha ao LPS. O LPS de *A. xylosoxidans* é um potente indutor de interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em células sanguíneas humanas isoladas, cultivadas e estimuladas *in vitro* (HUTCHISON et al., 2000), enquanto a Orn-L após ligação à receptores semelhantes ao Toll 4 (TLR4) é capaz de induzir a liberação de interleucina-1 β (IL-1 β), TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator estimulador de colônia (CSF) em macrófagos peritoneais de camundongos (KAWAI, et al., 1999; KAWAI et al., 1996). Por ser um potente ativador de macrófagos, essa molécula vêm sendo estudada como potencial adjuvante em vacinas (OKEMOTO, et al., 2008). Após a administração intravenosa de LPS, essa endotoxina é capaz de estimular a liberação de mediadores pela ligação a receptores TLR e CD14 que são encontrados em macrófagos e monócitos (DZIARSKI et al, 1998). Mediadores pró-inflamatórios característicos como TNF- α e IL-1 β são detectados nas fazer precoces da infecção e iniciam e amplificam a cascata de produção de outras citocinas por outras células do sistema imune culminando na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias como IL-6, IL-8 e IL-10 (LIN et al., 2000). IL-6, TNF- α e IL-8 são responsáveis pela ativação e

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

recrutamento de mais células do sistema imune nos sítios de infecção enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 é responsável por inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios limitando a inflamação (TOEWS, 2001; ISHIHARA; HIRANO, 2002). Durante infecções bacterianas pulmonares, neutrófilos são os leucócitos de maior importância recrutados para o sítio inflamatório, atraídos principalmente por IL-8 (ROSSI; ZLOTNIK, 2000) enquanto o TNF- α está associado a facilitação da diapedese, acúmulo dessas células no sítio infeccioso e por potencializar os efeitos microbicidas dos neutrófilos (KISICH et al., 2002). Interessantemente, diferentes espécies e cepas bacterianas apresentam distintos mecanismos de ativação do sistema imune e produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, culminando a diferentes respostas imunes no hospedeiro (MOHLER et al., 2003)

Recentemente foi reportado por Mantovani e colaboradores (2012), que algumas cepas de *A. xylosoxidans* podem apresentar um fator citotóxico ainda desconhecido, importante na patogenia do microrganismo. Sobrenadante de cultura de cepas isoladas de pacientes com Fibrose cística (FC) induziram alterações nas células pulmonares, provocando aumento do número de vacúolos citoplasmáticos e ativando mecanismos de morte celular. Além disso, estimularam a produção da citocinas IL-6 e da quimiocinas IL-8, que estão envolvidas em processos inflamatórios. Essas proteínas, quando liberadas continuamente, causam dano tecidual e declínio da função tecidual, agravando o quadro clínico do paciente, especialmente na FC (Mantovani et al., 2012).

A resistência à antibióticos é bastante reportado em humanos infectados por *A. xylosoxidans*. Ela ocorre pela capacidade que o patógeno tem em formar biofilme e pela seleção natural desenvolvida com o tratamento antimicrobiano prolongado em pacientes com infecções persistentes. *A. xylosoxidans* apresenta também multiresistência inata a diversos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas (exceto ceftazidime), azetreonam e aminoglicosídeos (KEAYS et al., 2009). Bador e colaboradores (2011) demonstraram que um dos mecanismos envolvidos na multirresistência inata é um sistema de efluxo denominado AxyABM, além da produção das enzimas β -lactamases e oxacillinases, que tornam as infecções por *A. xylosoxidans* recorrentes, crônicas e de difícil remissão. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a infecção por *A. xylosoxidans* afeta especialmente pacientes imunossuprimidos, podendo causar bacteremia, meningite, infecções das vias urinárias, abscessos, osteomielites e endocardites (SPEAR, et al., 1988). As principais doenças que predispõem a infecção pulmonar pelo *A. xylosoxidans* é a fibrose cística (FC) e a doença

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), causando nesses grupos de indivíduos altos índices de mortalidade e diminuição da qualidade de vida (MOGAYZEL, et al., 2010). Doenças malignas e o tratamento quimioterápico também estão associados ao favorecimento de infecções por *A. xylosoxidans*, provocando sepse nesses pacientes (AISENBERG et al., 2004, DUGGAN et al., 1996 e LEGRAND; ANAÏSSIE 1992). Dados da literatura reportam casos mais raros de infecções graves por *A. xylosoxidans*, como os descritos por Eshwara e colaboradores (2011), que descreveram um caso de pancreatite aguda necrotizante com evolução para pseudocisto pancreático e outro de infecção da ferida de um carcinoma ductal metastático de mama. Apesar de pouco reportado, a infecção por *A. xylosoxidans* na DPOC, é crescente. Angrill e colaboradores (2002), ao avaliarem a colonização do trato respiratório de indivíduos com DPOC, através da análise microbiológica do lavado bronco alveolar e escarro, encontraram menos de 1% de indivíduos colonizados. No entanto, mais recentemente, Renom e colaboradores (2010) encontraram 27,5% de pacientes infectados com *A. xylosoxidans* ou *Stenotrophomonas maltophilia*, outro patógeno gram-negativo emergente.

Apesar da crescente descrição de infecções por *A. xylosoxidans* em pacientes com câncer e com DPOC, a FC é a principal doença que favorece a colonização do trato respiratório por esse patógeno. Vários autores reportaram infecções e co-infecções nos indivíduos acometidos por FC, que por sua vez, se tornam crônicas, acarretando dano tecidual extenso com perda gradativa da funcionalidade do pulmão, levando o indivíduo a óbito (HANSEN et al., 2006; SPILKER et al., 2013; GIBSON et al., 2003). Lambíase e colaboradores (2011), em um recente estudo com 300 pacientes com FC, encontraram 53 deles infectados com *A. xylosoxidans* (17,6%) sendo que destes, 11,3% apresentaram co-infecção com *Pseudomonas aeruginosa*. Outro fator agravante da infecção pelo *A. xylosoxidans* nos indivíduos com FC é a facilidade de aquisição do patógeno. No estudo de Kanellopoulou e colaboradores (2004), cinco de nove pacientes que frequentavam o mesmo hospital, estavam infectados com cepas clones de *A. xylosoxidans*, o que pode contribuir para o aumento da frequência das infecções por esse patógeno.

1.2. Mediadores lipídicos e suas funções em imunomodulação

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Mediadores lipídicos são substâncias biologicamente ativas derivadas do metabolismo do ácido araquidônico (AA). O AA está presente em membranas celulares e é liberado pela ação das enzimas fosfolipases A₂ e C (PLA₂ e PLC) frente a um estímulo físico, químico ou biológico (MONCADA; HIGGS, 1988; AXELROD et al., 1988). Após sua liberação, o AA pode ser convertido por algumas enzimas, como as ciclooxigenases 1 ou 2 (COX-1 ou 2), as lipoxigenases – 5, 12 ou 15 (5, 12 ou 15 – LO) ou as epoxigenases do citocromo. Quando convertido pela COX 1 ou 2 o AA gera as prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXs). Quando convertido pelas lipoxigenases 5, 12 ou 15 geram leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) e as vias da epoxigenase levam a produção de ácidos epoxieicosatetraenóicos (EETs). Esses mediadores ativos são capazes de modular a resposta imune por se ligarem a receptores inibitórios ou excitatórios em diferentes células e tecidos (SERHAN et al., 1996; PARK et al., 2012).

A partir da ação das enzimas COX-1 ou COX-2 no AA liberado das membranas celulares e nucleares, é formada a prostaglandina H₂ (PGH₂), que pode dar origem a diversas outras prostaglandinas (PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}). A enzima COX-1 é constitutivamente expressa na maioria das células e é responsável pela produção basal de prostanóides envolvidos em processos fisiológicos. Já a COX-2 é induzida em vários tipos celulares por citocinas e fatores de crescimento e é responsável pelo aumento de prostanóides durante a inflamação, infecção e injúria tecidual (GILROY et al., 1999; MEDEIROS et al., 1999; FELDMAN; MCMAHON, 2000; MEDEIROS et al., 2004; MACHADO et al., 2005; MACHADO et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). As PGs são importantes metabólitos associados a diversas funções no organismo, como agregação plaquetária, função renal, estimulação da liberação de neurotransmissores e modulação da resposta imunológica (ROCCA; FITZGERALD, 2002; HARRIS et al., 2002; LAWRENCE et al., 2002).

Especificamente, a PGE₂, uma das PGs mais importantes, pode ser produzida por várias células, incluindo macrófagos, fibroblastos e células tumorais malignas (LAWRENCE, et al., 2002). A PGE₂ apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunossupressivas (TILLEY et al., 2001). Sua ação ocorre a partir da ligação a um ou a uma combinação de seus quatro subtipos de receptores (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) (HATA; BREYER, 2004; YAO et al., 2013; KALINSKI, 2012). Esses receptores são do tipo rodopsina, contendo sete domínios transmembrana hidrofóbicos acoplados por suas sequências intracelulares a proteínas G específicas, sinalizando por diferentes segundos mensageiros (HONDA et al., 1993; BREYER et al.,

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

2001; HARRIS, *et al.*, 2002; HATA *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2013; KALINSKI *et al.*, 2012). A PGD₂ e seu metabólito, 15-PGJ₂, apresentam também propriedades anti-inflamatórias e de imunorregulação através da ligação a dois receptores específicos, o receptor prostanóide D (DP1) e o “chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 lymphocytes” (CRTH2 ou DP2) (JOO; SADIKOT, 2007; MURATA *et al.*, 2013; PTTIPHER, 2008; GILROY *et al.*, 1999; HIRAI *et al.*, 2001).

Um dos principais inibidores seletivos da enzima COX-2 é o celecoxibe (FITZGERALD; PATRONO, 2001; SIMMONS *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* realizados por nosso grupo de pesquisa demonstram aumento na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares após inibição da COX-2 com o celecoxibe. Esses dados demonstram a propriedade imunossupressiva da PGE₂, que ao inibir a fagocitose pelos macrófagos alveolares, contribui para a diminuição da morte microbiana e aumento do processo inflamatório (PEREIRA, *et al.*, 2013). Aronoff e colaboradores (2004) haviam previamente descrito que a inibição da fagocitose em macrófagos alveolares mediada pela PGE₂ está diretamente relacionada a ligação ao receptor EP₂ e ao aumento do AMPc intracelular. Além disso, no estudo de Stables e colaboradores (2010), de maneira semelhante, é visto que a inibição da síntese de PGE₂ ou da sinalização via o receptor EP₂, em células sanguíneas humanas, melhora significativamente a resposta contra *Streptococcus pneumoniae*, inclusive de cepas resistentes a antimicrobianos. Reforçando esses achados, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a inibição da síntese de prostanóides pelo tratamento com celecoxibe aumenta a sobrevivência de animais infectados com inóculo letal de *Histoplasma capsulatum*, além de induzir aumento da produção de óxido nítrico (NO) e diminuição de unidades formadoras de colônia (UFC) nos pulmões e baço (PEREIRA *et al.*, 2013). Do mesmo modo, Sadikot e colaboradores (2007) mostraram que a ausência da PGE₂ ou do receptor EP₂, aumenta a eliminação do patógeno na infecção por *Pseudomonas aeruginosa* e Aronoff e colaboradores (2012) mostraram que a PGE₂ prejudica a imunidade inata durante infecções graves como na pneumonia por *S. pneumoniae*.

Além das PGs, outros mediadores lipídicos importantes são os LTs. Estes são produzidos após liberação do AA das membranas e transformação em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que devido a sua instabilidade é rapidamente convertido para leucotrieno A₄ (LTA₄). A transformação do AA em LTA₄ só é possível quando a 5-LO é transportada do citosol para a membrana nuclear e ativada pela Proteína Ativadora da 5-Lipooxigenase (FLAP) (DIXON *et al.*, 1990). LTA₄ é hidrolizado

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

enzimaticamente pela LTA₄ hidrolase formando LTB₄, ou convertida para LTC₄ após conjugação de LTA₄ com glutathione reduzida pela ação da enzima LTC₄ sintase. LTC₄ por sua vez, pode ser convertido a LTD₄ e LTE₄ pela ação da gama-glutamil transferase (LEWIS; AUSTEN, 1984). Os LTs são importantes mediadores da inflamação e participam de várias doenças como asma, colites ulcerativa, artrite reumatoide, psoríase entre outras. O LTB₄, produzido em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e eritrócitos, possui atividade quimiotática, promove ativação de neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (FUNK, 2001; TAGER; LUSTER, 2003). Os cisteinil-leucotrienos (cys-LTs), que incluem o LTC₄, LTD₄ e LTE₄, são produzidos por macrófagos, mastócitos, eosinófilos e basófilos e são responsáveis por vasoconstricção, broncoconstricção, aumento da permeabilidade capilar e ativação de leucócitos (HUI; FUNK, 2002).

Para que ocorram as ações biológicas dos LTs, a ligação do mediador com seus receptores específicos é fundamental. O LTB₄ possui dois receptores de membrana, o BLT₁ e o BLT₂, acoplados a proteínas G, sendo o BLT₁ um receptor de alta afinidade (K_d ≈ 0,4nM), que está associado a atividade quimiotática e quimiocinética do LTB₄. Para os cys-LTs, existem dois receptores conhecidos os Cys-LT₁ e Cys-LT₂ (FUNK, 2005; TAGER; LUSTER, 2003). Existem vários inibidores da síntese de leucotrienos ou da sua ligação a seus receptores específicos. Dentre eles, podemos citar os inibidores da PLA₂, como os glicocorticoides (NEWTON, 2000), inibidores da FLAP, como o MK886 (GILLARD et al., 1989; BELL; HARRIS, 1999), inibidores da 5-LO, como o zileuton (FUNK, 2005), antagonistas dos receptores de LTs, como o zarfilukast, pranlukast e montelukast e antagonistas dos receptores de PGs, como Ridogrel, AH-6809, L-161982 e outros (JONES et al., 2009; FUNK, 2001). Nosso grupo de pesquisa tem avaliado o papel dos LTs em diversos modelos de infecção. O estudo de Medeiros e colaboradores (1999) demonstraram que durante a infecção pelo *H. capsulatum* os LTs são produzidos e estão envolvidos no recrutamento de células do sistema imune e posteriormente (2004) demonstraram que os leucotrienos são importantes para uma eliminação eficiente do fungo nos pulmões e na imunorregulação. Esses dados foram corroborados utilizando camundongos deficientes de 5-LO (5-LO^{-/-}) que apresentaram piora na progressão da histoplasmose, devido ao comprometimento da morte das leveduras pelos macrófagos infectados, diminuição da produção de NO, diminuição da fagocitose e dificuldade de formação de células T efectoras (SECATTO et al., 2012). O estudo de Peres-Buzalaf (2011) e colaboradores também avaliou o papel dos LTs e das PGs em modelo de

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

infecção pulmonar pelo *Mycobacterium tuberculosis* e demonstraram que na ausência de PGs o patógeno é eliminado dos pulmões, aumentando a sobrevida dos animais, enquanto, que na ausência dos LTs o patógeno se prolifera nos pulmões, diminuindo a sobrevida.

Outros estudos também mostraram o papel dos LTs em infecções. Na infecção viral pelo vírus sincicial respiratório (VSR) o bloqueio da ligação dos LTs em seus receptores através da administração de montelukast, antagonista de Cys-LT₁ diminuiu a inflamação pulmonar (WEDDE-BEER *et al.*, 2001). Na infecção por *Trypanosoma cruzi*, o tratamento com o antagonista do receptor BLT inibiu parcialmente a produção de IFN- γ , NO e TNF- α com consequente aumento da parasitemia (TALVANI *et al.*, 2002). Com base nesses dados, podemos dizer que os LTs exercem um papel crucial na eliminação de patógenos.

1.3. Mediadores lipídicos nas doenças que predisõem a infecção por *A. xylosoxidans*

Dentre as doenças que predisõem o desenvolvimento de infecção pulmonar por *A. xylosoxidans*, a FC, a DPOC e o câncer são as mais comuns. Pacientes com essas doenças apresentam produção aumentada de mediadores lipídicos, especialmente PGE₂ (STRANDVIK, *et al.*, 1996; NJORGE, *et al.*, 2011; MEDJANE, *et al.*, 2005; ZAKRZEWSKI *et al.*, 1987) e LTB₄ (YANG *et al.*, 2012). Em estudo com 19 pacientes portadores de FC de diferentes idades, Strandvik e colaboradores (1996) encontraram, por meio da técnica de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas, elevada taxa de excreção urinária de PGE₂, TXB₂ e seus metabólitos. Esses dados foram corroborados pelo estudo de Jabr e colaboradores em 2013, os quais investigaram a excreção urinária de metabólitos de PGE₂ e PGD₂ em 59 indivíduos, sendo 35 com FC e 24 saudáveis. Neste estudo os autores encontraram uma taxa elevada de excreção de metabólitos de PGE₂ e PGD₂ quando comparados aos indivíduos saudáveis. Além disso, a taxa de excreção dos metabólitos de PGE₂ foi correlacionada com maior severidade da doença.

Outro estudo que demonstra a importância dos mediadores lipídicos na FC é o trabalho de Yang e colaboradores (2012) que, através da análise metabolômica do escarro de pacientes com FC, encontraram altos níveis de diversos mediadores lipídicos como PGE₂, LTB₄, RVE₁ (resolvina E₁) e TXB₂. Os autores encontraram correlação entre a concentração de RVE₁ com melhor progressão da doença. Por outro lado, altos níveis de LTB₄ e PGE₂ foram encontrados em indivíduos fibrocísticos que apresentaram um pior prognóstico da

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

doença (Yang *et al.*, 2012). Lucidi e colaboradores (2008) demonstraram que uma grande quantidade de PGE₂ é exalada do pulmão por esses pacientes. Njoroge e colaboradores (2011) encontraram aumento na expressão tanto da enzima COX-2 quanto da 5-LO em células epiteliais pulmonares de pacientes FC, indicando maior produção de PGE₂ e LTB₄. Medjane e colaboradores (2005) também demonstraram aumento de PGE₂ e da atividade da enzima COX-2 em células epiteliais de pacientes com FC. Além disso, pacientes com FC apresentam diminuição do ácido docosahexaenóico (ADH) e do ácido linoleico (AL) e variável aumento do AA (NJOROGÉ, *et al.*, 2011; FREEDMAN *et al.*, 2004). Essas diferenças parecem ser importantes para a fisiopatologia da FC e vários autores têm estudado as consequências da suplementação de ácidos graxos essenciais (AGE⁺) durante o processo inflamatório observado tanto em pacientes como em modelos murinos da doença (OLIVER; JAHNKE, 2011; WOOD, *et al.* 2001). Em conjunto esses dados sugerem que existe correlação entre mediadores lipídicos e a severidade da FC, embora a presença ou ausência de infecções ainda é contraditória e precisa ser melhor estudada (CONWAY *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2012). O que se sabe atualmente é que eles estão presentes em diversas secreções de pacientes fibrocísticos, (urina, escarro, lavado bronco alveolar, condensado respiratório e soro) provavelmente desempenhando papel na defesa contra os patógenos (KARP *et al.*, 2005; JABR *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2012; STRANDVIK *et al.*, 1996; CHIRON *et al.*, 2008; SCHMITT-GROHÉ *et al.*, 2002; PASTORE *et al.*, 2007; ZAKRZEWSKI *et al.*, 1987; KONSTAN *et al.*, 1993; REID *et al.*, 2007; CARPAGNANO *et al.*, 2003).

Na DPOC alta produção de mediadores lipídicos também é descrito. Mitsunobu e colaboradores (2001) encontraram maior produção de LTB₄ e LTC₄ por leucócitos do sangue periférico de indivíduos com DPOC quando comparado com indivíduos saudáveis, sendo este aumento associado a pior prognóstico na doença e também no escarro de indivíduos com DPOC e FC. Zakrzewski e colaboradores (1987) encontraram altas concentrações de LTB₄, cys-LTs, PGs e TXs, sendo que os estudos de Chen e colaboradores (2008) e de Montuchi e Barnes (2002) corroboram parte desses dados, mostrando produção aumentada de PGE₂. Além disso, macrófagos alveolares de pacientes com DPOC apresentaram aumento da expressão de COX-2 quando comparados com indivíduos saudáveis (TAHA *et al.*, 2000).

Diferentes estudos têm demonstrado ainda a presença de elevadas concentrações de mediadores lipídicos e seus metabólitos, assim como aumento na expressão de enzimas responsáveis por esta formação em vários tipos de câncer (PARK *et al.*, 2012), incluindo o

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

câncer de cólon (SHUREIQI et al., 1999), de pulmão (GONZALEZ et al., 2004), de próstata (SHAPPELL et al., 1999; TANG et al., 2007) e outros (JIANG et al., 2003; ÖHD et al., 2003; GUPTA et al., 2001), sendo que, a presença desses mediadores têm sido associado ao desenvolvimento e progressão direta e indireta de tumores (CHEN et al., 2004; KRISHNAMOORTHY; HONN, 2011; SEMENZA, 2010). Neste contexto, a PGE₂ favorece a adesão, migração e invasão tumoral (MENTER; DUBOIS, 2012), e os LTs favorecem a carcinogênese (SAKAI et al., 2012; STEELE et al., 1999; WANG E DUBOIS, 2010). Foi demonstrado também que a PGE₂ promove a sobrevivência de células malignas por inibir a apoptose e induzir a proliferação celular, além de aumentar a progressão tumoral por alterar a morfologia e promover o aumento da motilidade e migração dessas células. De forma direta, a PGE₂ induz metástase promovendo a síntese de metaloproteinases de matriz (MMPs) e estimulando a angiogênese (HARRIS, et al., 2002). Estes dados em conjunto, sugerem que o desequilíbrio na produção desses mediadores predispõe a infecção por *A. xylosoxidans* nas doenças como a FC, a DPOC e o câncer.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

2. Justificativa

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Pacientes com FC, DPOC e câncer apresentam maior prevalência de infecções pulmonares por *A. xylosoxidans* sendo que todas essas doenças têm em comum produção aumentada de mediadores lipídicos, especialmente PGs e LTs. Sabe-se que as PGs e os LTs são importantes moduladores da resposta imune em diversas doenças infecciosas, uma vez que PGs promovem supressão, dificultando a erradicação de patógenos e os LTs promovem melhor ativação do sistema imune e erradicação de patógenos. No entanto, até o presente nenhum estudo foi realizado para demonstrar a contribuição das PGs e LTs na infecção experimental por *A. xylosoxidans*. Diante disso, nós hipotetizamos que as PGs e LTs são induzidos durante a infecção pulmonar por *A. xylosoxidans* e podem participar dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

3. Objetivos

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

3.1. Objetivo

Nosso objetivo foi avaliar a produção e relevância dos mediadores lipídicos na infecção experimental por *A. xylosoxidans*.

3.2. Estratégias utilizadas

Para atingir nosso objetivo, inicialmente determinarmos o inóculo letal e subletal de *A. xylosoxidans* para infecção de camundongos C57Bl/6. A seguir, avaliamos em animais infectados, tratados ou não com o inibidor da produção de PGs (celecoxibe) ou inibidor da produção de LTs (MK886), os seguintes parâmetros:

1. A curva de sobrevivência.
2. A cinética de recrutamento celular para o espaço bronco alveolar.
3. A recuperação de unidades formadoras de colônias (UFCs) nos pulmões.
4. A produção de citocinas, quimiocinas, LTB₄ e PGE₂.
5. A frequência de células necróticas e apoptóticas recuperadas do LBA.
6. A quantificação de proteínas do LBA.
7. A análise histopatológica dos pulmões.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

4. Material e Métodos

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

4.1. Animais. Foram utilizados camundongos, adultos (24-28g), da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério Unidade II 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 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo nº 12.1.1652.53.6).

4.2. Obtenção e cultivo de *Achromobacter xylosoxidans*. Foi utilizada a cepa LMG 1863 de *A. xylosoxidans*, gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo FCFRP – USP. A cepa de 1^a passagem foi primeiramente cultivada em caldo “Brain Heart Infusion” BHI (Himedia Laboratories, Vadhani Industrial State, India) acrescido de 10% de glicerol por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e estocada em freezer a -80°C após confirmação de pureza. Anterior a cada experimento a cepa foi cultivada em ágar BHI e mantida em estufa 37°C a 5% de CO₂, após 18 horas de cultivo, as bactérias foram quantificadas através de leitura da D.O. em espectrofotômetro de forma que a suspensão atinja a escala de 21×10^8 bactérias por ml de suspensão.

4.3. Infecção pulmonar por *A. xylosoxidans* através de inoculação intratraqueal. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com Quetamina (150mg/kg) e Xilasina (15mg/kg), segundo recomendações sugeridas no Curso de Manipulação de Animais de Laboratório da FioCruz. Para a inoculação da suspensão bacteriana de *A. xylosoxidans*, os animais anestesiados, tiveram suas traquéias expostas e com o auxílio de uma seringa de insulina foram inoculados i.t. (intratraquealmente) 100 µl de uma entre quatro suspensões bacterianas contendo $2,5 \times 10^7$, $5,0 \times 10^7$, 1×10^8 e 2×10^8 /100µl para determinação dos o inóculos letal e subletal de *A. xylosoxidans*. Após essa determinação com o auxílio do método “Moving Average Interpolation” (WELKOS; O’BRIEN, 1974), os inóculos letal ($6,3 \times 10^7$) e subletal ($2,5 \times 10^7$) foram utilizados durante os demais experimentos. Animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico recebendo 100 µl de solução salina tamponada

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

com fosfato (PBS) estéril (MEDEIROS et al., 2004). Animais infectados e controles foram eutanasiados durante os dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção.

4.4. Tratamento dos animais infectados com inibidor da COX-2 (celecoxibe).

Camundongos infectados com *A. xylosoxidans* foram tratados com o composto Celecoxibe (PHARMACIA, Brasil), previamente diluído em 100 µL de etanol absoluto (Merck, Montreal, Canadá) e acrescido de água, obtendo assim a solução de tratamento. Os animais foram submetidos ao tratamento diário, por via oral com 0,5 mL de solução de celecoxibe, na concentração de 5mg/Kg durante 7 dias para experimento de sobrevivência ou 1mg/Kg, durante 16 dias para os demais. A primeira dose foi administrada 24 horas anterior a infecção, e todas as doses subsequentes uma hora antes da manipulação do (eutanásia). Os animais controles receberam v.o. etanol e água nas mesmas concentrações do diluente do celecoxibe. Animais não infectados não foram tratados com celecoxibe, pois experimentos anteriores do grupo mostraram que não ocorrem alterações relevantes (PEREIRA, et al., 2013).

4.5. Tratamento dos animais infectados com inibidor da FLAP (MK886).

Camundongos infectados com *A. xylosoxidans* foram tratados com o composto MK886 ou L-663,536 (3[1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5isopropilindol-2-yl]-2,2-ácidodimetilpropanóico), doado pela Merck Frosst, Canada Inc. O composto foi diluído conforme instruções do fabricante, em 100 µl de etanol absoluto (MERCK, Montreal, Canadá) e acrescido de água, obtendo assim a solução de tratamento. Os animais foram submetidos ao tratamento diário, por via oral (v.o.) com 0,5 mL de solução de MK886, na concentração de 5mg/kg durante 16 dias. A primeira dose foi administrada 24 horas antes da infecção e todas as doses subsequentes foram administradas uma hora antes da manipulação do animal para eutanásia. Os animais controles receberam v.o. etanol e água nas mesmas concentrações do diluente do MK886. Animais não infectados não foram tratados com MK886, pois experimentos anteriores do grupo não mostraram alterações relevantes (MEDEIROS et al., 2004).

4.6. Delineamento experimental. Suspensão bacteriana de *A. xylosoxidans* foi inoculada i.t. em animais da linhagem C57Bl/6. Os animais foram tratados ou não com inibidores da síntese de PGs ou LTs diariamente durante 16 dias, sendo que a primeira dose do tratamento foi realizada 24 horas antes da infecção. Nos dias de experimento a droga foi administrada

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

sempre uma hora antes da manipulação do animal. Os animais foram eutanasiados nos dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção para avaliação do recrutamento celular para o espaço bronco alveolar, frequência de células necróticas e apoptóticas do LBA recuperação de unidades formadoras de colônias e quantificação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos no parênquima pulmonar. Animais não infectados e não tratados foram utilizados como controle e denominados SHAM. Abaixo, diagrama ilustrando o protocolo experimental.

Grupos experimentais

Nome do grupo	Procedimento
SHAM	Inoculação (i.t.) de PBS no dia 0 e tratamento diário v.o. com água.
Ax + H ₂ O	Inoculação (i.t.) da suspensão letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratamento diário v.o. com água.
Ax + Celecoxibe	Inoculação (i.t.) da suspensão letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratamento diário v.o. com Celecoxibe (1mg/Kg).
Ax + MK886	Inoculação (i.t.) da suspensão letal ou subletal de <i>A. xylosoxidans</i> e tratamento diário v.o. com MK886 (5mg/Kg).

4.7. Análise do recrutamento celular para o espaço bronco alveolar. Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂/O₂ e as células do lavado bronco alveolar foram obtidas através da inserção de um cateter acoplado a uma seringa contendo 1 mL de PBS estéril. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. A contagem de células totais presentes nos lavados foi realizada empregando solução de TurK e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

células foram feitas a partir de lâminas preparadas em citocentrífuga e submetidas à coloração por Panótico Rápido (Laborclin – Paraná, Brasil). Os valores foram expressos em número de células/ml.

4.8. Avaliação da carga bacteriana em pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com inibidor da COX-2 (celecoxibe) ou da FLAP (MK886). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*, os pulmões dos camundongos infectados e tratados ou não com inibidor da COX-2 (celecoxibe) ou da FLAP (MK886) foram processados, como previamente descrito por Medeiros e colaboradores (2004) para obtenção do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de pulmão. Cada animal teve o lobo pulmonar superior esquerdo removido e pesado em placa de Petri estéril contendo 3 ml de meio RPMI-I. Para recuperação das UFC bacterianas o órgão foi cortado em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi estéril e adicionado em tubos de polietileno de 50 ml contendo 7 ml de RPMI-I acrescido de 0,5 µg/ml de liberase (Roche Applied Science – Mannheim, Germany). Os tubos foram mantidos sob agitação por 45 minutos a 150 rpm a 37°C. Após esse período os tecidos foram desprendidos com o auxílio de uma seringa de 10 ml. Diluições seriadas foram realizadas e 100 µl das suspensões foram adicionados em placas de Petri contendo ágar BHI em duplicata. As placas foram incubadas por 36 horas em estufa de CO₂/O₂ a 37°C, as UFCs contadas, e o número de colônias expresso em log por grama de tecido.

4.9. Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) em homogenato de pulmão. Os sobrenadantes do homogenato de pulmão de camundongos infectados que foram coletados e devidamente armazenados a -20°C até o momento das quantificações, foram utilizados para as dosagens das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 (R&D – Minnesota, USA) e das quimiocina KC, MIP-1α e MCP-1 (R&D). As concentrações foram determinadas empregando anticorpos de captura, citocinas/quimiocinas-padrão e anticorpos associados a biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄) aos poços. A leitura das amostras foi feita em filtro de 450 nm. O limite de detecção nestes ensaios é de 7 pg/mL.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

4.10. Quantificação de PGE₂ e LTB₄ por ensaio imunoenzimático (ELISA). Após a coleta dos sobrenadantes dos homogenatos de pulmões, conforme descrito no item 4.11., estes foram separadas para quantificação de mediadores lipídicos e acidificados para precipitação de proteínas. Foi então realizada a separação da fração lipídica das amostras através de purificação utilizando a coluna SEp PAK C18 (Water associates, Milford, Mass). As amostras acidificadas foram vagarosamente passadas através da coluna previamente lavada com 20 ml de etanol absoluto e 20 ml de água MQ (mili-Q). As frações lipídicas foram separadas após lavagens com 1 ml de etanol 35% e 20 ml de água MQ. As amostras de interesse foram então eluídas em 2 ml de etanol absoluto e posteriormente secas em concentrador (speed vaccum) e reconstituídas em 250µl de solução tamponada (Tampão Assay Buffer - Enzo Life Sciences - Farmingdale, NY - USA). Foram adicionados o volume de 100µl de cada amostra em placa de 96 poços fornecida pelo fabricante e a reação enzimática de competição foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Enzo Life Sciences - Farmingdale, NY - USA). A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (Bio Tec Instruments, Inc. - µQuant) com filtro de 450 nm e a concentração de PGE₂ e LTB₄ foi calculada a partir da curva padrão.

4.11. Quantificação de proteínas no LBA. O LBA recuperado foi centrifugado a 400g por 10 minutos a 10° C e estocado em freezer -20° C até o momento da quantificação. O extravasamento de proteínas foi avaliado pelo método de Bradford, empregando “kit” comercial (Pierce, Rockford, USA), conforme especificações do fabricante.

4.12. Histopatologia dos pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com inibidores de COX-2 (celecoxibe) ou inibidor da FLAP (MK886). A histopatologia do pulmonar foi realizada pela empresa Narcisus pesquisa clínica em Ribeirão Preto. Para tanto, o lobo pulmonar direito médio dos camundongos de cada grupo experimental foram removidos após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção. Os tecidos foram fixados em tampão de Millonig (10% de formaldeído), 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio e inclusos em parafina. Cortes histológicos, com 5 µm de espessura foram corados com hematoxilinaeosina (HE) e por fim, foram analisados comparativamente quanto aos componentes celulares e a organização tecidual no parênquima pulmonar dos animais.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

4.13. Análise da proporção de células necróticas e apoptóticas do lavado broncoalveolar. A mesma suspensão de células obtidas do lavado bronco alveolar para quantificação e identificação de leucócitos, como descrito no item 4.8, foram utilizadas para quantificação de células necróticas e apoptóticas. As células obtidas foram adicionadas em tubos apropriados para citometria de fluxo. Em seguida, as hemácias foram lisadas pela adição de cloreto de amônio 0,83% pH=7,2. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS1x e a marcação realizada conforme instruções do fabricante (Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I, - San Diego, USA).

4.14. Análise estatística. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por teste ANOVA (análise de variância) seguido do pós teste de comparações Múltiplas de Newman-Keuls. Para comparação entre duas amostras não pareadas, foi utilizado o test t Student e para análise de sobrevivência foi realizado o teste Log-Rank test e Mantel-Cox no pós-teste. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5. Resultados

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.1. Determinação do inóculo letal e subletal de *A. xylosoxidans* em camundongos.

Para determinação dos inóculos letal e subletal de *A. xylosoxidans*, realizamos a curva de sobrevivência de animais infectados i.t. com 100 µl contendo diferentes quantidades de bactéria. A partir de dados da literatura, partimos de suspensões contendo $2,0 \times 10^8$, 1×10^8 , $5,0 \times 10^7$, $2,5 \times 10^7$. O grupo controle recebeu 100 µl de solução de PBS estéril. A figura 1 mostra a porcentagem de sobrevida dos animais infectados com os diferentes inóculos de *A. xylosoxidans*. Podemos observar que animais que receberam o maior inóculo apresentaram 100% de morte até o terceiro dia de infecção, enquanto, que camundongos que receberam menor inóculo obtiveram 100% de sobrevivência até o período de 14 dias. Para o cálculo do inóculo letal utilizamos a equação matemática “Moving Average Interpolation” (WELKOS E O'BRIEN, 1974), que prediz o inóculo bacteriano capaz de levar 50% dos animais a óbito (DL_{50} ou inóculo letal) a partir dos dados utilizados para determinação da curva de sobrevivência. Como demonstrado na figura 1, podemos observar que o inóculo letal se encontra entre $5,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ bactérias/100 µl. Sendo assim, após o cálculo descrito abaixo utilizando o método matemático “Moving Average Interpolation”, encontramos que o inóculo letal é igual a $6,3 \times 10^7$ bactérias/mL. O inóculo subletal, por outro lado, foi facilmente determinado apenas pela curva de sobrevivência, e que corresponde a $2,5 \times 10^7$ bactérias, que como mostrado na Figura 1, é o maior inóculo da curva que mantém 100% dos animais vivos (WELKOS E O'BRIEN, 1974).

D= menor dose da curva

d= log do fator de diluição entre as doses

k= número de doses usadas na curva - 1

f= constante da tabela de mortalidade

$$\log DL_{50} = \log D + \frac{d(k-1)}{2} + df$$

$$\log DL_{50} = \log(2,5 \times 10^7) + \frac{0,3(3-1)}{2} + 0,3(0,33)$$

$$\log DL_{50} = 7,398 + 0,3 + 0,099 = 7,797$$

$$DL_{50} = 10^{7,792} = 6,3 \times 10^7$$

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 1: Curva de sobrevivência utilizada para determinação do inóculo letal e subletal de *A. xylosoxidans* em camundongos. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com 100 μ l de uma entre quatro suspensões bacterianas contendo $2,5 \times 10^7$ ou $5,0 \times 10^7$ ou $1,0 \times 10^8$ ou $2,0 \times 10^8$ bactérias/ml. Como controle, os animais receberam 100 μ l de PBS estéril. Experimento representativo de dois experimentos independentes (n = 6).

5.2. Efeito do tratamento com Celecoxibe na sobrevivência de animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*.

Para avaliar a importância das PGs na infecção experimental por *A. xylosoxidans*, utilizamos como estratégia de estudo a inibição da produção desse mediador empregando o composto celecoxibe, um inibidor seletivo da enzima COX-2. Utilizando o inóculo letal ($6,3 \times 10^7$), observamos que os camundongos infectados que receberam o veículo (água) ou o Celecoxibe (1mg/kg), tiveram igualmente 50% de sobrevivência em comparação com 100% de sobrevivência dos camundongos não infectados (Figura 2A).

Também camundongos infectados com o inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$), tratados ou não o celecoxibe (1mg/kg), apresentaram a mesma porcentagem de sobrevivência, sendo que neste caso 100% dos animais permanecem vivos em até 14 dias (Figura 2B). Como não observamos alteração da sobrevivência após o tratamento com 1 mg/kg de celecoxibe, utilizamos também a dose de 5 mg/kg do composto, para o tratamento de animais infectados com inóculo letal

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

durante sete dias. Como mostra a Figura 2 C, não houve mudança significativa na mortalidade dos animais infectados tratados com veículo e infectados tratados com celecoxibe (5 mg/kg), durante os 7 dias de observação. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que as PGs não participam dos mecanismos de morte com inóculo letal ou subletal. No entanto, futuramente iremos realizar uma curva dose-resposta para confirmar esses resultados.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 2: Tratamento com celecoxibe não altera a sobrevida de animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*. Animais da linhagem C57Bl/6 foram tratados ou não com celecoxibe diariamente (v.o.) na dose de 1mg/kg/dia (Figura 2A e 2B) ou 5mg/kg/dia (Figura 2C) e infectados (i.t) com 100 µl de suspensão bacteriana contendo (A e C) $6,3 \times 10^7$ bactérias/100 µl (inóculo letal) ou (B) $2,5 \times 10^7$ bactérias/100 µl (inóculo subletal). Animais controles receberam 100 µl de PBS estéril. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 14 dias (Figura 2 A e B) ou 7 dias (Figura 2 C). Dados representativos de dois experimentos independentes (n=8) (Figura 2 A e B). Teste estatístico: log-rank test (Mantel-Cox) $p < 0,05$. * infectados vs SHAM.

5.3. Efeito do tratamento com MK886 na sobrevida de animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*.

Para avaliar a importância dos LTs na infecção experimental por *A. xylosoxidans* realizamos o tratamento diário dos animais infectados com inóculo letal ($6,3 \times 10^7/100$ µl) ou subletal ($2,5 \times 10^7/100$ µl), de *A. xylosoxidans* com o inibidor da proteína ativadora da 5-LO (FLAP), o composto MK886 na dose de 5mg/Kg. Observamos que a inibição da síntese dos LTs alterou significativamente a sobrevida dos animais infectados com ambos os inóculos. Animais infectados e tratados com MK886 apresentaram aumento significativo da mortalidade quando comparados com animais infectados e tratados com veículo, os quais tiveram 75% e 65% de morte após infecção com $6,3 \times 10^7$ (inóculo letal) e $2,5 \times 10^7$ bactérias (inóculo subletal), respectivamente (Figura 3 A e B). Dessa forma, podemos sugerir que os LTs desempenham um papel fundamental nos mecanismos que levam a morte do hospedeiro durante a infecção por *A. xylosoxidans*.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 3: Tratamento com MK886 diminui a sobrevivência de animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*. Animais da linhagem C57Bl/6 tratados ou não com MK886 diariamente (v.o.) na dose de 5mg/Kg e infectados (i.t) com 100 µl de suspensão bacteriana contendo (A) inóculo letal ($6,3 \times 10^7$ bactérias/100 µl) ou (B) inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bactérias/100 µl). Animais controles receberam 100 µl de PBS estéril. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 14 dias. Dado representativo de dois experimentos independentes (n=6). Teste estatístico: log-rank test (Mantel-Cox) $p < 0,05$. * infectados vs não infectados (SHAM); # infectados tratados vs infectados não tratados.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.4. Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar em animais infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com celecoxibe ou MK886.

Para avaliar se o tratamento com celecoxibe (1mg/kg) ou MK886 (5mg/kg) altera o recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* realizamos a lavagem do espaço bronco alveolar nos dias 1, 3 ,7 e 14 após a infecção. Observamos que o pico de infiltrado neutrofílico ocorreu no dia 3 após a infecção, com redução a partir do sétimo dia (Figura 4A). Quanto ao número de células mononucleares, observamos maior infiltrado no sétimo dia (Figura 4B). O tratamento com celecoxibe não alterou a migração de neutrófilos e células mononucleares em nenhum dos dias de experimento. Por outro lado o tratamento com MK886 reduziu significativamente o número de neutrófilos somente no primeiro dia após a infecção, enquanto aumentou o número de células mononucleares no terceiro dia, provavelmente como um mecanismo compensatório da redução de neutrófilos (Figura 4A e B).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 4: Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco alveolar em animais infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com celecoxibe ou MK886. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com celecoxibe (1mg/Kg/dia) ou com MK886 (5mg/Kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados e as células do espaço bronco alveolar recuperadas. (A) neutrófilos e (B) células mononucleares foram diferencialmente contadas em lâminas coradas com Panótico Rápido. Dado representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM. Teste ANOVA, pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison Test. n = 5-8, p<0,05. * infectados vs não infectados (SHAM); # infectados não tratados vs infectados tratados e & infectados e tratados com celecoxibe vs infectados e tratados com MK886.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.5. Inibição da síntese de PGs ou LTs não altera a carga bacteriana recuperada dos pulmões de camundongos infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*

Para avaliar se o aumento na mortalidade observado nos animais infectados e tratados com MK886 ocorre devido a replicação dos bacilos, determinamos a carga bacteriana presente nos pulmões dos animais infectados e tratados ou não com este composto. Como controle experimental as UFCs também foram determinadas nos pulmões de animais infectados e tratados com celecoxibe. Observamos que durante o curso da infecção, o número de bactérias diminui gradativamente do parênquima pulmonar, desaparecendo totalmente até o 14º dia (N.R. = não recuperado) (Figura 5A e B). Os animais infectados com inóculo letal ($6,3 \times 10^7$ bacilos/100 µl) (Figura 5A) ou subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 µl) (Figura 5B) tratados com celecoxibe ou MK886 não apresentaram mudanças nas UFCs recuperadas em nenhum dos dias analisados. Esses resultados sugerem que os LTs exercem sua função protetora por um mecanismo diferente da eliminação do patógeno nos pulmões.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 5: Inibição das prostaglandinas ou leucotrienos não altera a carga bacteriana nos pulmões de animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com (A) inóculo letal ($6,3 \times 10^7$ bacilos/100 µl) ou (B) inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 µl) de *A. xylosoxidans* e tratados v.o. com celecoxibe (1mg/Kg/dia) ou MK886 (5mg/Kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados e o lobo esquerdo do pulmão foi retirado, macerado e plaqueado em ágar BHI para posterior contagem de UFC, após 36 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Dado representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM (n = 5-8). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas entre os grupos. N.R. = não recuperado.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.6. Concentração de citocinas e quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos infectados com *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

O nosso próximo passo foi investigar se os LTs poderiam alterar a produção de citocinas e quimiocinas durante a infecção subletal por *A. xylosoxidans*. Para isto, avaliamos a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Figura 6 A, B e C), KC, MIP-1 α e MCP-1 (Figura 7 A, B e C) no parênquima pulmonar de animais infectados e tratados ou não com o inibidor da síntese de LTs (MK886). Observamos que a infecção pelo *A. xylosoxidans* foi capaz de induzir a liberação significativa de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e das quimiocinas KC, MCP-1 e MIP-1 α especialmente nos dias 1 e 3 após a infecção (Figuras 6-7). Observamos que o tratamento com MK886 foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-6 no dia 14 após a infecção, enquanto aumentou a produção de TNF- α e IL-1 β no dia 7 após a infecção (Figura 6 A, B e C). Quanto as quimiocinas, observamos que o tratamento com MK886 aumentou significativamente a produção de KC no dia 14 após a infecção e MIP-1 α no dia 7. Valores de MCP-1 não foram alterados pelo tratamento (Figura 7 A, B e C).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 6: Concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante do homogenato pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886 (5mg/Kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado quanto à

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

produção de (A) TNF- α , (B) IL-1 β e (C) IL-6 pelo método de ELISA sanduíche. Dado representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM (n = 5-8). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * infectados vs não infectados (SHAM); # infectados não tratados vs infectados tratados.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 7: Concentração de KC, MIP-1 α e MCP-1 no sobrenadante do homogenato pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886 (5mg/Kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi retirado, homogeneizado e avaliado quanto à produção de KC, MIP-1 α e MCP-1 pelo método de ELISA sanduiche. Dado representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM (n = 5-8). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * infectados vs não infectados (SHAM); # infectados não tratados vs infectados tratados.

5.7. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

Análise histopatológica dos pulmões de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* mostram intenso infiltrado celular. No dia 1 após a infecção (Figura 8) podemos observar que há uma discreta diferença entre o grupo tratado com veículo e tratado com MK886, sendo que os animais tratados com MK886 apresentaram menor infiltrado leucocitário, dados que corroboram com os obtidos com células recuperadas do espaço bronco alveolar ou LBA (Figura 4 A e B). Assim como observamos com as células do LBA, o infiltrado de leucócitos aparentemente foi focalmente mais pronunciado no dia 3 (Figura 9) após a infecção, acompanhado de destruição da arquitetura tecidual e intenso extravasamento de eritrócitos. Já no dia 7, o aumento de infiltrado celular nos animais infectados e tratados com MK886 parece ser mais difuso, embora haja indícios de remodelamento tecidual (Figura 10) nos animais que sobreviveram. No dia 14, há diminuição do infiltrado celular em ambos os grupos (Figura 11).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 8: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Cortes histológicos de pulmão de camundongos após 1 dia de infecção i.t. com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. A, B e C tratados com veículo e C, D e E tratados diariamente com MK886 (5mg/kg). Coloração Hematoxilina e eosina (HE). Aumento: 25X (A e D), 100X (B e E) e 400X (C e F).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 9: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Cortes histológicos de pulmão de camundongos após 3 dias de infecção i.t. com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. A, B e C tratados com veículo e C, D e E tratados diariamente com MK886 (5mg/Kg). Coloração Hematoxilina e eosina (HE). Aumento: 25X (A e D), 100X (B e E) e 400X (C e F).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 10: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Cortes histológicos de pulmão de camundongos após 7 dias de infecção i.t. com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. A, B e C tratados com veículo e C, D e E tratados diariamente com MK886 (5mg/Kg). Coloração Hematoxilina e eosina (HE). Aumento: 25X (A e D), 100X (B e E) e 400X (C e F).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 11: Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Cortes histológicos de pulmão de camundongos após 14 dias de infecção i.t. com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. A, B e C tratados com veículo e C, D e E tratados diariamente com MK886 (5mg/Kg). Coloração Hematoxilina e eosina (HE). Aumento: 25X (A e D), 100X (B e E) e 400X (C e F).

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.8. Frequência de células necróticas e apoptóticas no LBA de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

Para avaliar se a infecção e o tratamento poderia alterar a viabilidade das células do LBA, investigamos a frequência de células necróticas e apoptóticas de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. Observamos que um dia após a infecção, a bactéria induz aumento da apoptose dos leucócitos recrutados para o LBA, indicado pela marcação da anexina na superfície celular (Figura 12 A). Por outro lado, nos dias 1 e 3 observamos redução da frequência de células em necrose e apoptose tardia, como indicado pela marcação por iodeto de propídio (PI) e dupla marcação Anexina e PI respectivamente (Figura 12 B e C). No entanto, quando comparados com animais infectados tratados com veículo, o tratamento com MK886, no terceiro dia, diminuiu, embora de modo não significativo, a porcentagem de células em apoptose recuperadas do LBA, e aumentou a necrose tardia no dia 7 após a infecção com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Figura 12: Frequência de células necróticas e apoptóticas recuperadas do LBA de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

tratados com MK886 (5mg/kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, e a frequência de células necróticas e apoptóticas recuperadas do LBA foi avaliado por citometria de fluxo quanto a marcação para anexina e PI. Dado representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM (n = 5-6). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * vs SHAM.

5.9. Concentração de LTB₄ no tecido pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

A seguir avaliamos se a infecção subletal com *A. xylosoxidans* induz aumento de LTB₄ nos pulmões, e se o tratamento com MK886 foi efetivo em inibir a produção deste mediador no tecido pulmonar (Figura 13). Notamos que a infecção aumenta a produção de LTB₄ nos dias 1 e 3, e que o tratamento com MK886 foi eficiente em reduzir a produção nesses dias.

Figura 13: Concentração de LTB₄ no tecido pulmonar de camundongos infectados com *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e tratados com MK886 (5mg/kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados e o homogenato purificado para extração de lipídeos e quantificação de LTB₄ pelo método de ¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

ELISA de competição. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de um experimento ($n = 3-5$). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * vs SHAM; # vs infectado não tratado.

5.10. Concentração de PGE_2 no tecido pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886.

A seguir avaliamos se a infecção subletal com *A. xylosoxidans* induz aumento de PGE_2 nos pulmões e se o tratamento com MK886 aumenta a produção desse mediador. Observamos que a infecção promove aumento de PGE_2 nos pulmões, embora os resultados apresentados não mostraram diferenças significativas. Por outro lado, o tratamento com MK886 aumenta significativamente a produção de PGE_2 , o que provavelmente é responsável pela mortalidade dos animais tratados (Figura 14).

Figura 14: Concentração de PGE_2 no tecido pulmonar de camundongos infectados com *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μl) de *A. xylosoxidans* e tratados com MK886 (5mg/kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados e o homogenato purificado para extração de lipídeos e quantificação de PGE_2 pelo método de ELISA de competição. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de um experimento ($n = 3$). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * vs SHAM; # vs infectados não tratados.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

5.11. Concentração de proteínas no LBA de camundongos infectados com *A. xylosoxidans* e tratados ou não com celecoxibe ou MK886.

Para investigar se existe um desequilíbrio entre as pressões hidrostáticas e osmóticas no tecido pulmonar durante a infecção subletal com *A. xylosoxidans*, e se o tratamento com MK886 poderia alterar esse equilíbrio, avaliamos a concentração de proteínas do LBA de camundongos infectados com inóculo subletal de *A. xylosoxidans*. Observamos que, houve extravasamento de proteínas para o LBA após a infecção com inóculo subletal. Observamos também que durante a infecção, o tratamento com MK886 foi capaz de aumentar significativamente a concentração de proteínas no terceiro dia quando comparado ao grupo somente infectado (Figura 15).

Figura 15: Concentração de proteínas no LBA de camundongos infectados com *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram (A) infectados i.t. com inóculo subletal ($2,5 \times 10^7$ bacilos/100 μ l) de *A. xylosoxidans* e tratados ou não com MK886 (5mg/Kg/dia). Após 1, 3, 7 e 14 dias de infecção os animais foram eutanasiados, o pulmão foi lavado e a concentração de proteínas quantificada pelo método colorimétrico de Bradford. Dado

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

representativo de dois experimentos independentes expressos como média $\pm$ EPM (n = 3-5). Teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $p < 0,05$. * vs SHAM; # vs apenas infectado.

6. Discussão

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

A primeira e única tentativa, até então, de descrever os mecanismos imunológicos pelos quais o bacilo comensal *A. xylosoxidans* é capaz de causar doença, foi realizada em 1982 por Hyodo e colaboradores. Naquele estudo camundongos Balb/c imunossuprimidos pelo tratamento com ciclofosfamida foram infectados com *A. xylosoxidans*, por via intraperitoneal (i.p.), com inóculos que variaram de $0,5 \times 10^8$ a 44×10^8 bactérias por animal. Observaram que inóculos a partir de $0,5 \times 10^8$ bactérias nos animais tratados com ciclofosfamida, levavam todos os animais a morte. Por outro lado, a suspensão de 44×10^8 bactérias administradas nos animais sem tratamento provocou a morte de 50% deles. Com base nesses dados, realizamos a curva de sobrevivência para determinação do inóculo letal e subletal de *A. xylosoxidans* nos animais da linhagem C57Bl/6, através da inoculação i.t. de 2×10^8 , 1×10^8 , $5,0 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^7$ bactérias/100µl de inóculo (Figura 1). Com isto, obtivemos uma curva de sobrevivência homogênea em que o maior inóculo foi capaz de levar 100% dos animais a óbito, enquanto o menor inóculo não afetou a sobrevivência. Os inóculos intermediários de 1×10^8 e $5,0 \times 10^7$ foram capazes de levar a óbito 80 e 30% dos animais, respectivamente. A curva de sobrevivência mostrou claramente que o inóculo letal, estaria entre 1×10^8 e $5,0 \times 10^7$ bactérias/100µl, e isso foi comprovado pelo cálculo com a equação “Moving average interpolation” que encontrou $6,3 \times 10^7$ como inóculo letal (DL₅₀), para nossas condições experimentais. O inóculo subletal, por outro lado, foi facilmente determinado apenas pela curva de sobrevivência, e que corresponde a $2,5 \times 10^7$ bactérias, que como mostrado na figura 1, é o maior inóculo da curva que não mata nenhum dos animais (WELKOS E O'BRIEN, 1974).

Quanto ao papel das PGs na infecção por *A. xylosoxidans*, observamos que nas doses utilizadas (1mg/kg e 5mg/kg) o tratamento com celecoxibe não alterou a mortalidade dos animais, sugerindo que as PGs não são essenciais para os mecanismos de defesa nesta infecção (Figura 2 A, B e C). A dose de 5mg/kg/dia de celecoxibe foi utilizada apenas para análise de sobrevida, enquanto que utilizando a dose de 1mg/kg/dia foi empregada para as demais avaliações. Neste caso, observamos que não houve alterações significativas nas UFCs recuperadas dos pulmões e migração de leucócitos para o sítio de infecção, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 4 e 5). Embora, os dados sugerem que as PGs não são essenciais para o controle desta infecção, futuramente iremos realizar curva-dose resposta como o celecoxibe. Esses achados são contrários aos encontrados por nosso grupo na infecção

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

por *H. capsulatum*, que demonstraram que o tratamento com celecoxibe (1mg/kg), resultou em resposta mais efetiva do hospedeiro, com diminuição das UFCs do fungo e aumento da sobrevivência dos animais infectados (PEREIRA et al., 2013). Outros grupos também encontraram resultados semelhantes aos de Pereira e colaboradores, e demonstraram que camundongos deficientes de COX-2 e infectados com *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram maior sobrevivência a partir do 1º dia de infecção (SADIKOT et al., 2007), e ainda que a inibição da PGE₂, ou o bloqueio da sua sinalização via EP₂ e EP₄, melhora as funções efetoras dos macrófagos como a fagocitose de bactérias causadoras de pneumonia como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (ARONOFF et al., 2004). Por outro lado, na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o tratamento com bloqueador da COX-2 (ácido niflúmico) resultou em redução da pneumonia, da carga bacteriana e aumento do tamanho dos granulomas na fase tardia da infecção (MORENO et al., 2002). Também, nosso grupo demonstrou que em camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados simultaneamente com inibidor das PGs (celecoxibe) e dos LTs (MK886) prevalece o efeito da inibição dos LTs, uma vez que houve diminuição da sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com inibidores de ambas as vias do metabolismo do ácido araquidônico (PEREZ-BUZALAF et al., 2011). De maneira contrária, Tatakihara e colaboradores (2007) encontraram que, em modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, o tratamento com indometacina, celecoxibe ou aspirina, utilizados para inibição da síntese de prostanoídes, aumentou a mortalidade dos animais, bem como a carga parasitária no sangue a partir do sétimo dia de infecção, demonstrando que as PGs podem desempenhar ações antagônicas em diferentes modelos.

Quanto a importância dos LTs na infecção experimental por *A. xylosoxidans*, observamos que em ambos os inóculos, letal e subletal, o tratamento com inibidor da produção dos LTs, MK886 na dose de 5 mg/kg, resultou em aumento significativo da mortalidade dos animais (Figura 3 A e B). Animais infectados com inóculo letal e subletal apresentaram respectivamente, aumento de 40 e 65% na mortalidade, quando comparados com animais infectados e não tratados, indicando que os LTs são essenciais para a proteção do hospedeiro durante esta infecção. Esses dados estão em acordo com o trabalho desenvolvido por Medeiros e colaboradores (2004), que mostraram que na infecção pelo *H. capsulatum* o tratamento com MK886 levou 100% dos animais infectados a óbito em comparação com 0% de morte dos animais infectados não tratados. Outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo mostra que na infecção pelo *M. tuberculosis*, o tratamento

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

com MK886 reduziu em 50% a sobrevivência dos camundongos, quando comparado aos animais não tratados (PERES et al., 2007). Além disso, LTB₄ microencapsulado ativa macrófagos derivados de medula óssea a produzir citocinas, quimiocinas e NO *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2011) e na infecção pelo *H. capsulatum*, reduz as UFCs recuperadas nos pulmões de camundongos infectados além de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias importantes no controle da infecção (NICOLETE et al., 2007). Soares e colaboradores (2013) também demonstraram que o LTB₄, via ligação ao receptor BLT₁, amplifica a resposta imune inata contra *Streptococcus pyogenes* na sepse puerperal. Outros grupos demonstraram também o papel benéfico dos LTs nas infecções. Batra e colaboradores (2012) mostraram em animais com pneumonia por *K. pneumoniae* que a administração intrapulmonar de LTB₄ é capaz de aumentar em 40% a sobrevivência dos animais CXCL1^{-/-} infectados, por aumentar o influxo de neutrófilos no sítio infeccioso, por reverter a baixa expressão de citocinas e quimiocinas, aumentar a ativação de NFκB e MAPK e a produção de ROS e RNS.

Apesar de anteriormente termos demonstrado claramente que os LTs participam dos mecanismos de defesa, e que sua inibição resulta em aumento da carga bacteriana (PERES et al., 2007) ou fúngica (MEDEIROS et al., 2004), e que por outro lado, as PGs inibem os mecanismos de defesa do hospedeiro (PEREIRA et al., 2013), em nosso modelo experimental não encontramos diferença na carga bacteriana recuperada dos pulmões dos camundongos infectados com ambos os inóculos de *A. xylosoxidans* e tratados com celecoxibe ou MK886 (Figura 5). Também nossos dados são contrários aos descritos por Sadikot e colaboradores (2007) que, encontraram maior *clearance* bacteriano em camundongos deficientes da enzima COX-2 quando infectados com *P. aeruginosa*. O bloqueio da produção de LTs, da mesma maneira que o das PGs, não alterou a recuperação de UFCs de *A. xylosoxidans*, dos pulmões dos animais infectados com inóculo letal ou subletal (Figura 5 A e B), apesar da inibição dos LTs diminuir a sobrevivência dos camundongos (Figura 3 A e B). Dessa forma, os LTs parecem essenciais para resposta imune (e/ou fisiológica) contra *A. xylosoxidans*, mas por um mecanismo distinto da ativação dos mecanismos efetores das células do sistema imune do hospedeiro.

Na tentativa de compreender os mecanismos pelos quais os LTs conferem proteção durante esta infecção, avaliamos o padrão de recrutamento celular para os pulmões, e produção de citocinas e quimiocinas sem e após o tratamento com MK888. A migração de leucócitos durante um episódio inflamatório é um processo bem descrito e que precisa da

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

participação de várias moléculas de adesão, como E-, L- e P- selectinas, além de integrinas que são induzidas por quimiocinas, proteínas do complemento e mediadores lipídicos (LEY, 1996; SMITH, 1994). Nos neutrófilos, é descrito que o AA e seus metabólitos podem regular a migração dessas células (YAMAUCHI et al., 2013; ISHII et al., 2012; MONTEIRO et al., 2011), além das funções efetoras como, fagocitose (DALLI; SERHAN, 2012) e liberação de produtos antimicrobianos (CHOUINARD et al., 2013;). Neutrófilos são células ricas em AA e são potentes produtores de lipídeos bioativos. O LTB₄ é quimioatraente para neutrófilos (FORD-HUTCHINSON et al., 1980; YAMAUCHI et al., 2013), enquanto os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ que também recrutam diferentes leucócitos (CHEN et al., 2011; MORI et al., 2009; YUAN et al., 2009), são principalmente vasoativos, e portanto, aumentam a permeabilidade vascular (MOOS et al., 2008), principalmente nos pulmões (PETERS-GOLDEN, 2008; HELE et al., 2001; NICOSIA et al., 2001). Por outro lado, as PGs suprimem as funções dos neutrófilos possivelmente pela sua habilidade de aumentar o AMPc intracelular (SMITH, 1994). Estes mediadores, especialmente a PGE₂, também participam do recrutamento celular, pois podem aumentar ou diminuir a produção de citocinas, que por sua vez, são capazes de agir sinergicamente com os mediadores lipídicos modulando esse processo (SHUSTER *et al.*, 1997; BUSSE, 1998; NAM et al., 2012; SADIK; LUSTER, 2011; KUHNS et al., 2001).

Durante a infecção pelo *A. xylosoxidans* há um importante infiltrado de neutrófilos na fase aguda da infecção (1 e 3 dias) e pouco infiltrado de células mononucleares. De maneira oposta, na fase mais tardia (7 e 14 dias após a infecção) as principais células recrutadas são as células mononucleares, que provavelmente participam da eliminação dos corpos apoptóticos das células recrutadas durante a fase aguda (TANG et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009). O tratamento com celecoxibe não foi capaz de alterar o infiltrado leucocitário em nenhum dos dias analisados após a administração i.t. do inóculo subletal. Nossos dados de recrutamento de neutrófilos diferem dos reportados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, em infecções por patógenos causadores de infecções crônicas como *H. capsulatum* e *M. tuberculosis*. Na infecção por *H. capsulatum*, animais tratados com celecoxibe apresentaram diminuição do infiltrado neutrofílico nos dias 2 e 14, enquanto o mesmo fenômeno ocorreu nos dias 30 e 60 na infecção pelo *M. tuberculosis* (PEREIRA et al., 2013; PEREZ-BUZALAF et al., 2011). Por outro lado, tanto na infecção pelo *M. tuberculosis* quanto *H. capsulatum* observamos menor recrutamento de células mononucleares após o tratamento com celecoxibe (PEREIRA et al., 2013; PEREZ-BUZALAF et al., 2011), fatos não encontrados na infecção pelo *A.*

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

xylosoxidans. Assim, sugerimos que a dose utilizada de 1mg/kg/dia de celecoxibe na infecção pelo *A. xylosoxidans* não foi efetiva em promover mudanças no recrutamento celular, ou ainda que diferentemente do que ocorre na infecção pelo *H. capsulatum* ou *M. tuberculosis*, as PGs não participam do recrutamento de células nesta infecção.

Neste estudo observamos também, que o tratamento com MK886 diminuiu o recrutamento de neutrófilos após 1 dia de infecção com inóculo subletal de *A. xylosoxidans* (Figura 4A), sugerindo que os LTs, como já descrito (FORD-HUTCHINSON et al., 1980; YAMAUCHI et al., 2013; OYOSHI et al., 2012; AFONSO et al., 2012) medeiam o recrutamento desses granulócitos no início desta infecção. De maneira oposta, este tratamento aumentou o recrutamento de células mononucleares no terceiro dia (Figura 4B), sugerindo que a ausência de LTs alterou a produção de outro mediador relevante (mas não quantificado por nós) para a migração destas células.

Apesar das alterações que encontramos no recrutamento celular, não observamos nenhuma alteração significativa na produção de citocinas ou quimiocinas dentre aquelas que quantificamos. A produção de algumas citocinas como IL-6, G-CSF e TNF- α já é descrito na pneumonia por *A. xylosoxidans* em humanos (HANSEN et al., 2010) e da quimiocina IL-8 *in vitro* (MANTOVANI et al., 2012). Observamos que a infecção subletal por *A. xylosoxidans* estimula a produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e das quimiocinas KC, MIP-1 α e MCP-1, no entanto, o tratamento com MK886 foi capaz de alterar a produção desses mediadores apenas a partir do dia 7 após infecção, dias em que a mortalidade dos animais já não é mais observada. Isso indica que o aumento ou redução da produção de citocinas e quimiocinas (Figura 6 e 7) nos animais infectados e tratados com MK886 não é o fator responsável pela mortalidade (Figura 3). Esses dados são contraditórios aos encontrados previamente pelo nosso grupo que mostraram que na ausência de LTs há aumento da produção de TNF- α IL-1, IL-6 e KC na infecção pelo *H. capsulatum* (MEDEIROS et al., 2004; SECATTO et al., 2012) e de IL-1 e IL-6 na infecção pelo *M. tuberculosis* (PEREZ-BUZALAF et al., 2011). Em contrapartida, outros trabalhos mostram que em outros modelos, LTB₄ aumenta a produção de IL-1 β na artrite reumatoide, de IL-8, homologa ao KC de camundongos, (KUHS et al., 2001) e MCP-1 (HUANG et al., 2002) em monócitos humanos estimulados *in vitro*.

Na infecção subletal com *A. xylosoxidans* o tratamento com MK886, além de inibir a produção de LTB₄, aumentou a produção de PGE₂ nos pulmões. Sabe-se da literatura que a

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

PGE₂ pode contribuir para o recrutamento de células mononucleares, uma vez que este mediador aumenta a responsividade destas células as quimiocinas (PANZER; UGUCCIONI, 2004; TAJIMA et al., 2008). Assim, o aumento discreto, mas significativo de células mononucleares, após o tratamento com MK886, poderia ser explicado pela maior liberação de PGE₂ nos pulmões. Outro mediador lipídico que pode ser inibido pelo tratamento com MK886 é a lipoxina (PERES et al., 2007), que é um mediador lipídico também derivado do AA que participa da regulação da resposta inflamatória (LAWRENCE et al., 2002). Embora, não tenhamos ainda quantificado as lipoxinas, podemos sugerir que o aumento de células mononucleares após tratamento com MK886, pode ser resultado da diminuição deste mediador (PERES et al., 2007; MADDIX; SERHAN, 1996). Interessante que dados anteriores de nosso grupo mostraram que na infecção por *H. capsulatum*, o tratamento com MK886 resultou no aumento de neutrófilos no lavado bronco alveolar e intensa reação inflamatória no parênquima pulmonar, a partir do sétimo dia de infecção, sendo este dado associado ao aumento no número de UFCs recuperadas dos pulmões dos camundongos e maior liberação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e KC (MEDEIROS et al., 2004). No entanto, nos animais infectados com *A. xylosoxidans* o tratamento com MK886 induziu somente discreto aumento do recrutamento de células mononucleares para o parênquima pulmonar, no dia 3 após infecção, (Figura 4B) fato que talvez não justifique o aumento de mortalidade por nós observada (Figura 3A e B).

Mantovani e colaboradores (2012) mostraram que *A. xylosoxidans* possui um fator citotóxico capaz de induzir morte celular *in vitro*, além disso, é bem descrito que alguns microrganismos apresentam fatores de virulência intrínsecos que ativam a apoptose para evadir das células do sistema imune do hospedeiro e promover o estabelecimento da infecção como as bactérias *Yersinia pseudotuberculosis* (MONACK et al., 1997), *P. aeruginosa* (JIA et al., 2006), *Vibrio cholerae* (ZITZER et al., 1997) e outros. Além disso, sabe-se que o LPS pode induzir a morte de células ativadas (ALBINA et al., 1993), e que o LTB₄ inibe a apoptose de neutrófilos via BLT₁ (MURRAY et al., 2003) e de maneira dependente da atividade da NADPH oxidase *in vitro* (BARCELLOS-DE-SOUZA et al., 2012). Assim, na tentativa de entendermos o(s) mecanismo(s) responsável(eis) pelo aumento da morte dos animais infectados e tratados com MK886, investigamos se tal composto poderia estar aumentando a morte dos leucócitos do LBA. Dessa forma, as células recuperadas do LBA foram marcadas para avaliação de apoptose, necrose e apoptose tardia. Observamos que

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

embora a infecção tenha aumentado o número de células em apoptose no primeiro dia após infecção (Figura 12 A) e diminuído a porcentagem de células em necrose nos dias 1 e 3 (Figura 12 B), a inibição da produção de LTs, não alterou estes fenômenos. Portanto, aparentemente a maior mortalidade dos animais infectados ocorria após inibição da produção de LTB₄ (Figura 13) pelo tratamento com o composto MK886, parece não se relacionar com a alteração da frequência de morte celular por necrose ou apoptose, induzida pela bactéria. Estes dados diferem de outros da literatura que mostram que inibidores da 5-LO promovem aumento da apoptose e redução da necrose em hepatócitos, e indicam que os metabólitos derivados da via da 5-LO, especialmente os LTs, reduzem a apoptose e aumentam a necrose durante injúria hepática (KORNIICHUK et al., 2002).

Uma das manifestações clínicas mais importantes no processo infeccioso pulmonar é a formação de edema. O edema pulmonar é caracterizado por acúmulo de líquido nos pulmões promovido pelo extravazamento de proteínas dos vasos para o tecido causando falência respiratória nos indivíduos acometidos (GONZALES; VERIN, 2012). É bem descrito que vários mediadores lipídicos atuam também em processos fisiológicos. Os LTs, especialmente o LTC₄ e o LTD₄ são conhecidos por promoverem vasoconstrição pulmonar, aumento da permeabilidade capilar. Essa capacidade em aumentar a permeabilidade vascular é importante para diapedese de leucócitos para o sítio inflamatório e formação de edema pulmonar. O LTB₄, induz aumento da permeabilidade vascular de maneira indireta, pela sua capacidade quimiotática, ou seja, a permeabilidade vascular induzida pelo LTB₄ é promovida pela adesão dos PMNs ao endotélio vascular (BJÖRK et al., 1982), enquanto os cysLTs podem mediar aumento da permeabilidade vascular por diversos mecanismos, como por exemplo, ativando CysLT₂R nas células endoteliais promovendo aumento de cálcio intracelular e facilitando o transporte de proteínas do lúmen vascular para o tecido através de vesículas (MOOS et al., 2009). Isso corrobora o fato que vários estudos mostram aumento de LTs nos LBA de indivíduos com doença pulmonar aguda (MOLONEY; EVANS, 2003; MATTHAY et al., 1984). Outros mediadores lipídicos como a PGI₂ e a PGE₂ também participam do aumento da permeabilidade vascular e da vasodilatação (SCHERMULY et al., 1999). PGE₂ ao se ligar aos receptores EP₂ ou EP₄ nas células musculares lisas, promovem vasodilatação, enquanto que ao se ligar ao receptor EP₃ promove liberação de histamina pelos mastócitos que então aumenta a permeabilidade vascular (MORIMOTO et al., 2013). Sabendo que a infecção por *A. xylosoxidans* induz a produção de LTB₄ (Figura 13) e de PGE₂

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

(Figura 14), e que o tratamento com MK886 aumentou a liberação deste prostanóide (Figura 14), quantificamos as proteínas no LBA dos animais infectados com inóculo subletal tratados ou não com inibidor de LTs, como um parâmetro do edema. Observamos que a infecção por *A. xylosoxidans* induziu aumento do extravasamento de proteínas para o LBA (Figura 15), o que é um indicativo da formação de edema pulmonar, o qual também pode ser observado nos cortes histológicos dos pulmões nos diferentes períodos (Figuras 8, 9, 10 e 11). Curiosamente encontramos que animais tratados com MK886 apresentaram maior extravasamento de proteínas recuperadas no LBA no dia 3 após infecção (Figura 15), período de alta mortalidade nos animais (Figura 3). Estes dados são inesperados, pois trabalhos anteriores (MEDEIROS et al., 2004; FRIEDMAN et al., 1993; LORRAIN et al., 2009), e os da figura 13, mostram que o tratamento com MK886 inibe a produção de LTB_4 , e possivelmente de LTC_4 e LTD_4 , que são importantes mediadores do aumento da permeabilidade vascular. Por outro lado, sabe-se que PGE_2 , via receptor EP_3 , é potente indutor de edema pulmonar (GÖGGEL et al., 2002). Como anteriormente relatado por nós (PERES-BUZALAF et al., 2011) e os dados da figura 14, mostram que o tratamento de animais infectados, com o composto MK886, resulta em aumento na produção de PGE_2 . Esses dados sugerem que o aumento da mortalidade dos animais tratados com MK886 podem estar relacionados com o aumento da produção de PGE_2 com consequente aumento do edema pulmonar e falência respiratória. Futuros experimentos serão realizados para comprovar esta hipótese e também para investigar a participação das lipoxinas neste fenômeno.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Resumo dos resultados

Tabela 1: A inibição de PGs ou LTs provocam alterações na resposta imunológica de camundongos infectados com *A. xylosoxidans*.

Parâmetros avaliados	Letal		Subletal	
	<i>A. xylosoxidans</i> + Celecoxibe	<i>A. xylosoxidans</i> + MK886	<i>A. xylosoxidans</i> + Celecoxibe	<i>A. xylosoxidans</i> + MK886
Sobrevida	=	↓	=	↓
Neutrófilos	NA	NA	=	↓
Mononucleares	NA	NA	=	↑
UFC	=	=	=	=
TNF- α	NA	NA	NA	↑
IL-1 β	NA	NA	NA	↑
IL-6	NA	NA	NA	↓
KC	NA	NA	NA	↑
MIP-1 α	NA	NA	NA	↑
MCP-1	NA	NA	NA	=
Apoptose	NA	NA	NA	=
Necrose	NA	NA	NA	=
Apoptose tardia	NA	NA	NA	=
Proteínas	NA	NA	NA	↑
LTB ₄	NA	NA	NA	↓
PGE ₂	NA	NA	NA	↑

Alterações gerais promovidas pelo tratamento com celecoxibe ou MK886 em animais infectados com inóculo letal ou subletal de *A. xylosoxidans*. As setas ↑ e ↓ indicam respectivamente, aumento e diminuição em relação aos animais infectados tratados com veículo. = : não altera e NA: não avaliado.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

7. Conclusão

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Nossos dados mostram que a infecção por *A. xylosoxidans* induz recrutamento de leucócitos para os pulmões, aumento da produção de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e formação de edema. O tratamento dos animais com inibidor da síntese de PGs não alterou o curso da infecção nem a sobrevivência dos animais, sugerindo que na concentração induzida pela infecção, as PGs não são deletérias para os animais. Por outro lado, a inibição de LTs, aumentou a mortalidade dos animais infectados e este fenômeno não parece se relacionar com alterações na carga bacteriana, no recrutamento celular, na produção de citocinas e quimiocinas, mas sim com o aumento exacerbado de PGE₂ e do edema pulmonar. Desta forma, podemos concluir que na infecção pulmonar por *A. xylosoxidans*, o balanço entre a produção dos mediadores lipídicos é fundamental para a resposta efetiva do hospedeiro.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

8. Referências Bibliográficas

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

AFONSO, P. V.; JANKA-JUNTILA, M.; LEE, Y. J.; MCCANN, C. P.; OLIVER, C. M.; AAMER, K. A.; LOSERT, W.; CICERONE, M. T.; PARENT, C. A. LTB₄ Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. **Developmental Cell**. v. 22 p. 1079 – 1091, 2012.

AISENBERG, G.; ROLSTON, K.; safdar, A. Bacteremia Caused by *Achromobacter* and *alcaligenes* Species in 46 Patients with Cancer (1989-2003). **American Cancer Society**. v.101 n. 9 p. 2134-2140, 2004.

ALBINA, J. E.; CUI, S.; MATEO, R. B.; REICHNER, J. S. Nitric Oxide-Mediated Apoptosis in Murine Peritoneal Macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 150 p. 5080 – 5085, 1993.

ANGRILL, J.; AGUSTÍ, C.; DE CELIS, R.; RAÑÓ, A.; GONZALEZ, J.; SOLÉ, T.; XAUBET, A.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; TORRES, A. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. **Thorax**. v. 57 p. 15–19, 2002.

ARONOFF, D. M.; BERGIN, I. L.; LEWIS, C.; GOEL, D.; O'BRIEN, E.; PETERS-GOLDEN, M.; MANCUSO, P. E-prostanoid 2 receptor signaling suppresses lung innate immunity against *Streptococcus pneumoniae*. **Prostaglandins & other lipid mediators**. v. 98. p. 23-30, 2012.

ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **J Immunol**. v. 173 n.1 p. 559–65, 2004.

AXELROD, J.; BURCH, R. M.; JELSEMA, C. L.; Receptor-mediated activation of phospholipase A₂ via GTPbinding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **TINS**. v. 11 n. 3 p. 117 – 123, 1988.

BADOR, J.; AMOUREUX, L.; DUEZ, J.; DRABOWICZ, A.; SIEBOR, E.; LLANES, C.; NEUWIRTH, C. First description of an RND-Type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.55 n. 10 p. 4912-4914, 2011.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P.; CANETTI, C.; BARJA-FIDALGO, C.; ARRUDA, M. A. Leukotriene B₄ inhibits neutrophil apoptosis via NADPH oxidase activity: Redox control of NF-κB pathway and mitochondrial stability. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1823 p. 1990 – 1997, 2012.

BATRA, S.; CAI, S.; BALAMAYOORAM, G.; JEYASSELAN, S.; Intrapulmonary administration of Leukotriene B₄ augments neutrophil accumulation and responses in the lung to *Klebsiella* infection in CXCL1 knockout mice. **J Immunol**. v. 188 p. 3458 - 3468, 2012.

BELL, R. L.; HARRIS, R. R. The Enzymology and Pharmacology of 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase Activating Protein. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**. v. 17 p. 91 – 109, 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

BJÖRK, J.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K.; Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**. v. 6 n. 2, 1982.

BREYER, R.M.; BAGDASSARIAN, C. K.; MYERS, S. A.; BREYER, M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 41. p. 661–690, 2001.

BUSSE, W. W. Leukotrienes and Inflammation. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 157 p. S210 – S213, 1998.

CARPAGNANO, G. E.; BARNES, P. J.; GEDDES, D. M.; HODSON, M. E.; KHARITONOV, S. A. Increased Leukotriene B₄ and Interleukin-6 in Exhaled Breath Condensate in Cystic Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 167 p. 1109 – 1112, 2003.

CHEN, L. Y.; EBERLEIN, M.; ALSAATY, S.; MARTINEZ-ANTON, A.; BARB, J.; MUNSON, P. J.; DANNER, R. L.; LIU, Y.; LOGUN, C.; SHELHAMER, J. H.; WOSZCZEK, G. Cooperative and redundant signaling of leukotriene B₄ and leukotriene D₄ in human monocytes. **Allergy**. v. 66 p. 1304 – 1311, 2011.

CHEN, Y.; CHEN, P.; HANAOKA, M.; DROMA, Y.; KUBO, K.; Enhanced levels of prostaglandin E₂ and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. **Respirology**. v. 13 p. 1014–1021, 2008.

CHESTER, B.; COOPER, L. H. *Achromobacter* species (CDC Group Vd): Morphological and Biochemical Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 9 n. 3 p. 425-436, 1979.

CHIRON, R.; GRUMBACH, Y. Y.; QUYNH, N. V. T.; VERRIERE, V.; URBACH, V. Lipoxin A₄ and interleukin-8 levels in cystic fibrosis sputum after antibiotherapy. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 7 p. 463–468, 2008.

CHOUINARD, F.; TURCOTTE, C.; GUAN, X.; LAROSE, M.; POIRIER, S.; BOUCHARD, L.; PROVOST, V.; FLAMAND, L.; GRANDVAUX, N.; FLAMAND, N. 2-Arachidonoyl-glycerol- and arachidonic acid-stimulated neutrophils release antimicrobial effectors against *E. coli*, *S. aureus*, HSV-1, and RSV. **J. Leukoc. Biol.** v. 93 p. 267 – 276, 2013.

CONWAY, S.P.; ETHERINGTON, C.; PECKHAM, D.G.; WHITEHEAD, A. A pilot study of zafirlukast as an anti-inflammatory agent in the treatment of adults with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 2 p. 25–28, 2003.

DALLI, J.; SERHAN, C. N.; Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. **Blood**. v. 120 p. e60 – e72, 2012.

DIXON, R. A. F.; DIEHL, R. E.; OPAS, E.; RANDS, E.; VICKERS, P. J.; EVANS, J. F.; GILLARD, J. W.; MILLER, D. K. Requirement of 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. **Nature**. v. 343 p. 282 – 284, 1990.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

DOS SANTOS, D. F.; BITENCOURT, C. S.; GELFUSO, G. M.; PEREIRA, P. A. T.; DE SOUZA, P. R. M.; SORGI, C. A.; NICOLETE, R.; FACCIOLI, L. H. Biodegradable microspheres containing leukotriene B₄ and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44 p. 580 – 588, 2011.

DOUGLAS B. KUHN, EDWARD L. NELSON, W. GREGORY ALVORD AND JOHN I. GALLIN. **Fibrinogen** Induces IL-8 Synthesis in Human Neutrophils Stimulated with Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine or Leukotriene B₄. **J Immunol**. v. 167 p. 2869 - 2878, 2001

DUGGAN, J. M.; GOLDSTEIN, S. J.; CHENOWETH, C. E.; KAUFFMAN, C. A.; BRADLEY, S. F. *Achromobacter xylosoxidans* Bacteremia: Report of four cases and Review of the literature. **Clinical Infectious Disease**. n. 23 p. 569-576, 1996.

DZIARSKI, R.; TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Binding of Bacterial Peptidoglycan to CD14. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273 p. 8680-8690, 1998.

ESHWARA, V. K.; MUKHOPADHYAY, C.; MOHAN, S.; PRAKASH, R.; PAI, G.; Two unique presentations of *Achromobacter xylosoxidans* infections in clinical settings. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v. 5 n. 2 p. 138-141, 2011.

FELDMAN, M.; MCMAHON, A.T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Annals of Internal Medicine**. v. 132. n. 2. p. 134-143, 2000.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The antiinflammatory properties and safety of the Coxibs, selective inhibitors of COX-2. **N Engl J Med**. v. 345. p. 433–42, 2001.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. H. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregation substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**. 1980.

FREEDMAN, S. D.; BLANCO, P. G.; ZAMAN, M. M.; SHEA, J. C.; OLLERO, M.; HOPPER, I. K.; WEED, D. A.; GELRUD, A.; REGAN, M. M.; LAPOSATA, M.; ALVAREZ, J. G.; O’SULLIVAN, B. P. Association of Cystic Fibrosis with Abnormalities in Fatty Acid Metabolism. **The New Engl J Med**. v. 350 p. 560-9, 2004.

FRIEDMAN, B. S.; BEL, E. H.; BUNTINX, A.; TANAKA, W.; HAN, Y. R.; SHINGO, S.; SPECTOR, R.; STERK, P.; Oral Leukotriene Inhibitor (MK-886) Blocks Allergen-induced Airway Responses. **Am Rev Respir Dis**. v. 147. p 839 - 844, 1993.

FUNK, C. D. Leukotriene modifiers as Potential therapeutics for cardiovascular disease. **Nature**. v. 4 p. 664 – 672, 2005.

FUNK, C. D.; Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**. v. 294 p. 1871 – 1875, 2001.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W.; Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 168 p. 918 - 951, 2003.

GILLARD, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CHAN, C.; CHARLESON, S.; DENIS, D.; FOSTER, A.; FORTIN, R.; LEGER, S.; MCFARLANE, C. S.; MORTON, H.; PIECHUTA, H.; RIENDEAU, D.; ROUZER, C. A.; ROKACH, J.; YOUNG, R.; MACINTYRE, D. E.; PETERSON, L.; BACH, T.; EIERMANN, G.; HOPPLE, S.; HUMES, J.; HUPE, L.; LUELL, S.; METZGER, J.; MEURER, R.; MILLER, D. K.; OPAS, E.; PACHOLOK, S. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 5 p. 456-464, 1989.

GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLIS, D.; CHIVERS, J.; PAUL-CLARK, M. J.; WILLOUGHBY, D. A.; Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature**. v. 5 n. 6 p. 698 – 701, 1999.

GÖGGEL, R.; HOFFMAN, S.; NÜSING, R.; NARUMIYA, S.; UHLIG, S. Platelet-Activating Factor-induced Pulmonary Edema Is Partly Mediated by Prostaglandin E₂, E-Prostanoid 3-Receptors, and Potassium Channels. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 166 p. 657 – 662, 2002.

GONZALES, J.; VERIN, A. Non-Cardiogenic Pulmonary Edema. **Lung Diseases - Selected State of the Art Reviews**. p. 525 – 539, 2012.

GONZALEZ, A. L., ROBERTS, R. L., MASSION, P. P., OLSON, S. J., SHYR, Y., SHAPPELL, S. B. 15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic lung: An immunohistochemical study and correlation with tumor grade and proliferation. **Human Pathology**, v. 35 n.7 p. 840 – 849, 2004.

GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; AHMAD, N.; SAKAMOTO, K.; BOSTWICK, D. G.; MUKHTAR, H. Lipoxygenase-5 Is Overexpressed in Prostate Adenocarcinoma. **Cancer** v. 91 p. 737–43, 2001.

HANSEN, C. R.; PRESSLER, T.; HØIBY, N.; GORMSEN, M. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. **Journal of Cystic Fibrosis** v. 5 p. 245 – 251, 2006.

HANSEN, C. R.; PRESSLER, T.; NIELSEN, K. G.; JENSEN, P. Ø.; BJARNSHOLT T.; HØIBY, N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 9 p. 51 – 58, 2010.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY D.; PHIPPS, R. P.; Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**. v. 23. n. 3. p. 144-150, 2002.

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 103 p. 147– 166, 2004.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

HELE, D. J.; BIRRELL, M. A.; WEBBER, S. E.; FOSTER, M. L.; BELVISI, M. G.; MEDIATOR involvement in antigen-induced bronchospasm and microvascular leakage in the airways of ovalbumin sensitized Brown Norway rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 132 p. 481 – 488, 2001.

HIRAI, B. H.; TANAKA, K.; YOSHIE, O.; OGAWA, K.; KENMOTSU, K.; TAKAMORI, Y.; ICHIMASA, M.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S.; NAGATA, K. Prostaglandin D2 Selectively Induces Chemotaxis in T Helper Type 2 Cells, Eosinophils, and Basophils via Seven-Transmembrane Receptor CRTH₂. **J. of Experimental Medicine**. v. 193 n. 2. p. 255 – 261, 2001.

HONDA, A.; SEKIGUCHI, Y.; MORI, Y.; Prostaglandin E₂ stimulates cyclic AMP-mediated hyaluronan synthesis in rabbit pericardial mesothelial cells. **Biochem. J.** v. 292, p. 497 – 502, 1993.

HUANG, L.; ZHAO, A.; WONG, F.; AYALA, J. M.; STRUTHERS, M.; UJJAINWALLA, F.; WRIGHT, S. D.; SPRINGER, M. S.; EVANS, J.; CUI, J. Leukotriene B₄ Strongly Increases Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human Monocytes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 24 p. 1783 - 1788, 2004.

HUI, Y.; FUNK, C. D. Cysteinyl leukotriene receptors. **Biochemical Pharmacological**. v. 64 p. 1549 – 1557, 2002.

HUTCHISON, M. L.; BONELL, E. C.; POXTON, I. R.; GOVAN, J. R.W. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 27 p.73-77, 2000.

HYODO, A.; KATAHIRA, S.; SHIGETA, S.; Experimental infection of immunocompromised mice with *Achromobacter xylosoxidans*. **Journal of experimental medicine**. v. 136 p. 251 – 261, 1982.

IGRA-SIEGMAN, Y.; CHMEL, H.; COBBS, C.; Clinical and Laboratory Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 11 n. 2 p. 141-145, 1980.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1592 p.281– 296, 2002.

ISHII, M.; ASANO, K.; NAMKOONG, H.; TASAKA, S.; MIZOGUCHI, K.; ASAMI, T.; KAMATA, H.; KIMIZUKA, Y.; FUJIWARA, H.; FUNATSU, Y.; KAGAWA, S.; MIYATA, J.; ISHII, K.; NAKAMURA, M.; HIRAI, H.; NAGATA, K.; KUNKEL, S. L.; HASEGAWA, N.; BETSUYAKU, T. CRTH₂ Is A Critical Regulator of Neutrophil Migration and Resistance to Polymicrobial Sepsis. **J Immunol**. v. 188 p. 5655 - 5664, 2012.

JABR, S.; GARTNER, S.; MILNE, G. L.; ROCA-FERRER, J.; CASAS, J.; MORENO, A.; GELPÍ, E.; PICADO, C. Quantification of major urinary metabolites of PGE₂ and PGD₂ in cystic fibrosis: Correlation with disease severity. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 89 p. 121–126, 2013.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

JIA, J.; WANG, Y.; ZHOU, L.; JIN, S.; Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoS Effectively Induces Apoptosis in Host Cells. **Infect. Immun.** v. 74 p. 6557 – 6570, 2006.

JIANG, W. G., DOUGLAS-JONES, A., & MANSEL, R. E. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69 n. 4 p. 275 – 281, 2003.

JONES, R. L.; GIEMBYCZ, M. A.; WOODWARD, D. F. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. **British Journal of Pharmacology**. v. 158 p. 104 – 145, 2009.

JOO, M.; SADIKOT, R. T. PGD Synthase and PGD2 in Immune Response. Mediators of Inflammation. p. 1 – 6, 2007.

KALINSKI, P.; Regulation of Immune response Prostaglandin E₂. The Journal of Immunology. v. 188 p. 21 – 28, 2012.

KANELLOPOULOU, M.; POURNARAS, S.; IGLEZOS, H.; SKARMOUTSOU, N.; PAPAFRANGAS, E.; MANIATIS, A. N.; Persistent Colonization of Nine Cystic Fibrosis Patients with na *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* Clone. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**. n.23 p. 336-339, 2004.

KARP, C. L.; FLICKA, L. M.; YANG, R.; UDDIN, J.; PETASIS, N. A. Cystic fibrosis and lipoxins. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 73 p. 263–270, 2005.

KAWAI, Y.; NAKAGAWA, Y.; MATUYAMA, T.; AKAGAWA K.; ITAGAWA, K.; FUKASE, K.; KUSUMOTO, S.; NISHIJIMA, M.; YANO, I. A typical bacterial ornithine-containing lipid N^ω-(D)-[3-(hexadecanoyloxy) hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. n. 23 p. 67-73, 1999.

KAWAI, Y.; TAKASUKA, N.; AKAGAWA, K.; NAITO, S. Hypothermic Response of mice to ornithine-containing lipids and to endotoxin. **Infection and Immunity**. v. 64 n. 6 p. 2101-2105, 1996.

KEAYS, T.; FERRIS, W.; VANDEMHEEN, K. L.; CHAN, F.; YEUNG, S.; MAH, T.; RAMOTAR, K.; SAGINUR, R.; AARON, S. D.; A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: A better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 8 p. 122-127, 2009.

KISICH, K. O.; HIGGINS, M.; DIAMOND, G.; HEIFETS, L. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by Human Neutrophils. **Infection and Immunity**. v. 70 n. 9 p. 4591–4599, 2002.

KONSTAN, M. W.; WALENGA, R. W.; HILLIARD, K. A.; HILLIARD, J. B. Leukotriene 84 Markedly Elevated in the Epithelial Lining Fluid of Patients with Cystic Fibrosis. **Am Rev Respir Dis**. v. 148 p. 896 – 901, 1993.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

KORNIICHUK, H. M.; MAKOHON, N. V.; LUSHNIKOVA, I. V.; ALEKSIEIEVA, I. M. Lipoxygenase inhibitors induce rat hepatocyte apoptosis in primary culture. **Ukr Biokhim Zh.** v. 74 p. 125-127, 2002.

KRISHNAMOORTHY, S.; HONN, K. V. Eicosanoids and other lipid mediators and the tumor hypoxic microenvironment. **Cancer Metastasis Ver.** v. 30 p. 613 – 618, 2011.

LAMBIASE, A.; RAIA, V.; DEL PEZZO1, M.; SEPE, A.; CARNOVALE, V.; ROSSANO, F. Microbiology of airway disease in a cohort of patients with Cystic Fibrosis. **BMC Infectious disease.** v. 6 n. 4, 2006.

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

LEGRAND, C.; ANAÏSSIE, E.; Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in patients with cancer. **Clinical Infectious Disease.** v. 14 n. 2 p. 479-484, 1992.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; The biologically active leukotrienes. **Journal of clinical investigation.** v. 73 p. 889 – 897, 1984.

LEY, K.; Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. **Cardiovascular Research.** v. 32 p. 733 – 742, 1996.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery.** v. 127 p.117-26, 2000.

LORRAIN, D. S.; BAIN, G.; CORREA, L. D.; CHAPMAN, C.; BROADHEAD, A. R.; SANTINI, A. M.; PRODANOVICH, P.; DARLINGTON, J. V.; HUTCHINSON, J. H.; KING, C.; LEE, C.; BACCEI, C.; LI, Y.; ARRUDA, J. M.; EVANS, J. F. Pharmacological Characterization of 3-[3-*tert*-Butylsulfanyl]-1-[4-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-benzyl]-5-(pyridin-2-ylmethoxy)-1*H*indol-2-yl]-2,2-dimethyl-propionic Acid (AM103), a Novel Selective 5-Lipoxygenase-Activating Protein Inhibitor That Reduces Acute and Chronic Inflammation. **The J of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 331 p. 1042–1050, 2009.

LUCIDI, V.; CIABATTONI, G.; BELLA, S.; BARNES, P. J.; MONTUSCHI, P.; Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E₂ in patients with stable and unstable cystic fibrosis. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 45 p. 913-919, 2008.

MACHADO, E. R.; CARLOS, D.; LOURENÇO, E. V.; SOUZA, G. E. P.; SORGI, C. A.; SILVA, E. V.; UETA, M. T.; RAMOS, S. G.; ARONOFF, S. M.; FACCIOLI, L. H.; Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** v. 59 p. 18-32, 2010.

MACHADO, E.R., UETA, M.T., LOURENÇO, E.V., ANIBAL, F.F., SORGI, C.A., SOARES, E.G., ROQUE-BARREIRA, M.C., MEDEIROS, A.I., FACCIOLI, L.H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology.** v.175. n. 6 p. 3892-3899, 2005.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

MALDOX, J. F.; SERHAN, C. N.; Lipoxin A₄ and B₄ Are Potent Stimuli for Human Monocyte Migration and Adhesion: Selective Inactivation by Dehydrogenation and Reduction. **The J of Experimental Medicine**. v. 183 p. 137 – 146, 1996.

MANTOVANI, R. P.; LEVY, C. E.; YANO, T.; A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian Patients with CF is associated with *in vitro* increased proinflammatory cytokines. **Journal of Cystic Fibrosis**. p. 1-7, 2012.

MATTHAY, M. A.; ESCHENBACHER, W. L.; GOETZL, E. J. Elevated Concentrations of Leukotriene D₄ in Pulmonary Edema Fluid of Patients with the Adult Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Clinical Immunology**. v. 4 n. 6, 1984.

MEDEIROS, A. I.; SA-NUNES, A.; SOARES, E. G.; PERES, C. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, p. 1637-1644, 2004.

MEDEIROS, A. I.; SILVA, C. L.; MALHEIRO, A.; MAFFEI, C. M. L.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the β -glucan present in their cell wall. **British Journal of Pharmacology**. v. 128. p. 1529-1537, 1999.

MEDJANE, S.; RAYMOND, B.; WU, Y.; TOUQUI, L.; Impact of CFTR δ F508 mutation on prostaglandin E₂ production and type IIA phospholipase A₂ expression by pulmonary epithelial cells. **Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**. n. 289. p. 816-824, 2005.

MENTER, D. G.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration, and Invasion. **International Journal of Cell Biology**. p. 1 – 12, 2012.

MITSUNOBU, F.; MIFUNE, T.; HOSAKI, Y.; ASHIDA, K.; TSUGENO, H.; OKAMOTO, M.; TAKATA, S.; TANIZAKI, Y. Enhanced production of leukotrienes by peripheral leukocytes and specific IgE antibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J. Allergy Clin Immunol**. v. 107 p. 492 – 8, 2001.

MOGAYZEL, P. J. Jr.; FLUME, P. A.; Update in Cystic Fibrosis 2009. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 181 p. 539-544, 2010.

MOHLER, J.; AZOULAY-DUPUIS, E.; AMORY-RIVIER, C.; MAZOIT, J. X.; BÉDOS, J. P. P.; RIEUX, V.; MOINE, P. *Streptococcus pneumoniae* strain-dependent lung inflammatory responses in a murine model of pneumococcal pneumonia. **Intensive Care Med**. v. 29 p. 808–816, 2003.

MOLONEY, E. D.; EVANS, T. W. Pathophysiology and pharmacological treatment of pulmonary hypertension in acute respiratory distress syndrome. **Eur Respir J**. v. 21 p. 720 – 727, 2003.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

MONACK, D. M.; MECSAS, J.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94 p. 10385 – 10390, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Metabolism of Arachidonic Acid. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 522 p. 454–463, 1988.

MONTEIRO, A. P. T.; PINHEIRO, C. S.; LUNA-GOMES, T.; ALVES, L. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; PORTO, B. N.; BARJA-FIDALGO, C.; BENJAMIM, C. F.; PETERS-GOLDEN, M.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, M. T.; CANETTI, C. Leukotriene B₄ Mediates Neutrophil Migration Induced by Heme. **J of Immunology**, 2011.

MONTUSCHI, P.; BARNES, P. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. **J Allergy Clin Immunol.** v. 109 p. 615 – 20, 2002.

MOOS, M. P. W.; MEWBURN, J. D.; KAN, F. W. K.; ISHII, S.; ABE, M.; SAKIMURA, K.; NOGUCHI, K.; SHIMIZU, T.; FUNK, C. D.; Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability *via* transendothelial vesicle transport. **FASEB J.** v. 22 p. 4352 – 4362, 2009.

MORENO, J. R.; GARCÍA, I. E.; HERNÁNDEZ, M. L. G.; LEON, D. A.; MARQUEZ, R.; PANDO, R. H. The role of prostaglandin E₂ in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology.** v. 106 p. 257 – 266, 2002.

MORI, M.; TAKAKU, Y.; KOBAYASHI, T.; HAGIWARA, K.; KANAZAWA, M.; NAGATA, M. Eosinophil Superoxide Anion Generation Induced by Adhesion Molecules and Leukotriene D₄. **Int Arch Allergy Immunol.** v. 149 p. 31 – 38, 2009.

MORIMOTO, K.; SHIRATA, N.; TAKETOMI, Y.; TSUCHIYA, S.; SEGI-NISHIDA, E.; INAZUMI, T.; KABASHIMA, K.; TANAKA, S.; MURAKAMI, M.; NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E₂-EP₃ Signaling Induces Inflammatory Swelling by Mast Cell Activation. **The Journal of Immunology.** v. 192, 2013.

MURATA, T.; ARITAKE, K.; TSUBOSAKA, Y.; MARUYAMA, T.; NAKAGAWA, T.; HORIA, M.; HIRAI, H.; NAKAMURA, M.; NARUMIYA, S.; URADE, Y.; OZAKI, H. Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. **PNAS.** v. 110 n. 13 p. 5205 – 5210, 2013.

MURRAY, J.; WARD, C.; O'FLAHERTY, J. T.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; CHILVERS, E. R.; ROSSI, A. G. Role of leukotrienes in the regulation of human granulocyte behaviour: dissociation between agonist-induced activation and retardation of apoptosis. **British Journal of Pharmacology.** v. 139 p. 388 – 398, 2003.

NAM, Y. H.; MIN, A.; KIM, S. H.; LEE, Y. A.; KIM, K. A.; SONG, K.; SHIN, M. H. Leukotriene B₄ receptors BLT₁ and BLT₂ are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. **Inflamm. Res.** v. 61 p. 97 – 102, 2012.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

NEWTON, R.; Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**. v. 55 p. 603 – 613, 2000.

NICOLETE, R.; LIMA, K. M.; JÚNIOR, J. M. R.; BARUFFI, M. D.; MEDEIROS, A. I.; BENTLEY, M. V. L. B.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B₄-loaded biodegradable microspheres. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. v. 83 p. 121 – 129, 2007.

NICOSIA, S.; CAPRA, V.; ROVATI, G.E. Leukotrienes as Mediators of Asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 14 p. 3 – 19, 2001.

NJOROGE, S. W.; SEEGMILLER, A. C.; KATRANGI, W.; LAPOSATA, M.; Increased Δ 5- and Δ 6-desaturase, cyclooxygenase-2, and lipoxygenase-5 expression and activity are associated with fatty acid and eicosanoid changes in cystic fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1811; p. 431-440, 2011.

ÖHD, J. F.; NIELSEN, C. K.; CAMPBELL, J.; LANDBERG, G.; LÖFBERG, H.; SJÖLANDER, A. Expression of the Leukotriene D₄ Receptor CysLT₁, COX-2, and Other Cell Survival Factors in Colorectal Adenocarcinomas. **Gastroenterology**. v. 124 p. 57 – 70, 2003.

OKEMOTO, K.; HANADA, K.; NISHIJIMA, M.; KAWASAKI, K. The preparation of a lipidic endotoxin affects its biological activities. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 10 n.31 p. 1952-1954, 2008.

OLIVER, C.; JAHNKE, N.; Omega-3fatty acids for cystic fibrosis (Review). **The Cochrane Library**. v. 8, 2011.

OYOSHI, M. K.; HE, R.; LI, Y.; MONDAL, S.; YOON, J.; AFSHAR, R.; CHEN, M.; LEE, D. M.; LUO, H. R.; LUSTER, A. D.; CHO, J. S.; MILLER, L. S.; LARSON, A.; MURPHY, J. F.; GEHA, R. S. Leukotriene B₄ driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation. **Immunity**. v. 37 n. 4 p. 747 – 758, 2012.

PANZER, U.; UGUCCIONI, M. Prostaglandin E₂ modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **Eur. J. Immunol.** v. 34 p. 3682 – 3689, 2004.

PARK, J. B.; LEE, C. S.; JANG, J.; GHIM, J.; KIM, Y.; YOU, S.; HWANG, D.; SUH, P.; RYU, S. Phospholipase signalling networks in câncer. **Nature**. v. 12 p. 782 – 792, 2012.

PASTORE, F. D.; SCHLEGEL-HAUETER, S. E.; BELLI, D. C.; ROCHAT, T.; DUDEZ, T. S.; SUTER, S. Chemotactic Factors in Bronchial Secretions of Cystic Fibrosis Patients. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 177 n. 5 p. 1413 - 1417, 1998.

PEREIRA, A. T. P.; TRINDADE, B. C.; Secatto, A.; NICOLETE, R.; PERES-BUZALAF, C.; RAMOS, S. G.; SADIKOT, R.; BITENCOURT, C. S.; FACCIOLI, L. H.; Celecoxib improves host defense through prostaglandin inhibition during *Histoplasma capsulatum* infection. **Mediators of inflammation**. p. 1-11, 2013.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

PERES, C. M.; PAULA, L.; MEDEIROS, A. I.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; CARLOS, D.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect.** v. 9 n. 4 p. 483 – 489, 2007.

PERES-BUZALAF, C.; PAULA, L. DE.; FRANTZ, F. G.; SOARES, E. M.; MEDEIROS, A. I.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v. 85. p. 75-81, 2011.

PETERS-GOLDEN, M.; Expanding Roles for Leukotrienes in Airway Inflammation. **Current Allergy and Asthma Reports.** v. 8 p. 367 – 373, 2008.

PTTIPHER, R. The roles of the prostaglandin D₂ receptors DP₁ and CRTH₂ in promoting allergic responses. **British Journal of Pharmacology.** v. 153 p. S191–S199, 2008.

REID, D. W.; MISSO, N.; AGGARWAL, S.; THOMPSON, P. J.; WALTERS, E. H. Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. **Respirology.** v. 12 p. 63–69, 2007.

RENOM, F.; YÁÑEZ, A.; GARAU, M.; RUBÍ, M.; CENTENO, M.; GORRIZ, M.; MEDINAS, M.; RAMIS, F.; SORIANO, J. B.; AGUSTÍ, A.; Prognosis of COPD patients requiring frequent hospitalization: Role of airway infection. **Respiratory Medicine** v. 104 p. 840 – 848, 2010.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A.; Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **International Immunopharmacology.** n.2 p. 603-630, 2002.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The Biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunology.** v. 18 p. 217-242, 2000.

SADIK, C. D.; LUSTER, A. D.; Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. **J. Leukoc. Biol.** v. 91 p. 207–215, 2012.

SADIKOT, R. T.; ZENG, H.; AZIM, A. C.; JOO, M.; DEY, S. K.; BREYER, R. M.; PEEBLES, R. S.; BLACKWELL, T. S.; Cristman, J. W. Bacterial clearance of *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by the inhibition of COX-2. **Eur. J. Immunol.** v. 37. p. 1001-1009, 2007.

SAKAI, M.; KAKUTANI, S.; HORIKAWA, C.; TOKUDA, H.; KAWASHIMA, H.; SHIBATA, H.; OKUBO, H.; SASAKI, S. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. **BMC Cancer.** v. 12 n. 606, 2012.

SCHERMULY, R. T.; GHOFrani, H. A.; ENKE, B.; WEISSMANN, N.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; SCHUDT, C.; WALMRATH, D. Low-dose Systemic Phosphodiesterase Inhibitors Amplify the Pulmonary Vasodilatory Response to Inhaled Prostacyclin in Experimental Pulmonary Hypertension. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 160 p. 1500 – 1506, 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

SCHMITT-GROHÉ, S.; EICKMEIER, O.; SCHUBERT, R.; BEZ, C.; ZIELEN, S. Anti-inflammatory effects of montelukast in mild cystic fibrosis. **Ann Allergy Asthma Immunol.** v. 89 p. 599– 605, 2002.

SECATTO, A.; RODRIGUES, L. C.; SEREZANI, C. H.; RAMOS, S. G.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H.; MEDEIROS, A. I. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptative immune responses during fungal infection. **Plos One.** v. 7 n. 3. p. 1-9, 2012.

SEMENZA, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. **Oncogene.** v. 29 p. 625 – 634, 2010.

SERHAN, C. N.; HAEGGSTRÖM, J. Z.; LESLIE, C. C.; Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. **FASEB J** v. 10 p. 1147-58, 1996.

SHAPPELL, S. B.; BOEGLIN, W. E.; OLSON, S. J.; KASPER, S.; BRASH, A. R. 15-Lipoxygenase-2 (15-LOX-2) Is Expressed in Benign Prostatic Epithelium and Reduced in Prostate Adenocarcinoma. **American Journal of Pathology.** v. 155 n. 1, 1999.

SHUREIQI, I.; WOJNO, K. J.; POORE, J. A.; REDDY, R. J.; MOUSSALLI, M. J.; SPINDLER, S. A.; GREENSON, J. K.; NORMOLLE, D.; HASAN, A. A. K.; LAWRENCE, T. S.; BREENER, D. E.; Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers. **Carcinogenesis.** v. 11 n. 10 p. 1985 – 1995, 1999.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI JR, M. E.; RAINARD, P.; PAAPE, M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 65 n. 8 p. 3286 – 3292, 1997.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. **Pharmacol Rev.** v. 56 p. 387–437, 2004.

SMITH, J. A.; Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. **J. of Leukocyte biology.** v. 56 p. 672 – 686, 1994.

SMITH, W. L.; MEAD E. A.; DEWITT, D. L.; Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes 1 and 2. **Ann. New York Acad. Sci.** v. 714. p. 136 – 142, 1994.

SOARES, E. M.; MASON, K. L.; ROGERS, L. M.; SEREZANI, C. H.; FACCIOLI, L. H.; ARONOFF, D. M. Leukotriene B₄ enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. **J Immunol.** v. 190 p. 1614 - 1622, 2013

SPEAR, J. B.; FUHRER, J.; KIRBY, B.D.; *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *Xylosoxidans*) Bacteremia Associated with a Well-Water Source: Case Report and Review of the Literature. **Journal of clinical Microbiology.** v. 26 n. 3 p. 598-599, 1988.

SPIPKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J.; Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis.** v. 12 p. 298–301, 2013.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

STABLES, M. J.; NEWSON, J.; AYOUB, S. S.; BROWN, J.; HYAMS, C. J.; GILROY, D. W.; Priming innate immune responses to infection by cyclooxygenase inhibition kills antibiotic-susceptible and -resistant bacteria. **Blood**. v.116. n. 16 p. 2950-2959, 2010.

STEELE, V. E.; HOLMES, C. A.; HAWK, E. T.; et al. Chemopreventives Lipoygenase Inhibitors as Potential Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 8 p. 467 – 483, 1999.

STRANDVIK, B.; SVENSSON, E.; SEYBERTH, H. W.; Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 55. n.6. p. 419-425, 1996.

TAHA, R.; OLIVENSTEIN, R.; UTSUMI, T.; ERNST, P.; BARNES, P. J.; RODGER, I. W.; GIAID, A. Prostaglandin H Synthase 2 Expression in Airway Cells from Patients with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 161 p. 636 – 640, 2000.

TAJIMA, T.; MURATA, T.; ARITAKE, K.; URADE, Y.; HIRAI, H.; NAKAMURA, M.; OZAKI, H.; HORIM, M. Lipopolysaccharide Induces Macrophage Migration via Prostaglandin D₂ and Prostaglandin E₂. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 326 p. 493 – 501, 2008.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infection and Immunity**. v. 70 n. 8. p. 4247-42573, 2002.

TANG, D. G.; BHATIA, B.; TANG, S.; SCHNEIDER-BROUSSARD, R. 15-lipoxygenase 2 (15-LO2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 82 p. 135 – 146, 2007.

TARGER, A. M.; LUSTER, A. D. BLT₁ and BLT₂: the leukotriene B₄ receptors. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 69 p. 123–134, 2003.

TATAKIHARA, V. L. H.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol** v. 52 p. 47–58, 2008.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest**. v. 108 p. 15 – 23, 2001.

TOEWS, G. B. Cytokine and the lung. **Eur Respir Journal**. v.18 p. 3s-17s, 2001.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and câncer. **Nature**. v. 10 p. 181 – 193, 2010.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

WEDDE-BEER, K.; HU, C.; RODRIGUEZ, M. M.; PIEDIMONTE, G.; Leukotrienes mediate neurogenic inflammation in lungs of young rats infected with respiratory syncytial vírus. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 282 p. L1143–L1150, 2002.

WOOD, L. G.; FITZGERALD, D. A.; GIBSON, P. G.; COOPER, D. M.; COLLINS, C. E.; GARG, M. G.; Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 20, n. 2. p. 157-165 2001.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; GOTO, S.; TANIMURA, E.; TOMIYOSHI, I.; OHYAMA, A. Description of *Achromobacter xylosoxidans* Yabuuchi and Ohyama 1971. **Int. J. Syst. Bacteriol**. v. 24 p. 470-477, 1974.

YAMAUCHI, A.; DEGAWA-YAMAUCHI, M.; KURIBAYASHI, F.; KANEGASAKI, S.; TSUCHIYA, T. Systematic single cell analysis of migration and morphological changes of human neutrophils over stimulus concentration gradients. **Journal of Immunological Methods**. 2013.

YANG, J.; EISERICH, J. P.; CROSS, C. E. ; MORRISSEY, B. M.; HAMMOCK, B. D. Metabolomic profiling of regulatory lipid mediators in sputum from adult cystic fibrosis patients. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53 p. 160–171, 2012.

YAO, C.; HIRATA, T.; SOONTRAPA, K.; MA, X.; TAKEMORI, H.; NARUMIYA, S.; Prostaglandin E2 promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nature*. p. 1 - 13, 2013.

YUAN, Y.; FANG, S.; QIAN, X.; LIU, L.; XU, L.; SHI, W.; ZHANG, L.; LU, Y.; ZHANG, W.; WEI, E. Leukotriene D₄ Stimulates the Migration but Not Proliferation of Endothelial Cells Mediated by the Cysteinyl Leukotriene CysLT1 Receptor via the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. **J Pharmacol Sci**. v. 109 p. 285 – 292, 2009.

ZAKRZEWSKI, J. T.; BARNES, N. C.; COSTELLO, J. F.; PIPER, P. J. Lipid Mediators in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am Rev Respir Dis**. v. 136 p. 779-782, 1987.

ZITZER, A. WASSENAAR, T. M.; WALEV, I.; BHAKDI, S. Potent Membrane-Permeabilizing and Cytocidal Action of *Vibrio cholerae* Cytolysin on Human Intestinal Cells. **Infection and Immunity** p. 1293–1298, 1997.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

Anexos

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1652.53.6), intitulado "Papel da Prostaglandina E₂ na Infecção Pulmonar Experimental por *Achromobacter xylosoxidans*", de autoria de **Morgana Kelly Borges Prado** e de **Lúcia Helena Faccioli**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04.03.2013.

Colaboradores: Priscila Aparecida Tartari Pereira;
Ana Lúcia da Costa Darini;
Joseane Cristina Ferreira

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1652.53.6), entitled: "Papel da Prostaglandina E₂ na Infecção Pulmonar Experimental por *Achromobacter xylosoxidans*", by **Morgana Kelly Borges Prado** and **Lúcia Helena Faccioli**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, March, 04 2013.

Ribeirão Preto, 8 de março de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.