

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**VALÉRIA APARECIDA BELO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTERLEUCINA-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO  
PELA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO MURINO**

Alfenas/MG

2018

**VALÉRIA APARECIDA BELO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTERLEUCINA-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO  
PELA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas – MG  
Orientador: Leonardo Augusto de Almeida  
Co-orientadora: Patrícia Paiva Corsetti

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Belo, Valéria Aparecida.

Avaliação do papel da interleucina-10 endógena na infecção pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em modelo murino / Valéria Aparecida Belo. -- Alfenas, MG, 2018.

48 f. : il. –

Orientador: Leonardo Augusto de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Interleucina-10. 3. Inflamação. 4. Metaloproteases. I. Almeida, Leonardo Augusto de. II. Título.

CDD 616.079

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB-6/425



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.  
CEP: 37130-001



VALÉRIA APARECIDA BELO

“AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INTERLEUCINA-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO PELA  
BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO MURINO”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 22 de junho de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Leonardo Almeida

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo  
Instituição: UFJF

Assinatura: Gilson Costa Macedo

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Felipe Leomil Coelho

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre me confortar nos momentos difíceis e iluminar meu caminho para que pudesse concluir mais esta etapa em minha vida.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem. À minha irmã e demais familiares, por torcerem pela minha conquista.

Aos meus amigos por me incentivarem, em especial a Joana, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou em vários momentos da minha vida, principalmente durante o mestrado.

Ao meu orientador Leonardo Augusto de Almeida, pelos ensinamentos e dedicação. Obrigada por toda paciência e por me acolher tão bem junto ao seu grupo de pesquisa.

À minha co-orientadora Patrícia Paiva Corsetti, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos professores Rômulo Dias Novaes e Carla Speroni Ceron da Universidade Federal de Alfenas e Débora de Oliveira Lopes da Universidade Federal de São João Del-Rei pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del-Rei - Campus Dona Lindu – CCO, Divinópolis – MG, pela possibilidade de realizar a experimentação.

Aos meus colegas de laboratório Fernanda, Sara, Gabriela, Homero, Bruna, Caio, Gustavo e Augusto, pelo apoio, colaboração e amizade. Ao Gustavo por me incentivar a fazer o processo seletivo para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Serei sempre grata a vocês.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelos conhecimentos transmitidos e dedicação.

Obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, considerada como patógeno oportunista humano, causando infecções agudas potencialmente letais, sendo de grande importância clínica. A resposta imune inata ocorre através do reconhecimento do patógeno seguida de uma intensa resposta inflamatória que auxilia na eliminação da bactéria. Contudo, essa resposta deve ser controlada, sendo a IL-10 considerada como uma citocina imunorreguladora que inibe a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, e as metaloproteinases (MMPs) também importantes reguladores da resposta imune e estão associadas a diversos processos fisiológicos e patológicos. Dada a importância dos mecanismos imunológicos para o melhor entendimento da patofisiologia da infecção por *P. aeruginosa*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da IL-10 murina endógena na infecção pela cepa virulenta PA14 de *P. aeruginosa*. Para avaliar o papel da IL-10, foi realizada a infecção intratraqueal com a cepa PA14 virulenta em camundongos C57BL/6 ou IL-10 KO. Dez horas após a infecção foi analisada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), análises histopatológicas, estereológicas, zimografia e PCR em tempo real nos pulmões dos animais. As análises *in vivo* demonstraram que a cepa PA14 foi recuperada em ambos os tipos de animais, no qual os camundongos IL-10 KO apresentaram elevado número de bactérias viáveis no órgão quando comparado ao grupo C57BL/6. As análises histopatológicas e estereológicas mostraram que os camundongos IL-10 KO apresentaram espessamento de septos alveolares, uma inflamação difusa intensa com elevada concentração de infiltrado de células inflamatórias e alvéolos colapsados culminando na diminuição do espaço alveolar e da superfície pulmonar quando comparados aos animais controles. A atividade da MMP-9, mas não da MMP-2, foi aumentada nos animais infectados, sendo mais ativa nos animais IL-10 KO, assim como o aumento da expressão diferencial dos genes IL-6 e TNF- $\alpha$ . Este trabalho apresenta de forma inédita a estreita relação entre o controle da infecção por *P. aeruginosa* pela IL-10 endógena e o seu controle sobre a MMP-9 e os processos histopatológicos do processo infeccioso em questão.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Interleucina-10. Inflamação. Metaloproteases.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacterium, considered as a human opportunistic pathogen causing acute lethal infections being of great clinical importance. The innate immune response occurs through recognition of the pathogen leading to an inflammatory response which is beneficial for the elimination of the bacterium. However, this response must be controlled being IL-10 an immunoregulator cytokine that inhibits the overproduction of proinflammatory cytokines, and also metalloproteinases (MMPs) that are associated with physiological and pathological processes and immunoregulators. Given the importance of immunological mechanisms for a better understanding of the pathophysiology of *P. aeruginosa* infection, the objective of this study was to evaluate the role of endogenous murine IL-10 in infection with the virulent strain *P. aeruginosa* PA14. To assess the role of IL-10, was performed intratracheal infection with PA14 strain in C57BL/6 or IL-10 KO mice. Ten hours after infection, the recovery of viable bacteria, histopathological and stereological analyzes, zymography and real-time PCR were performed in mice lungs. *In vivo* analyzes demonstrated that IL-10 KO mice were more susceptible due to the high number of viable bacteria in lung when compared to C57BL/6 group. Histopathological and stereological analyzes showed that IL-10 KO mice had alveolar septal thickening, an intense diffuse inflammation with a high concentration of inflammatory cell infiltrate and collapsed alveoli culminating with decrease in alveolar space and lung surface when compared to control animals. The activity of MMP-9, but not MMP-2, as well as IL-6 and TNF- $\alpha$  expression were augmented in the lungs of infected animals, being much more evident in IL-10 KO animals when compared to the other analyzed groups. Taken together, the results of this work presents in an unprecedented way the close relationship between the control of *P. aeruginosa* infection by endogenous IL-10 and its control over MMP-9 activity, IL-6 and TNF- $\alpha$  expression and the histopathological processes of this infectious process.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. Interleukin-10. Inflammation. Metalloproteases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características e fatores de virulência da <i>P. aeruginosa</i> .....	14
Figura 2 - Mecanismo de indução da expressão da IL-10 e pontos de controle da inibição da ativação da resposta pró-inflamatória.....	19
Figura 3 - Animais IL-10 KO são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela <i>P. aeruginosa</i> .....	28
Figura 4 - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados com a cepa PA14 de <i>P. aeruginosa</i> demonstram maiores danos em animais IL-10 KO quando comparados aos controles.....	29
Figura 5 - Análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 ou IL-10 KO infectados com a cepa PA14 de <i>P. aeruginosa</i> e não-infectados, analisados 10 horas após a infecção.....	30
Figura 6 - Análises estereológicas do pulmão de camundongos infectados com a cepa PA14 de <i>P. aeruginosa</i> demonstram diminuição do espaço alveolar e da superfície pulmonar em animais IL-10 KO quando comparados aos controles.....	31
Figura 7 - Animais IL-10 KO e infectados pela <i>P. aeruginosa</i> apresentam maior expressão diferencial dos genes <i>IL-6</i> e <i>TNF-<math>\alpha</math></i> no pulmão quando comparados aos animais controles.....	33
Figura 8 - Animais IL-10 KO apresentam maior atividade enzimática de MMP-9, mas não da MMP-2 quando infectados com a cepa PA14 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR em tempo real.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APCs</b> -	Células apresentadoras de antígenos
<b>CTFR</b> -	Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística
<b>DPOC</b> -	Doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>EMMPRIN</b> -	Indutor extracelular de metaloproteinase
<b>FC</b> -	Fibrose cística
<b>IgG</b> -	Imunoglobulina G
<b>IL</b> -	Interleucina
<b>IFN</b> -	Interferon
<b>KO</b> -	Nocaute
<b>LB</b> -	Lauria Broth
<b>LPS</b> -	Lipopolissacarídeo
<b>MHC II</b> -	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
<b>MMP</b> -	Metaloproteinase
<b>NLRP</b> -	Receptores semelhantes à NOD
<b>NF-κB</b> -	Fator nuclear kappa B
<b>NK</b> -	Natural killer
<b>OPN</b> -	Osteopontina
<b>PAMPs</b> -	Padrões moleculares associados a agentes patogênicos
<b>PMN</b> -	Polimorfonucleares
<b>PRRs</b> -	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>T3SS</b> -	Sistema de secreção do tipo III

<b>TGF-<math>\beta</math></b> -	Fator transformador de crescimento beta
<b>Th</b> -	T <i>helper</i>
<b>TIMP</b> -	Inibidor tecidual de metaloproteinase
<b>TNF</b> -	Fator de necrose tumoral
<b>Treg</b> -	T reguladora
<b>TLR</b> -	Receptor semelhante à <i>Toll</i>
<b>UFC</b> -	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , características e fatores de virulência.....	13
<b>2.2</b>	Doenças causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
<b>2.3</b>	Resposta imune contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
<b>2.4</b>	Controle da resposta imune, IL-10 e as metaloproteinases.....	18
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>4.1</b>	Objetivo geral.....	22
<b>4.2</b>	Objetivos específicos.....	22
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>5.1</b>	Cultivo das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
<b>5.2</b>	Animais, certificado da CEUA-UNIFAL e Certificado de Qualidade de Biossegurança (CQB).....	23
<b>5.3</b>	Infecção.....	23
<b>5.4</b>	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....	24
<b>5.5</b>	Zimografia.....	24
<b>5.6</b>	Histopatologia e estereologia.....	24
<b>5.7</b>	Análise da expressão dos genes codificadores de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ por PCR em tempo real.....	25
5.7.1	Extração de RNA total.....	25
5.7.2	Síntese de cDNA.....	26
5.7.3	PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas.....	26
<b>5.8</b>	Análises Estatísticas.....	27
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
<b>6.1</b>	Animais IL-10 KO são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela <i>P. aeruginosa</i> .....	28
<b>6.2</b>	A ausência da IL-10 endógena acarreta em maiores danos teciduais durante a infecção pulmonar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , mas não altera a arquitetura hepática.....	29

<b>6.3</b>	<b>Animais IL-10 KO apresentam maior expressão de IL-6 e TNF-<math>\alpha</math> nos pulmões quando infectados pela <i>P. aeruginosa</i> quando comparado aos animais C57BL/6.....</b>	<b>32</b>
<b>6.4</b>	<b>Animais IL-10 KO apresentam maior atividade enzimática de MMP-9, mas não da MMP-2, quando infectados com a cepa virulenta de <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, oxidase positiva e não fermentadora de glicose, ubíqua e que geralmente habita o solo e a água. É uma bactéria considerada como patógeno oportunista humano, causando infecções agudas potencialmente letais em pacientes com lesão na barreira epitelial, como nas feridas por queimaduras, e em pacientes imunossuprimidos, resultando em bacteremia, infecção do trato urinário e pneumonia. A *P. aeruginosa* possui grande importância clínica devido ao seu elevado nível de resistência intrínseca aos antibióticos (GRIMWOOD et al., 2015; BREIDENSTEIN et al., 2011).

A infecção pela *P. aeruginosa* é composta por três fases: (1) adesão bacteriana e colonização, (2) invasão local e (3) disseminação. Após uma fase inicial de colonização, o processo infeccioso evolui para uma infecção aguda, caracterizada pela alta produção de fatores de virulência extracelulares, ou crônica em que há baixos níveis desses fatores. Em alguns casos, durante a exacerbação da infecção crônica, como na fibrose cística, a produção de fatores de virulência extracelulares pode estar aumentada (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998; TODAR, 2009).

A resposta imune inata contra uma infecção pela *P. aeruginosa* ocorre através da produção de citocinas inflamatórias, recrutamento celular e depuração fagocítica dessa bactéria por neutrófilos e macrófagos. A imunidade adaptativa exibe especificidade e memória, pode ter uma resposta humoral ou celular com ativação e diferenciação dos linfócitos B e T. Dentre os fatores capazes de regular a resposta imune está a interleucina-10 (IL-10). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória responsável pelo controle das respostas imunes inata e adquirida, evitando lesões teciduais decorrentes de respostas inflamatórias exacerbadas não somente durante processos infecciosos como também na prevenção de patologias inflamatórias assépticas e de doenças autoimunes (CHRISTOFI; APIDIANAKIS, 2013; LOVEWELL et al., 2014; HAZLETT et al, 2014).

Apesar dos grandes progressos obtidos no modelo murino, muitos mecanismos imunológicos induzidos pela *P. aeruginosa* no hospedeiro ainda necessitam ser desvendados. Além disso, estudos da regulação da resposta imune baseado nos mecanismos mediados pela IL-10, uma citocina supressora das respostas pró-inflamatórias da imunidade inata e adaptativa, são necessários para o melhor entendimento da patofisiologia da infecção por

*P. aeruginosa*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da IL-10 endógena na resposta imune frente à infecção pela bactéria *P. aeruginosa* em modelo murino.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção apresentamos a revisão de literatura dividida em tópicos para melhor compreensão do assunto.

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*, características e fatores de virulência

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, oxidase positiva e não fermentadora de glicose, ubíqua e que geralmente habita o solo e a água. Seu genoma de 6.264.403 pares de bases, juntamente com os sistemas de regulação adaptáveis, versatilidade metabólica e alta resistência intrínseca aos antibióticos, permite sua sobrevivência em diversos ambientes (GRIMWOOD et al., 2015; MADIGAN et al., 2016).

A baixa permeabilidade das principais proteínas porinas da membrana externa da *P. aeruginosa* e a presença de várias bombas de efluxo de fármacos são fatores que contribuem para os mecanismos de resistência a antimicrobianos, no qual está incluída a resistência intrínseca cromossomicamente codificada do organismo a diversos antibióticos, a capacidade de adquirir resistência por mutações e a transferência horizontal de genes. A persistência da infecção por esta espécie bacteriana é devido à capacidade de formação de biofilmes e resistência aos antibióticos, que leva a diversas complicações terapêuticas e é associada a tratamento ineficaz e morte do paciente infectado (PELUSO et al., 2010; SUN et al., 2011).

As proteínas da membrana externa, o lipopolissacarídeo (LPS), o pili e os flagelos são estruturas presentes na *P. aeruginosa* e são investigados como possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas. A *P. aeruginosa* sintetiza substâncias da parede celular que permitem a formação de biofilmes caracterizados por uma matriz extracelular contendo polissacarídeos (ex; alginato), proteínas e DNA extracelular. Os polissacarídeos participam da iniciação, desenvolvimento, manutenção do biofilme e evasão do sistema imune inato (Fig. 1) (PELUSO et al., 2010; HORINO et al., 2012; HILL et al., 2017).

Outra importante característica da *P. aeruginosa* é a expressão de um sistema de secreção do tipo III (T3SS), que permite a secreção de potentes toxinas diretamente no citoplasma do hospedeiro, através de um canal (“agulha”) denominado de injessoma, localizado na superfície celular bacteriana. Diversas bactérias Gram-negativas expressam o

T3SS, permitindo que essas bactérias invadam células não fagocíticas ou inibam a fagocitose, reduzam ou promovam as respostas pró-inflamatórias, induzam a apoptose, previnam a autofagia ou modulam o tráfico intracelular, sendo os efetores do T3SS de *P. aeruginosa* caracterizados pela atividade anti-fagocítica e citotóxica (CORNELIS, 2006; SATO; FRANK, 2011; BOUILLOT et al., 2017).

Os fatores de virulência secretados pela *P. aeruginosa*, como pequenas moléculas orgânicas, exoenzimas, toxinas, piocianina e hemolisinas são controlados pelo *quorum sensing*, permitindo que as bactérias produzam esses fatores de uma forma coordenada. O *quorum sensing* é um mecanismo de sinalização no qual a bactéria é capaz de detectar a sua densidade populacional e o ambiente ao seu redor e ativar ou inibir a expressão de genes específicos de maneira cooperativa em vez de células individuais. Além das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, o *quorum sensing* também pode ser observado em fungos. O *quorum sensing* contribui para a formação de biofilmes, assim, favorece a sobrevivência bacteriana em diversos ambientes (WILLIAMS, 2007; MORKUNAS et al., 2016; STRATEVA; MITOV, 2011).

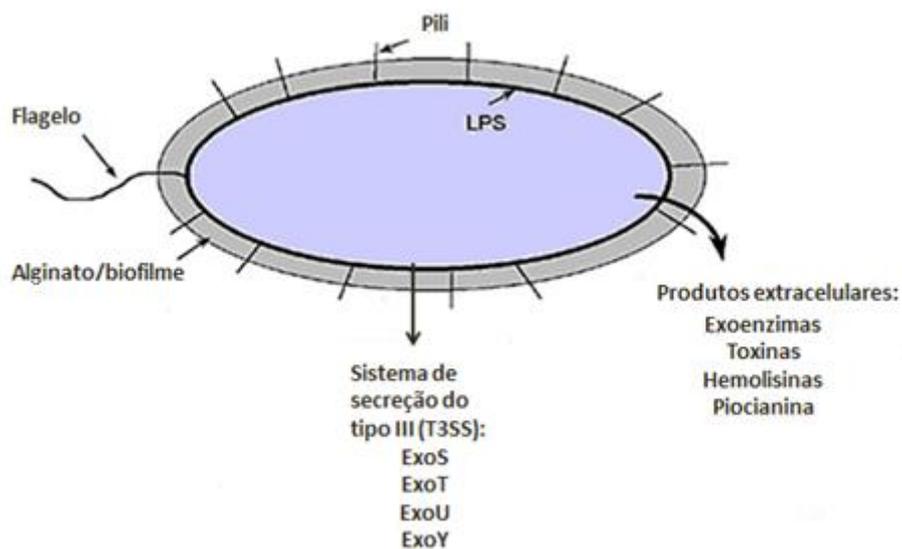


Figura 1 - Características e fatores de virulência da *P. aeruginosa*.

Fonte: Adaptado de sahsrojias.pbworks.com

Nota: O lipopolissacarídeo (LPS), o pili e os flagelos são fatores de virulência presentes na estrutura da *P. aeruginosa*. O alginato é um polissacarídeo presente na parede celular da *P. aeruginosa*, que permitem a formação de biofilmes. O sistema de secreção do tipo III (T3SS) permite a secreção de potentes toxinas (ExoS, ExoT, ExoU e ExoY) diretamente no citoplasma do hospedeiro. As exoenzimas, toxinas, hemolisinas e piocianina são fatores de virulência produzidos no interior da bactéria e secretados para o meio extracelular.

## 2.2 Doenças causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é uma bactéria capaz de causar doenças oportunistas de cunho importante em infecções hospitalares. É responsável por infecções agudas geralmente associadas com feridas de queimaduras, procedimentos invasivos, podendo levar à bacteremia e infecções crônicas nos pacientes com doença pulmonar persistente, principalmente os pacientes que necessitam de ventilação mecânica, como na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e na fibrose cística, e imunossuprimidos, incluindo os pacientes transplantados e em tratamento contra cânceres. As altas incidências de infecções respiratórias agudas e crônicas levaram ao esforço para compreender as condições que facilitam a infecção e colonização da *P. aeruginosa*, bem como mecanismos de patogênese nos pulmões dos hospedeiros mamíferos (PELUSO et al., 2010; LOVEWELL et al., 2014; MUNGUIA et al., 2017).

As infecções por biofilmes de *P. aeruginosa* incluem pneumonia em pacientes com fibrose cística (FC), infecções de feridas crônicas, otite média crônica, prostatite bacteriana crônica e infecções relacionadas a utensílios e equipamentos médicos. Pacientes com FC são frequentemente acometidos por infecções causadas pela *P. aeruginosa*, devido a uma mutação no gene que regula a proteína transmembrana CTFR, gerando um mau funcionamento do canal de cloreto, que resulta em um microambiente anormal do epitélio pulmonar devido a alterações na secreção da mucosa e diminuição do transporte mucociliar. Nestes indivíduos o biofilme de bactérias presente nos pulmões é cercado por leucócitos, que são constantemente recrutados, gerando uma significativa resposta inflamatória que causa danos aos pulmões e consequentemente resulta em insuficiência respiratória (RYBTKE et al., 2015; SAINT-CRIQ et al., 2018).

Apesar do elevado número de pacientes que desenvolvem infecção por *P. aeruginosa* e ineficácia ao tratamento dessa infecção, ainda não há vacina disponível no mercado, apesar dos esforços na investigação para o desenvolvimento de vacina e imunização passiva. Vários desafios necessitam de mais estudos, sendo um deles a vacinação profilática que requer imunização antes da colonização da *P. aeruginosa* nas vias respiratórias, com seu uso limitado para os idosos e pacientes com FC não infectados. Por outro lado, há necessidade de imunização passiva para pacientes criticamente doentes que possuem uma baixa resposta à imunização ativa (PELUSO et al., 2010; GRIMWOOD et al., 2015).

### 2.3 Resposta imune contra *Pseudomonas aeruginosa*

As barreiras de defesa, como a barreira física da pele, muco intestinal e a baixa ou elevada acidez do trato gastrointestinal são as primeiras linhas de defesa contra microrganismos invasores, seguida da resposta imune mediada pelas células de defesa que pode induzir uma resposta rápida e abrangente. A eliminação da *P. aeruginosa* depende do seu reconhecimento pelos fagócitos, tais como neutrófilos e macrófagos, internalização e degradação da bactéria, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (SKERRETT et al., 2007; LOVEWELL et al., 2014; CHRISTOFI; APIDIANAKIS, 2013).

As células do sistema imune inato reconhecem o patógeno através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície das células, em endossomos e no citosol. Os receptores reconhecem os padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) e, em seguida, ativam as vias de transdução intracelulares como a mediada pelo fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que é um complexo de proteína que controla a transcrição de genes codificadores de componentes inflamatórios. Após a ativação do NF- $\kappa$ B ocorre a produção de mediadores da inflamação para induzir reações precursoras da resposta inflamatória (JEON et al., 2014).

Dentre os PAMPs da *P. aeruginosa*, o LPS é capaz de ativar o receptor semelhante à *Toll* 4 (TLR4), a flagelina o receptor TLR5 e o TLR9 reconhece o DNA CpG não-metilado, contribuindo para o reconhecimento do DNA extracelular presente no biofilmes desta bactéria. O T3SS injeta efetores bacterianos nas células hospedeiras e são reconhecidos pelos receptores citosólicos envolvidos na ativação do inflamossoma. Após a ligação entre esses produtos bacterianos e o receptor citosólico NLRP3 ocorre a clivagem e ativação da pró-caspase-1 ativando e secretando a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . A ativação dos TLR 2, 3, 4 ou 7 induzem a expressão da pró-IL-1 $\beta$  e NLRP3 e conseqüentemente ativa o inflamossoma (LIN; KAZMIERCZAK, 2017). A IL-1 após se ligar a seu receptor induz a síntese de produtos pró-inflamatórios, estimulando o recrutamento de fagócitos para o local da infecção para a eliminação da bactéria. Entretanto, os produtos secretados pelos fagócitos, como espécies reativas de oxigênio, em níveis elevados são responsáveis por lesões teciduais no hospedeiro. Torres et al. (2018) demonstra que um ambiente ácido promove um aumento da inflamação dependente de IL-1 em uma infecção por *P. aeruginosa*, sendo o controle do pH um mecanismo para evitar a progressão da doença. Alguns produtos secretados pela *P. aeruginosa* são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, tais como os efetores do T3SS (ExoS, ExoT, ExoU e ExoY) e a piocianina, responsáveis pela virulência da bactéria.

Os efetores ExoS, ExoT, ExoU possuem atividades enzimáticas e citotóxicas nas células hospedeiras. O efector ExoY pode inibir a ativação da caspase-1 que é um componente essencial para a resposta inflamatória mediada pelo inflamossoma. Já a piocianina é capaz de inibir a secreção de IL-1 mediado pela inibição pós-transcricional de NLRP3. A capacidade da *P. aeruginosa* de evadir do sistema imunológico do hospedeiro através desses produtos, contribuem para a sua disseminação e progressão da doença (JEON et al., 2017; WINTER; ZYCHLINSKY, 2018).

A resposta imunológica adaptativa contra bactérias extracelulares, como a *P. aeruginosa*, é caracterizada pela imunidade humoral e celular. Na imunidade humoral há a produção de anticorpos específicos que atuam na neutralização do patógeno, opsonização e ativação do complemento pela via clássica. Além disso, os antígenos proteicos da *P. aeruginosa* ativam as células TCD4<sup>+</sup> via células apresentadoras de antígenos (APCs), levando os linfócitos a secretarem citocinas que estimulam a produção de anticorpos, induzem a inflamação e acentuam as atividades microbidas dos fagócitos (ABBAS et al., 2012; RICKLIN et al., 2010).

As bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa* quando reconhecidas pela resposta imune inata, são capazes de ativar uma resposta imune adaptativa potente. Um dos perfis de resposta imune adaptativa celular é a indução de um perfil Th1, no qual a IL-12 produzida pelas células da imunidade inata juntamente a apresentação dos antígenos proteicos bacterianos aos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, estimulam essas células a secretar IFN- $\gamma$ . Essa importante citocina do perfil Th1 estimula o poder fagocítico, inflamatório e microbicida de macrófagos ao ativá-los classicamente (M1). A estimulação excessiva ou prolongada de M1, frequentemente leva à lesão tecidual e contribui para a patogênese. Os macrófagos também podem desempenhar papéis importantes como imunomoduladores. Neste caso as citocinas IL-4 e IL-13 secretadas pelas células Th2 induzem a ativação dos macrófagos da classe M2 capazes de produzir IL-10 e antagonizar ao papel dos M1. Os pacientes com FC infectados com *P. aeruginosa* tem maior quantidade de M2 em seus pulmões (HAZLETT et al., 2014; SINGH, et al., 2015).

A IL-17 secretadas pelas células Th17 é responsável pela indução da inflamação com predomínio de neutrófilos. A capacidade da IL-17 de induzir citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e quimiocinas são essenciais para a defesa do hospedeiro contra *P. aeruginosa*. Entretanto, a resposta inflamatória induzida por IL-17 pode ser prejudicial ao hospedeiro, levando a danos teciduais através da acumulação de neutrófilos no local da infecção e indução de metaloproteinasas (LI et al., 2014; BAYES et al., 2016).

## 2.4 Controle da resposta imune, IL-10 e as metaloproteinases

Muitas das complicações graves da infecção são devidas a uma resposta imunológica excessiva. Essa resposta exacerbada causa danos nos tecidos e aumento da mortalidade. O papel dos componentes imunoregulatórios da resposta imune é importante para limitar a patologia (COUPER et al., 2008; SARAIVA; O’GARRA, 2010).

Um mecanismo de controle da resposta imune são as células Treg. Essas células expressam CD25<sup>+</sup> e uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>, necessitam de IL-2 para sua geração, manutenção e função. O desenvolvimento e a função das células Treg são controladas pelo fator Foxp3 e desempenham um papel importante no controle do desenvolvimento do câncer, doenças autoimunes e infecciosas. As células Treg secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (BARTHLOTT et al., 2005; WAN; FLAVEL, 2007; LI et al., 2017).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória essencial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes. A IL-10 é um imunorregulador nas infecções com vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, inibindo a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células Th1 e CD8<sup>+</sup>, como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , evitando lesões teciduais que são responsáveis por grande parte da imunopatologia. A IL-10 humana é uma proteína homodimérica de 35 kDa, secretada por diversos leucócitos que contribui para a regulação da resposta inflamatória, levando a uma resposta imune equilibrada com a depuração eficaz dos patógenos e poucos danos no tecido do hospedeiro. A IL-10 também é secretada por células dendríticas, mastócitos, macrófagos, células *natural killer* (NK) e polimorfonucleares (PMN), assim, a produção de IL-10 está associada à resposta imune inata e adquirida (COUPER et al., 2008; HAZLETT et al., 2014; PEÑAZOLA, et al., 2016).

O fenótipo M2 dos macrófagos secreta citocinas como IL-4 e IL-10 e está associado ao reparo tecidual. No início da resposta inflamatória há predomínio do fenótipo M1, importante para a fagocitose e eliminação do microrganismo, e durante essa resposta ocorre a mudança para o fenótipo M2 levando ao reparo do tecido lesionado (ARNOLD et al., 2007; SILVA et al., 2015; XU et al., 2017; SACKMANN et al., 2017)

A produção de IL-10 por células da imunidade inata pode ser induzida pelo reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs. O receptor TLR2 é responsável pela expressão de IL-10 por células apresentadoras de antígenos. A estimulação de TLR4 e TLR9 também expressa IL-10 pelos macrófagos e células dendríticas, e IL-10 produzidos após estimulação de TLR3 ocorrem apenas nos macrófagos. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-

inflamatórias inibindo a ativação de NF $\kappa$ B, pela inibição da fosfoliração de I $\kappa$ B ou pela inibição da ligação do fator de transcrição ao DNA (Fig. 2). A IL-10 também inibe a expressão de MHC de classe II através de um mecanismo pós-transcricional, no qual envolve a inibição do transporte das moléculas MHC II ligadas a peptídeos microbianos para a membrana plasmática, prejudicando a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (GRÜTZ, 2005; MOORE et al., 2001; SARAIVA; O'GARRA, 2010; PEÑALOZA et al., 2016).

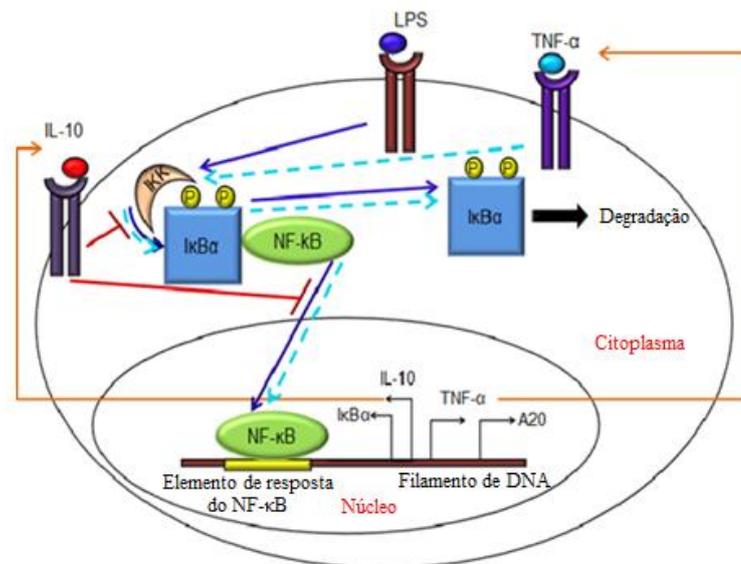


Figura 2 - Mecanismo de indução da expressão da IL-10 e pontos de controle da inibição da ativação da resposta pró-inflamatória.

Fonte: Adaptado de Maiti et al., 2015.

Nota: A produção da IL-10 por células da imunidade inata pode ser induzida pelo reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs. Um exemplo é o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas pelo TLR4 que ativa o fator transcrricional NF $\kappa$ B capaz de induzir além de citocinas pró-inflamatórias também induz a IL-10. A IL-10, por um processo de *feedback* negativo, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias inibindo a ativação de NF $\kappa$ B, pela inibição da fosfoliração de I $\kappa$ B ou pela inibição da ligação do fator de transcrição ao DNA.

Outros importantes componentes reguladores da resposta imune são as metaloproteinases (MMPs). As MMPs são proteases que degradam a matriz extracelular, e estão associadas a processos fisiológicos e patológicos. As MMPs são enzimas zinco-dependentes, e são classificadas de acordo com seus substratos em collagenases, gelatinases, estromelinas, matricinas e MMPs de membrana, que integram a membrana celular como enzima ativa. As atividades das MMPs são reguladas em nível transcricional, ativação de zimógenos e pela ação de inibidores endógenos. Normalmente as MMPs não são expressas em tecidos saudáveis, geralmente são detectadas em processos de reparação ou remodelamento, em tecidos inflamados e em carcinomas (PARKS et al., 2004; BREW; NAGASE, 2010).

As MMPs desempenham papel fisiológico na remodelação tecidual, como desenvolvimento embrionário, angiogênese, no treinamento físico e cicatrização de feridas. Em eventos patológicos como a inflamação, as MMPs são responsáveis por regular a integridade das barreiras físicas, transmigração de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos, através da geração de gradientes de quimiocinas, disponibilidade e atividade de mediadores inflamatórios e regulação da sobrevivência de células inflamatórias (NISSIENEN; KÄHÄRI, 2014; HELMERSSON-KARLQVIST et al., 2012).

As MMP-2 e MMP-9 são gelatinases ou também denominadas de colagenases do tipo IV, e estão associadas ao câncer e à fibrose tecidual. A MMP-9 está envolvida em diversos aspectos da inflamação, tais como o acúmulo de células inflamatórias, a cicatrização e os processos de remodelamento tecidual (LI et al, 2015; BRUSCHI et al., 2014).

A MMP-2 é expressa em diversos tipos de células e está envolvida na regulação de quimiocinas, com isso essa gelatinase participa da modulação da inflamação, essas funções estão associadas à inativação, aumento, antagonismo ou dispersão das propriedades quimiotáticas das quimiocinas. A MMP-2 está associada positivamente à expressão de IL-10 e negativamente a IL-1 $\beta$ , indicando sua importância na regulação da inflamação (MEDEIROS et al., 2017).

A MMP-9 está envolvida na migração celular e na remodelação do tecido durante o desenvolvimento de patologias relacionadas a processos inflamatórios, levando a uma resposta imunológica exacerbada. A MMP-9 é capaz de clivar a IL-1 $\beta$  em uma via independente de caspase-1, contribuir para a secreção de TNF- $\alpha$ , além de ativar o TGF- $\beta$ , envolvido na fibrose (MEDEIROS et al., 2017; WANG et al., 2002).

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são capazes de inibir uma grande variedade de MMPs, entretanto, existem diferenças de especificidade entre eles. A ativação de MMPs e TIMPs ocorre de forma concomitante, o desequilíbrio entre essas enzimas e sua inibição resulta em danos teciduais. Além de sua atividade inibidora de MMPs, as TIMPs possuem várias atividades biológicas, como a promoção da proliferação celular, atividades anti-angiogênicas, pró e anti-apoptóticas e sinápticas, muitas das quais são independentes da inibição da metaloprotease (GARLET et al., 2006; BREW; NAGASE et al., 2010). Os TIMPs são produzidos por vários tipos de células e induzidos ou expressos constitutivamente pela maioria dos tecidos e fluidos corporais. TIMP-1 inibe a atividade da maioria das MMPs, mas possui atividade como um inibidor natural da MMP-9 (BRUSCHI et al, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

*Pseudomonas aeruginosa* possui a capacidade de colonizar vários ambientes e infectar diversos organismos, incluindo o homem. Não existem terapias que previnem esta infecção, sendo o uso de antibióticos o único tratamento aprovado. Dificultando ainda mais o tratamento, *P. aeruginosa* apresenta múltiplos mecanismos de resistência, inclusive à ciclosporinas de terceira geração. A IL-10 é uma citocina envolvida no controle da resposta imunológica inata e adaptativa, com o intuito de evitar lesões teciduais decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada. Apesar dos grandes progressos obtidos no modelo murino, muitos mecanismos imunológicos induzidos pela *P. aeruginosa* no hospedeiro ainda necessitam ser desvendados. Além disso, estudos da regulação da resposta imune baseado nos mecanismos mediados pela IL-10 são necessários para o melhor entendimento da patofisiologia da infecção por *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos o objetivo geral e os específicos.

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da IL-10 murina endógena na infecção pela cepa virulenta PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.2 Objetivos específicos:

Os objetivos específicos foram descritos a seguir:

- a) Quantificar o número de bactérias viáveis no pulmão, baço e fígado de camundongos C57BL/6 ou IL-10 KO infectados com *P. aeruginosa*;
- b) Analisar a expressão de genes codificadores de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6 no pulmão de animais C57BL/6 ou IL-10 KO infectados com *P. aeruginosa*;
- c) Analisar o papel da IL-10 nas variações histopatológicas frente à infecção pela *P. aeruginosa*;
- d) Avaliar a atividade de metaloproteinases MMP-2 ou MMP-9 no pulmão de animais C57BL/6 ou IL-10 KO infectados com *P. aeruginosa*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção apresentamos a metodologia deste estudo.

### 5.1 Cultivo das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

A cepa virulenta de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, que utilizada neste trabalho pertence à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Vacinas do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas. O cultivo da bactéria se deu em meio Lauria Broth (LB), à temperatura de 37 °C e a 180 rotações por minuto. Para o cultivo da cepa bacteriana, 1 mL de cultura congelada (-80°C) de *P. aeruginosa* foi inoculado em 50 mL de meio Lauria Broth (LB) e incubados a 37°C sob constante agitação até a fase de crescimento exponencial da bactéria (fase log), previamente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (aproximadamente 6 horas de crescimento), no qual foi utilizada  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC) para os experimentos.

### 5.2 Animais, certificado da CEUA-UNIFAL e Certificado de qualidade de biossegurança (CQB)

Os animais utilizados nesse projeto foram camundongos da linhagem C57BL/6 com seis a oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais IL-10 KO foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e limpeza, alimentação baseada em água e ração *ad libitum*. Os protocolos do experimento foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL- MG, registrado com o nº 42/2017 (Anexo). A experimentação que envolveu o uso dos animais IL-10 KO foram realizadas em colaboração com a Universidade Federal de São João Del-Rei – Campus Dona Lindu - CCO, sob a coordenação da Profa. Dra. Débora de Oliveira Lopes nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular que possui certificação CQB 301/10.

### 5.3 Infecção

Os animais foram anestesiados com aproximadamente 0,1 mL de solução anestésica composta por 260 uL de quetamina 10%, 130 ul de xilasina [2.3g] e 1110 uL de salina estéril. E em seguida a traqueia dos animais foi exposta e quantidades iguais de *P. aeruginosa* PA14 foram inoculadas ( $1 \times 10^5$  UFCs) (FACCHINI et al., 2014). Após o procedimento, os animais retornaram ao biotério, 10 horas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados com dose letal de anestésico para a retirada de fragmentos do pulmão, baço e fígado para contagem de UFC de bactérias viáveis nos tecidos, análise histopatológica, estereológica, e a partir do macerado do pulmão destes animais foram realizados a análise da expressão dos genes codificadores de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 e avaliação da atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 por zimografia.

### 5.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Os fragmentos de pulmão, fígado e baço extraídos dos animais C57BL/6 e IL-10 KO foram macerados em 9 mL de salina estéril e diluídos serialmente. O macerado de pulmão foi diluído a  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  e os macerados de fígado ou de baço foram diluídos a  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . As diluições foram plaqueadas em duplicata em ágar Lauria Broth (LB). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 horas e realizado a contagem de UFCs.

### 5.5 Zimografia

Os fragmentos de pulmão de camundongos C57BL/6 e IL-10 KO foram triturados e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas e preparação das amostras para determinação de MMP-2 e MMP-9. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% contendo 1% de gelatina. Após a eletroforese os géis foram retirados das placas e imersos em Triton X-100 a 2%, sob suave agitação por 30 minutos, sendo esse processo repetido por três vezes para remoção do SDS (dodecil sulfato de sódio, utilizado para linearizar as proteínas). Em seguida, os géis foram colocados em solução de Tris-HCl 50mM por 16 horas em temperatura de 37°C para ativação das MMPs. Posteriormente os géis foram corados em solução Coomassie Blue, em seguida foi realizada a descoloração com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Os géis foram digitalizados e a atividade enzimática das MMPs foram determinadas de acordo com os pesos

moleculares, utilizando o programa de imagem ImageJ (National Institutes of Health) (CERON et al., 2013).

## 5.6 Histopatologia e estereologia

Fragmentos do fígado e do pulmão foram fixados em solução de formol a 10%, desidratados, diafanizado e embebidos em parafina. Secções de tecido de quatro micrômetros de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. As avaliações histopatológicas presentes em secções histológicas dos órgãos foram determinadas usando um microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmera fotográfica digital acoplada. As imagens digitalizadas foram obtidas utilizando-se o software de captura e análise de imagens Axion Vision LE (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha) na objetiva de 40x. As análises estereológicas foram determinadas pelos parâmetros contagem de alvéolos (alvéolos/mm<sup>2</sup>), densidade de volume de septo e espaço alveolar (V<sub>v</sub> %) e densidade de superfície alveolar (S<sub>v</sub>, μm<sup>2</sup>/μm<sup>3</sup>). A contagem de alvéolos e densidade de volume de septo e espaço alveolar foram determinadas em uma área de 35x10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>. A densidade de volume (V<sub>v</sub>, %) de septo e espaço alveolar foi estimada utilizando um sistema de teste de 100 pontos que incidem sobre septos ou alvéolos em uma área de acordo com a seguinte fórmula:  $V_v = \Sigma P / P_t$ ; em que  $\Sigma P$  representa o número de pontos do sistema de teste que incidem sobre septos ou alvéolos e  $P_t$  corresponde ao número total de pontos do sistema de teste. A densidade de superfície foi estimada utilizando um sistema de teste de 25 arcos cicloides de acordo com relação  $S_v = (2 \times \Sigma I) / L_T$ , em que  $\Sigma I$  indica o número total de interseções entre os arcos cicloides e a superfície alveolar, e  $L_T$  representa o comprimento total do sistema de arcos cicloides (757,02 μm). As análises estereológicas foram realizadas utilizando o software de análise de imagens Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES et al., 2012).

## 5.7 Análise da expressão dos genes codificadores de IL-10, IL-6 e TNF-α por PCR em tempo real

Nesta seção apresentamos a metodologia da análise da expressão dos genes codificadores de IL-10, IL-6 e TNF-α por PCR em tempo real dividida em tópicos para melhor compreensão do assunto.

### 5.7.1 Extração de RNA total

Para análise da expressão diferencial dos genes, o RNA das amostras provenientes do macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 e IL-10 KO infectados com a *P. aeruginosa* e não infectados, foram extraídos utilizando o reagente LS Trizol® (Life Technologies, USA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras com Trizol foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se então 200 uL de clorofórmio, homogeneizou-se, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1200 g. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um tubo estéril. O RNA total foi precipitado com 200 uL de isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado lavado com etanol 75%. Por fim, o RNA total foi eluído com 25 uL de água livre de RNase. Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nanodrop (ThermoScientific, USA) a 260 nm e armazenado a -80°C até ser utilizado para a síntese do cDNA de fita simples.

### 5.7.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada através da reação de transcrição reversa utilizando o kit ilustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads – GE, no qual contem a enzima transcriptase reversa, dNTPs, tampão MgCl<sub>2</sub>, Tris HCl e KCl, de acordo com os dados do fabricante. Foram adicionados aos eppendorfs pertencentes ao kit utilizado, 1 µL de oligo dT, 1µg de RNA obtidos do macerado de pulmão dos animais infectados com a *P. aeruginosa* e não infectados e H<sub>2</sub>O nuclease free (q.s.p. 49 µL). As amostras foram levadas para termociclador Geneamp pcr system 9700 a 42°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C ∞. Após a conclusão da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C para posteriores análises de PCR em tempo real.

### 5.7.3 PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas

Para a análise da expressão diferencial dos genes codificadores das citocinas IL-10, IL-6 e TNF-α foram utilizados iniciadores previamente desenhados pelo nosso grupo de pesquisa. Os iniciadores utilizados e suas sequências estão representados na tabela 1. As reações da PCR foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems Applied Biosystems utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA

sintetizadas. O volume final das reações foi de 10 uL, contendo 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 1µL de cada oligonucleotídeo a 250nM e 3 uL do cDNA de cada amostra. As condições de amplificação utilizadas para a análise de genes codificadores de citocinas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi a *β-actina*. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR em tempo real

Primer	Sequência
IL-10 F	5' -GGTTGCCAAGCCTTATCGGA- 3'
IL-10 R	5' -ACCTGCTCCACTGCCTTGCT -3'
IL-6 F	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
IL-6 R	5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGGA-3'
TNF-α F	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACA-3'
TNF-α R	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>β-actina</i> F	5'-AGGTGTGCACTTTTTATTGGTCTCAA-3'
<i>β-actina</i> R	5'-TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT-3'

Fonte: Corsetti et al., 2018.

## 5.8 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados usando o programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc), através de teste *t* / teste one way ANOVA, com pós teste de Turkey.

## 6 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estarão apresentados na seguinte ordem: análises de CFU, histopatológicas, estereológicas, expressão dos genes *IL-10*, *IL-6* e *TNF- $\alpha$*  e zimografia.

### 6.1 Animais IL-10 KO são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*

Dez horas após a infecção intratraqueal de camundongos C57BL/6 ou IL-10 KO, nenhum animal foi a óbito, entretanto os camundongos IL-10 KO mostraram-se mais debilitados que os camundongos C57BL/6. Após serem eutanasiados, o número de bactérias viáveis foi avaliado nos pulmões, no baço e no fígado destes animais.

A contagem de UFC foi realizada e resultados significativos foram observados apenas no pulmão, mostrando que nesse período não ocorreu disseminação bacteriana para os outros órgãos. As análises *in vivo* demonstraram que a cepa PA14 foi recuperada de pulmões de ambos os tipos de animais, no qual os camundongos IL-10 KO mostrou-se mais suscetível devido ao elevado número de bactérias viáveis no órgão (Média 4,8 log UFC), quando comparado ao grupo C57BL/6 (Média 3,3 log UFC) (Fig. 3). A diferença entre os grupos é de aproximadamente 1,5 log UFC recuperados do pulmão desses animais em média.

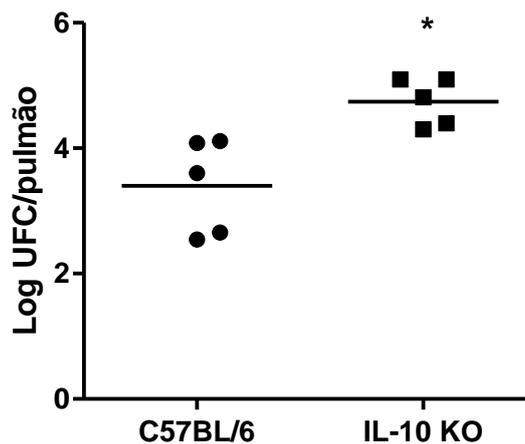


Figura 3 - Animais IL-10 KO são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*.

Fonte: Da autora.

Nota: O pulmão de animais infectados com  $1 \times 10^5$  UFCs da cepa PA14 de *P. aeruginosa* foi recuperado 10 horas após a infecção e foi feita a contagem de UFCs viáveis. Os dados foram transformados em valores de log de UFC por pulmão. O resultado apresentado é representativo de 2 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ .

## 6.2 A ausência da IL-10 endógena acarreta em maiores danos teciduais durante a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*, mas não altera a arquitetura hepática.

As análises histopatológicas foram realizadas com amostras de pulmão e fígado de animais infectados e não infectados com a *P. aeruginosa* após 10 horas de infecção, sendo observadas alterações somente nos pulmões dos animais infectados quando comparados aos pulmões dos animais não infectados, concordante com os resultados de obtenção de bactérias viáveis neste órgão. Os fragmentos de tecido pulmonar corados com hematoxilina e eosina mostraram que os camundongos IL-10 KO apresentaram espessamento de septos alveolares, uma inflamação difusa intensa com elevada concentração de infiltrado de células inflamatórias e alvéolos colapsados quando comparados aos demais grupos analisados (Fig. 4).

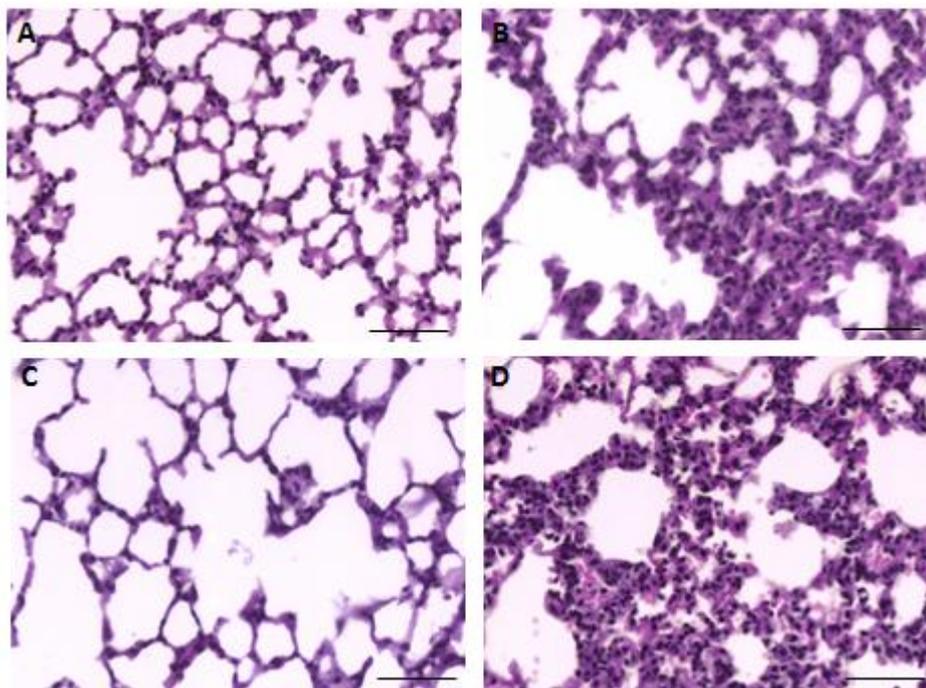


Figura 4 - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* demonstram maiores danos em animais IL-10 KO quando comparados aos controles.

Fonte: Da autora.

Nota: Fragmentos do pulmão de animais C57BL/6 ou IL-10 KO, infectados ou não infectados, foram fixados em solução de formol a 10%, desidratados, diafanizado e embebidos em parafina. Secções de tecido foram corados com hematoxilina e eosina. (A) Arquitetura histológica normal de C57BL/6 não infectado. (B) Espessamento de septo e presença de infiltrado inflamatório, com moderada celularidade nos camundongos C57BL/6 infectado. (C) Arquitetura histológica normal, apresentando alvéolos maiores comparados aos C57BL/6 não infectado nos camundongos IL-10 KO não infectado. (D) Espessamento de septo, infiltrado inflamatório difuso, elevada celularidade e alvéolos colapsados nos camundongos IL-10 KO infectado. Aumento de 40x. Barras (50µm).

A análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 e IL-10 KO infectados não apresentaram alterações em sua arquitetura comparadas com o fígado dos animais controles (Fig. 5), corroborando com os resultados observados na contagem de UFC, demonstrando que em 10 horas de infecção, a cepa PA14 de *P. aeruginosa* não foi capaz de se disseminar e causar danos em outros tecidos.

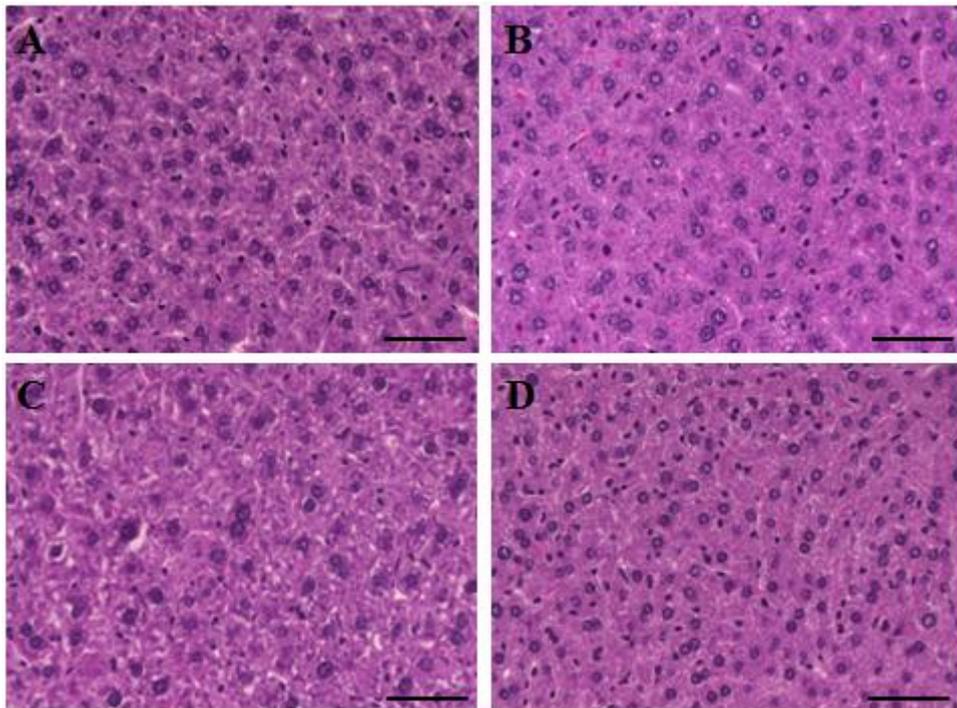


Figura 5 - Análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 ou IL-10 KO infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* e não infectados, analisados 10 horas após a infecção.

Fonte: Da autora.

Nota: A análise do tecido hepático demonstra não haver alterações histológicas neste órgão em nenhum dos animais analisados. Fragmentos do fígado de animais C57BL/6 ou IL-10 KO, infectados ou não infectados, foram fixados em solução de formol a 10%, desidratados, diafanizado e embebidos em parafina. Secções de tecido foram corados com hematoxilina e eosina. (A) Arquitetura histológica normal de C57BL/6 não infectado. (B) Arquitetura histológica normal de C57BL/6 infectado. (C) Arquitetura histológica normal de IL-10 KO não infectado. (D) Arquitetura histológica normal de IL-10 KO infectado. Aumento de 40x. Barras (50µm).

Para quantificar as alterações observadas, análises estereológicas foram realizadas para a determinação da contagem de alvéolos, espaço alveolar e septo alveolar e densidade de superfície. Na contagem de alvéolos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Fig. 6A). As análises estereológicas demonstraram uma diminuição do espaço alveolar dos animais IL-10 KO infectados quando comparado aos camundongos IL-10 KO não infectado e C57BL/6 infectados (Fig 6B) e uma diminuição da densidade de superfície do pulmão dos animais IL-10 KO infectados quando comparado aos camundongos

IL-10 KO não infectados e C57BL/6 infectados (Fig 6C), corroborando com as alterações observadas no corte histológico (Fig 4).

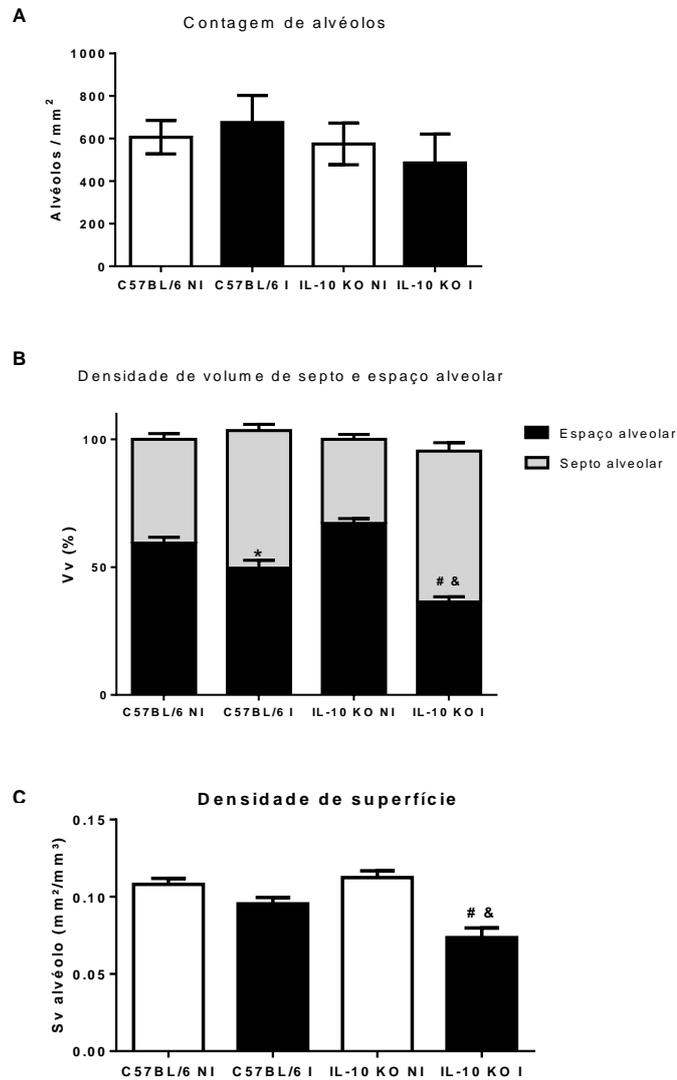


Figura 6 - Análises estereológicas do pulmão de camundongos infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* demonstram diminuição do espaço alveolar e da superfície pulmonar em animais IL-10 KO quando comparados aos controles.

Fonte: Da autora.

Nota: Nas análises estereológicas, não foram encontradas diferenças significativas na contagem de número de alvéolos (A). Os camundongos IL-10 KO infectados apresentaram menor espaço alveolar comparado com os camundongos IL-10 KO não infectados e C57BL/6 infectados, também foi observado uma diminuição do espaço alveolar nos tecidos pulmonares de camundongos C57BL/6 infectados comparado com os C57BL/6 não infectados (B). Foi mostrada uma diminuição na densidade de superfície alveolar nos camundongos IL-10 KO infectados comparados aos IL-10 KO não infectados e C57BL/6 infectados (C). \* $p < 0,05$  em relação ao C57BL/6 não infectados; # $p < 0,05$  em relação IL-10 KO não infectado; & $p < 0,05$  em relação ao C57BL/6 infectado.

### **6.3 Animais IL-10 KO apresentam maior expressão de *IL-6* e *TNF- $\alpha$* nos pulmões quando infectados pela *P. aeruginosa* quando comparado aos animais controles**

A expressão dos genes *IL-10*, *IL-6* e *TNF- $\alpha$*  do macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 e IL-10 KO após 10 horas de infecção com cepa PA14 de *P. aeruginosa* foram avaliados utilizando RT-qPCR.

Na análise da expressão diferencial de *IL-10* foi observado um aumento desta citocina em camundongos C57BL/6 infectados em relação aos camundongos C57BL/6 não infectados. Não foi observada a expressão de *IL-10* nos camundongos IL-10 KO, confirmando sua deleção (Fig. 7A).

Na análise da expressão diferencial do gene codificado da *IL-6* foi demonstrado um aumento da citocina no macerado de pulmão de camundongos IL-10 KO quando comparados aos demais grupos analisados. Além disso, também pode ser observado um aumento da expressão de *IL-6* em camundongos C57BL/6 infectados em relação aos camundongos C57BL/6 não infectados, contudo o gene *IL-6* teve uma expressão significativamente maior nos animais IL-10 KO (Fig. 7B). Na análise da expressão de *TNF- $\alpha$*  verificou-se um aumento significativo desta citocina nos animais IL-10 KO infectados e C57BL/6 infectados em relação aos animais controles, sendo esse aumento relativamente maior nos camundongos IL-10 KO infectados comparados aos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* (Fig. 7C).

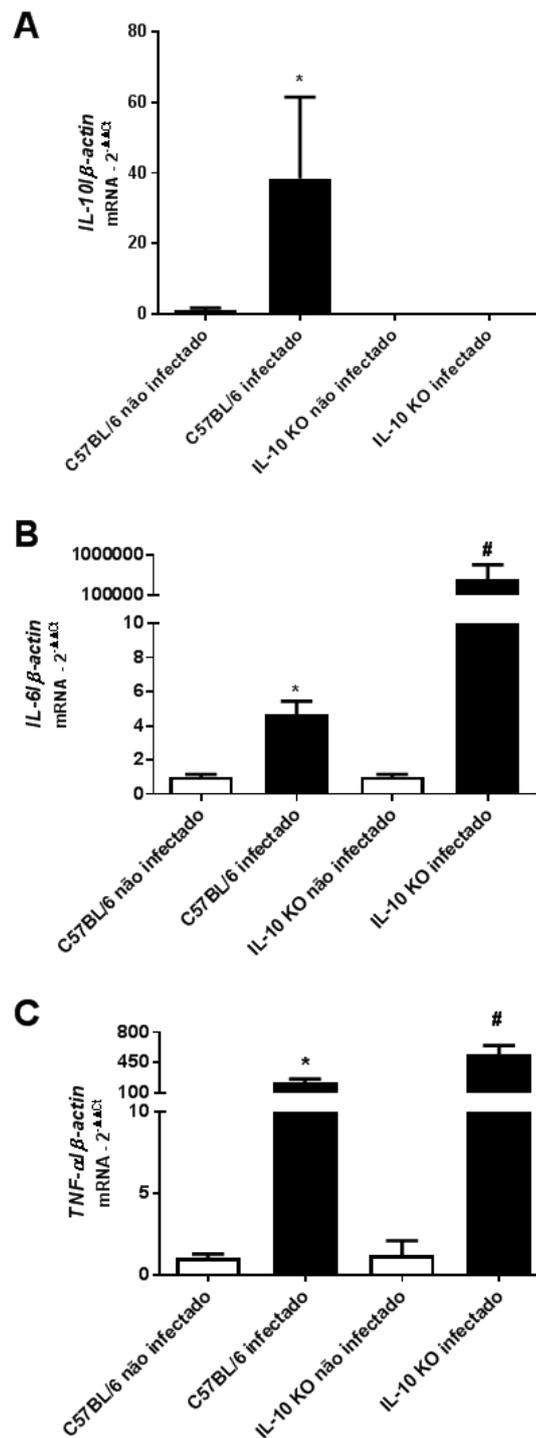


Figura 7 - Animais IL-10 KO infectados pela *P. aeruginosa* apresentam maior expressão diferencial dos genes *IL-6* e *TNF- $\alpha$*  no pulmão quando comparados aos animais controles.

Fonte: Da autora.

Nota: A análise da expressão dos genes pró-inflamatórios *IL-6* e *TNF- $\alpha$*  ou anti-inflamatório *IL-10* no macerado de pulmão de animais C57BL/6 e IL-10 KO não infectados e infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* foi realizada por RT-qPCR. Análise da expressão diferencial de *IL-10* (A), *IL-6* (B) ou *TNF- $\alpha$*  (C) em animais C57BL/6 ou IL-10 KO quando infectados ou não infectados pela cepa virulenta de *P. aeruginosa*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo C57BL/6 não infectados; # $p < 0,05$  em relação ao grupo IL-10 KO não infectado.

#### **6.4 Animais IL-10 KO apresentam maior atividade enzimática de MMP-9, mas não da MMP-2, quando infectados com a cepa virulenta de *P. aeruginosa***

O macerado dos pulmões foi utilizado para a análise da atividade das MMP-2 e MMP-9 por zimografia. As análises dos géis de zimografia mostraram a presença de bandas de aproximadamente 64kDa correspondente à atividade da enzima MMP-2 em amostras de fragmentos de pulmão de animais C57BL/6 e IL-10 KO não infectados (controles) e nos animais C57BL/6 e IL-10 KO após 10 horas de infecção com a cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Não foi observada diferença significativa da atividade de MMP-2 entre os animais controles e IL-10 KO, como mostrado na figura 8A.

Já a análise da atividade da MMP-9, foi possível observar elevada atividade de MMP-9 em animais IL-10 KO infectados com *P. aeruginosa* comparado aos animais dos demais grupos, também foi observado um aumento significativo de MMP-9 nos animais C57BL/6 infectados comparados aos animais C57BL/6 não infectados ( $p < 0,05$ ), mostradas pela presença de bandas de aproximadamente 89 kDa (Fig. 8B).

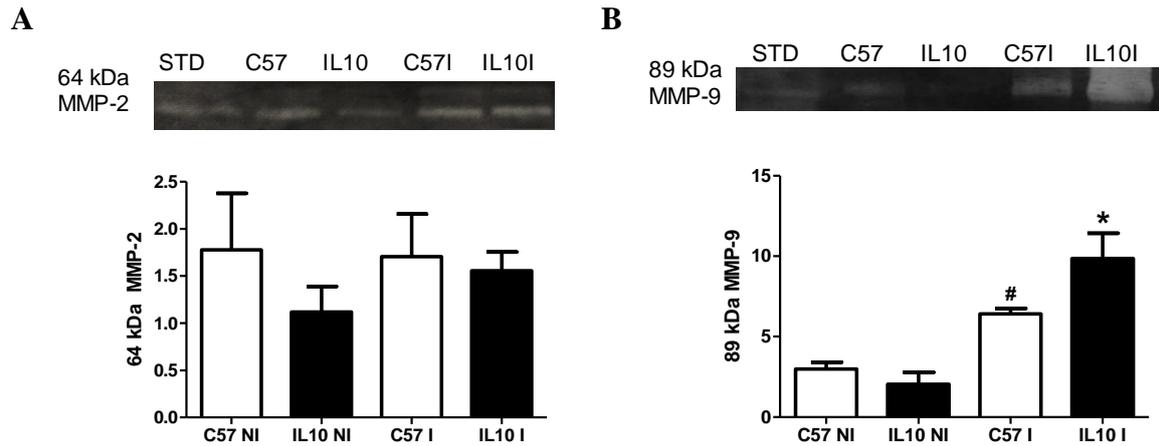


Figura 8 - Animais IL-10 KO apresentam maior atividade enzimática de MMP-9, mas não da MMP-2 quando infectados com a cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Da autora.

Nota: A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar de animais C57BL/6 ou IL-10 KO infectados ou não infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* foi avaliada por zimografia. Em A observa-se a avaliação da atividade da MMP-2 no tecido pulmonar de animais C57BL/6 não infectado (C57NI), IL-10 KO não infectado (IL-10NI), C57BL/6 infectado (C57I) ou IL-10 KO e infectado (IL-10I) e a representação do gel da zimografia é demonstrada pela intensidade das bandas utilizando o programa de editoração de imagens ImageJ em relação ao grupo de menos atividade apresentada (Neste caso o grupo IL-10). Em B observa-se a avaliação da atividade da MMP-9 no tecido pulmonar de animais C57BL/6 não infectado (C57NI), IL-10 KO não infectado (IL-10NI), C57BL/6 infectado (C57I) ou IL-10 KO infectado (IL-10I) e a representação do gel da zimografia é demonstrada pela intensidade das bandas utilizando o programa de editoração de imagens ImageJ em relação ao grupo de menos atividade apresentada (Neste caso o grupo IL-10). \* $p < 0,05$  em relação aos demais grupos; # $p < 0,05$  em relação ao C57BL/6 não infectado. STD: padrão.

## 7 DISCUSSÃO

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória responsável pelo controle da resposta imunológica, evitando resposta exacerbada e prevenindo danos teciduais. O reconhecimento da *P. aeruginosa* pelos receptores nas células do sistema imune inato resulta na ativação das vias de sinalização de NF- $\kappa$ B, levando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  necessárias para a depuração bacteriana. As respostas inflamatórias exacerbadas estão associadas com o aumento da morbidade e mortalidade do hospedeiro, sendo a causa principal da doença e não a presença do microrganismo patogênico (LIN; KAZMIERCZAK, 2017).

Neste estudo foi mostrado de forma inédita que na deleção da IL-10 endógena houve uma recuperação elevada de bactérias viáveis no pulmão dos animais infectados com a cepa virulenta PA14 da *P. aeruginosa*. Esse dado foi obtido através da contagem de UFC no pulmão de camundongos IL-10 KO comparados aos camundongos C57BL/6, ambos infectados com  $1 \times 10^5$  UFCs da cepa PA14 de *P. aeruginosa* (Fig. 3). Entretanto, não foram recuperadas bactérias no baço e fígado desses animais, mostrando que após 10 horas de infecção, a *P. aeruginosa* não foi capaz de se disseminar para outros órgãos. Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, animais C57BL/6 infectados com  $1 \times 10^6$  UFC da cepa virulenta PA14 da *P. aeruginosa*, todos os animais foram a óbito 16 horas após a infecção e que essa cepa foi capaz de se espalhar por diversos órgãos dos animais (trabalho em processo de submissão). Xavier e colaboradores (2013) mostraram que os macrófagos murinos isolados possuem papel limitado na produção de IL-10 frente a uma infecção pela bactéria patogênica intracelular *Brucella abortus*, contribuindo para uma menor sobrevivência do patógeno em macrófagos derivados de camundongos IL-10 KO. Contudo foi demonstrada uma menor sobrevivência de *B. abortus* no baço e no fígado de camundongos IL-10 KO, sugerindo que *B. abortus* pode residir em células com baixa atividade microbicida. Já Corsetti e colaboradores demonstraram uma maior depuração da mesma bactéria em animais IL-10 KO, chegando ao *clearance* total da bactéria 14 semanas após a infecção (Corsetti et al., 2013).

Um estudo de Chen e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos com infecção secundária pela *P. aeruginosa* após sepse, apresentaram diminuição na depuração bacteriana no pulmão, aumento da mortalidade desses animais e aumento na expressão de IL-10. Piao e Yuan (2017) demonstraram que a osteopontina (OPN), uma glicoproteína presente em vários tecidos e células imunes, promoveu a expressão de citocinas pró-

inflamatórias, mas não alterou a expressão de IL-10 e gerou elevada mortalidade em camundongos infectados com *P. aeruginosa*. Apesar da maior depuração bacteriana nos camundongos controles 12 horas após a infecção, esses camundongos apresentaram maiores danos no baço, indicando que a ausência de OPN leva à resistência a infecção por *P. aeruginosa*. Esses trabalhos demonstram um papel importante da IL-10 no controle da bactéria no hospedeiro mediada por uma resposta imune efetiva.

No presente estudo foi observada, nas análises histopatológicas, elevado infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar (Fig. 4), e através de análises estereológicas, foi demonstrada uma diminuição do espaço alveolar e da densidade de superfície alveolar de camundongos IL-10 KO infectados (Fig. 6), mostrando que essas alterações na arquitetura do pulmão colaboram com a gravidade da doença. Apesar de um maior influxo de células inflamatórias para o local da infecção, os animais IL-10 KO não conseguiram manter uma depuração bacteriana eficiente como nos animais C57BL/6 (Fig. 3). No estudo de Peñaloza e colaboradores (2015), foi demonstrado que a ausência de IL-10 em uma pneumonia causada pelo *Streptococcus pneumoniae* leva a uma inflamação excessiva, com aumento do recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias, acarretando em elevada mortalidade do hospedeiro. Os resultados de Peñaloza e colaboradores corroboram com as análises histopatológicas observadas neste trabalho. Contudo, nenhum dos animais IL-10 KO foi a óbito no pequeno espaço de tempo analisado no presente estudo. Esses dados sugerem que a citocina IL-10 tem papel importante na depuração bacteriana e no controle da resposta inflamatória.

No estudo de Wölbeling e colaboradores (2011) foi demonstrada a diminuição da função pulmonar de camundongos C57BL/6 após infecção intratraqueal com  $6 \times 10^5$  UFC da *P. aeruginosa*, apresentando infiltrado inflamatório, com presença de células polimorfonucleares nos alvéolos, histiocitose alveolar, necrose do septo alveolar e edema, em animais mais fortemente afetados, apresentaram sinais de pneumonia supurativa. As alterações mais significativas foram observadas entre 24 e 48 horas após a infecção, nesse tempo também foi observado redução da contagem de UFC no pulmão. Entretanto o infiltrado inflamatório foi observado a partir de 2 horas após a infecção.

A secreção de citocinas por células do sistema imune inato são de extrema importância nas respostas inflamatórias agudas. Dentre as principais citocinas da resposta imune inata estão a IL-6 e TNF- $\alpha$ , responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o local da infecção, a fim de eliminar o microrganismo patogênico (ABBAS, 2012). No presente estudo foi observado um aumento da expressão tanto do gene codificador da IL-6 quanto de

TNF- $\alpha$  no pulmão de camundongos infectados pela *P. aeruginosa*, sendo esse aumento mais evidente e diferencialmente aumentado nos pulmões dos animais IL-10 KO comparados com os demais grupos analisados, corroborando com as análises histopatológicas e estereológicas, no qual a inflamação é mais evidente nesses animais.

Gutierrez-Murgas et al. (2016) demonstrou aumento de IL-6 em camundongos IL-10 KO com cateteres infectados com *Staphylococcus epidermidis* implantados no cérebro. Também foi observado que a ausência de IL-10 não influenciou na depuração bacteriana. Entretanto, o aumento da inflamação em animais IL-10 KO foi importante para o aumento da gravidade da doença.

Corsetti et al. (2013) mostra um aumento de TNF- $\alpha$  no soro de camundongos IL-10 KO comparados ao *background* genético dos camundongos analisados (*wild-type*) quando infectados com *Brucella abortus*. Guilbault et al. (2002) demonstrou um aumento de TNF- $\alpha$  nos pulmões de camundongos IL-10 KO comparados aos controles após 4 dias de infecção por *P. aeruginosa*, sugerindo que níveis elevados de TNF- $\alpha$  podem ser prejudiciais ao hospedeiro ao longo do tempo em um processo infeccioso. Além disso, um estudo anterior do mesmo autor mostra que o aumento de TNF- $\alpha$  nas primeiras 24 horas após a infecção foi benéfico na erradicação da bactéria divergindo do resultado obtido neste trabalho, onde, mesmo com aumento significativo dessa citocina (Fig. 7C), foi recuperado um maior número de bactérias viáveis no pulmão dos animais IL-10 KO (Fig. 3).

Neste estudo foi observado um aumento da IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* comparados aos camundongos C57BL/6 não infectados. Esse dado indica o potencial da função reguladora da IL-10 frente uma infecção por *P. aeruginosa*, visto o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, a produção de IL-10 se faz necessária para o controle da resposta inflamatória. É provável que a expressão diferencial do gene codificador dessa citocina esteja acompanhando um aumento prévio da expressão dos genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias em um processo capaz de imunorregular um processo inflamatório tão extenso provocado pela *P. aeruginosa* como pode ser visto nas análises histopatológicas pulmonares (Fig. 4) e quantificados pelas análises estereológicas (Fig. 6).

Levando em consideração o efetivo aumento na expressão de genes codificadores das citocinas pró-inflamatórias e o aumento do influxo inflamatório no pulmão de animais IL-10 KO infectados pela *P. aeruginosa*, o presente estudo avaliou a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no pulmão dos animais C57BL/6 ou IL-10 KO durante a infecção pela *P. aeruginosa*. As MMPs são consideradas importantes controladoras da resposta imune

(PARKS et al., 2004), sendo assim se torna de suma importância determinar quais outros fatores imunorregulatórios que podem vir a suprir a ausência da IL-10 no processo infeccioso em estudo. Os resultados apresentados na figura 8 demonstram que há um aumento da atividade da MMP-9, mas não da MMP-2 no pulmão dos animais infectados, sendo mais ativa nos animais IL-10 KO. As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco que degradam a matriz extracelular e são secretadas por diversos tipos celulares, participando de processos fisiológicos e patológicos. A MMP-2 é constitutivamente expressa pela maioria das células, e geralmente não são induzidas por citocinas ou fatores de crescimento. Ao contrário, a expressão de MMP-9 é baixa em tecidos normais e elevada, induzida por citocinas inflamatórias, como em células inflamatórias e células cancerosas. Esses dados correlacionam-se com os resultados não somente da histopatologia e estereologia dos pulmões dos animais infectados pela *P. aeruginosa* obtidos neste trabalho, como também na análise da expressão diferencial dos genes pró-inflamatórios indicando que o aumento da atividade de MMP-9 está relacionado com a elevada concentração de células inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos IL-10 KO infectados com a cepa PA14 de *P. aeruginosa* (Fig. 8B).

A MMP-9 tem papel importante na proteção contra endotoxinas mediadoras do choque, redução da migração de células dendríticas, redução de angiogênese, diminuição da bronquiolização após lesão pulmonar aguda, alterações nos gradientes de quimiocinas e leucócitos induzindo a inflamação (PARKS et al., 2004; LI et al., 2015; ZHANG et al, 2017).

Embora tenha sido observado aumento da inflamação e de MMP-9, foi recuperado mais bactérias no pulmão de camundongos IL-10 KO, comparados os camundongos do tipo selvagem, sugerindo que a IL-10 tem papel na modulação da inflamação, na expressão de MMP-9 e na depuração bacteriana. O trabalho de Kothari et al. (2014) relata um bloqueio na expressão de MMP-9 em macrófagos expostos a IL-10 exógena e um aumento na expressão de MMP-9 em macrófagos incubados na presença de IgG anti-IL-10, corroborando os nossos resultados.

Outro importante estudo de Hong et al. (2011), a MMP-2 e, em menor grau, a MMP-9, clivam a IL-17 diminuindo sua função pró-inflamatória. Esse dado foi observado utilizando camundongos BALB nocautes para MMP-2 e 9 infectados com *Streptococcus pneumoniae*, no qual também foi relatado maior neutrofilia, porém, com fagocitose prejudicada em camundongos MMP-9 nocautes, limitando a depuração bacteriana. Este estudo demonstra que a MMP-2 e MM-9 possuem papéis imunomoduladores que atenuam a IL-17, evitando aumento de polimorfonucleares no pulmão. Neste trabalho não foi analisada

expressão da IL-17 devido ao curto período de análise do processo infeccioso. A IL-17 é uma citocina altamente expressa por linfócitos do perfil Th17 e podem estar presentes em um período posterior ao proposto neste trabalho.

Zhang et al (2017) mostram que a expressão elevada de MMP-9 pode levar a resposta inflamatória exacerbada da artéria pulmonar, indução da proliferação de células musculares e degradação da matriz extracelular. A inibição de MMP-9 pode ter resultados satisfatórios na prevenção e tratamento da Doença Pulmonar Crônica Obstrutiva (DPCO). De forma cognata Li e colaboradores (2016), demonstram que o silenciamento do gene do indutor extracelular de MMPs (EMMPRIN) resulta em elevada carga bacteriana em uma infecção por *P. aeruginosa*, aumento da expressão de citocinas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18 e diminuição da expressão de citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5, assim como diminuição da citocina regulatória IL-10, demonstrando que o EMMPRIN leva a maior resistência à infecção por *P. aeruginosa*, sendo um dos motivos o aumento da MMP-9.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta de forma inédita a estreita relação entre o controle da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* pela IL-10 endógena e o seu controle sobre a expressão de genes pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- $\alpha$ , na atividade da MMP-9 e nos processos histopatológicos do processo infeccioso em questão. Este trabalho dá suporte à possibilidade de investigação de novos trabalhos que visem à busca por terapias baseadas na resposta imune para uma maior qualidade de vida para indivíduos que fazem parte do grupo de risco de serem infectados pela *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Rockefeller University Press**, v. 204, n. 5, p. 1057–1069, may. 2007.
- BARTHLOTT, T. et al. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells compete with naive CD4<sup>+</sup> T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. **International Immunology**, v. 17, n. 3, p. 279–288, mar. 2005.
- BAYES, H. K.; RITCHIE, N. D.; EVANS, T. J. Interleukin-17 is required for control of chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 12, p. 3507-3516, nov. 2016.
- BOUILLOT, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. **Scientific Reports**, v. 7, n. 2120, may. 2017.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, aug. 2011.
- BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 1, p. 55-71, jan. 2010.
- BRUSCHI, F. et al. Matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 as inflammation markers of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* infections in mice. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 10, p. 540–549, oct. 2014.
- CERON, C. S. et al. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- $\beta$  and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 47–56, dec. 2013.
- CHEN, W. et al. Ethyl pyruvate reverses development of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during sepsis-induced immunosuppression. **International Immunopharmacology**, v.52, p. 61–69, nov. 2017.
- CHRISTOFI, T.; APIDIANAKIS, Y. Drosophila immune priming against *Pseudomonas aeruginosa* short-lasting and depends on cellular and humoral immunity. **F1000Research**, v. 2, n. 76, mar. 2013.
- CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 811-825, nov. 2006.

- CORSETTI, P. P. et al. Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, sep. 2013.
- CORSETTI, P. P. et al. miR-181a-5p regulates TNF- $\alpha$  and miR-21a-5p influences gualynate-binding protein 5 and IL-10 expression in macrophages affecting host control of *Brucella abortus* infection. **Frontiers Immunology**, v. 9, n. 1331, jun. 2018.
- COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M.. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, may. 2008.
- FACCHINI, M. et al. Long term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 85, mar. 2014.
- FERNANDES, D. M.; JIANG, X.; JUNG, J. H.; BALDWIN, C. L. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 193-203, dec. 1996.
- GARLET, G. P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology Immunology**, v. 21, n. 1, p.12–20, feb. 2006.
- GUTIERREZ-MURGAS, Y. M. et al. IL-10 plays an important role in the control of inflammation but not in the bacterial burden in *S. epidermidis* CNS catheter infection. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 271, oct. 2016.
- GUILBAULT, C. et al. Influence of gender and interleukin-10 deficiency on the inflammatory response during lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. **Immunology**, v.107, n. 3, p. 297–305, nov. 2002.
- GRIMWOOD, K. et al. Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 11, n.1, p. 14-20, 2015.
- GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10 mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 1, p. 3-15, jan. 2005.
- HAZLETT, L. D.; JIANG, X.; MCCLELLAN, S. A. IL-10 function, regulation, and in bacterial keratitis. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 373-380, jun. 2014.
- HELMERSSON-KARLQVIST, J. et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 concentrations and MMP-9 activity during surgery-induced inflammation in humans. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**, v.50, n. 6, p. 1115–1119, feb. 2012.
- HILL, P. J. et al. Modifications of *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope in the cystic fibrosis airway alters interactions with immune cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 4761, jul. 2017.

- HONG, J. S. et al. Dual protective mechanisms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in immune defense against *Streptococcus pneumoniae*. **Journal Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6427-6436, jun. 2011.
- HORINO, T. et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in patients with bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Internal Medicine**, v. 51, n. 1, p. 59-64, jan. 2012.
- HORIO, Y. et al. Protective effect of Galectin-9 in murine model of lung emphysema: Involvement of neutrophil migration and MMP-9 production. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, jul. 2017.
- JEON, J. W. et al. Chemiluminometric immuno-analysis of innate immune response against repetitive bacterial stimulations for the same mammalian cells. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6011, aug. 2014.
- JEON, J. et al. T3SS effector ExoY reduces inflammasome-related responses by suppressing bacterial motility and delaying activation of NF- $\kappa$ B and caspase-1. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 284, n. 20, p. 3392-3403, oct. 2017.
- KOTHARI, P. et al. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. **Journal Immunology**, v. 192, n. 1, p. 349-357, jan. 2014.
- LI, C. et al. Interleukin 17 regulates mer tyrosine kinase-positive cells in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 10, p. 6886-6900, oct. 2014.
- LI, W. L. et al. Local inflammation alters MMP-2 and MMP-9 gelatinase expression associated with the severity of nifedipine-induced gingival overgrowth: a rat model study. **Inflammation**, v. 4, n. 4, p. 1517-1528, aug. 2015.
- LI, Y. et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer enhances host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* infection through MAPK signaling pathway. **American Journal of Translation Research**, v. 8, n. 12, p. 5619-5627, dec. 2016.
- LI, X. et al. Interleukin 2 and interleukin 10 function synergistically to promote CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity, which is suppressed by regulatory T cells in breast cancer. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 87, p. 1-7, jun. 2017.
- LIN, C. K.; KAZMIERCZAK, B. I. Inflammation: a double-edged sword in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 3, p. 250-261, 2017.
- LOVEWELL, R. R.; PATANKAR, Y. R.; BERWIN, B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. **American Journal Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 7, p. 591-603, apr. 2014.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAITI, S. et al. Mathematical modeling of pro- and anti-inflammatory signaling in macrophages. **Processes**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2015.

MEDEIROS, N. I.; GOMES, J. A. S.; OLIVEIRA, R. C. Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 8, aug. 2017.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MORKUNAS, B. et al. Discovery of an inhibitor of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 1428–1433, jul. 2016.

MUNGUIA, J. et al. The Mla pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* resistance to outer membrane permeabilization and host innate immune clearance. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 10, p. 1127-1136, oct. 2017.

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V. M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 8, p. 2571-2580, aug. 2014.

NOVAES, R. D. et al. Bark extract of *Bathysacupidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces mortality in rats. **International Journal Experimental Pathology**, v. 93, n. 3, p. 225-233, jun. 2012.

PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617-629, aug. 2004.

PELUSO, L. et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 9, jan. 2010.

PEÑALOZA, H. F. et al. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Immunology**, v. 146, n. 1, p. 100-112, sep. 2015.

PEÑALOZA, H. F. et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 32, p. 17-30, dec. 2016.

PIAO, Z.; YUAN, H. Osteopontin exacerbates *Pseudomonas aeruginosa*-induced bacteremia in mice. **Cellular Immunology**, v. 318, p. 23-28, aug. 2017.

*Pseudomonas aeruginosa* Project. 2010. Disponível em: < <http://sahsrojas.pbworks.com>>. Acesso em: 25 out. 2017.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, sep. 2010.

- RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal Molecular Biology**, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, nov. 2015.
- SACKMANN, V. et al. Anti-inflammatory (M2) macrophage media reduce transmission of oligomeric amyloid beta in differentiated SH-SY5Y cells. **Neurobiology of Aging**, v. 60, p. 173-182, dec. 2017.
- SAINT-CRIQ, V. et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator–IL-6–antimicrobial–repair pathway. **Thorax**, v. 73, n. 1, p. 49-61, jan. 2018.
- SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181, mar. 2010.
- SATO, H.; FRANK, D. W. Multi-functional characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* type III needle-tippotein, PcrV; comparison to orthologs in other Gram-negative bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 142, jul. 2011.
- SILVA, M. D. et al. IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 19-31, feb, 2015.
- SINGH, S. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulatory factor enhances the pro-inflammatory response of interferon- $\gamma$ -treated macrophages to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **PLoS One**, v. 10, n. 2, feb. 2015.
- SKERRETT, S. J. et al. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 1, p. 312-322, jan. 2007.
- STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 717-732, may. 2011.
- SUN, H.Y. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy. **Chest**, v. 139, n. 5, p. 1172-1185, may. 2011.
- TODAR, K. Opportunistic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Kenneth Todar’s Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, 2009.
- TORRES, I. V.; PATANKAR, Y. R.; BERWIN, B. Acidosis exacerbates in vivo IL-1-dependent inflammatory responses and neutrophil recruitment during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. **American Physiological Society Lung Cell Molecular Physiology**, v. 314, n. 2, p. 225-235, feb. 2018.
- VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 551-560, oct./dec. 1998.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. **Nature**, v. 445, n. 7129, p. 766-770, feb. 2007.

WANG, L. et al. Potential role of apoptotic macrophages in pulmonary inflammation and fibrosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 194, p. 215–224, oct. 2002.

WILLIAMS P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiology** v. 153, n. 12, p. 3923–3938, dec. 2007.

WINTER, S. V.; ZYCHLINSKY, A. The bacterial pigment pyocyanin inhibits the NLRP3 inflammasome through intracellular reactive oxygen and nitrogen species. **Journal Biological Chemistry**, v. 293, n.13, p. 4893-4900, mar. 2018.

WÖLBELING, F. et al. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. **Immunobiology**, v. 216, n. 8, p. 901–908, aug. 2011.

XAVIER, M. N. et al. CD4(+) T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, jun. 2013.

XU, X. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 167, aug 2017.

ZHANG, R.; NI, H. J.; ZHOU, H. S. Study on the expression of Toll-like receptor 4 and matrix metalloproteinase-9 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and their clinical significance. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 9, p. 2185-2191, may. 2017.

**ANEXO – Certificado da Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UNIFAL).**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada " AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-10 ENDÓGENA NA INFECÇÃO PELA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO MURINO", registrada com o nº 42/2017, sob a responsabilidade de Leonardo Augusto de Almeida, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 07/08/2017 a 09/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6 / isogênico
Nº de animais	24
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMG

Alfenas, 07 de Agosto de 2017.

  
 Paulo Márcio de Faria e Silva  
 Reitor/UNIFAL-MG