

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**FERNANDA DE LIMA TANA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E DO PAPEL DOS microRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p DURANTE A INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA PELA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa***

ALFENAS/MG

2017

**FERNANDA DE LIMA TANA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E DO PAPEL DOS microRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p DURANTE A INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA PELA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof Leonardo Augusto de Almeida.

ALFENAS/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Tana, Fernanda de Lima

Avaliação da expressão e do papel dos microRNAs mmu-miR-155p e mmu-miR-146b-5p durante a infecção pulmonar causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* / Fernanda de Lima Tana. -- Alfenas/MG, 2017. 92 f.

Orientador: Leonardo Augusto de Almeida.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.  
Bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. MicroRNAs. 3. Resposta imune.  
I. Almeida, Leonardo Augusto de. II. Título.

CDD-616.92



**FERNANDA DE LIMA TANA**

“Avaliação da expressão e do papel dos microRNAs mmu-miR-155-5p e um-miR-146b-5p durante a infecção pulmonar causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*”

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: 26 de abril de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Leonardo Almeida

Prof. Dr. Carlos Roberto Prudêncio

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura: Carlos Roberto Prudêncio

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Cosme Cotta Malaquias

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar forças e saúde para concluir mais uma etapa!

Ao professor Leonardo Augusto de Almeida pela orientação e profissionalismo. Agradeço pela paciência e confiança, gerando o meu amadurecimento, enriquecimento e crescimento profissional, despertando ainda mais o meu interesse pela pesquisa. Obrigada por toda a dedicação, pelos ensinamentos e por me acolher como sua orientada!

Á professora Patrícia Paiva Corsetti por todos os ensinamentos e colaboração. Obrigada por acompanhar sempre de perto e se tornar um exemplo de profissional para mim!

Ao professor Romulo Novaes pela colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do laboratório de Vacinas, Luis Felipe Leomil Coelho e Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas por todo o conhecimento transmitido.

Aos amigos do Laboratório de Vacinas, em especial á Stella, Gabriel, Ezequiel, Pedro Lauana, Raissa, Natalia, Tertuliano, Alessandra, Isabella, Camila, Gabriela, Valéria, Sara, Mayara, por todos os momentos que compartilhamos, fazendo com que os dias se tornassem mais alegres e divertidos. Obrigada por todo o apoio, colaboração, amizade e risadas.

Aos meus familiares, em especial minha Mãe Solange, meu pai Cláudio e meu irmão Filipe pelo amor, carinho, incentivo, parceria, cervejas, conversas e principalmente por acreditar no meu sonho!

Ao meu namorado Eduardo pela paciência, incentivo, carinho e amor. Obrigada por mesmo estando longe, me ajudar e estar comigo nessa etapa!

Às minhas amigas da República: Amanda, Mayara, Natalie e Juliana. Obrigada pela convivência e por tornar Alfenas um lugar especial!

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e pelo meu crescimento acadêmico.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Á todos que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno humano oportunista capaz de causar severas infecções em pacientes imunodeprimidos e em pacientes que apresentam fibrose cística. Para desencadear uma resposta efetiva contra a infecção pela *P. aeruginosa* é necessário uma primeira linha de reconhecimento desta bactéria pelo sistema imunológico inato. Apesar do desencadeamento da resposta imune inata ser benéfica no controle da infecção pela *P. aeruginosa*, esta resposta deve ser controlada. Estudos recentes têm começado a esclarecer como os miRNAs desempenham papéis fundamentais na regulação de processos como infecção, resposta imune e inflamação participando da modulação da resposta imune. Dada a relevância da bactéria *P. aeruginosa* nos processos infecciosos em humanos e estimulados pela necessidade de desvendar os mecanismos de regulação da resposta imune contra esta bactéria, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* expressos em camundongos infectados pelas cepas ATCC 27853 e PA14 da bactéria *P. aeruginosa*. Para avaliar o nível de expressão dos *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 *in vitro*, o RNA total foi extraído de células Raw 264.7, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) e de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) para análise de PCR em tempo real. Após a infecção das células Raw 264.7, BMDMs e BMDCs foi possível observar que a expressão dos miRNAs e das citocinas ocorreu de forma dependente em cada tipo celular infectado. Para as análises *in vivo* camundongos C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com as cepas ATCC 27853 e PA14 de *P. aeruginosa* para análises de UFCs, RT-qPCR, histopatologia e estereologia. Apenas a cepa PA14 foi recuperada no pulmão e baço dos animais, onde não foi observado variação na expressão do *mmu-miR-155-5p* nem aumento significativo de uma série de citocinas efetoras. As análises histopatológicas demonstraram intenso processo inflamatório difuso apresentando número maior de células inflamatórias, diminuição no número de alvéolos e do volume da estrela quando comparados aos animais não infectados e animais infectados pela cepa avirulenta. No pulmão dos animais infectados com a cepa ATCC 27853, observou-se aumento de expressão de *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p*, das citocinas inflamatórias. A identificação das redes de regulação dos miRNAs em estudo mostrou importantes alvos diretos e indiretos associados à resposta imune inata que podem estar comprometidas durante a expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* em favorecimento ou em detrimento da resolução da infecção pela *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos até o momento

permitem sugerir que a infecção pela *P. aeruginosa* exerce uma modulação na expressão de miRNAs e conseqüentemente na resposta imune contra esta bactéria e que a virulência de diferentes cepas de *P. aeruginosa* influenciam na expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p*, de citocinas pró-inflamatórias e na patologia. Mais estudos são necessários para desvendar os mecanismos pelos quais cepas virulentas da *P. aeruginosa* conseguem subverter a resposta imune e garantir a sua replicação no hospedeiro.

**Palavras chave:** *Pseudomonas aeruginosa*. miRNA. resposta imune.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic human pathogen capable of causing severe infections in immunocompromised patients and in patients with cystic fibrosis. To trigger an effective response against infection by *P. aeruginosa* is required a first line of recognition of this bacterium by the innate immune system. Although the innate immune response is beneficial in the control of *P. aeruginosa* infection, this response should be controlled. Recent studies have begun to clarify how miRNAs play key roles in regulating processes such as infection, immune response and inflammation by participating in the immune response modulation. Due to the importance of the *P. aeruginosa* bacterium in infectious processes in humans and stimulated by the need to uncover the mechanisms of regulation of the immune response against this bacterium, the objective of this study was to evaluate the role of mmu-miR-155-5p and mmu-miR-146b -5p expressed in mice infected with strains ATCC 27853 and PA14 of the bacterium *P. aeruginosa*. To assess the level of expression of mmu-miR-155-5p and mmu-miR-146b-5p and the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-12 in vitro, the total RNA was extracted from Raw 264.7 cells, bone marrow derived macrophages (BMDM) and bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) for real-time PCR analysis. After infection of the Raw 264.7, BMDMs and BMDCs cells, it was possible to observe that the expression of miRNAs and cytokines occurred in a dependent manner in each infected cell type. For the in vivo analyzes C57BL / 6 mice were infected intratracheally with the strains ATCC 27853 and PA14 of *P. aeruginosa* for analysis of CFU, RT-qPCR, histopathology and stereology. Only the PA14 strain was recovered in the lungs and spleens of the animals, where no variation in the expression of mmu-miR-155-5p or a significant increase in a series of effector cytokines was observed. Histopathological analyzes demonstrated an intense diffuse inflammatory process, presenting a larger number of inflammatory cells, a decrease in the number of alveoli and the volume of the star when compared to uninfected animals and animals infected by the avirulent strain. In the lung of animals infected with ATCC 27853 strain, increased expression of mmu-miR-155-5p and mmu-miR-146b-5p, of inflammatory cytokines was observed. The identification of regulatory networks of the miRNAs under study showed important direct and indirect targets associated with the innate immune response that may be compromised during the differential expression of mmu-miR-155-5p and mmu-miR-146b-5p in favor or detriment of *P. aeruginosa* infection.

The results obtained to date suggest that the infection by *P. aeruginosa* exerts a modulation in the expression of miRNAs and consequently in the immune response against this bacterium and that the virulence of different strains of *P. aeruginosa* influence the expression of miRNAs mmu-miR-155-5p and mmu-miR-146b-5p, of proinflammatory cytokines and in pathology. Further studies are needed to uncover the mechanisms by which virulent *P. aeruginosa* strains can subvert the immune response and ensure replication in its host.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*. miRNA. immune response.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bactéria <i>P. aeruginosa</i> corada através do método de Gram.....	20
Figura 2 - Representação do genoma circular da <i>P. aeruginosa</i> .....	21
Figura 3 - Biogênese de miRNAs.....	34
Figura 4 - Visão geral da regulação de miRNAs de mamíferos por diferentes bactérias.....	36
Figura 5 - Técnica de conversão em cDNA – miScript II RT Kit.....	47
Figura 6 - Curva de crescimento das cepas ATCC 27853 e PA14 da <i>P. aeruginosa</i> em função do tempo.....	54
Figura 7 - Expressão diferencial de <i>mmu-miR-155-5p</i> e <i>mmu-miR-146b-5p</i> em células Raw 264.7 infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de <i>P. aeruginosa</i> .....	56
Figura 8 - Expressão diferencial de <i>IL-1<math>\beta</math></i> , <i>IL-6</i> e <i>IL-12</i> em células Raw 264.7 infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de <i>P. aeruginosa</i> .....	57
Figura 9 - Expressão diferencial de <i>mmu-miR-155-5p</i> e <i>mmu-miR-146b-5p</i> em BMDMs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	58
Figura 10 - Expressão diferencial de <i>IL-1<math>\beta</math></i> , <i>IL-6</i> e <i>IL-12</i> em BMDMs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de <i>P. aeruginosa</i> . ....	59
Figura 11 - Expressão diferencial de <i>mmu-miR-155-5p</i> e <i>mmu-miR-146b-5p</i> em BMDCs infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	60
Figura 12 - Expressão diferencial de <i>IL-1<math>\beta</math></i> , <i>IL-6</i> e <i>IL-12</i> em BMDCs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de <i>P. aeruginosa</i> . ....	61
Figura 13 - Log de UFCs no pulmão e no baço dos animais infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de <i>P. aeruginosa</i> . ....	62
Figura 14 - Expressão diferencial de <i>mmu-miR-155-5p</i> e <i>mmu-miR-146b-5p</i> em macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	63
Figura 15 - Expressão diferencial de <i>IL-1<math>\beta</math></i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-12</i> , <i>IFN<math>\gamma</math></i> e <i>TNF-<math>\alpha</math></i> em macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	65
Figura 16 - Expressão diferencial de <i>mmu-miR-155-5p</i> e <i>mmu-miR-146b-5p</i> em macerado de baço de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	66

Figura 17 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	67
Figura 18 - Parâmetros estereológicos do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da <i>P. aeruginosa</i> .....	69
Figura 19 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	70
Figura 20 - Vias de interação do mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p com alguns de seus putativos alvos .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BMDC</b>	-Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea
<b>BMDM</b>	-Macrófagos Derivados Da Medula Óssea
<b>DMEM</b>	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	-Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	-Desoxinucleosídeos trifosfato
<b>DO</b>	-Densidade ótica
<b>FC</b>	-Fibrose cística
<b>G</b>	-Força da gravidade
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-Interferon gama
<b>IL</b>	-Interleucina
<b>LB</b>	-Meio Lauria Broth
<b>LPS</b>	-Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	-Proteína Cinase Ativada por Mitógeno
<b>M-CSF</b>	-Fator estimulador de colônias de monócitos
<b>miRNA</b>	-microRNA
<b>MOI</b>	-Multiplicidade de infecção
<b>mRNA</b>	-RNA mensageiro
<b>MyD88</b>	-Fator de Diferenciação Mielóide 88
<b>MyD88-/-</b>	-Deficiência do Fator de Diferenciação Mielóide 88
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	-Fator nuclear kappaB
<b>NI</b>	-Não infectado
<b>NLRs</b>	-Receptores do tipo NOD
<b>Nm</b>	-Nanómetro
<b>PAMPs</b>	-Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PBS</b>	-Tampão salina fosfato
<b>pré-microRNA</b>	-precursor de miRNA
<b>pri-microRNA</b>	-miRNA primário
<b>PRRs</b>	-Receptores de reconhecimento de padrões
<b>RISC</b>	-Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
<b>RNAi</b>	-RNA de interferência
<b>rpm</b>	-Rotações por minuto
<b>RT</b>	-Transcrição reversa

<b>SFB</b>	-Soro fetal bovino
<b>SOCS</b>	-Supressores de sinalização de citocinas
<b>T3SS</b>	-Sistema de Secreção de Tipo III
<b>Th1</b>	-T <i>helper</i> 1
<b>Th17</b>	-T <i>helper</i> 17
<b>Th2</b>	-T <i>helper</i> 2
<b>TLRs</b>	-Receptores semelhantes a Toll
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	-Fator de necrose tumoral alfa
<b>Treg</b>	-Células T reguladoras
<b>UFC</b>	-Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	DESCRIÇÕES INICIAIS DA BACTÉRIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.3	INFECCÕES CAUSADAS PELA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
2.4	RESPOSTA IMUNE CONTRA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
2.4.1	Resposta imune inata contra <i>P. aeruginosa</i> .....	25
2.4.2	Resposta imune adaptativa contra <i>P. aeruginosa</i> .....	28
2.5	CONTROLE DA RESPOSTA IMUNE.....	30
2.6	microRNAs.....	31
2.7	miRNAs E RESPOSTA IMUNE CONTRA BACTÉRIAS .....	35
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	41
5.2	CEPAS BACTERIANAS .....	41
5.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i> .....	41
5.4	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO DE <i>P. aeruginosa</i> .....	42
5.5	INFEÇÃO INTRATRAQUEAL POR <i>P.aeruginosa</i> .....	42
5.5.1	Determinação do número de unidades formadoras de colônias .....	43
5.6	CULTURA E ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS OU CÉLULAS DENDRÍTICAS DA MEDULA ÓSSEA .....	43
5.7	CULTURA E ESTÍMULO DE CÉLULAS RAW 264.7.....	44
5.8	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CODIFICADORES DE CITOCINAS E DE miRNAs POR PCR EM TEMPO REAL.....	45
5.8.1	Extração de RNA total .....	45
5.8.2	Reação de Transcrição Reversa para síntese de cDNA.....	46
5.8.3	Reação de Transcrição Reversa para síntese de cDNA para miRNAs.....	46
5.8.4	PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas e miRNAs ....	48

5.9	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA.....	49
5.10	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	50
5.11	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA .....	50
5.13	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PUTATIVOS ALVOS DOS miRNAs SELECIONADOS.....	51
5.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	52
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
6.1	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE miRNAs e citocinas por RT-qPCR .....	55
6.1.1	Análise da expressão de miRNAs e citocinas em células Raw 264.7.....	55
6.1.2	Análise da expressão de miRNAs e citocinas em macrófagos derivados da medula óssea .....	57
6.1.3	Análise da expressão de miRNAs e citocinas em células dendríticas derivadas da medula óssea.....	59
6.2	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA INFECÇÃO INTRATRAQUEAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 .....	61
6.2.1	Avaliação do número de unidades formadoras de colônia no pulmão e baço dos camundongos. ....	62
6.2.2	Avaliação da expressão diferencial de miRNAs e citocinas no pulmão .....	63
6.2.3	Avaliação da expressão diferencial de miRNAs no baço.....	66
6.2.4	Análise histopatológica do tecido pulmonar .....	66
6.2.5	Parâmetros estereológicos do pulmão .....	68
6.2.6	Análise histopatológica do tecido hepático .....	69
6.3	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PUTATIVOS ALVOS DOS miRNAs SELECIONADOS.....	70
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa*, uma das mais importantes do gênero *Pseudomonas* sob o ponto de vista médico, é uma bactéria Gram-negativa, extracelular capaz de infectar diferentes organismos, dentre eles nematódeos, leveduras, insetos e mamíferos. Esta bactéria é ubiqüitária e pode ser encontrada em diversos ambientes tanto em superfícies aquosas e no solo, bem como pode estar frequentemente presente em pequena quantidade na microbiota intestinal normal e na pele dos seres humanos (JAWETZ, MELNICK, ADALBERG'S., 2016; LAVOIE et al., 2011;). Devido a sua alta adaptabilidade e resistência intrínseca aos antibióticos, a *P. aeruginosa* é capaz de sobreviver em uma ampla gama de outros ambientes naturais e artificiais, incluindo superfícies como pias, bancadas, pisos e instalações e equipamentos médicos tais como ventiladores mecânicos e cateteres (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

As infecções graves pela *P. aeruginosa* são frequentemente nosocomiais ou hospitalares, e quase sempre estão associadas ao comprometimento das defesas do hospedeiro. Dessa forma em humanos, a *P. aeruginosa* é considerada um patógeno oportunista, que pode causar infecções potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos e que estão sujeitos aos reservatórios naturais e artificiais em que a bactéria pode ser encontrada (HAJ KHALIFA, BEN et al., 2011). Além disso, a *P. aeruginosa* é o patógeno mais comumente identificado nas secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística (FC) (HAUSER et al., 2011).

Esta espécie de bactéria pode causar infecções agudas e crônicas no trato urinário, na córnea, no trato respiratório, destacando-se a pneumonia nosocomial como a maior causa de morte em unidades de tratamento intensivo (LOUIE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007). As manifestações clínicas da infecção variam conforme o local onde a *P. aeruginosa* se encontra, podendo ocorrer febre, choque, oligúria, leucocitose, leucopenia, coagulação intravascular disseminada e síndrome do desconforto respiratório (JAWETZ, MELNICK, ADALBERG'S., 2016).

Para desencadear uma resposta imune efetiva contra a *P. aeruginosa* é necessária uma primeira linha de reconhecimento desta bactéria pelo sistema imunológico inato. Macrófagos e células dendríticas são as populações mais estudadas para entender o papel dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imune inato relacionado com o reconhecimento dos padrões moleculares associados à *P. aeruginosa* (LAVOIE et al., 2011).

Este reconhecimento ativa vias de sinalização intracelulares que culminam na indução da inflamação e a regulação positiva de moléculas co-estimulatórias. Na resposta imune inata contra *P. aeruginosa* as células do hospedeiro, principalmente os macrófagos, podem reconhecer o lipopolissacarídeo e a flagelina da bactéria através de receptores semelhantes a *Toll*, TLR4 e TLR5 respectivamente. Assim, após o reconhecimento dessas estruturas da bactéria, os macrófagos irão produzir citocinas, como IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$  que irão atuar ativando a resposta imune adquirida (MIJARES et al.,2011; PENE et al., 2008; RAOUST et al.,2009). Apesar do desencadeamento da resposta imune inata ser benéfica no controle da infecção pela *P. aeruginosa*, esta resposta deve ser controlada, pois paradoxalmente, as reações inflamatórias intensas produzidas pela resposta imune inata são frequentemente associadas com persistência bacteriana e lesão tecidual. (LIN, KAZMIERCZAK, 2017).

Dentre as vias de controle da resposta imune inata recentes estudos têm demonstrado que a regulação transcricional assim como a degradação de um mRNA codificador de um componente inflamatório são controlados pela via de RNA de interferência (RNAi). A principal classe de pequenos RNAs reguladores que concentram estes efeitos de interferência nos eucariotos é constituído pelos microRNAs (miRNAs) (HUNTZINGER et al., 2011). Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (MUN et al., 2013). O papel dos miRNAs na resposta imune inata foi demonstrado quando miRNAs como mmu-miR-146b-5p e mmu-miR-155-5p foram induzidos em uma via de sinalização dependente de receptores semelhantes a *Toll* em monócitos (ZHOU et al., 2014).

Dada a relevância da bactéria *P. aeruginosa* nos processos infecciosos e inflamatórios em humanos e estimulados pela necessidade de conhecer os mecanismos de regulação da resposta imune contra esta bactéria, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos microRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p na regulação da resposta imune de camundongos infectados pela bactéria *P. aeruginosa*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Após a revisão crítica da literatura, neste tópico serão apresentadas as principais informações que foram pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho.

### 2.1 DESCRIÇÕES INICIAIS DA BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa*

Historicamente, as descrições iniciais da *Pseudomonas aeruginosa* ocorreram por volta de 1850, quando Sédillot, um cirurgião militar francês, observou a formação de exsudato e pus azulado nas feridas e ataduras de soldados. Em 1860, Fordos extraiu o pigmento responsável pela coloração azulada das feridas, porém somente em 1882, Carle Gessard relatou em uma publicação intitulada “*On the Blue and Green Coloration of Bandages*” o isolamento e crescimento do organismo que ele intitulou “*Bacillus pyocyaneus*”, presente nas feridas de dois pacientes que apresentavam pus azul-esverdeado. Assim, a *Pseudomonas aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) passou a ser descrita como o agente causador da purulência azul-esverdeada nas feridas de pacientes. Somente por volta de 1900, uma apresentação mais completa sobre as vias de invasão e disseminação de *P. aeruginosa* levando a infecção aguda ou crônica foi fornecida por Freeman. Também por volta de 1900, Migula adotou o nome *Pseudomonas* (em grego: 'pseudes', falso, 'monas', unidade) e foi então denominada espécie *Pseudomonas pyocyanea*. O epíteto *aeruginosa* (latim: aeruginosus, cheio de ferrugem de cobre, isto é, verde) tornou-se amplamente usado e é agora o nome utilizado da espécie (LISTER et al., 2009; PITT, SIMPSON, 2006).

### 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

As espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* são bastonetes Gram-negativos, móveis, aeróbios, sendo que algumas das quais produzem pigmentos solúveis em água. Existem diversas espécies do gênero *Pseudomonas*, sendo a de maior destaque no ponto de vista médico a *Pseudomonas aeruginosa*. (JAWETZ, MELNICK, ADALBERG’S., 2016).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria extracelular, Gram-negativa, aeróbica, não fermentadora de glicose e não formadora de esporos, pertencente à família Pseudomonadaceae (ALMEIDA et al., 2012). Esta bactéria é ubiqüitária, e pode ser encontrada em ambientes úmidos, como na água, no solo, em plantas, detritos e também pode estar presente em pouca quantidade na microbiota intestinal normal e na pele dos seres humanos (DUBOIS et al., 2001; LAVOIE et al., 2011; TORRES et al., 2006). Por se tratar de uma bactéria que utiliza muitos compostos ambientais como fontes de energia, e que apresenta grande facilidade de adaptação e alta resistência intrínseca aos antibióticos, a *P. aeruginosa* pode sobreviver em diferentes ambientes naturais e artificiais, dentre eles superfícies como bancadas, pisos, instalações e equipamentos médicos tais como ventiladores mecânicos e cateteres. (GELLATLY; HANCOCK, 2013; LYCZAK; CANNON; PIER, 2000).

Esta bactéria possui comprimento variando de 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  e largura variando de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  (DOGGET, 1979). A *P. aeruginosa* apresenta uma cápsula polissacarídica que concede proteção contra a fagocitose e a ação de medicamentos antibióticos, além de ancorar a bactéria às células epiteliais do hospedeiro e produzir a endotoxina lipopolissacarídica que é o principal antígeno da parede celular desta bactéria (MURRAY et al., 2003).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria móvel devido à presença de um flagelo monotríqueo polar (SCHEFFER 2008 apud ALMEIDA et al., 2012). Estas bactérias apresentam também estruturas denominadas pili que são filamentos superficiais menores presentes na *P. aeruginosa* relacionados com a motilidade bacteriana. Este tipo de motilidade, proporcionada pelo pili, chamada de “*twitching*” acontece devido às propriedades retráteis do pili da *P. aeruginosa*, permitindo que ela se espalhe em ambientes úmidos (KIPNIS et al., 2006). Os pili de tipo IV tem se mostrado importante para a adesão e colonização da superfície de células eucarióticas revelando um papel importante na patogênese da *P. aeruginosa* (O’TOOLE; KOLTER, 1998). Uma outra função dos pili da *P. aeruginosa* é o processo de conjugação bacteriana. A conjugação bacteriana é um mecanismo de transferência genética entre bactérias onde ocorre a necessidade de um contato entre a célula doadora de material genético e sua receptora. Uma cópia de fita simples do DNA plasmidial é transferido a partir de uma sessão denominada origem de transferência, para a célula receptora. Dessa forma, genes que conferem resistência a antibióticos contidos em plamídeos, podem ser transferidos para outras bactérias (BAPTISTA,2013; KELLY et al., 2009; THOMAS & NIELSEN, 2005). Na *P. aeruginosa*, foi demonstrado que a ilha de patogenicidade PAPI-1, responsável por conter genes que codificam fatores de virulência como os do grupo B, responsáveis pela

aderência da *P. aeruginosa* ao tecido do hospedeiro, é transferida via pili (CARTER et al., 2010; HE et al., 2004).

Esta bactéria exibe uma variabilidade marcante na virulência, variando de cepas moderadamente virulentas a estirpes altamente virulentas. A PA14 que foi utilizada neste estudo é um isolado altamente virulento e representa o grupo clonal mais comum no mundo (MIKKELSEN et al., 2011). Já a cepa ATCC 27853, também utilizada neste estudo, foi isolada a partir de uma cultura de sangue em Boston em 1971 e compreende uma estirpe moderadamente virulenta (ATCC, 2014). Dessa forma, é possível afirmar que o potencial patogênico da *P. aeruginosa* é cepa-dependente (MIKKELSEN et al., 2011).

O genoma da cepa PA14 contém duas ilhas de patogenicidade, e estes contêm vários genes implicados em virulência (MIKKELSEN et al., 2011). Um exemplo é a ilha PAPI -2 que codifica a proteína efetora patogênica ExoU e sua chaperona SpcU. ExoU faz parte do sistema de secreção do tipo III (T3SS) e é considerada uma das proteínas mais potentes desse sistema, contribuindo para a patogenicidade da PA14 (HE et al., 2004; SATO et al., 2003). Estas ilhas de patogenicidade não estão presentes na cepa ATCC 27853.

Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem um grande número de exoprodutos, incluindo a elastase, protease alcalina, hemolisina e piocianina que irão de diferentes maneiras auxiliar o patógeno durante a infecção. A piocianina é um metabólito produzido por algumas cepas de *P. aeruginosa*, inclusive pela cepa PA14. Alguns estudos vêm demonstrando o papel da piocianina na virulência das cepas de *P. aeruginosa* e revelaram que este metabólito apresenta um importante papel na infecção por esta bactéria (LAU; HASSETT; et al., 2004).

Foi descrito no trabalho de Mahajan-Miklos em 1999 que a piocianina produzida pela cepa PA14 participa do processo de morte rápida do nematoide *Caenorhabditis elegans*, produzindo intermediários reativos de oxigênio. Quando eles infectaram o nematoide com cepas que não produziram piocianina, a capacidade das cepas em causar a morte dos animais infectados reduziu drasticamente. O papel da piocianina na infecção pulmonar em camundongos também foi demonstrado. Em um modelo de pneumonia aguda, camundongos foram incapazes de eliminar as cepas produtoras de piocianina PA14 e PAO1 de *P. aeruginosa*, apresentando altos títulos de células viáveis no pulmão em 16 horas de infecção. Em contraste, na infecção ocasionada por cepas mutantes que não apresentavam piocianina, os camundongos foram capazes de eliminar ou diminuir o processo infeccioso (LAU; RAN; et al., 2004).

A identificação de *P. aeruginosa* ocorre através da coloração diferencial pelo método de Gram através da visualização de bacilos Gram-negativos (figura 1), e pelo o uso de

procedimentos bioquímicos, onde algumas características metabólicas devem ser observadas. A *P. aeruginosa*, em geral, é citocromo oxidase positiva, e não é capaz de fermentar carboidratos (MENEZES et al., 2004).



Figura 1 - Bactéria *P. aeruginosa* corada através do método de Gram  
Fonte: Todar's Online Textbook of Bacteriology

O genoma da *P. aeruginosa* é constituído por um cromossomo circular, sendo um dos maiores entre as bactérias, com aproximadamente 6,3 mega pares de bases (STOVER et al., 2000) (Figura 2). O genoma das cepas de *P. aeruginosa* possui cerca de 90% de conservação. A grande conservação de genes de virulência nos genomas das cepas sugere que a capacidade causadora da doença deste patógeno durante infecções depende, em geral, de um conjunto de mecanismos patogênicos altamente conservados. (WOLFGANG et al., 2003).

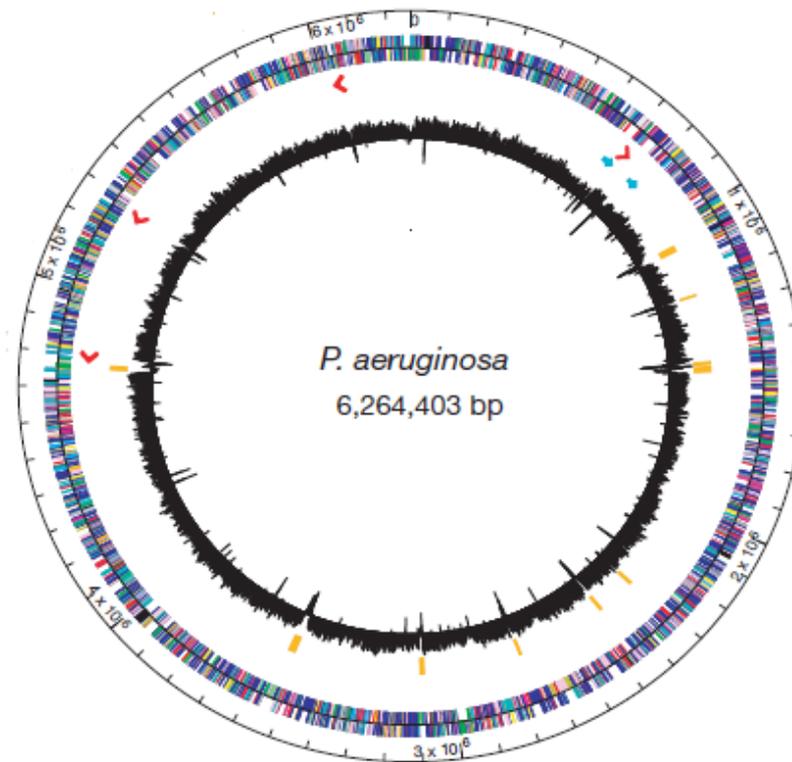


Figura 2 - Representação do genoma circular de *P. aeruginosa*.  
Fonte: Adaptado de (STOVER et al., 2000)

Nota: O círculo externo indica a localização cromossômica em pares de bases. A distribuição de genes é representado por caixas coloridas de acordo com a categoria funcional e direção da transcrição (banda exterior é a cadeia positiva; banda interior é a cadeia negativa). As setas vermelhas: os locais e direção da transcrição de genes de RNA ribossômico. Setas azuis: a localização de duas regiões contendo prováveis bacteriófagos. De preto, no centro, representa o percentual de G + C.

### 2.3 INFECÇÕES CAUSADAS PELA *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de infectar diversos organismos, dentre eles nematódeos, leveduras, insetos, plantas e mamíferos (MAHAJAN-MIKLOS et al., 2000). De acordo com Pritchett et al, (2015) em humanos, a *P. aeruginosa* é considerada um patógeno oportunista capaz de causar infecções fatais em pacientes imunocomprometidos, sendo um dos principais causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo e se tornando uma ameaça à saúde pública (BENTZMANN; PLÉSIAT, 2011).

A *P. aeruginosa* apresenta uma fácil adaptação às condições ambientais de temperatura, nutrição e umidade. Além disso, esta bactéria é capaz de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos contendo desinfetantes, soluções antissépticas, e em utensílios e equipamentos hospitalares, fato este que determina a alta incidência de *P. aeruginosa* em infecções nosocomiais (GRUNDMANN et al., 1995). Estudos demonstram que pelo menos de 10 a 15% das infecções hospitalares são causadas pela *P. aeruginosa* (GRISHIN et al., 2015).

Diversos tecidos humanos podem ser colonizados pela *P. aeruginosa* e causar um certo número de doenças agudas e crônicas, dentre elas: pneumonia, bacteremia, otite externa, dermatite, infecções do trato urinário, sepse, meningite, endocardite além de infecções ósseas e articulares. A prevalência de bacteremia causada por bactérias Gram-negativas vem aumentando em transplantados de células tronco hematopoiéticas. Foi relatado que *P. aeruginosa* é a principal bactéria Gram-negativa envolvida na bacteremia nesses pacientes, sendo de aproximadamente 22% no Brasil (OLIVEIRA et al., 2007).

A pneumonia nosocomial está relacionada com pacientes que utilizam ventilação mecânica e a *P. aeruginosa* representa um dos patógenos predominantemente responsáveis por essa infecção (CHASTRE; FAGON, 2002). Referida como pneumonia associada à ventilação mecânica, esta doença trata-se de uma infecção comum vista em unidades de terapia intensiva (UTI), que geralmente ocorre em pacientes após 48 horas de utilização de ventilação mecânica através de tubo traqueal ou traqueostomia. A pneumonia representa a resposta inflamatória do hospedeiro à invasão do parênquima pulmonar normalmente estéril, por micro-organismos como, por exemplo, a *P. aeruginosa* (BREWER et al., 1996; RELLO et al., 1998). A magnitude desta resposta depende dentre outros fatores da virulência dos organismos envolvidos e da competência do sistema imune do hospedeiro. Existem grandes variedades de mecanismos que protegem o pulmão contra a infecção, incluindo agentes antimicrobianos na saliva, tosse, transporte mucociliar e imunidade celular e humoral, no entanto, em pacientes onde são relatadas disfunções imunes, muitos desses mecanismos de defesa do hospedeiro são ineficazes (HUNTER, 2006).

A *P. aeruginosa* está frequentemente associada à infecção pulmonar em pacientes com Fibrose Cística (FC), tornando-se uma causa importante de morbidade e mortalidade nestes pacientes (STEHLING et al., 2008). Cerca de 52,5% dos isolados encontrados nas secreções respiratórias de pacientes adultos com fibrose cística correspondem a *P. aeruginosa*. Apesar da resposta inflamatória e da terapia antibiótica, a maioria das infecções causadas pela *P.*

*aeruginosa* persistem e se tornam crônicas em pacientes com FC, levando eventualmente a insuficiência respiratória (HAUSER et al., 2011).

A FC é uma doença hereditária autossômica recessiva, potencialmente letal, causada por mutações no gene que codifica a proteína “*cystic fibrosis transmembrane regulator*” (CFTR) (RIORDAN et al., 1989). Esta mutação provoca a ausência da proteína transmembrana das células epiteliais causando a interrupção do transporte de íons e a desidratação da superfície de mucosas (ZEMANICK et al., 2010). As principais manifestações clínicas em pacientes com FC envolvem o trato gastrointestinal, tratos genitais e o trato respiratório, ocasionando um aumento da susceptibilidade às infecções das vias aéreas inferiores (CALDAS et al., 2015). A grande produção e acúmulo de muco respiratório desidratado e viscoso e a inflamação excessiva representam uma característica da FC além de constituir o principal ambiente encontrado pela *P. aeruginosa* durante infecções crônicas (WOLFGANG et al., 2004). As bactérias da espécie *P. aeruginosa* possuem fatores que contribuem para a colonização pulmonar, dentre eles a formação de biofilmes e o desenvolvimento de um fenótipo mucoide (CALDAS et al., 2015). Nesses pacientes, o biofilme é a principal ameaça à vida e não o modo de infecção aguda de *P. aeruginosa*. Esse biofilme leva a infecções recorrentes que conduzem a insuficiência fatal no pulmão (MIKKELSEN et al., 2011).

A *P. aeruginosa* representa um desafio terapêutico tanto para infecções adquiridas na comunidade quanto para as infecções adquiridas em ambiente hospitalar, sendo a seleção do antibiótico adequado essencial para o sucesso da terapia e resultado clínico. Porém, a seleção do antibiótico é dificultada pela capacidade de seleção de cepas da *P. aeruginosa* resistente a múltiplas classes de antibióticos (LISTER et al., 2009).

O total da prevalência de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos está aumentando, com até 10% de isolados globais multirresistentes (LUTZ; LEE, 2011). Um estudo de atualização da frequência e das taxas de resistência de bastonetes Gram-negativos isolados de centros médicos latino-americanos inscritos no Programa de Vigilância Antimicrobiana demonstrou que de 2008 a 2010, 5704 (44,5%) de um total de 12811 isolados bacterianos coletados em centros médicos latino-americanos correspondiam a bastonetes Gram-negativos. As amostras foram coletadas da Argentina (19,6%), do Brasil (40,9%), do Chile (18,4%) e do México (18,4%). A maioria dos isolados clínicos foi coletada de pacientes com diagnóstico de infecção no sangue (52,6%); infecções da pele e tecidos moles, incluindo infecções de feridas cirúrgicas (22,9%); e pneumonia (13,1%). As causas mais comuns de pneumonia ocorreram

pela *P. aeruginosa*, com 31,2% dos casos nos hospitais do Brasil, Argentina, Chile e México (GALES et al., 2012).

A *P. aeruginosa* tem sido a causa de surtos nosocomiais em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde a resistência à múltiplas drogas é comum entre essas cepas (ROSSI, 2011). Em um estudo realizado em um hospital universitário público no Paraná foram encontrados um total de 75 isolados de *P. aeruginosa*, sendo a maior frequência em pacientes do sexo masculino (62,7%), principalmente em pacientes acima de 60 anos (54,7%), e em UTIs (41,4%). Dentro os 75 isolados, 54,6% eram multirresistentes (SIQUEIRA et al., 2013). Em outro estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (2007), com amostras provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, foi demonstrado uma elevada prevalência de multirresistência, com 49,7% das cepas de *P. aeruginosa* resistentes a três antibióticos ou mais e 28% das cepas resistentes a seis ou mais antibióticos.

#### 2.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*

Durante o processo de infecção por bactérias extracelulares, os mecanismos de defesa estão relacionados principalmente com as barreiras naturais do hospedeiro, a resposta imune inata e a produção de anticorpos (MACHADO et al., 2004). Os mecanismos do sistema imune que controlam a infecção por bactérias extracelulares como a *P. aeruginosa* são aqueles que ativam o sistema complemento, onde o complexo de ataque a membrana causa a lise de bactérias; a fagocitose, o reconhecimento de padrões moleculares bacterianos por receptores semelhantes a *Toll* (TLRs – *Toll like receptors*) que participam da estimulação das atividades microbianas de fagócitos; e a resposta inflamatória. Além desses mecanismos de imunidade inata, a imunidade adquirida humoral mediada pelos anticorpos atua bloqueando a infecção, eliminando estas bactérias extracelulares e neutralizando suas toxinas. A resposta imune adquirida celular também possui importante papel no controle da infecção por bactérias extracelulares ao ativar células T CD4+ auxiliares, que produzem citocinas indutoras da inflamação local, aumentando as atividades fagocíticas de macrófagos e neutrófilos e também estimulando a produção de anticorpos (ABBAS et al., 2015).

#### 2.4.1 Resposta imune inata contra *P. aeruginosa*

A resposta imune inata desempenha um papel crítico no controle de infecções agudas pela *P. aeruginosa* no ser humano e em animais. Para desencadear uma resposta efetiva contra o patógeno, é necessária uma primeira linha de reconhecimento desta bactéria pelo sistema imunológico inato (LAVOIE et al., 2011). Várias estruturas conservadas do patógeno, coletivamente conhecidas como “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs), estão implicados na ativação da resposta imune inata do hospedeiro contra a *P. aeruginosa*. Os PAMPs são detectados por um conjunto de receptores chamados “receptores de reconhecimento de padrões” (PRRs) presentes em células do sistema imune inato como, por exemplo, os macrófagos e as células dendríticas. Dentre os PRRs, destacam-se os receptores transmembrânicos semelhantes a *Toll* e receptores citosólicos semelhantes a NOD (NLRs – *NOD like receptors*) (MIJARES et al., 2011; SKERRETT et al., 2004).

Os PAMPs ao serem reconhecidos pelos TLRs desencadeiam uma sinalização intracelular. Sob reconhecimento do ligante cognato, cada TLR irá provocar respostas distintas em junção com uma combinação diferente de quatro adaptadores contendo o domínio de região homóloga de receptores Toll/IL-1 receptor (MyD88, TIRAP/MAL, TRIF ou TRAM), por meio de interações hemofílicas desses domínios. O fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), é uma molécula adaptadora essencial para sinalização mediado pelos TLRs, exceto TLR3, resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Quando associado ao TLR, MyD88 recruta as proteínas IRAK-1 (*IL-1R-associated kinase-1*), IRAK-4 e TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) em um complexo. IRAK-1 e TRAF6 se dissociam e interagem com TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase*), levando a ativação desta cinase. Quando TAK1 é ativada, ocorre a fosforilação de IKK-b (IkB cinase), e MAPcinase 6 (MKK6) culminando com a degradação de IkB. Essa degradação deixa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) livre para ser translocado ao núcleo, e ativar múltiplos genes de citocinas pró-inflamatórias dentre elas IL-12 e TNF- $\alpha$ , como também a ativação de proteínas cinase ativada por mitógeno (MAPKs), que possuem diversas funções biológicas (ALMEIDA, 2010).

Na infecção pela *P. aeruginosa*, as células do hospedeiro, principalmente os macrófagos, podem reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS) e a flagelina da bactéria através de receptores TLR4 e TLR5, respectivamente. Os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos na sinalização das respostas ao alginato capsular produzido pelas cepas mucoides da *P.*

*aeruginosa* (SKERRETT et al., 2007). Já foi demonstrado que MyD88 é uma molécula necessária para o controle da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* (MIJARES et al., 2011). Em um estudo, foi demonstrado que camundongos nocautes para *MyD88* (*MyD88*<sup>-/-</sup>) eram mais susceptíveis à pneumonia induzida pela infecção pela *P. aeruginosa*. Os camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> foram incapazes da produção rápida de citocinas e de resposta inflamatória e, quando desafiados com *P. aeruginosa* no pulmão, não foram capazes de conter a replicação bacteriana local e sistêmica. Tais resultados indicaram que as vias de sinalização dependentes de MyD88 são fundamentais para a ativação da imunidade inata contra *P. aeruginosa* nos pulmões (SKERRETT et al., 2004).

Além dos TLRs, os NLRs também são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos. Os receptores do tipo NOD (NLRs) são proteínas citosólicas e compreendem proteínas Nods (*nucleotidebinding oligomerization domain-1*), Nalps (*NATCH-LRR-and pyrin-domaincontaining proteins*), Naips (*neuronal apoptosis inhibitor factors*), Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) e Ipaf (*ICE-protease activating factor*). Compreendem um grupo de proteínas formadas principalmente por três domínios, sendo um domínio efetor N - terminal variável, um domínio central do tipo NOD e uma porção C-terminal com sequências ricas em leucinas. O reconhecimento de padrões se dá pela cauda com sequências ricas em leucinas, a qual, quando recrutada, permite a oligomerização do domínio central do tipo NOD e ativação do domínio efetor. O domínio efetor pode ser do tipo CARD (*caspase activation recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*baculoviral IAP repeats domain*), dependendo do tipo de receptor recrutado, que, por sua vez, induz uma cascata de ativação que culmina na ativação do fator de transcrição NF-κB ou da protease caspase-1 (LIMA, 2009).

A subfamília de NLRP (família NLR, proteínas contendo o domínio pirina) dos receptores de reconhecimento de padrões do tipo NOD respondem á PAMPs com complexos de sinalização chamados de inflamassomas. Os inflamassomas são formados por NLRs que oligomerizam para formar uma plataforma molecular que por sua vez, é constituída por um complexo proteico que controla a produção de citocinas proinflamatórias como interleucina 1-beta (IL-1β) e interleucina -18 (IL-18) pela ativação da proteína Caspase 1, que cliva as formas imaturas destas citocinas em formas ativas com características inflamatórias (PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012). No início da resposta do hospedeiro à infecção pulmonar pela *P. aeruginosa* ocorre a clivagem da forma imaturas Pro-IL-1β pela caspase 1, para a forma ativa da citocina proinflamatória IL-1β que, para que posteriormente seja secretada (ABBAS et al., 2015; LI et al., 1995; SKERRETT et al., 2007; WANGDI et al., 2010).

A infecção pulmonar pela *P. aeruginosa* leva ao recrutamento massivo de neutrófilos nas vias aéreas infectadas. Os neutrófilos desempenham um papel primário e claro na remoção da *P. aeruginosa* durante a infecção pulmonar aguda, como é demonstrado pela susceptibilidade extrema de camundongos neutropênicos a este patógeno. Tal fato foi relatado em um estudo onde foi feita a depleção de neutrófilos e como resultado, os camundongos se tornaram susceptíveis a infecção com baixo inóculo bacteriano de várias estirpes diferentes de *P. aeruginosa* (KOH et al., 2009). Dentre as formas ativas dos neutrófilos capazes de eliminar a *P. aeruginosa*, a serina protease específica de neutrófilos desempenha um papel importante na eliminação da bactéria, como demonstrado em um estudo feito com camundongos com falta de elastase de neutrófilo (NE<sup>-/-</sup>). Estes camundongos demonstraram um aumento da vulnerabilidade a *P. aeruginosa* na pneumonia aguda, e a eliminação das bactérias nos pulmões foram prejudicadas em animais nocautes em comparação com animais controles do tipo selvagem. Também foi demonstrado que a porina da membrana externa da bactéria era um alvo primário da atividade da elastase de neutrófilos (HIRCHE et al., 2008).

As primeiras células imunes que irão entrar em contato com a *P. aeruginosa* no pulmão do hospedeiro são os macrófagos alveolares. *In vitro*, os macrófagos alveolares murinos secretam citocinas como, por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-6, e quimiocinas a seguir da ativação dos receptores TLR4 e TLR5 pelo lipopolissacarídeo e flagelina da *P. aeruginosa* respectivamente (RAOUST et al., 2009). Assim, os macrófagos são capazes de produzir quimiocinas de recrutamento de células inflamatórias ao local de infecção. Estas células também podem responder à fatores de virulência que podem ser secretados via sistema de secreção de tipo III da *P. aeruginosa* (T3SS) por ativação da caspase 1. Dessa forma, a IL-1 $\beta$ , produzida por macrófagos pode ser detectada por células epiteliais das vias respiratórias, e estas células, por sua vez, secretam quimiocinas de recrutamento de neutrófilos (MIJARES et al., 2011). A depleção de macrófagos alveolares em camundongos em um ensaio de infecção pulmonar aguda pela *P. aeruginosa*, atenuou significativamente as respostas inflamatórias, tais como, a secreção de quimiocinas MIP -2. (HASHIMOTO et al., 1996).

Outro papel importante dos macrófagos alveolares durante a infecção pulmonar é a fagocitose de neutrófilos mortos e iniciação de resolução e de reparação. A citocina MCP 1, que é secretada por células epiteliais alveolares em resposta a infecção pela *P. aeruginosa* estimula a migração de macrófagos alveolares e a fagocitose (AMANO et al., 2004). Após o reconhecimento da *P. aeruginosa*, citocinas como IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$  serão expressas pelos macrófagos e estas irão atuar ativando a resposta imune adquirida.

#### 2.4.2 Resposta imune adaptativa contra *P. aeruginosa*

Na resposta imune adaptativa contra bactérias extracelulares como a *P. aeruginosa*, a imunidade humoral compreende um dos mecanismos de eliminação do patógeno (CASTELO et al., 2009). As respostas mediadas por anticorpos são direcionadas contra os antígenos da parede celular e toxinas secretadas e associadas à célula bacteriana, como por exemplo, os polissacarídeos. A resposta humoral contra os polissacarídeos de *P. aeruginosa* é independente do timo. Os mecanismos efetores empregados pelos anticorpos para combater a infecção incluem a neutralização, a opsonização e a fagocitose, além de ativação do sistema complemento pela via clássica (ABBAS, et al., 2015).

A ação dos anticorpos pode ser do tipo opsonina, onde as bactérias são revestidas por anticorpos do tipo IgG e fagocitadas por macrófagos e neutrófilos, através de receptores para a porção Fc presente nessas células. A via clássica do sistema complemento também pode atuar no controle da infecção por patógenos extracelulares levando a indução de uma resposta inflamatória e a formação de um complexo de ataque à membrana que irá resultar na lise da bactéria (CASTELO et al., 2009).

A colonização realizada pela *P. aeruginosa* resulta numa resposta de anticorpos, que pode não ser por si só, capaz de eliminar o patógeno, dessa forma, a imunidade mediada por células T também é importante para pacientes infectados pela *P. aeruginosa* (BAYES et al., 2014).

Diversos trabalhos têm sugerido que os linfócitos T desempenham um importante papel no controle da infecção pela *P. aeruginosa*. Tanto as células T CD4<sup>+</sup> quanto as células TCD8<sup>+</sup> ativadas produzem a citocina pró-inflamatória na tentativa de conter o processo infeccioso (LAVOIE et al., 2011). Em infecções bacterianas é atribuído a resposta de células T auxiliares (Th). Os linfócitos do tipo T<sub>H</sub>1 secretam IFN- $\gamma$  como citocina efetora contra infecções causadas por bactérias, e linfócitos do tipo T<sub>H</sub>2 secretam citocinas como IL-4 e IL-5 (MOSER et al., 2002). Em um estudo sobre a secreção de citocinas a partir de células mononucleares no sangue periférico estimuladas com antígenos da *P. aeruginosa*, foi descrito uma resposta dominante do tipo T<sub>H</sub>2 em pacientes com fibrose cística e infecção crônica por *P. aeruginosa*. A resposta das células T-auxiliares em uma infecção específica pode ser predominantemente T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2, onde vários fatores influenciam na orientação da resposta. Na infecção pulmonar crônica pela *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, uma característica importante é que a exposição pulmonar a antígenos pareceu promover uma

resposta do tipo T<sub>H</sub>2. Além disso, foi demonstrado que pacientes portadores de FC infectados cronicamente e com a maior produção de IFN- $\gamma$  demonstraram uma melhor função pulmonar. (MOSER et al., 2002, 2005).

A citocina inflamatória IFN- $\gamma$  é um potente ativador dos mecanismos fagocíticos de macrófagos. Esta citocina do perfil T<sub>H</sub>1 é frequentemente um dos primeiros imunomoduladores secretados durante eventos inflamatórios. A presença de IFN- $\gamma$  demonstrou em modelo de infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, uma inflamação moderada (LEID et al., 2005; MOSER et al., 2005).

Em um estudo realizado em 2006, o lavado broncoalveolar de 12 pacientes portadores de FC, cronicamente infectados pela *P. aeruginosa*, 11 pacientes portadores de FC e não infectados, e oito pacientes controle, foram obtidos para determinar se a resposta T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 eram alteradas em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de FC e infectados com *P. aeruginosa*. O estudo determinou que pacientes portadores de FC e infectados por *P. aeruginosa*, apresentaram níveis significativamente superiores de citocinas de células do tipo T<sub>H</sub>2 como IL-4 e IL-13 e níveis diminuídos de IFN- $\gamma$  quando comparados aos níveis verificados em pacientes portadores de FC não infectados e em pacientes controles. Dessa forma, foi demonstrado que a prevalência de resposta imunológica pulmonar T<sub>H</sub>2 em pacientes portadores de FC e infectados pela *P. aeruginosa* é bastante elevada (HARTL et al., 2006).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida pelo subgrupo de células T CD4<sup>+</sup> do perfil T<sub>H</sub>17, que regula tanto a granulopoiese como o recrutamento de neutrófilos em locais de inflamação. Isto ocorre em parte devido à capacidade da IL-17 induzir a liberação de quimiocinas CXC, bem como regular a expressão de G-CSF, um fator crítico de crescimento granulopoietico. Devido às suas propriedades funcionais, as células T<sub>H</sub>17 produtoras de citocinas como a IL-17 desempenham um papel importante nas respostas contra bactérias Gram-negativas extracelulares, nas quais a infiltração de neutrófilos é altamente protetora (ROMAGNANI, 2008).

Um estudo avaliou o papel da IL-17 na resposta imune pulmonar dos camundongos durante infecção aguda pela *P. aeruginosa*. Neste estudo foi demonstrado que os níveis de mRNA e da proteína IL-17 aumentaram significativamente no pulmão e no lavado broncoalveolar dos camundongos quando infectados pela *P. aeruginosa* e a fonte deste aumento é mediado pelas células T<sub>H</sub>17. Também foi demonstrado que após a infecção pela *P. aeruginosa*, a IL-17 levava a um aumento dos níveis de fatores de estimulação de colônias granulocíticas no lavado bronco alveolar dos camundongos. Além disso, animais tratados com

anticorpos neutralizantes de IL-17 apresentaram um número maior de unidades formadoras de colônias de *P. aeruginosa* no lavado broncoalveolar do que o grupo não tratado com anticorpo neutralizante de IL-17 (LIU et al., 2011).

Wonnenberg e colaboradores (2016) demonstraram que a citocina IL-17A atrai células inflamatórias durante infecção pulmonar murina com *P. aeruginosa*. No modelo de pneumonia aguda, a IL-17A mediou a expressão de quimiocinas derivadas de queratinócitos que corresponde um quimioatraente para neutrófilos e o recrutamento de células inflamatórias para o local de infecção em camundongos infectados com a *P. aeruginosa*.

## 2.5 CONTROLE DA RESPOSTA IMUNE

Ao observarmos o curso de uma resposta imunológica montada frente a um antígeno, percebemos que diversos são os componentes e mecanismos imunes envolvidos neste processo, como quimiocinas e citocinas produzidas pelas células após entrar em contato com a *P. aeruginosa* para exercerem as funções de recrutamento e ativação de células imunes para o local da infecção. Os mecanismos envolvidos nessa situação necessitam de processos reguladores considerados como alvos para a manipulação da resposta imune (ABBAS et al., 2015).

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina imunomodulatória, que funciona para inibir respostas pró-inflamatórias da imunidade inata e adaptativa, além de evitar as lesões nos tecidos causadas por respostas imunes exacerbadas (HAZLETT et al., 2014). É uma importante citocina anti-inflamatória endógena que desempenha um papel fundamental na regulação de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina-1 (IL-1). A IL-10 representa uma das citocinas mais importantes, capaz de atuar inibindo a sepse e a lesão pulmonar aguda por modulação da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar, respectivamente. Em vários modelos, a IL-10 mostrou-se capaz de inibir a produção de várias citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 que são conhecidas por contribuir para o desenvolvimento de estado inflamatório agudo (SUN et al., 2009). A IL-10 apresenta um pico de produção relativamente tardio após a infecção aguda pela *P. aeruginosa*, num momento em que os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão diminuindo (WÖLBELING et al., 2011).

Uma família de proteínas intracelulares, conhecidas como supressores de sinalização de citocinas (SOCS) desempenham papéis reguladores essenciais tanto na função imune

quanto não imune. Dos oito membros conhecidos, SOCS1 e SOCS3 em conjunto com as células T reguladoras (Treg), desempenham papéis fundamentais na regulação do sistema imunológico. Entre outros reguladores da resposta imune, as células T reguladoras, também desempenham um papel importante na regulação do sistema imune. Já foi demonstrado, que existe uma associação entre SOCS1 e células T reguladoras, onde SOCS1 age na manutenção da estabilidade das Treg (AHMED et al., 2015). As proteínas SOCS são induzidas pela ativação de STAT, e assim, inibem a sinalização do receptor após as citocinas exercerem seus efeitos (MURPHY et al., 2010). As SOCSs foram demonstradas em vários tipos de células com a função de regular o sinal de transcrição de citocinas (ZIMMERER et al., 2007). SOCS 1 têm se destacado como um importante inibidor da sinalização de IFN- $\gamma$  e SOCS 3 contribui para a inibição da indução de IL-10 mediada por exposição à LPS (DALPKE et al., 2003).

As Tregs representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25<sup>+</sup> e do fator nuclear FOXP3. Estas células induzem a supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica (MELO; CARVALHO, 2009). As respostas imunes reguladas por células T têm sido associadas com infecção pulmonar causada pela *P. aeruginosa*. Células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatórias surgem durante o processo regular de desenvolvimento do timo, e constituem de 5 a 10% das células sanguíneas TCD4<sup>+</sup>. A transcrição do fator nuclear FOXP3 têm se mostrado essencial para o desenvolvimento e função de células T regulatórias. Estas células inibem as respostas inflamatórias através de atividades supressoras contra células T efetoras, células dendríticas e neutrófilos. Neste estudo, a infecção pela *P. aeruginosa* em camundongos causou um aumento nos níveis de células regulatórias, porém, apesar do aumento da frequência de Tregs *in vivo* em resposta à infecção pela *P. aeruginosa*, a depleção de células Tregs naturais não alterou fatores como a sobrevivência dos animais, remoção bacteriana, infiltração de neutrófilos, ativação de NF- $\kappa$ B e produção de citocinas durante a infecção (CARRIGAN et al., 2009).

## 2.6 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) compõem uma classe de pequenos RNAs endógenos, de cadeia simples de aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas, que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional. Descritos há pouco

mais de uma década em *Caenorhabditis elegans* e associados à regulação do desenvolvimento larval (LEE et al., 1993), os miRNAs são hoje reconhecidos como reguladores fundamentais da expressão gênica em plantas e animais (SIMÕES, 2009). Constantes estudos têm demonstrado que a regulação pós-transcricional de mRNAs específicos são controlados pelas vias de RNA de interferência (RNAi). Os miRNAs são considerados como a principal classe de pequenos RNAs reguladores endógenos, que exercem efeitos de interferência nos mRNAs de eucariotos (HUNTZINGER et al., 2011). Os genes codificadores de miRNAs são encontrados no genoma e são capazes de suprimir a síntese de proteínas por degradação ou por inibição da tradução de um mRNA alvo (MASHIMA, 2015). Os miRNAs demonstraram regular negativamente a expressão de genes por emparelhamento de bases, mediado pelas características de complementariedade de bases nitrogenadas, com a região 3' não traduzida (3'UTRs) dos mRNAs, indicando que esta classe de moléculas de RNA não codificadoras, constituem uma maneira de exercer controle regulatório sobre os mecanismos de expressão gênica em diferentes organismos (BUSHATI; COHEN, 2007), (Figura 3).

Os miRNAs regulam o desenvolvimento dos animais em múltiplos tecidos e em vários estágios de desenvolvimento. Evidências sugerem que os miRNAs são essenciais para o desenvolvimento normal de vários tecidos animais (ZHANG, 2007). Além disso, vários estudos indicam que os miRNAs participam da regulação de diversos processos celulares, e mudanças em sua expressão gênica são observadas em patologias humanas como no câncer. Também pode ser observado o envolvimento dos miRNAs na regulação da hematopoiese, apoptose, proliferação celular e desenvolvimento de órgãos (HAN et al., 2004; RUGGIERO et al., 2009).

Estudos recentes também têm começado a esclarecer como os miRNAs desempenham papéis fundamentais na regulação de processos como infecção, resposta imune e inflamação e têm sugerido um grande papel dos miRNAs na regulação da patogênese de doenças inflamatórias. Análises individuais de miRNAs confirmaram a importante relação regulatória com alvos específicos da imunidade em defesa do hospedeiro (ZHOU et al., 2014).

A maioria dos miRNAs em mamíferos são codificados em íntrons, e o processamento destes parece ocorrer antes do processo de *splicing* (BUSHATI; COHEN, 2007). A biossíntese do miRNA é um processo de várias etapas, que se inicia no núcleo da célula, após a transcrição, e continua no citoplasma, onde finalmente a molécula de miRNA madura exerce sua principal função (LEE et al., 2003) (Figura 3). Os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II), gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) com estrutura espacial secundária caracterizada por uma alça em forma de grampo

(*stem loop*) contendo cap 5' e cauda poli (A) 3'. Algumas exceções são os miRNAs transcritos pela RNA polimerase III (BUSHATI; COHEN, 2007).

O pri-miRNA é clivado no núcleo pela RNase III, Drosha, e DGCR8, gerando uma molécula precursora denominada pré-miRNA, com cerca de aproximadamente 70-200 nucleotídeos também caracterizada pela estrutura em grampo (LEE et al., 2004; SIMÕES, 2009). Posteriormente, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma por uma proteína que realiza exportação nuclear denominada exportina-5 (LUND et al., 2004).

Já no citoplasma, o pré-miRNA é processado gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 a 25 nucleotídeos. Somente uma das fitas do duplex de miRNA que corresponde á sequência do miRNA maduro é inserida em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que têm como principal componente as proteínas Argonautas. Posteriormente, este miRNA maduro será direcionado para controlar a expressão pós transcricional de genes alvo. Esta regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs depende do grau de complementariedade de bases na região 3'UTR com o mRNA alvo levando a inibição traducional ou degradação do mRNA alvo (SIMÕES, 2009).

O processo de inibição da tradução do mRNA alvo pode ocorrer por mecanismos como competição pelo 5' CAP, inibição da montagem dos ribossomos, deadenilação seguida pelo bloqueio da iniciação da tradução, dissociação prematura de ribossomos. O processo de desestabilização do RNA-alvo, que também consiste em um mecanismo de ação dos miRNAs ocorre através de clivagem do transcrito alvo, metilação do DNA, modificações na cromatina (PEREIRA et al., 2015).

Os miRNAs já foram descritos nos mais diversos organismos, como insetos, plantas, camundongos e humanos. Grande parte dos miRNAs são conservados entre espécies relacionadas e por volta de 30% deles são altamente conservados, com ortólogos em invertebrados ou vertebrados, propondo uma conservação evolutiva com base em sua função biológica (BARTEL, 2004; SIMÕES 2009).

Os miRNAs influenciam a resposta imunológica devido ao seu envolvimento no desenvolvimento diferenciação de células imunes e na liberação de mediadores inflamatórios (HÁ, 2011). Além disso, os miRNAs participam da modulação da resposta imune por poderem regular a sinalização desencadeada por TLRs, incluindo a ativação de NF- $\kappa$ B e a expressão de moléculas anti-inflamatórias como a citocina IL-10. Assim, os miRNAs podem funcionar como um componente de autorregulação participando do aparato de resolução da resposta inflamatória (MARÇOLA, 2014).

Além do seu envolvimento em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, os miRNAs são cada vez mais implicados na resposta a agentes bacterianos nas células eucarióticas. Diferentes agentes patogênicos bacterianos são capazes de modular a expressão de miRNAs, e estes apresentam grande importância no desenvolvimento e na resposta do sistema imune do hospedeiro (EULALIO et al., 2012).

Recentemente, foi analisado o perfil de miRNAs em células epiteliais brônquicas de pacientes com FC infectadas pela *P. aeruginosa* através de microarranjo de DNA e RT-PCR. Foi demonstrado que o miRNA-93 (miR-93) que é altamente expresso em condições basais, diminui sua expressão durante a infecção pela *P. aeruginosa* em paralelo com o aumento da expressão do gene *IL-8*, que representa uma citocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para os sítios inflamatórios. Esses resultados demonstram uma possível ligação entre a expressão de miRNA e a indução de IL-8 em células epiteliais brônquicas infectadas pela *P. aeruginosa* (FABBRI et al., 2014).

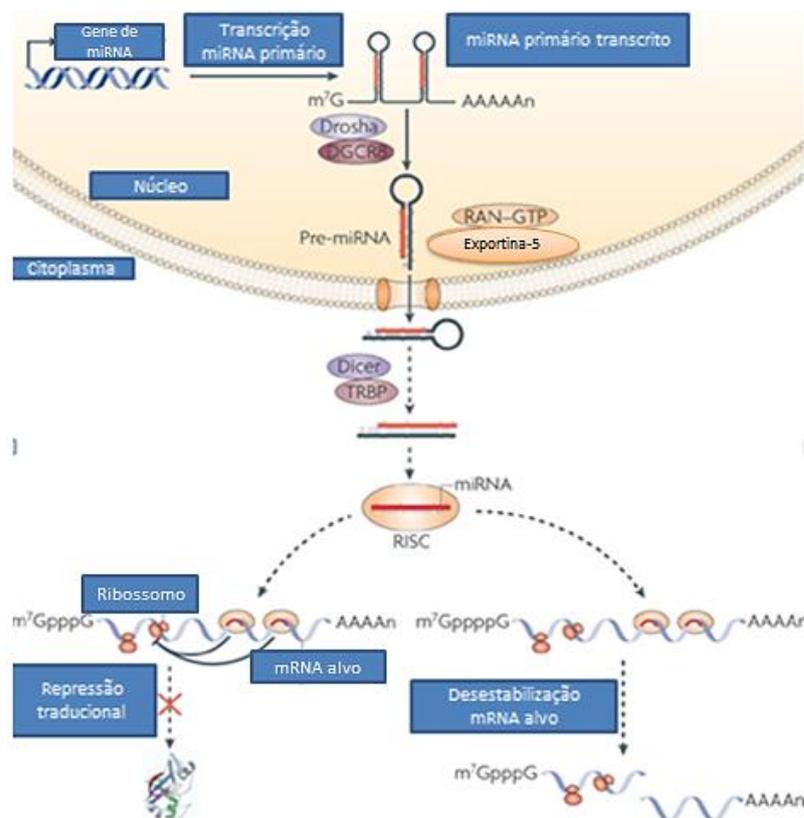


Figura 3- Biogênese de miRNAs.

Fonte: Adaptado de Lodish et al., 2008.

Nota: O gene de miRNA é transcrito. O pri-miRNA apresenta uma estrutura em forma de grampo que é clivada pela enzima RNase III, Drosha formando o pre-miRNA. A Exportina 5 exporta este produto do núcleo para o citoplasma para ser processado por Dicer, gerando um miRNA. Somente uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão do gene alvo enquanto a outra fita é degradada.

## 2.7 miRNAs E RESPOSTA IMUNE CONTRA BACTÉRIAS

A regulação dos genes mediada pelos miRNAs é crítica para as funções celulares normais, e aproximadamente um terço dos mRNAs podem ser alvos dos miRNAs. A importância dos miRNAs no desenvolvimento e na resposta do sistema imune é relatada devido o envolvimento dos miRNAs no desenvolvimento e diferenciação de células imunes, na produção de anticorpos e na liberação de mediadores inflamatórios (HA, 2011). Portanto, evidências sugerem que os miRNAs desempenham um papel fundamental na regulação das funções imunes, incluindo as respostas imunes inata e adaptativa e prevenção de autoimunidade (HA, 2011; PAULEY; CHAN, 2008). Além disso, estudos da expressão diferencial de genes codificadores de miRNAs em resposta a infecções bacterianas revelaram o importante papel dos mesmos na resposta imune do hospedeiro (STAEDL; DARFEUILLE, 2013).

Durante o curso de uma infecção, agentes patogênicos bacterianos alteram uma vasta gama de funções celulares do hospedeiro para garantir a sua sobrevivência e a replicação. No entanto, cada agente patogênico pode usar diferentes estratégias moleculares para subverter os caminhos complexos que regulam a resposta imune do hospedeiro. (DIACOVICH; GORVEL, 2010). A compreensão das funções dos miRNAs na resposta imune à infecção bacteriana foi iniciada por um estudo na planta *Arabidopsis thaliana* onde a detecção da flagelina da bactéria extracelular *P. syringae* pelo receptor FLS2 foi observada para induzir a transcrição de miR-393a (NAVARRO et al., 2006). O papel dos miRNAs nas respostas celulares de mamíferos contra infecções bacterianas foi originalmente inferido a partir de estudos envolvendo a detecção de PAMPs por receptores TLRs (EULALIO et al., 2012).

Foi relatado por Taganov e colaboradores (2006) a expressão de 200 miRNAs em monócitos humanos após a estimulação dos receptores TLR4 pelo LPS, revelando a indução de miR-132, miR-146a/b e miR-155. Além disso, foi demonstrado que miR-146a/b e miR-155 são induzidos de um modo dependente de NF- $\kappa$ B, sendo assim considerados uma parte dos mecanismos reguladores que modulam a produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecção bacteriana (EULALIO et al., 2012).

Diferentes agentes patogênicos bacterianos são capazes de modular a expressão de miRNAs, e estes apresentam grande importância no desenvolvimento e na resposta do sistema imune do hospedeiro, (Figura 4).

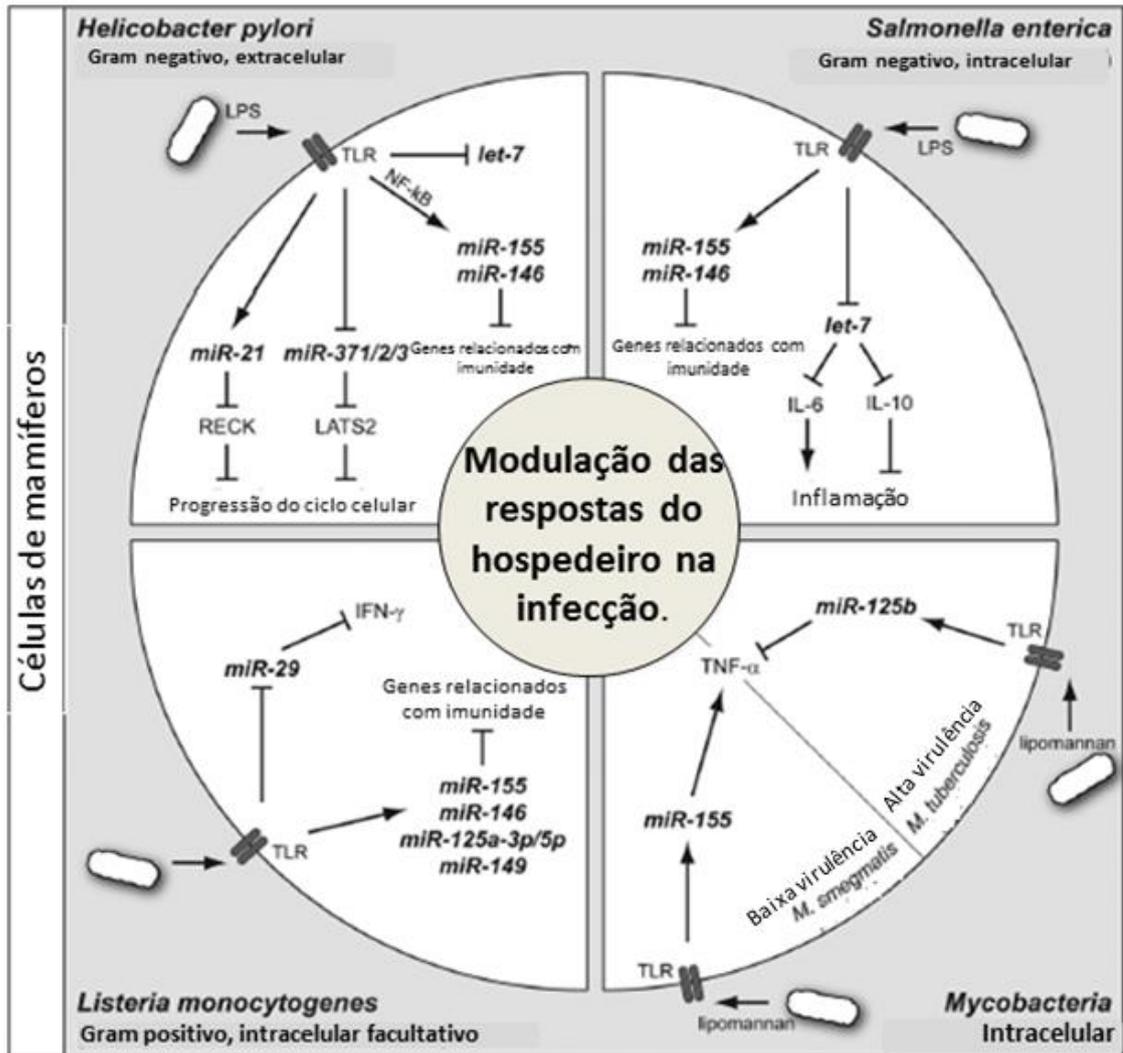


Figura 4 - Visão geral da regulação de miRNAs de mamíferos por diferentes bactérias.

Fonte: EULALIO et al, 2012.

Para elucidar o papel dos miRNAs nos mecanismos da resposta imune inata *in vivo*, Mochos et al (2007), examinaram a expressão de miRNAs usando a reação de PCR em tempo real, durante um modelo de inflamação pulmonar em camundongos expostos ao LPS. A exposição dos camundongos ao LPS levou a um aumento imediato da concentração de citocinas pró-inflamatórias. A partir da liberação destas citocinas, o nível de miRNA no tecido pulmonar foi medido ao longo de 6 horas. A exposição ao LPS resultou em uma elevação geral dos níveis de miRNA. O pico dos níveis de miRNA no tecido pulmonar dos camundongos em 3 horas coincidiu com a queda da produção de TNF- $\alpha$ . Desta forma, o estudo demonstrou que a resposta imune inata induzida pelo contato com o LPS está associada com a diferença de expressão gênica dos genes codificadores dos miRNAs no pulmão dos camundongos, e estas mudanças observadas poderiam estar envolvidas na regulação da resposta inflamatória

Análises de miRNAs confirmam a importante relação de regulação com alvos imunes específicos em defesa do hospedeiro. O papel dos miRNAs na resposta imune inata foi demonstrado quando miRNAs como miR-146a, miR-155 e miR-21 foram induzidos em uma via de sinalização dependente do TLR4 em monócitos (ZHOU et al., 2014). Para investigar se a expressão de miRNA poderia ser regulada por uma infecção por *P. aeruginosa*, Zhou et al (2014), analisaram o perfil de expressão de miRNAs em macrófagos alveolares de camundongos. Após a infecção pela *P. aeruginosa*, a análise de microarranjo revelou que oito miRNAs apresentaram sua expressão aumentada nos macrófagos, sendo o miR-302b o que obteve o aumento de expressão mais significativo, demonstrando o envolvimento deste miRNA no processo infeccioso. Apesar deste trabalho apresentar o miR-302b como um novo regulador da resposta imunológica e inflamatória nas infecções bacterianas do trato respiratório, é possível inferir que outros miRNAs também estão envolvidos no controle da resposta imune inata contra *P. aeruginosa*, não somente pelo aumento de expressão de um dado miRNA, mas também pela diminuição de expressão destes.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o miR-146 a/b e o miR-155 se encontram diferencialmente expressos em células imunes em resposta à vários agentes patogênicos bacterianos, incluindo *Helicobacter pylori*, *Salmonella* entérica, espécies de *Mycobacterium*, *Francisella tularensis* entre outras (STAEDEL; DARFEUILLE; 2013).

O miR-146 a/b é induzido por receptores TLRs de superfície celular que reconhecem os PAMPs bacterianos. Juntamente com a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias através das vias de TLRs, o miR-146 é induzido através de NF-kb que transcreve o gene do micro RNA. TRAF6 (factor 6 associado a TNFR) e IRAK1 (quinase 1 associada a IL-1R), que são moléculas adaptadoras chave na via TLR / NFkB, constituem alvos diretos de miR-146. O modelo atual da função miR-146 propõe um mecanismo de feedback negativo que regula a sinalização TLR em resposta a produtos bacterianos, diminuindo assim a sensibilidade do LPS celular e evitando a inflamação excessiva. O microRNA 146 está envolvido no estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica, onde macrófagos tornam-se menos susceptíveis a estímulos bacterianos extracelulares para proteger o organismo contra o choque séptico.

O miR-155 desempenha um papel importante na inflamação. Um estudo de Huang et al., (2011) demonstrou que os níveis de expressão de miR-155 estavam aumentados em córneas humanas infectadas com *P. aeruginosa* em comparação com córneas não infectadas. Além disso, *in vitro*, foi demonstrado que o desafio com a *P. aeruginosa* induziu a expressão de miR-155 de um modo dependente do tempo e da multiplicidade de infecção em

macrófagos peritoneais e células Raw 264.7. Concomitante com o aumento da expressão de miR-155, ocorreu um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  (HUANG et al.,2011). O miR-155 tem como alvo SHIP 1, que representa um regulador negativo da produção de citocinas pró inflamatórias (STAEDEL; DARFEUILLE, 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* possui a capacidade de colonizar vários ambientes e infectar diversos organismos, incluindo o homem. Quando coloniza o homem, é capaz de causar infecções, principalmente em ambientes hospitalares, sendo o principal patógeno encontrado em secreções de pacientes com fibrose cística. Existe um grande aumento de isolados globais multirresistentes de *P. aeruginosa*, chegando a ser o isolado mais comum em pacientes com pneumonia em hospitais do Brasil, Argentina, Chile e México. Apesar disso, 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. Assim, a busca por novas imunoterapias se faz necessária. 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 pelos pequenos RNAs não codificadores com foco nos miRNAs são necessários para o melhor entendimento da patofisiologia da infecção por *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR146b-5p diferencialmente expressos durante a infecção pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão diferencial de miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR146b-5p e citocinas *in vitro* frente a infecção pela *P. aeruginosa*.
- Avaliar a expressão diferencial de miRNAs *in vivo* frente a infecção pela *P. aeruginosa*.
- Analisar os possíveis alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em macrófagos alveolares.
- Analisar as variações histopatológicas frente à infecção pela *P. aeruginosa*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico será descrita a metodologia empregada no desenvolvimento do presente trabalho.

### 5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com seis a oito semanas de idade, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses animais foram mantidos no Biotério sob condições controladas de temperatura, limpeza e com acesso livre à água e alimentos. Os protocolos do experimento foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG, sob registro 562/2014.

### 5.2 CEPAS BACTERIANAS

Nesse estudo foram utilizadas as cepas ATCC 27853 (avirulenta) referida como ATCC e PA14 (virulenta) da *Pseudomonas aeruginosa* disponíveis na coleção bacteriana do Laboratório de Vacinas da UNIFAL – MG.

### 5.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS CEPAS DE *P. aeruginosa*

Para o cultivo das cepas de *P. aeruginosa*, utilizadas nos experimento *in vivo* e *in vitro*, 500 uL de cultura congelada de cada uma das cepas foram inoculadas em 20 mL de meio Lauria Broth (LB) e incubadas a 37 °C em um agitador horizontal sob 180 rotações por minuto (rpm). Para manutenção das cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e PA14, estas foram congeladas depois de atingir a sua fase logarítmica de crescimento e mantidas a -80 °C em caldo LB contendo 20% de glicerol até sua utilização.

#### 5.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO DE *P. aeruginosa*

Para determinação aproximada da concentração bacteriana que seria utilizada para os experimentos *in vivo* e *in vitro*, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) em espectrofotômetro e posterior contagem de unidades formadoras de colônias visualizadas em placas de meio LB solidificado. Para isto, 500 uL de cultura congelada em glicerol de cada uma das cepas foram inoculadas em 20 mL de meio LB e incubadas a 37 °C em um agitador horizontal sob 180 rotações por minuto (rpm). Uma hora após o inóculo das cepas em meio LB, 1 mL da cultura foi retirado para medição da  $DO_{600}$  e 100 ul para realização de diluição seriada ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) em solução salina estéril para plaqueamento de 100 ul da diluição em meio LB solidificado e, após incubação a 37 °C por 24 horas, contagem das UFCs. Esta etapa foi repetida sucessivamente a 2, 3, 4, 6, 8 e 11 horas de incubação do meio inoculado com as cepas ATCC 27853 e PA14. Um frasco contendo meio LB estéril foi utilizado ao longo do experimento para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da  $DO_{600}$ . Para determinação da curva de crescimento da *P. aeruginosa* ATCC e PA14, foram utilizados os valores da  $DO_{600}$ , UFCs e tempo de inóculo.

#### 5.5 INFECÇÃO INTRATRAQUEAL POR *Pseudomonas aeruginosa*

As duas cepas de *P. aeruginosa* utilizadas foram cultivadas por 6 horas a 37 °C sob 180 rpm antes da infecção dos camundongos. Para confirmação da estimativa de concentração bacteriana, foi realizada diluição seriada ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) e um total de 100 uL de cada diluição foi plaqueado em meio LB solidificado e, após incubação a 37 °C por 24 horas, as UFCs foram contadas. Para infecção, cada camundongo foi anestesiado intraperitonealmente com aproximadamente 0,1 mL de uma solução contendo 260 uL de Quetamina 10%, 130 ul de Xilasina [2.3g] e 1110 uL de salina estéril. Os animais foram divididos em grupos que seriam infectados com a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, PA14 ou expostos a tampão salina fosfato (PBS). A traqueia dos animais foi exposta e 50 uL da suspensão contendo aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFCs de *P. aeruginosa* ou salina foi administrada com uma agulha de 26G. A pele dos animais foi fechada através de suturas e após 16 horas de infecção os

animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico seguido por deslocamento cervical para a extração do baço, pulmão, fígado, fêmures e tíbias.

#### 5.5.1 Determinação do número de unidades formadoras de colônias

Os pulmões extraídos dos animais foram macerados em 9 mL de solução salina estéril, com o auxílio de uma peneira de aço e diluídos serialmente. As diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram plaqueadas em duplicada em meio LB ágar. Os baços dos animais também foram extraídos, macerados e diluídos serialmente. As diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram plaqueadas em duplicada em meio LB ágar. Os resultados foram expressos como log de UFC do pulmão ou baço de cada animal. Além disso, 100 uL dos macerados de pulmão e baço dos três grupos foram adicionados a 250 uL de TRIZOL para posteriores análises.

#### 5.6 CULTURA E ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS OU CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 foram sacrificados através de deslocamento cervical e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades desses ossos foram cortadas e foi injetado aproximadamente 5 mL de solução salina estéril por osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos e o precipitado de células foi ressuspenso em 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 ul de Penicilina/Streptomicina e 500 uL de Anfotericina B.

As amostras foram submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70  $\mu$ m para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Após a filtração, as células foram plaqueadas em Placas de Petri e incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, de maneira a obter somente células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e posteriormente ressuspenso em 1 mL de DMEM suplementado. As células viáveis foram contadas por meio da coloração com o corante Azul de Tripán na câmara de Neubauer. Para a obtenção de

Macrófagos Derivados da Medula Óssea (BMDMs) ou Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea (BMDCs), as células viáveis foram distribuídas em placas de 24 poços com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 ul de Penicilina/Strptomocina, 500 uL de Anfotericina B e 10% de LCCM, (L929 *cell conditioned medium*) como uma fonte de fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF) ou de 30% de granulócito recombinante murino (GM-CSF), na concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço. A placa foi incubada a 37°C e sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a diferenciação em macrófagos, três dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 100 uL de M-CSF por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também M-CSF. Para diferenciação em células dendríticas, três dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 5mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 50 uL de Penicilina/Streptomocina e 30% de GM-CSF em cada placa de Petri e, no quinto e sétimo dia, foram retirados de cada uma das placas 4 mL de meio e adicionados mais 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 50 uL de Penicilina/Streptomocina e 30% de GM-CSF.

Após a diferenciação das células em Macrófagos Derivados da Medula Óssea, ou Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea, cada 6 poços da cultura foram estimulados com as cepas ATCC 27853 e PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*, meio DMEM (controle negativo) ou LPS, (1 µg/mL),(controle positivo).

Para o estímulo dos BMDM ou BMDCs foram adicionados, no décimo dia de cultura, 400ul de meio DMEM com 100 uL das cepas de *P. aeruginosa*. As cepas estavam em uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 1,5 e em suspensão contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFCs de *P. aeruginosa* tanto para ATCC 27853 quanto para PA14. Após 6 horas de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante das culturas foi coletado para a análise da expressão de citocinas. Às células aderidas na placa, foi adicionado 100 uL de TRIZOL para posteriores análises.

## 5.7 CULTURA E ESTÍMULO DE CÉLULAS RAW 264.7

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi obtida do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. As células Raw 264.7 foram mantidas em nitrogênio líquido em solução de congelamento composta por 90% de SFB e 10% de

Dimetilsulfóxido (DMSO) até sua utilização. Para o experimento de estimulação *in vitro* as células foram descongeladas, colocadas em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, Penicilina/Estreptomicina e Anfotericina B à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as células atingirem uma confluência de 70 a 80% o meio DMEM presente na garrafa foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, as garrafas foram lavadas com solução salina estéril. Em seguida, foi adicionado 1 mL de Tripsina para retirada das células aderidas, e 9 mL de salina estéril foi utilizada para a lavagem da garrafa. A salina contendo as células foi retirada com uma pipeta sorológica e centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Ao fim da centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM. As células viáveis foram contadas por meio da coloração com o corante Azul de Tripam na câmara de Neubauer, e distribuídas em uma placa de 24 poços na concentração de 1 x 10<sup>5</sup> células por poço. A placa foi incubada a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para a aderência das células.

Para o estímulo das células Raw 264.7, foram adicionadas separadamente, as cepas ATCC 27853 e PA14 de *P. aeruginosa* em uma MOI de 1:10 e meio DMEM (controle negativo). Os estímulos foram feitos em triplicata e após 0, (não estimulado), 6, 18 e 24 horas de incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi coletado para análises e às células aderidas na placa, foi adicionado 100 uL de TRIZOL para posteriores análises.

## 5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CODIFICADORES DE CITOCINAS E DE MIRNAS POR PCR EM TEMPO REAL

### 5.8.1 Extração de RNA total

Para análise da expressão diferencial dos genes, o RNA das amostras provenientes das culturas celulares estimuladas, e dos macerados de pulmão e baço infectados com a *P. aeruginosa* ou estimulados com PBS, 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, e 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.

### 5.8.2 Reação de Transcrição Reversa para síntese de cDNA

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript III (Invitrogen) de acordo com os dados do fabricante. Inicialmente, 1 uL de oligo(dT) na concentração de 10 uM, foram adicionados juntamente com 1 uL de dNTPs (desoxinucleosídeos trifosfato) e RNA total. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 1 µg foi utilizado, completando o volume final da reação para 20 uL com água livre de RNase. As amostras foram levadas para termociclador *Geneamp pcr system 9700* a 65°C por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 1 uL de DTT (0.1M), 4uL de 5 X *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) e 1 uL da enzima SuperScript III. As amostras foram levadas novamente para o termociclador onde foram submetidas a 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. 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.

### 5.8.3 Reação de Transcrição Reversa para a síntese de cDNA para miRNAs

Para análise da expressão diferencial dos genes codificadores de miRNA, o RNA das amostras provenientes das culturas celulares estimuladas, e dos macerados de pulmão e baço infectados com a *P. aeruginosa* ou estimulados com PBS, foram extraídos utilizando o reagente LS Trizol® (Life Technologies, USA) seguindo as instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA exclusivo de miRNAs maduros foi realizada utilizando-se o miScript II RT Kit (QIAGEN) segundo as especificações do

fabricante. Primeiramente, 4 uL de *5X miScript HiSpec Buffer* e 2uL de *10X miScript Nucleics Mix* foram adicionados juntamente com 2 uL da enzima *miScript Reverse Transcriptase Mix* e com o RNA molde, completando a reação com água livre de RNase para um volume final de 20 uL. As amostras foram levadas para o termociclador com as condições de ciclo de 60 minutos a 37°C e 5 minutos a 95°C. Brevemente, os miRNAs maduros serão poliadenilados pela enzima poly(A) polimerase presente no tampão e serão reversamente transcritos em cDNA utilizando oligo-dT como iniciadores. A transcrição reversa é feita em paralelo no mesmo tubo de reação. O oligo-dT possui uma sequência “âncora” na porção 3’ e uma sequência “tag” universal na porção 5’ permitindo a amplificação do miRNA maduro no PCR em tempo real. A combinação da poliadenilação e do “tag” universal garante que os ensaios futuros não detectem DNA genômico. O fluxograma abaixo (fluxograma 1) resume a técnica de conversão em cDNA de miRNAs maduros.

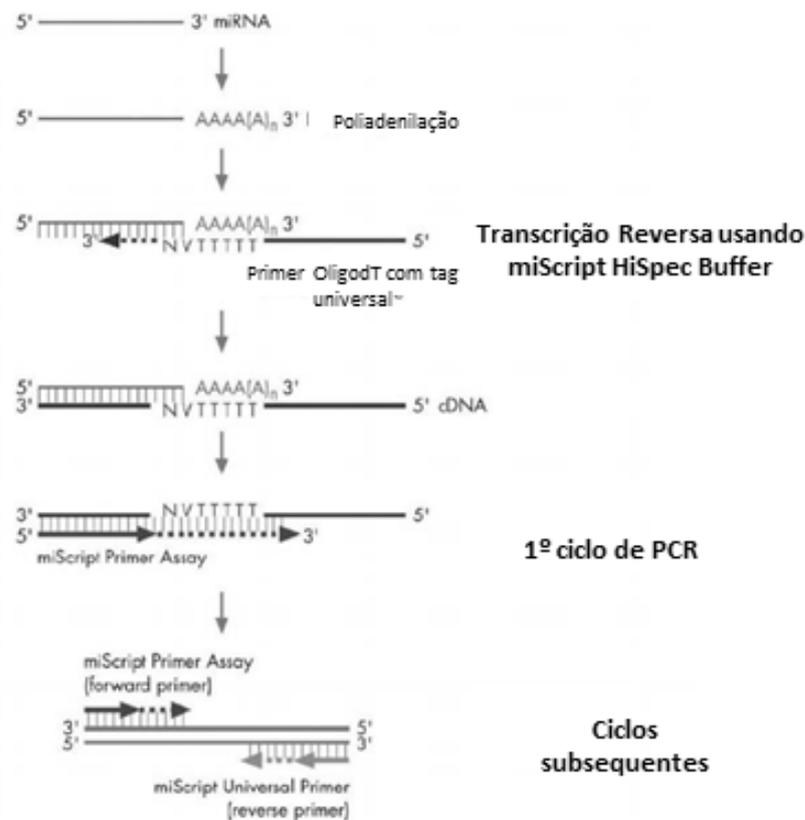


Figura 5 - Técnica de conversão em cDNA  
Fonte: miScript II RT Kit (QIAGEN)

#### 5.8.4 PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas e miRNAs

Para análise da expressão diferencial dos genes codificadores das citocinas IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, os iniciadores foram desenhados utilizando dados da literatura ou através do software RTPrimerDB. Os iniciadores utilizados e suas sequências estão representados na tabela 1. Para a análise da expressão de genes codificantes de miRNA, foi utilizado o kit *miScript Primer Assays*, sendo os alvos os miRNAs mmu-miR-155-5p ou mmu-miR146b-5p.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
<i>IL-12 F</i>	5'- TGGTGTCTCCACTCATGG -3'
<i>IL-12 R</i>	5'- AGCAGCAGATGTGAGTGG -3'
<i>IL-1<math>\beta</math>- F</i>	5' - TGACCTGGGCTGTCCAGATG -3'
<i>IL-1<math>\beta</math>- R</i>	5'- CTGTCCATTGAGGTGGAGAG-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math> F</i>	5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math> R</i>	5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>IFN-<math>\gamma</math> F</i>	5'- TCTGGAGGAACTGGCAAAAG -3'
<i>IFN-<math>\gamma</math> R</i>	5'- TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG -3'
<i>IL-6 F</i>	5'- CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA -3'
<i>IL-6 R</i>	5' – GATGGATGCTACCAAAGTGGGA -3'
<i>mmu-miR155-5p F e R</i>	De acordo com o fabricante (QUIAGEN <sup>®</sup> )
<i>mmu-miR146b-5p F e R</i>	De acordo com o fabricante (QUIAGEN <sup>®</sup> )
<i><math>\beta</math> – actina F</i>	5'- AGG TGT GCA CTT TTT ATT GGT CTC AA -3'
<i><math>\beta</math> – actina R</i>	5' TGT ATG AAG GTT TGG TCT CCC T -3'
<i>snord95 F e R</i>	De acordo com o fabricante (QUIAGEN <sup>®</sup> )

Fonte: Do autor

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR<sup>®</sup> Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume final das reações foi de 10 uL contendo 5 µL de SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM de cada oligonucleotídeo 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. Já as condições de amplificação utilizadas para análise da expressão de miRNAs consistiram de aquecimento a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, seguido de 55°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos. As reações que compreendem a faixa de 95%-105% de eficiência foram utilizadas e aceitas para as análises posteriores.

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* para citocinas e o *snord95* para os miRNAs. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação.

## 5.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA

O pulmão e o fígado dos animais foram fixados com formol a temperatura ambiente. Após a fixação histológica os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Para cada órgão foram obtidos em micrótomo rotativo 9 cortes semi-seriados com 5 µm de espessura para evitar a análise a mesma área histológica. As secções do pulmão e fígado foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica geral. Os cortes histológicos montados sobre lâmina histológica foram visualizados com a utilização de câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens digitalizadas foram obtidas a partir de cada corte histológico utilizando-se o software de captura e análise de imagens Axion Vision LE (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha).

## 5.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na análise histopatológica do pulmão e do fígado, foram investigados qualitativamente a morfologia do pulmão e fígado, além de evidências de necrose tecidual, padrão de organização e distribuição das células intersticiais. Em adição, foi investigada a presença e distribuição de focos inflamatórios e exsudatos. A análise histopatológica foi realizada em 10 campos histológicos aleatórios para cada animal, os quais foram obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×).

## 5.11 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

O método estereológico foi utilizado para avaliar a amplitude do remodelamento morfológico do parênquima e estroma do pulmão. A densidade de superfície e de volume de septos e espaços alveolares, bem como a celularidade tecidual e o volume alveolar médio foram estimados. A densidade de superfície alveolar ( $S_v$ ,  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) foi estimada por meio da relação  $S_v = (2 \times \Sigma I) / L_T$ , em que  $\Sigma I$  indica o número total de interseções entre os arcos cicloides ( $n = 30$ ) e a superfície alveolar, e  $L_T$  representa o comprimento total do sistema de arcos cicloides (852,9  $\mu\text{m}$ ). A densidade de volume ( $V_v$ , %) de septo e espaço alveolar foi estimada por contagem de pontos 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. Para estas análises, foi usado um sistema de teste com 100 pontos contidos em uma área de teste ( $A_t$ ) de  $42,21 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  ao nível do tecido. A análise estereológica foi realizada em 10 campos histológicos aleatórios para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), perfazendo uma área total do órgão de  $21,10 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  para cada grupo e foi executada com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES et al., 2013).

A intensidade do processo inflamatório no pulmão dos animais dos três grupos foi investigada pelo método estereológico através da contagem do número de células intersticiais observadas no tecido pulmonar de animais infectados com as cepas ATCC 27853 e PA14 em relação a celularidade observada no grupo controle. Para isso quantificou-se a densidade de

número de células inflamatórias ( $QA_{inf}$ ) por meio da relação:  $QA_{inf} = \Sigma_{inf} / At$ , onde  $\Sigma_{inf}$  representa o somatório do número de perfis de núcleos de células intersticiais (inflamatórias) e  $At$  corresponde a dimensão da área de teste utilizada ( $25 \times 10^3 \mu m^2$ ). A celularidade tecidual foi avaliada em 10 campos histológicos aleatórios por animal com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), perfazendo uma área total de  $12,9 \times 10^5 \mu m^2$  para cada grupo.

O volume médio alveolar foi estimado usando o princípio de *Star Volume* ( $V^*$ ), que é definido como o volume médio de todas as partes de um objeto quando visto sem ser observado ao longo de linhas retas ininterruptas em todas as direções de pontos aleatórios dentro do objeto. No tecido pulmonar,  $V^*$  fornece uma estimativa do tamanho médio do espaço alveolar em três dimensões e também reflete a conectividade do septo alveolar. O volume de estrela foi calculado como:  $V^* = (\pi / 3) \times \ell^3$ , onde  $\ell$  é o comprimento médio de um intercepto com orientação aleatória através de um ponto aleatório (Cruz-Orive et al., 1992). O volume de estrela foi analisado em 25 alvéolos amostrados aleatoriamente por grupo.

## 5.12 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE PUTATIVOS ALVOS DOS miRNAs SELECIONADOS

Primeiramente, para realização das análises *in silico* dos possíveis alvos dos miRNAs alvos deste trabalho, foi utilizado o programa miRBase para obtenção da sequência de cada miRNA, sendo “uuaaugcuaauugugauaggggu” a sequência do mmu-miR-155-5p (número de acesso MIMAT0000165) e “ugagaacugaaauccauaggcu” a sequência do mmu-miR-146b-5p (número de acesso MIMAT0003475).

Para as análises *in silico* dos possíveis alvos dos miRNAs mmu-miR-155-5p, mmu-miR-146b-5p, foram utilizados, a base de dados “StarBase v2.0” para alvos validados. A base de dados “StarBase v2.0” foi criada para analisar vias de interações mediadas por RNAs longos (lncRNAs), miRNAs, RNAs endógenos competidores (ceRNAs), proteínas de ligação ao RNA (RBPs) e RNAs mensageiros provenientes de análises em larga escala por “CLIP-Seq”. Assim, o StarBase v2.0 proporciona as análises de interações entre proteínas-RNA e de miRNAs e seus possíveis alvos. O banco de dados do StarBase compõe mais de 501.607 interações envolvendo vários programas de predição como: TargetScan, PicTar, RNA22, PITA e miRanda/mirSVR. A primeira escolha dentro do programa foi a análise do miRNA-

mRNA em miRNA-target intersections. Os parâmetros adicionados para cada miRNA foram: análises em mamíferos, no genoma do *Mus musculus* (mm10), com baixa estringência (low stringency  $\geq 1$ ). Os dados foram exportados para uma planilha no programa “Excel” e posteriormente analisados.

Em seguida a análise no StarBase v2.0, para ambos miRNAs, foi realizado a análise dos genes alvos para vias do software “Reactome v59” e avaliados pelo Teste Fisher Exato (*Exact Fisher Test*). Esta análise facilita a seleção de genes alvos em uma vasta lista, além de atribuir função biológica. No programa Reactome v59 foi possível analisar as vias imunológicas e suas interações na imunidade inata e adquirida. Os dados foram exportados para o programa “Excel” contendo as vias biológicas e os valores de p-valor para cada via. Estas vias foram avaliadas e selecionadas de acordo com os valores do p-valor, frequência e importância biológica para o alvo de estudo. Após esta seleção, o banco de dados do programa Reactome v59 foi utilizado para a busca dos genes alvos presentes dentro de cada via selecionada. Cada gene alvo foi avaliado individualmente seguido de uma busca pelos códigos das proteínas depositadas no programa “UNIPROT”. Posteriormente, no UNIPROT foi avaliada a função para cada proteína como putativo alvo dos miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p e o seu possível papel na resposta imunológica e estes dados foram adicionados no programa “Excel”.

Após a análise de predição de alvos sendo selecionados apenas aqueles putativos alvos de maior interesse para posteriores avaliações, foram realizadas a construção de vias de interação dos miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p com seus alvos através do software *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA® versão 01-07), onde foram utilizados, em detrimento do grande número de moléculas geradas pelo IPA®, somente alguns dos dados obtidos pelo programa UNIPROT, levando em consideração a importância de cada putativo alvo mediante o contexto deste trabalho.

## 5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos através da contagem de UFCs do pulmão e do baço dos camundongos e do PCR em tempo real foram analisados usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc), através do teste t de Student ou one-way ANOVA com pós-teste de Turkey, sendo considerado significativas as análises com  $p < 0,05$ .

Nas análises estereológicas, os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad-Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

Inicialmente, realizou-se a padronização do inóculo das cepas avirulenta, ATCC 27853, e virulenta, PA14, da *Pseudomonas aeruginosa* para determinação da quantidade de UFCs que seriam utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos a partir da contagem de unidades formadoras de colônias durante os tempos de crescimento em cultura estão representados na figura 6.

A figura 6 demonstra o valor aproximado de unidades formadoras de colônias obtidas nas placas em diferentes intervalos de tempo. Em ambos grupos, é possível observar a curva de crescimento bacteriano, onde o período de adaptação das cepas ATCC 27853 e PA14 da *P. aeruginosa* ocorreu por aproximadamente duas horas de inóculo inicial. Após a fase de adaptação, ambas as cepas alcançaram um crescimento exponencial atingindo uma elevada quantidade de unidades formadoras de colônias, representando dessa forma, a fase logarítmica do seu crescimento. De acordo com a curva de crescimento bacteriano representada na figura 6, em aproximadamente 8 a 10 horas de inóculo tanto a cepa ATCC 27853 quanto a cepa PA14 demonstraram um perfil característico da fase estacionária. Na contagem de UFCs após 10 horas de inóculo, observamos um maior número de colônias da cepa ATCC 27853 em comparação com a cepa PA14 da *P. aeruginosa*

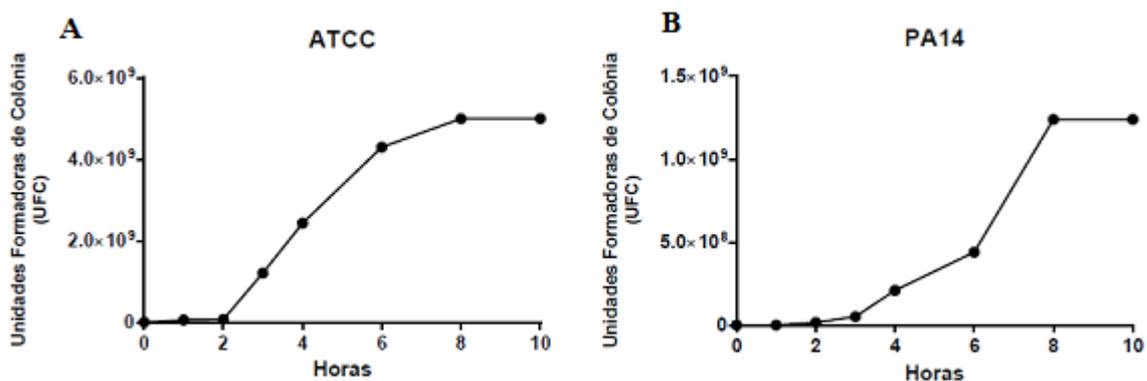


Figura 6 - Curva de crescimento das cepas ATCC 27853 e PA14 da *P. aeruginosa* em função do tempo. Fonte: Do autor

Nota: Quantidade de UFCs da cepa ATCC da *P. aeruginosa* contadas em diferentes intervalos de tempo (A). Quantidade de UFCs da cepa PA14 da *P. aeruginosa* contadas em diferentes intervalos de tempo (B). Os pontos indicam os valores aproximados de UFCs contadas em Placas de Petri em cada intervalo de tempo em horas.

## 6.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE miRNAs e citocinas por RT-qPCR

Para verificar a expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* e a expressão dos genes codificadores das citocinas *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* em células Raw 264.7, células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea infectados com as cepas virulenta e avirulenta da *P. aeruginosa*, foram utilizadas as análises de RT-qPCR.

### 6.1.1 Análise da expressão de miRNAs e citocinas em células Raw 264.7

As células Raw 264.7 representam uma linhagem macrófágica e aderente que preservam todas as características de uma célula fagocítica do sistema mononuclear. A partir dos dados obtidos pelo RT-qPCR, observa-se uma diminuição da expressão do *mmu-miR-155-5p* nas células Raw 264.7 infectadas com a cepa ATCC 27853 da *P. aeruginosa* quando comparadas com as células não infectadas (NI), (Figura 7A). É possível observar na figura 7A, o mesmo ocorre nas células infectadas com a cepa PA14, porém a queda de expressão deste miRNA é mais evidente nas células infectadas com a cepa PA14 quando comparadas com a diminuição de expressão do *mmu-miR-155-5p* nas células expostas à cepa ATCC 27853.

De acordo com os dados apresentados na figura 7B, verifica-se uma pequena diminuição da expressão do *mmu-miR-146b-5p* em células Raw 264.7 infectadas com a cepa avirulenta da *P. aeruginosa*, quando comparado com as células não infectadas, ( $p < 0,05$ ), já as células infectadas com a cepa PA14 da *P. aeruginosa* não demonstraram diferença significativa de expressão do *mmu-miR-146b-5p* em relação ao grupo controle NI.

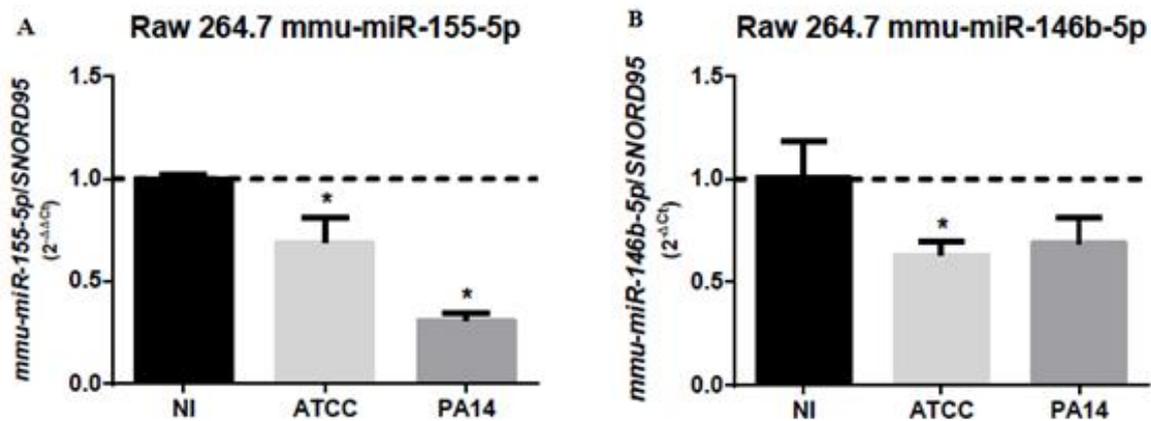


Figura 7- Expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) em células Raw 264.7 infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Células Raw 264.7 foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão do *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

Os níveis de expressão das citocinas *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* também foram avaliados nas células Raw 264.7 e estão representados na figura 8. De acordo com a figura 8A, foi possível observar diminuição da expressão da citocina *IL-1 $\beta$*  nas células infectadas com a cepa ATCC 27853 em relação ao grupo não infectado. Quando as células Raw 264.7 foram infectadas com a cepa PA14, notamos um aumento da expressão de *IL-1 $\beta$*  comparado ao grupo controle não infectado.

Na análise de expressão da citocina *IL-6* em células Raw 264.7, verifica-se um aumento significativo da expressão desta citocina nas células infectadas com ambas as cepas de *P. aeruginosa* em comparação com o grupo não infectado, (Figura 8B).

Quando analisada a expressão de *IL-12* nas células infectadas com a cepa PA14 da *P. aeruginosa*, ocorreu o aumento efetivo da expressão deste gene em resposta à infecção quando comparamos com a expressão de *IL-12* no grupo NI ( $p < 0,05$ ). Ao compararmos a expressão de *IL-12* em células infectadas com a cepa avirulenta com as células NI, observa-se uma ligeira diminuição da expressão de *IL-12* (Figura 8C).

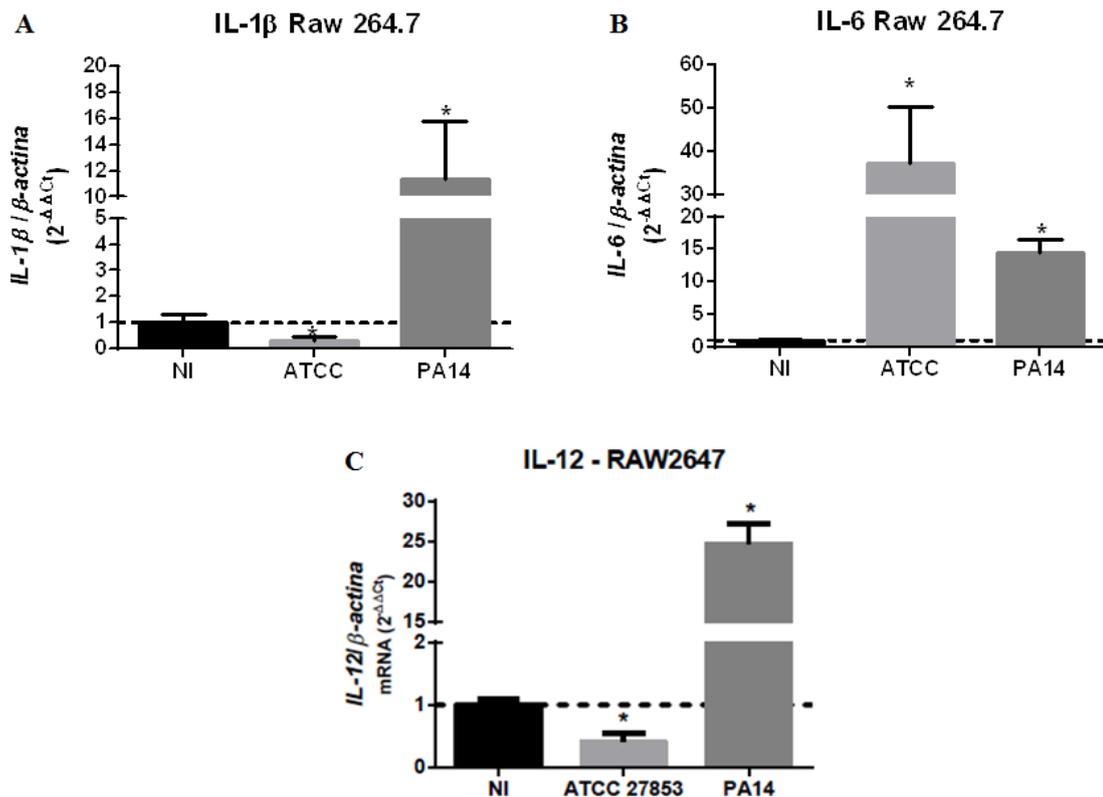


Figura 8 - Expressão diferencial de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* em células Raw 264.7 infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Células Raw 264.7 foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão de *IL-1 $\beta$*  (A), *IL-6* (B), e *IL-12* (C) foi acessada por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

### 6.1.2 Análise da expressão de miRNAs e citocinas em macrófagos derivados da medula óssea

Os níveis de expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* em BMDMs estão representados na figura 9A e 9B. Foi observado nos macrófagos infectados com a cepa PA14 uma ligeira queda da expressão do *mmu-miR-155-5p* quando comparados com o grupo de macrófagos não infectados ( $p < 0,05$ ), (Figura 9A). Os macrófagos infectados com a cepa ATCC 27853 da *P. aeruginosa* não demonstraram diferença significativa de expressão do *mmu-miR-155-5p* em relação ao grupo controle NI.

Na análise da expressão diferencial do *mmu-miR-146b-5p* em macrófagos, diferentemente do que ocorreu com a expressão do *mmu-miR-155-5p* neste mesmo tipo celular, é possível observar aumento de expressão do *mmu-miR-146b-5p* nos macrófagos

infectados com as cepas avirulenta e virulenta da *P. aeruginosa* em comparação com o grupo NI ( $p < 0,05$ ), (Figura 9B).

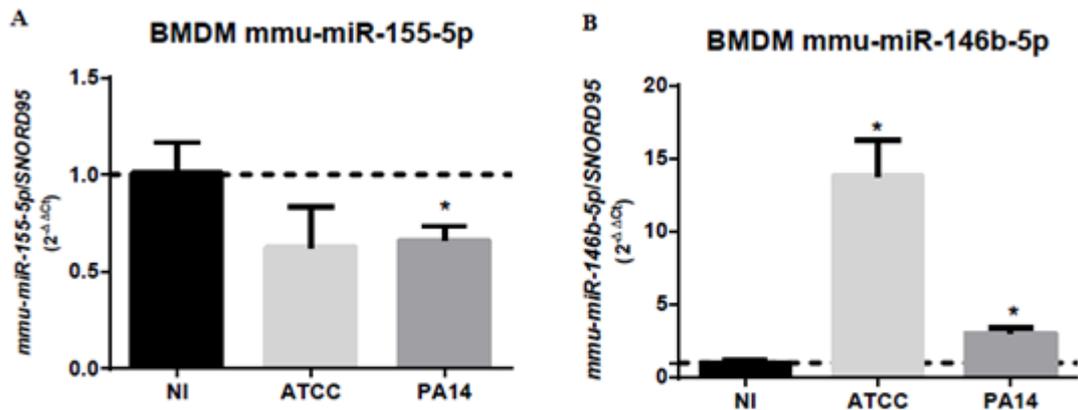


Figura 9 - Expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* em BMDMs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Células da medula óssea murina foram diferenciadas em BMDMs e após a diferenciação, foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão do *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

Os níveis de expressão de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* em BMDMs estão representados na figura 10A, 10B e 10C, respectivamente. Os macrófagos infectados com as cepas ATCC 27853 e PA14 não apresentaram diferenças significativas de expressão de *IL-1 $\beta$*  em relação ao grupo controle NI (Figura 10A).

Os BMDMs infectados com a cepa ATCC apresentaram um aumento significativo da expressão de *IL-6* em relação ao grupo NI. Por outro lado, os macrófagos infectados com a cepa PA14 tiveram uma diminuição de *IL-6* comparados ao grupo NI (Figura 10B).

Quando analisamos o perfil de expressão de *IL-12*, os macrófagos infectados com a cepa PA14 apresentaram um aumento significativo desta citocina, (Figura 10C), comparado com as células NI, semelhante ao aumento expressão de *IL-12* em células Raw 264.7 infectadas com a mesma cepa (Figura 8C). Já em macrófagos infectados com a cepa ATCC 27853, não houve diferença de expressão de *IL-12* em comparação com as células NI (Figura 10C).

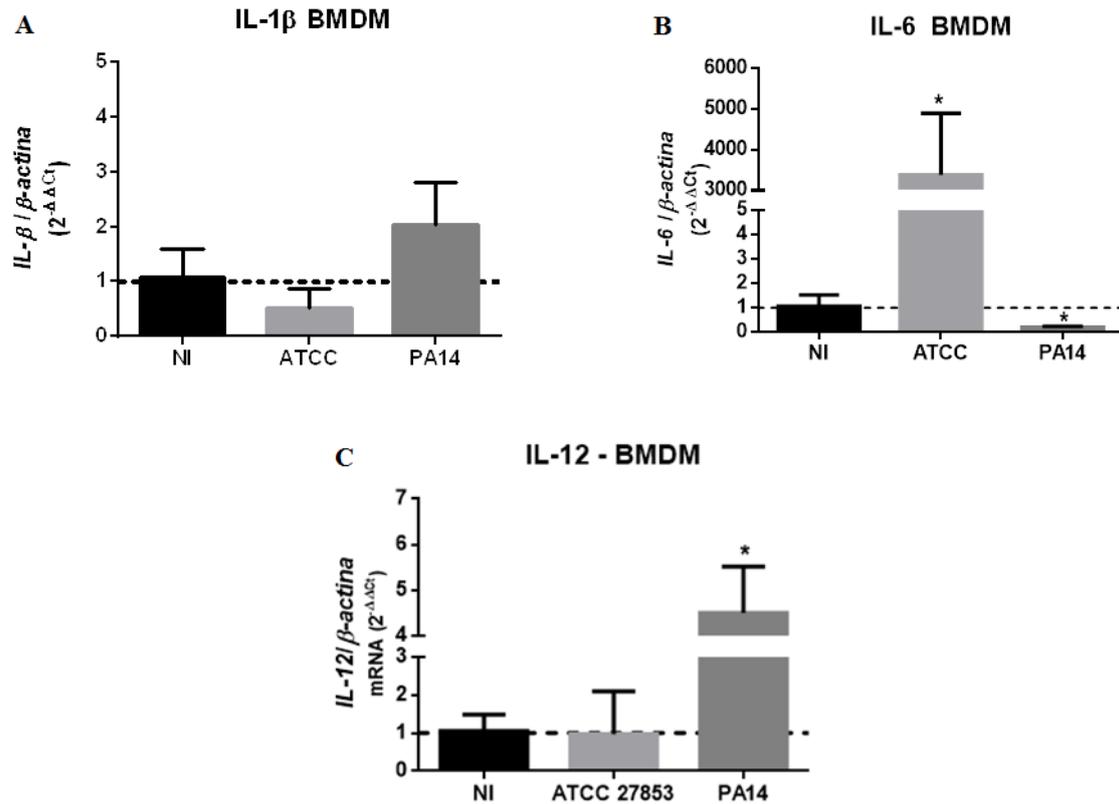


Figura 10 – Expressão diferencial de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* em BMDMs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: BMDMs foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão de *IL-12* (A) e *IL-10* (B) foi acessada por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

### 6.1.3 Análise da expressão de miRNAs e citocinas em células dendríticas derivadas da medula óssea

Os resultados da expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* em BMDCs estão representados na figura 11. De forma divergente do que ocorreu em células Raw 264.7 e em BMDMs, as células dendríticas apresentaram níveis significativamente maiores de expressão tanto do *mmu-miR-155-5p* (Figura 11A), quanto do *mmu-miR-146b-5p* (Figura 11B) quando comparados com as células dendríticas não infectadas.

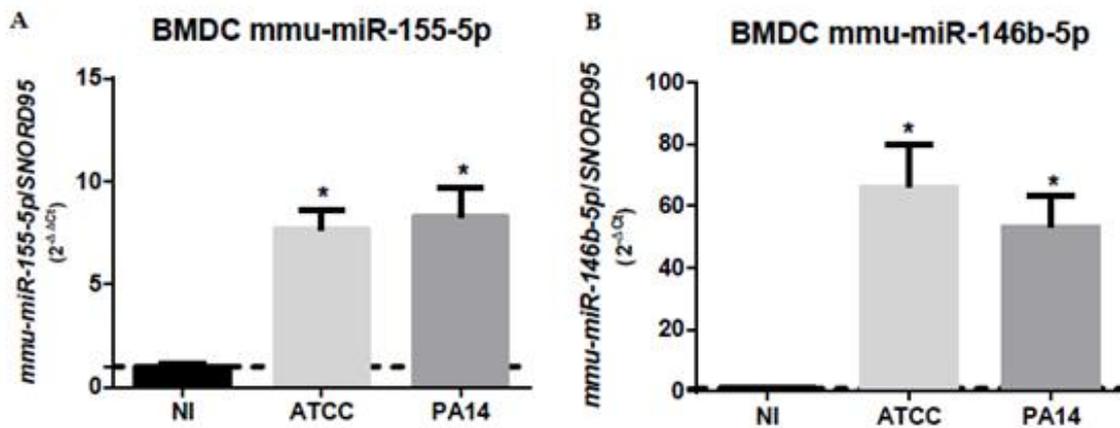


Figura 11 - Expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* em BMDCs infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Células da medula óssea murina foram diferenciadas em BMDCs e após a diferenciação, foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão do *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

Os níveis de expressão dos genes codificadores das citocinas nas células dendríticas controle e infectadas com ambas as cepas da *P. aeruginosa* estão representadas na figura 12. As células dendríticas infectadas com a cepa ATCC 27853 apresentaram um aumento significativo da expressão de *IL-1β* em relação ao grupo controle, as células infectadas com a cepa PA14 não demonstraram diferenças significativas de expressão de *IL-1β* comparadas ao grupo NI. (Figura 12A)

Na figura 12B, não foi possível observar nenhuma diferença significativa de expressão de *IL-6* nos grupos infectados com as cepas ATCC e PA14 em relação ao grupo controle não infectado.

Observou-se um aumento significativo da expressão de *IL-12* nas células dendríticas infectadas com as cepas ATCC 27853 e PA14 quando comparamos com as células não infectadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 12C).

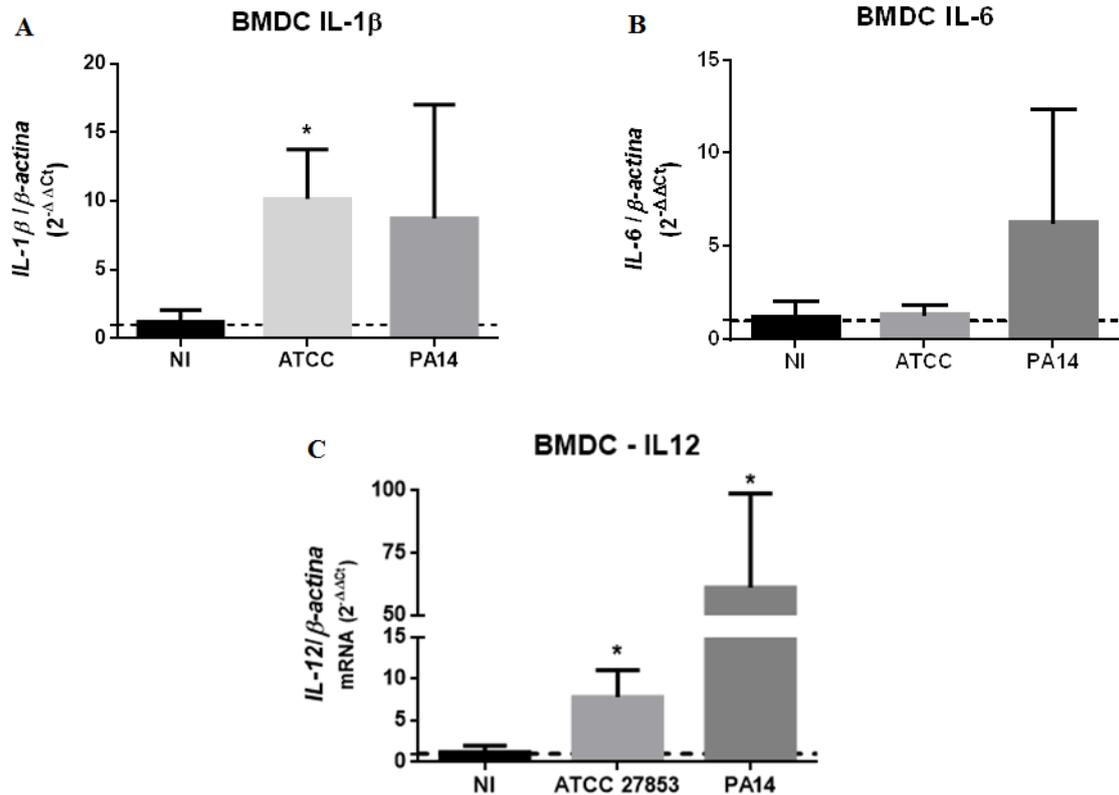


Figura 12 - Expressão diferencial de *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-12* em BMDCs infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: BMDCs foram infectadas pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*. Vinte e quatro horas após, o RNA total foi extraído, transformado em cDNA e a expressão de *IL-12* (A) e *IL-10* (B) foi acessada por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI)

## 6.2 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA INFECÇÃO INTRATRAQUEAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Após os testes *in vitro* em células Raw 264.7, BMDMs e BMDCs, foi realizada a infecção via intratraqueal em camundongos da linhagem C57BL/6. A partir da infecção, foram feitas as análises *in vivo* onde foram realizados os testes de contagem de UFCs, análises da expressão de miRNAs e citocinas no pulmão e baço dos animais, além de análises histopatológicas e estereológicas do pulmão e fígado. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, sendo estes o grupo de animais infectados com a cepa ATCC 27853, grupo de animais infectados com a cepa PA14 e animais expostos ao PBS (grupo controle).

### 6.2.1 Avaliação do número de unidades formadoras de colônia no pulmão e baço dos camundongos.

Para avaliar o número de bactérias no pulmão e no baço dos animais infectados por ambas cepas da *P. aeruginosa*, foram realizadas contagem de UFCs no pulmão e baço dos animais de cada grupo experimental. Notoriamente, foi verificado que os animais infectados pela cepa ATCC 27853 foram capazes de controlar a infecção, no tempo de 16 horas após a infecção, não havendo recuperação de bactérias no pulmão e no baço desses animais, durante as 16 horas de infecção, semelhante ao ocorrido ao grupo controle exposto a PBS. Já os animais que foram infectados pela cepa virulenta da *P. aeruginosa*, apresentaram uma média de 6,94 logs de UFCs, no pulmão dos animais, demonstrando que a cepa PA14 foi capaz de permanecer nesses animais durante as 16 horas de infecção. Além da recuperação de bactérias no macerado de pulmão dos animais infectados pela cepa PA14, observa-se que esta cepa foi capaz de se disseminar no organismo hospedeiro, se instalando no baço dos animais desse grupo experimental, onde recuperamos uma média de 3,91 logs de UFCs no macerado de baço (Figura 13).

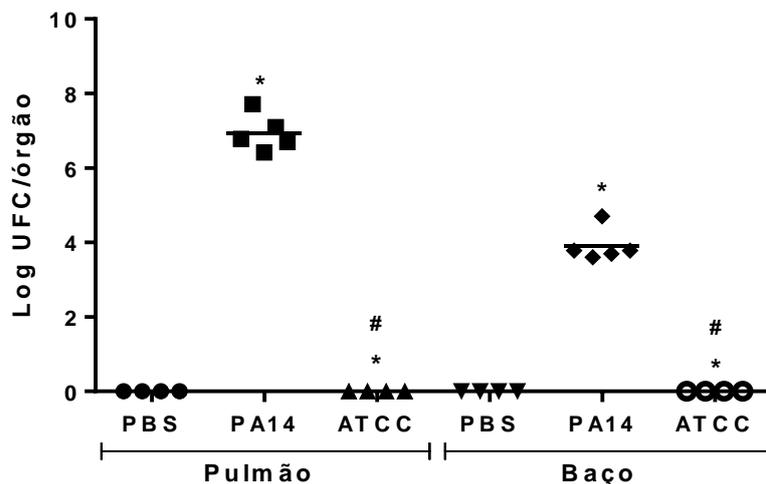


Figura 13 -Log de UFCs no pulmão e no baço dos animais infectados pelas cepas ATCC ou PA14 de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^5$  bactérias e 16 horas após a infecção, o título das cepas ATCC 27853 e PA14 da *P. aeruginosa* foi analisado no pulmão (Figura 8A) e baço (Figura 8B) desses animais e apresentados em log de UFCs. Os dados representam 3 experimentos independentes. (\*) $p < 0,05$  em relação ao grupo estimulado com PBS. (#)  $p < 0,05$  em relação ao grupo infectado com a cepa PA14.

## 6.2.2 Avaliação da expressão diferencial de miRNAs e citocinas no pulmão

Para as análises de expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* no pulmão dos animais dos três grupos experimentais, foram utilizadas análises de RT-qPCR.

Os níveis de expressão dos miRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* foram avaliados no macerado de pulmão dos animais e estão representados na figura 14A e 14B. Quando os valores de expressão do *mmu-miR-155-5p* são comparados entre o grupo infectado com a cepa avirulenta e o grupo NI, verificou-se que o grupo infectado com a cepa avirulenta apresentou níveis superiores de expressão do *mmu-miR-155-5p* em comparação com os níveis de expressão verificados no grupo NI ( $p < 0,05$ ). Já o grupo infectado com a cepa virulenta não apresentou diferença significativa de expressão do *mmu-miR-155-5p* quando comparados com os níveis de expressão do grupo NI ( $p > 0,05$ ) (Figura 14A).

Na análise da expressão diferencial do *mmu-miR-146b-5p* no macerado de pulmão, diferentemente do que ocorreu com a expressão do *mmu-miR-155-5p*, é possível observar aumento significativo de expressão do *mmu-miR-146b-5p* nos grupos infectados com as cepas avirulenta e virulenta da *P. aeruginosa* em comparação com o grupo NI ( $p < 0,05$ ) (Figura 14B).

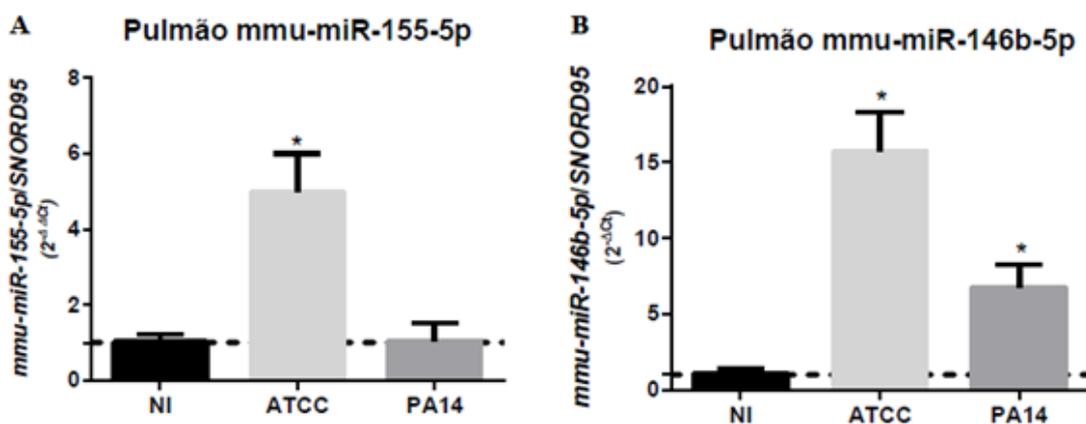


Figura 14 - Expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) em macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^5$  bactérias e 16 horas após a infecção, os animais foram sacrificados e o RNA total do macerado de pulmão foi extraído, transformado em cDNA e a expressão do *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

Os níveis de expressão dos genes codificadores de citocinas no macerado de pulmão dos animais não infectados ou infectados com ambas as cepas da *P. aeruginosa* estão representadas na figura 15.

Na análise da expressão diferencial de *IL-1 $\beta$*  no macerado de pulmão, observamos somente uma diferença significativa da expressão desta citocina no pulmão dos animais infectados com a cepa PA14 da *P. aeruginosa*, onde houve uma diminuição da expressão de *IL-1 $\beta$*  em relação ao grupo de animais não infectados (Figura 15A).

Na análise de expressão de IL-6, verifica-se aumento significativo da citocina no macerado de pulmão de ambos os grupos quando comparados ao grupo controle (Figura 15B). Em contrapartida, ao analisarmos a expressão de IL-12 no pulmão dos animais, observa-se diminuição de IL-12 no macerado de pulmão dos grupos infectados com ATCC e PA14 em comparação ao grupo controle (Figura 15C). Na figura 15D observou-se aumento efetivo de expressão de IFN- $\gamma$  somente nos animais infectados com a cepa ATCC em comparação com o grupo controle não infectado. Na análise da expressão de TNF- $\alpha$  no macerado de pulmão, verifica-se um aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  no macerado dos animais infectados com as cepas ATCC 27853 e PA14 quando comparamos com as células não infectadas ( $p < 0,05$ ).

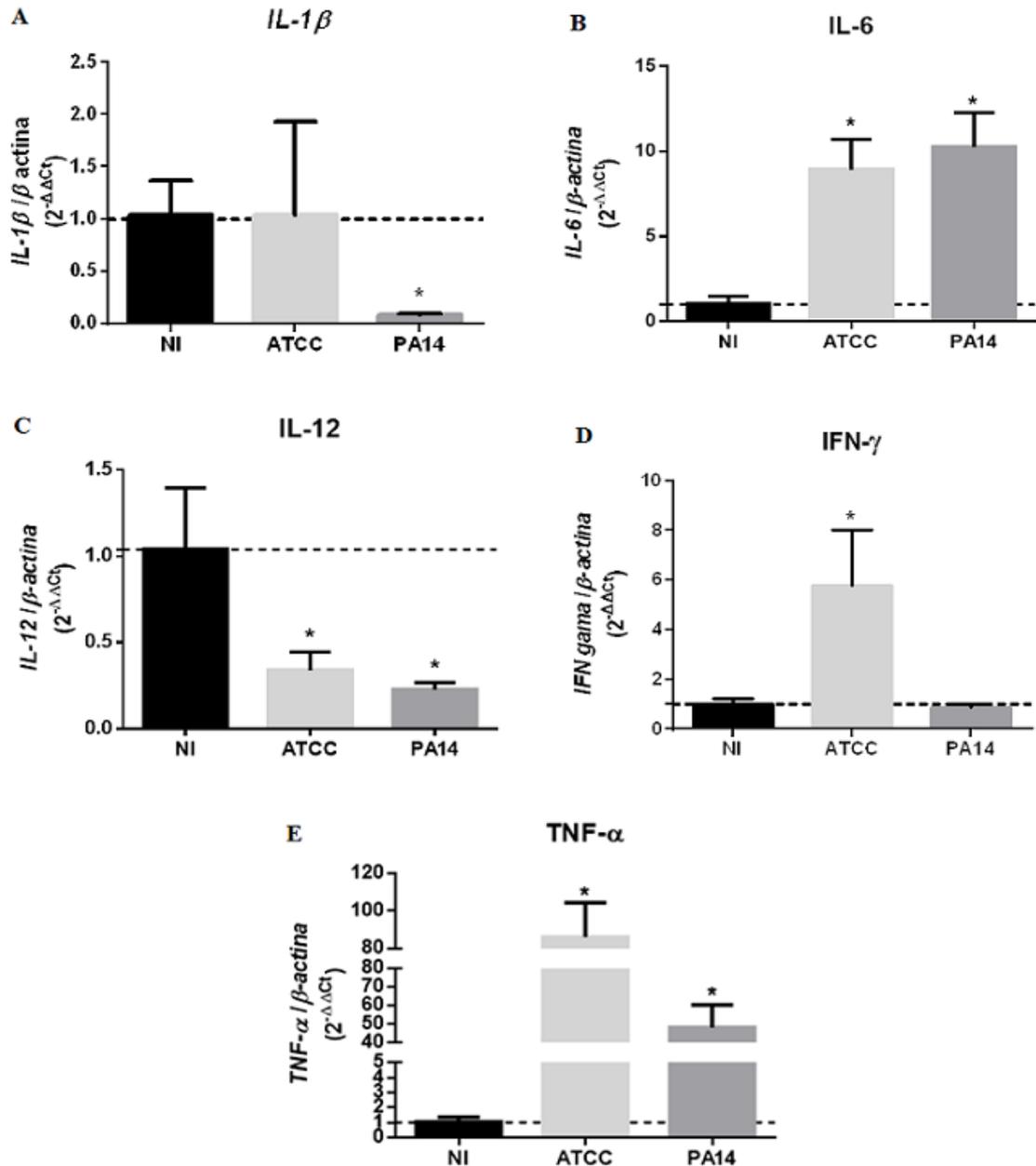


Figura 15 - Expressão diferencial de *IL-1β*, *IL-6*, *IL-12*, *IFNγ* e *TNF-α* em macerado de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^5$  bactérias e 16 horas após a infecção, os animais foram sacrificados e o RNA total do macerado de pulmão foi extraído, transformado em cDNA e a expressão de *IL-1β*, *IL-6*, *IL-12*, *IFNγ* e *TNF-α* foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

### 6.2.3 Avaliação da expressão diferencial de miRNAs no baço

Além da expressão dos microRNAs *mmu-miR-155-5p* e *mmu-miR-146b-5p* e de citocinas no macerado de pulmão, como a cepa virulenta da *P. aeruginosa* foi capaz de alcançar o baço dos animais, (Figura 13), verificou-se a expressão dos mesmos miRNAs no baço dos animais de cada grupo experimental. Dessa forma, não foi observado diferença significativa de expressão de *mmu-miR-155-5p* nos animais infectados por ambas as cepas de *P. aeruginosa* quando comparados com o grupo NI ( $p > 0,05$ ), (Figura 16A). Na análise da expressão diferencial do *mmu-miR-146b-5p*, observa-se significativamente uma diminuição da expressão desse miRNA apenas nos animais infectados com a cepa ATCC 27853 comparados com a expressão de miR-146 no grupo NI ( $p < 0,05$ ). Os animais infectados com a cepa PA14 não apresentaram diferença significativa de expressão ao compararmos com o grupo NI ( $p > 0,05$ ) (Figura 16B).

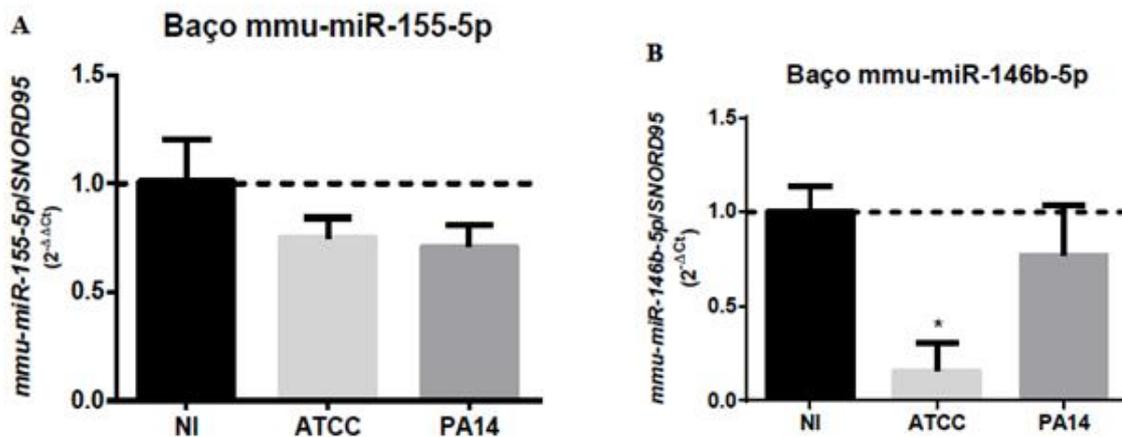


Figura 16 - Expressão diferencial de *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) em macerado de baço de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^5$  bactérias e 16 horas após a infecção, os animais foram sacrificados e o RNA total do macerado de baço foi extraído, transformado em cDNA e a expressão do *mmu-miR-155-5p* (A) e *mmu-miR-146b-5p* (B) foi acessado por PCR em tempo real. O resultado é representativo de três repetições da experimentação em triplicatas. (\*) $p < 0,05$  em relação ao não infectado (NI).

### 6.2.4 Análise histopatológica do tecido pulmonar

Na análise histopatológica qualitativa do pulmão, os animais controle não infectados apresentaram morfologia pulmonar normal. Foram observadas vias aéreas e alvéolos desobstruídos, septos alveolares delgados e baixa celularidade tecidual (Figura 17A). Os

animais infectados pela cepa ATCC de *P. aeruginosa* apresentaram infiltrado inflamatório evidente, espessamento de septos alveolares e colapso alveolar, (Figura 17B.1), também foi observado exudato fibrinoso focal e acúmulo de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no espaço alveolar (Figura 17B.2). Já os animais infectados pela cepa PA14 de *P. aeruginosa* apresentaram intenso processo inflamatório difuso formado por células MN e PMN, espessamento de septo alveolar, colapso alveolar maciço (C1), obstrução bronquiolar inflamatória (C2), congestão vascular (C3), infiltrado inflamatório alveolar (C4) e exudato fibrinoso e sero-hemorrágico (C5).

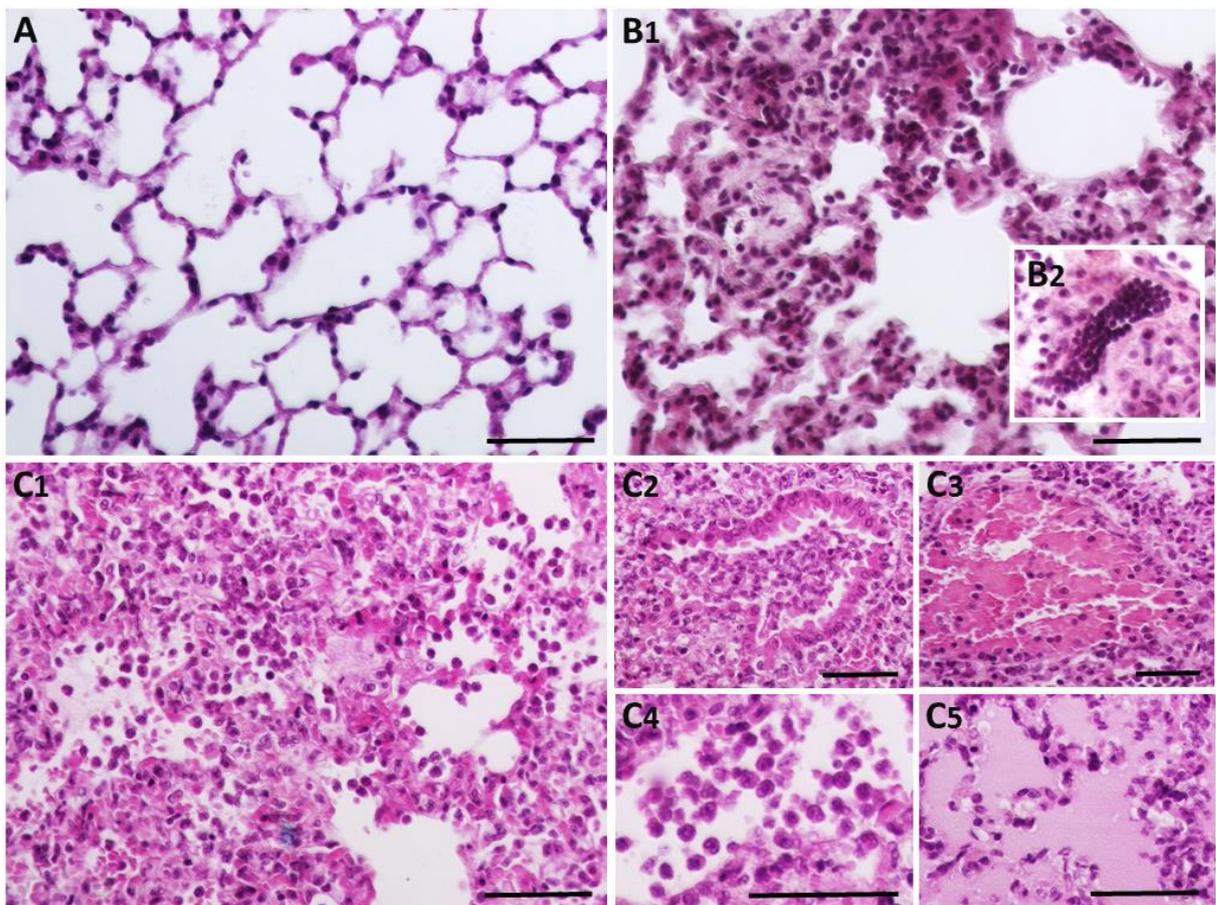


Figura 17 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos infectados com diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: (A) Controle não infectado: organização histológica normal com alvéolos bem definidos, septo alveolar delgado e baixa celularidade. (B1) Infectado com a cepa ATCC: infiltrado inflamatório difuso, espessamento de septo e alvéolos colapsados. Foco inflamatório de linfocitário (B2). (C1) Infectado com a cepa PA14: Infiltrado inflamatório difuso, septos espessados, colapso alveolar, obstrução bronquiolar (C2), congestão vascular (C3), infiltrado inflamarório alveolar (C4) e exudato seroso (C5). (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina) Barras (50  $\mu$ m).

### 6.2.5 Parâmetros estereológicos do pulmão

Os resultados da análise estereológica do tecido pulmonar encontram-se apresentados nas figuras 18. A densidade de superfície ( $S_v$  alvéolos [ $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ]) de alvéolos diminuiu significativamente nos animais infectados com as cepas ATCC e PA14 quando comparados ao grupo controle não infectado ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas da densidade de superfície quando comparados os grupos de animais infectados com a cepa ATCC e animais infectados com a cepa PA14 (Figura 18A).

A densidade do número de células inflamatórias ( $Q_{A_{inf}}$  [células/ $\text{mm}^2$ ]) no tecido pulmonar encontra-se na figura 18B. Animais infectados com a cepa ATCC apresentaram número significativamente maior de células inflamatórias no pulmão em comparação com o grupo não infectado. Os animais do grupo infectados com a cepa PA14 apresentaram número significativamente maior de células inflamatórias no pulmão quando comparado com os grupos não infectados e infectados pela cepa avirulenta ATCC.

Com relação aos componentes alveolares ( $\text{mm}^2$ ), observa-se na figura 18C que o número de alvéolos ( $Q_A$  [alvéolos/ $\text{mm}^2$ ]) diminuiu significativamente nos animais infectados com a cepa ATCC em comparação com o grupo não infectado, além disso, verifica-se um número significativamente menor de alvéolos nos animais infectados com a cepa PA14 quando comparados com os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Enquanto o número de alvéolos diminuiu nos animais infectados com as cepas de *P. aeruginosa*, principalmente nos animais infectados com a cepa PA14, observa-se um aumento significativo da densidade de septos nos animais infectados com a cepa ATCC em comparação com o grupo controle. Da mesma forma, verifica-se um crescimento significativo da densidade de septos nos animais infectados com a cepa PA14 em comparação com os grupos não infectados e infectados com a cepa ATCC, (Figura 18C).

O resultado da análise de volume da estrela está representado na figura 18D. Os animais infectados com a cepa ATCC apresentaram diminuição significativa do volume da estrela quando comparados com o grupo não infectado. Da mesma forma, verifica-se um número significativamente menor do volume da estrela nos animais infectados com a cepa PA14 quando comparados com os grupos de animais não infectados e infectados com a cepa ATCC ( $p < 0,05$ ).

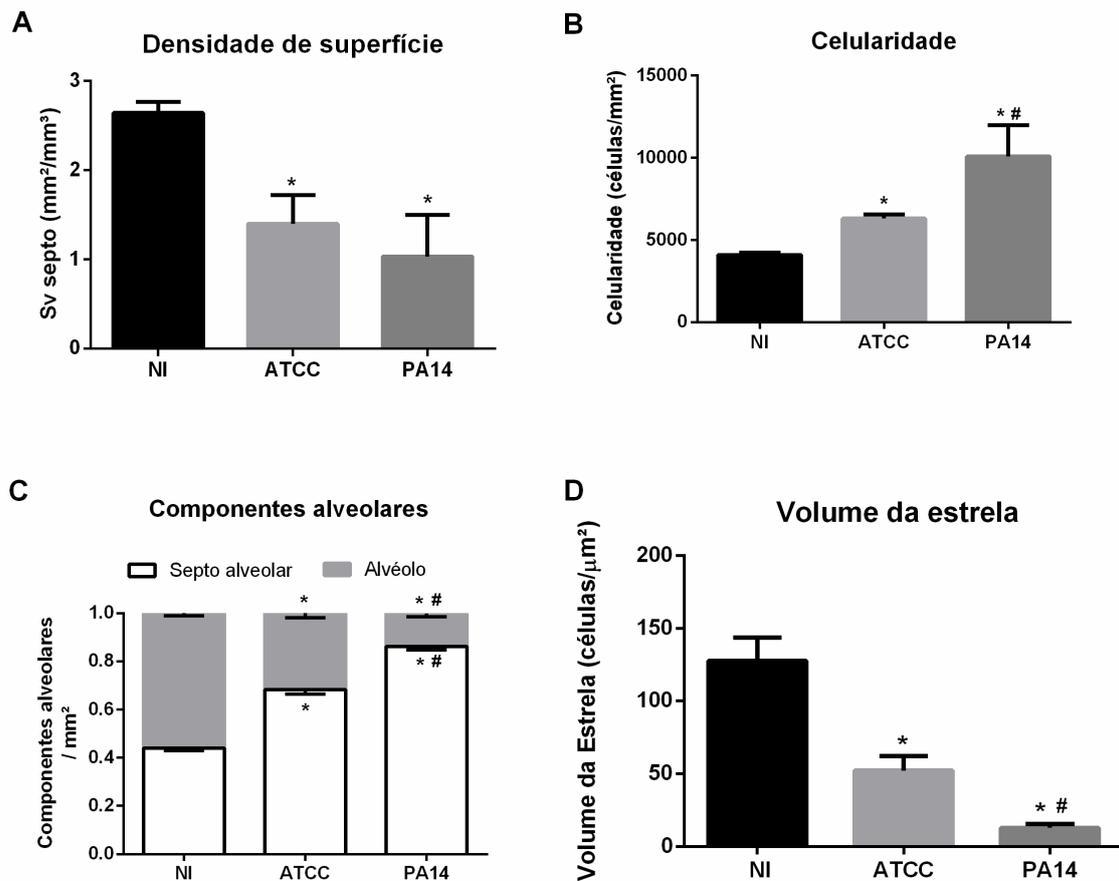


Figura 18 - Parâmetros estereológicos do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados pelas cepas ATCC ou PA14 da *P. aeruginosa*.

Fonte: Do autor

Nota: (A) Densidade de superfície (Sv septo (mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>)). (B) Celularidade (células/mm<sup>3</sup>). (C) Componentes alveolares (mm<sup>3</sup>). (D) Volume de estrela (células/μm<sup>2</sup>). (\*)p<0,05 em relação ao não infectado (NI). (#)p<0,05 em relação a ATCC.

### 6.2.6 Análise histopatológica do tecido hepático

Nas análises histopatológicas do tecido hepático, observou-se estrutura histológica normal em todos os grupos investigados. Foram observados hepatócitos com citoplasma homogêneo, levemente granuloso e núcleo celular com morfologia regular. Os hepatócitos apresentaram distribuição em cordões circundados por capilares sinusóides bem definidos. Os animais infectados, especialmente aqueles infectados com a cepa PA14, apresentaram aumento da celularidade tecidual e focos de congestão de capilares sinusóides (Figura 19).

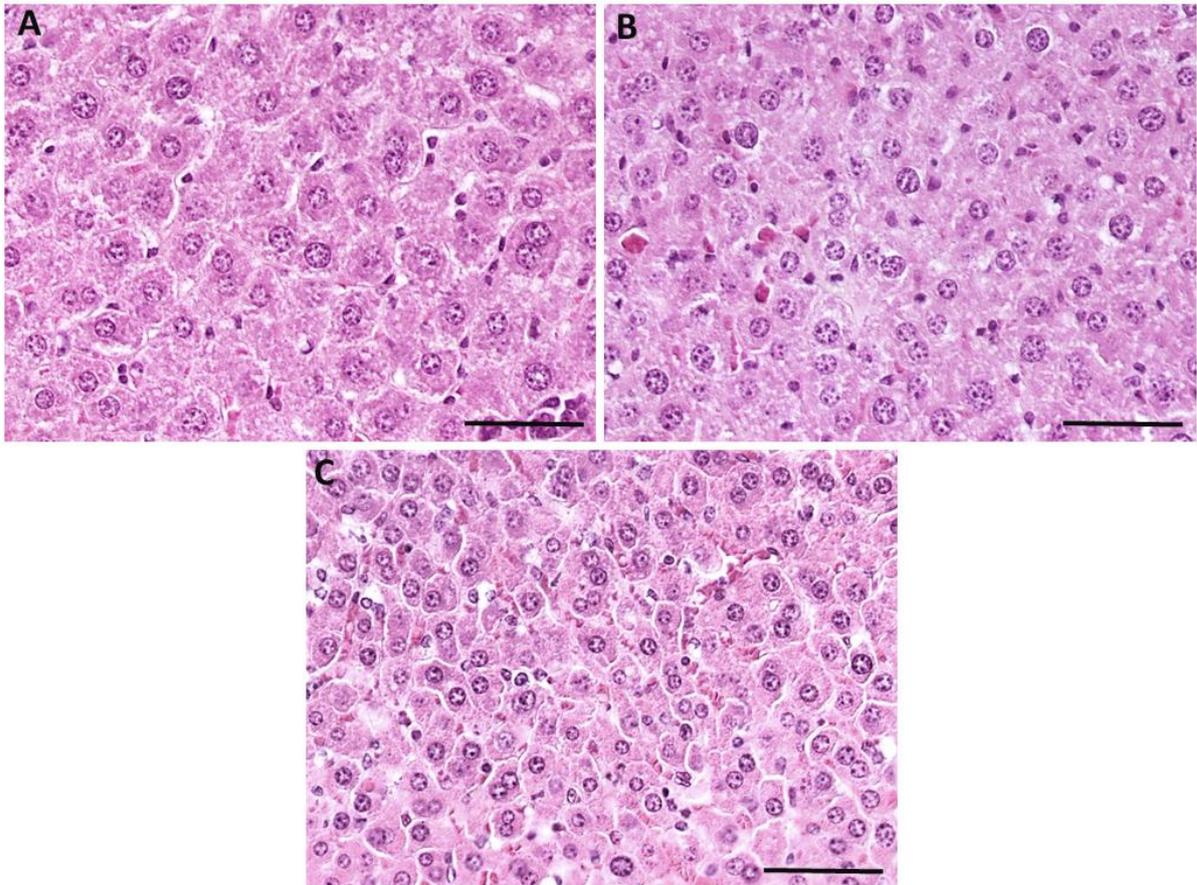


Figura 19 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos infectados com diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

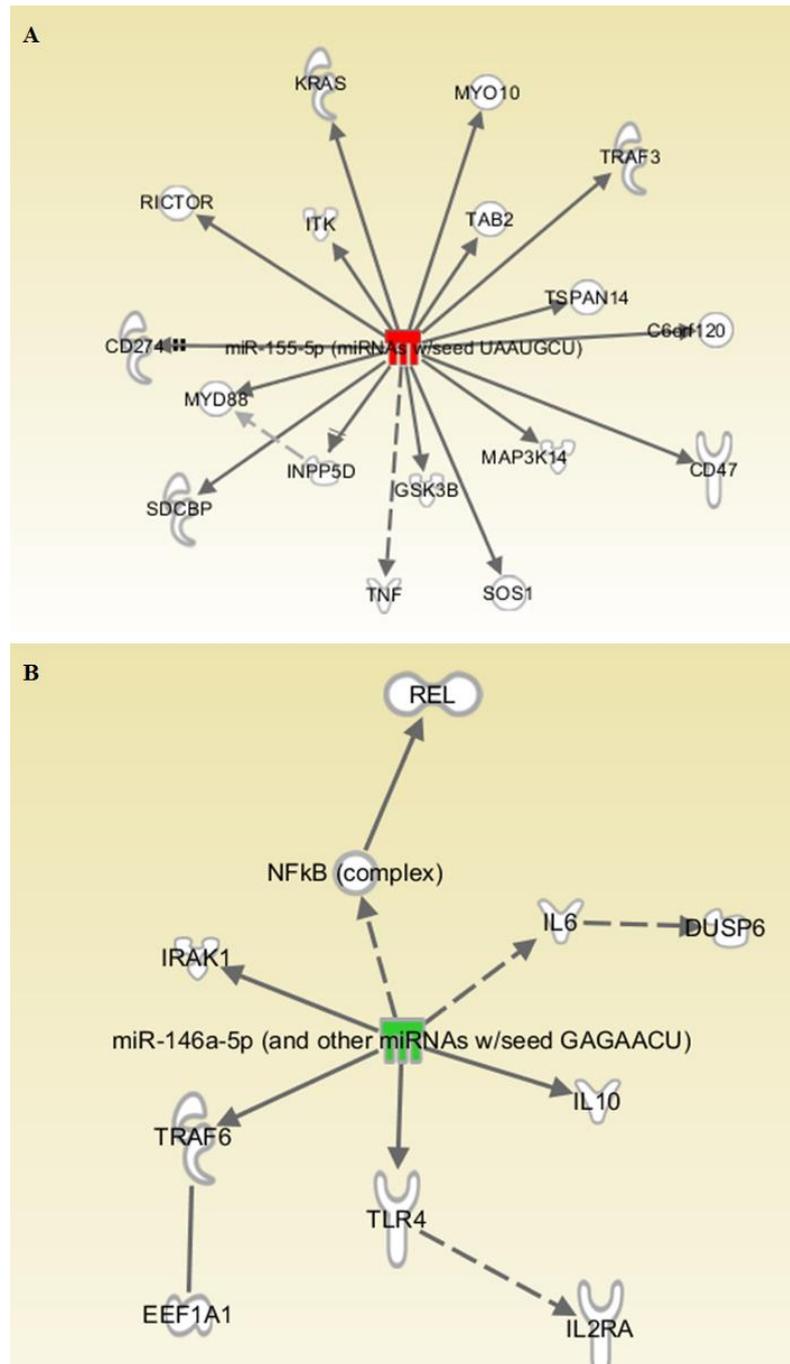
Fonte: Do autor

Nota: (A) Controle não infectado: organização histológica normal. (B) Infectado com a cepa ATCC: organização histológica normal. (C) Infectado com a cepa PA14: organização histológica normal aumento da celularidade tecidual e focos de congestão de capilares sinusóides. (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina) Barras (50  $\mu$ m)

### 6.3 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE PUTATIVOS ALVOS DOS miRNAs SELECIONADOS

Para identificar moléculas potencialmente envolvidas na correlação existente entre determinados miRNAs e a resposta imunológica frente a *P. aeruginosa*, foi feita uma análise *in silico*. Os miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p, alvos deste trabalho, foram selecionados para a construção de redes com relações diretas ou indiretas, com forte predição para algumas moléculas (Figura 20 A e B). Foi feita uma análise com o software *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA®), e em detrimento do grande número de moléculas e vias geradas pelo software, foi usado na análise do IPA® apenas algumas das moléculas obtidas anteriormente através do programa UNIPROT após criteriosa seleção dos putativos alvos de interesse para este trabalho.

Na figura 20 observa-se as vias de interação dos microRNAs, onde as linhas em preto indicam relações diretas entre o mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p e seus putativos alvos e as linhas pontilhadas indicam relações indiretas entre o mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p e seus putativos alvos relacionados com o seu possível papel na resposta imune (Figura 20 A e B).



**Figura 20.** Vias construídas a partir da interação do mmu-miR-155-5p e do mmu-miR-146a-5p com alguns de seus putativos alvos.

Fonte: Do autor

Nota: As linhas em preto indicam a interação direta entre os genes enquanto as linhas pontilhadas inferem uma relação indireta. Figura produzida no software *Ingenuity® Pathway Analysis*

Com relação ao papel na resposta imune, utilizando o software IPA<sup>®</sup> e dados obtidos previamente pelo UNIPROT, observamos 17 putativos alvos do mmu-miR-155-5p, sendo que os genes TRAF3, C6orf120, CD47, MAP3K14, SOS1, GSK3B, SHIP1(INPP5D), SDCBP, MYD88, CD274, RICTOR, ITK, KRAS, MYO10, TAB2 e TSPAN14 apresentam um relação direta com o miR-155 e o gene TNF apresenta uma relação indireta com o miR-155 (Figura 20 A). Na figura 20 B, observamos os alvos IL-10, TLR4, TRAF6 e IRAK1 com relações diretas com o mmu-miR-146b-5p, enquanto os alvos REL1, complexo NFkB, IL-6, DUSP6, IL2RA, EEF1A1 apresentaram uma relação indireta com o mmu-miR-146b-5p.

## 7 DISCUSSÃO

Alguns miRNAs, incluindo o miR-155 e miR-146 são muitas vezes modulados durante a infecção bacteriana e contribuem para as respostas imunes afim de eliminar a bactéria e ao mesmo tempo, preservando o organismo contra a inflamação excessiva (STAEDDEL; DARFEUILLE, 2013). Ao longo deste trabalho, foi possível verificar uma provável modulação da expressão destes miRNAs de forma diferente pelas cepas ATCC 27853 e PA14 da *P. aeruginosa* em diferentes tipos celulares (Figuras 7, 9 e 11).

Na infecção de células Raw 264.7 ocorreu uma diminuição da expressão do *mmu-miR-155-5p* nas células infectadas com as cepas ATCC e PA14 e uma diminuição da expressão do *mmu-miR-146-5p* nas células infectadas com a cepa PA14 quando comparamos com as células não infectadas (Figuras 7A e 7B).

Durante a infecção, as bactérias são capazes de interferir com muitos processos celulares do hospedeiro utilizando moléculas efetoras e fatores de virulência. Em particular, através da modulação da expressão de miRNAs, bactérias como a *P. aeruginosa* podem manipular a fisiologia e defesas da célula hospedeira, com consequências favoráveis para a sobrevivência do patógeno. Já foi descrito que a bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* reduz a expressão de TNF- $\alpha$ , um potente mediador de resposta inflamatória que auxilia na eliminação bacteriana, através da diminuição da expressão de miR-155, miR-125b e miR-99b em macrófagos. (RAJARAM et al., 2011; SINGH et al., 2013). A queda da expressão do miR-155 em macrófagos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* foi concordante com o resultado da expressão do miR-155 nas células Raw 264.7 que representam uma linhagem macrofágica, infectadas pelas cepas de *P. aeruginosa*.

Estudos anteriores destacam que a redução da expressão de miR-155, por exemplo, causa um aumento da expressão de SHIP-1 (INPP5D), um regulador negativo da via de NF- $\kappa$ B, e subsequente redução de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas pró-inflamatórias (CREMER et al., 2009). O miR-155 regula diretamente SHIP-1, como representado na via de interação do miR-155 com seus putativos alvos (Figura 20 A). Sendo assim, o miR-155 pode atuar como um regulador positivo da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-8 e IL-12 em macrófagos (MASHIMA, 2015).

Neste trabalho, observou-se que a diminuição do miR-155 em células Raw 264.7 infectadas com a cepa ATCC 278853 pode estar relacionada com a diminuição da expressão da citocina pró-inflamatória IL-12 e IL-1 $\beta$  neste mesmo grupo (Figuras 8A e 8B), talvez pelo

aumento da expressão de SHIP-1 que impede a sinalização da via de NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias (CREMER et al., 2009). Nas células Raw 264.7 infectadas com a cepa PA14, que corresponde à cepa virulenta da *P. aeruginosa*, observa-se um aumento efetivo da expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (Figura 8). A IL-12, secretada por macrófagos e células dendríticas ativadas estimula os linfócitos T do perfil T<sub>H</sub>1 a produzirem IFN- $\gamma$ , que conseqüentemente irá ativar macrófagos para destruírem o agente infeccioso, (LAVOIE et al., 2011) enquanto que as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 promovem a diferenciação de células T CD4+ para o subgrupo T<sub>H</sub>17 para combater o microrganismo através de recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos para os locais de infecção (ROMAGNANI, 2008). Schoeniger e colaboradores (2016) demonstraram que o estímulo de células Raw 264.7 por uma cepa de *P. aeruginosa* ou por LPS resultava em ativação de macrófagos mediada por aumento de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6.

Em BMDMs foi demonstrado neste trabalho uma diminuição da expressão do *mmu-miR-155-5p* nos macrófagos infectados com a cepa PA14 da *P. aeruginosa*, (Figura 9A), representando uma possível modulação da resposta imunológica, já que este miRNA induz a produção de citocinas pró-inflamatórias que iriam atuar na eliminação da bactéria. Na análise da expressão diferencial do *mmu-miR-146-5p* em BMDMs, é possível verificar um aumento da expressão deste miRNA nas células infectadas com ambas as cepas de *P. aeruginosa*, (Figura 9B), e mais uma vez, é possível sugerir sobre uma possível modulação da expressão deste miRNA pela *P. aeruginosa* já que este pode atuar regulando negativamente a sinalização dos TLRs, tendo como possíveis alvos as proteínas TRAF6 e IRAK1, que são moléculas adaptadoras essenciais na via de ativação de NF- $\kappa$ B, regulando diretamente estas moléculas, como mostrado na via de interação do miR-146 com seus alvos (Figura 20 B). Este estado insensível a componentes antigênicos, que pode ser fornecido pelo aumento da expressão de miR-146, como por exemplo ao LPS, é necessário para proteger o organismo do choque séptico, preservando-o contra os efeitos deletérios da inflamação (MEHTA; BALTIMORE, 2016). Na análise da expressão de citocinas em BMDMs, observa-se um aumento de IL-6 nas células infectadas com a cepa ATCC. Wang e colaboradores (2014) infectaram BMDMs com a bactéria *Mycobacterium bovis* (BCG) e observaram um aumento de expressão da citocina inflamatória IL-6 em comparação com o grupo não infectado. No presente estudo, os macrófagos que foram infectados com a cepa PA14 apresentaram aumento de expressão de IL-12 (Figura 10 B e C). Fica claro que este aumento da expressão de *IL-12* nos BMDMs infectados com a PA14 onde houve aumento da expressão de miR-146, não foi

tão efetivo quanto o aumento desta mesma citocinas nas células Raw 264.7 onde não houve aumento de expressão do miR-146.

Foi demonstrado que BMDCs infectadas com as cepas ATCC 27853 ou PA14 da *P. aeruginosa* apresentaram um aumento efetivo tanto do miR-155 quanto do miR-146 (Figura 11A e 11B). Vários estudos estão concordantes com o resultado da expressão diferencial destes miRNAs neste trabalho. O miR-155, juntamente com o miR-146, são regulados mais positivamente em diferentes células imunes como por exemplo, células dendríticas, em resposta a vários agentes patogênicos bacterianos, incluindo *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, entre outras (STAEDEL; DARFEUILLE, 2013). O miR-155 e miR-146, foram inicialmente identificados numa linhagem celular monocítica onde foram desafiados com o LPS (TAGANOV et al., 2006). O miR-146 é caracterizado como um miRNA capaz de proteger o organismo contra o choque séptico (DUVAL et al., 2016).

Na análise da expressão de genes codificadores das citocinas em BMDCs, é possível observar um aumento da expressão de *IL-12* em células infectadas com as cepas ATCC 27853 e PA14, e de *IL-1B* nas células infectadas com a cepa avirulenta (Figura 12A e 12C). Em uma avaliação da contribuição das células dendríticas para a defesa pulmonar em modelo murino de sepse foi realizada uma infecção pulmonar secundária por infecção intratraqueal por *P. aeruginosa*, onde os animais que receberam administração intrapulmonar de BMDCs exógenas concomitante com o desafio pela bactéria obtiveram uma resposta inflamatória pulmonar mais adequada através do equilíbrio entre as citocinas IL-12 e IL-10. (PÈNE et al., 2008)

*In vivo*, foi realizada a bacteriologia quantitativa do valor de UFCs recuperadas no pulmão e no baço dos camundongos infectados intratraquealmente com as cepas de *P. aeruginosa* (Figura 13). A maior carga bacteriana foi recuperada no pulmão dos animais infectados com a cepa PA14, 16 horas após a infecção. Este resultado é concordante com os dados encontrados por Song e colaboradores (2003), onde uma cepa mutante, não mucoíde da *P. aeruginosa*, Alg<sup>-</sup> PAOalgD, apresentou a maior carga bacteriana no pulmão de camundongos 24 horas após a infecção, o que pode ter ocorrido devido a uma maior produção de elastase (SONG et al., 2016). Neste trabalho, no pulmão dos animais infectados com a cepa ATCC 27853 não houve recuperação bacteriana, sugerindo que o hospedeiro provavelmente foi capaz de eliminar a bactéria no tempo de 16 horas de infecção, ao passo que esta cepa pode não expressar fatores de virulência que a auxiliaria a se manter no tecido pulmonar do hospedeiro e suplantando o processo inflamatório ocasionado através do reconhecimento de

PAMPs da *P. aeruginosa* ATCC 27853 pelos PRRs, por exemplo, TLR4 e TLR5 (LAVOIE et al., 2011; STAEDL, DARFEUILLE, 2013).

A presença de bactérias no baço reflete a habilidade de invasão da bactéria para se espalhar a partir do ponto inicial de inoculação (SONG et al., 2016), e neste trabalho, notoriamente, a cepa PA14 se mostrou competente para se espalhar pelo hospedeiro após aproximadamente 16 horas de infecção e levar os animais a óbito (dados não mostrados) diferentemente da cepa avirulenta ATCC 27853, (Figura 13).

Nos testes *in vivo*, os resultados da expressão de *mmu-miR-155-5p* ou *mmu-miR-146-5p* ocorreram de uma forma que sugerem uma possível modulação da expressão dos microRNAs pelas cepas de *P. aeruginosa*, principalmente pela cepa PA14. No pulmão dos animais infectados com a PA14 foi possível observar que não houve alteração da expressão do *mmu-miR-155-5p* (Figura 14A). O aumento de expressão de miR-155 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias para estimular ativação de mais células fagocíticas (STAEDL; DARFEUILLE, 2013). Este estudo pode sugerir que na condição de infecção pela cepa PA14, os níveis de *mmu-miR-155-5p*, que não se alteram durante a infecção pela cepa virulenta, um mecanismo de evasão do sistema imune apresentado pela *P. aeruginosa*. É possível que o patógeno module a resposta do hospedeiro produzindo moléculas que interfiram na produção ou induzem a degradação deste microRNA. Nos animais infectados com a cepa avirulenta ATCC 27853, foi observado um aumento da expressão do miR-155, ou seja, neste caso esta cepa não foi capaz de modular a expressão de miR-155, o que possivelmente pode ser relacionado com processo inflamatório e consequente eliminação da bactéria do pulmão destes animais.

Um resultado bastante semelhante ao deste estudo foi reportado, onde os autores observaram que o miR-155 regulava positivamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias em monócitos infectados com a bactéria avirulenta *Francisella novicida*. Dadas as observações de que o miR-155 é fortemente induzido em resposta a infecção por *F. novicida* e que o miR-155 poderia regular negativamente a expressão de SHIP-1, os autores sugeriram a hipótese de que o miR-155 exerceria a sua função pró-inflamatória contra a *F. novicida* por repressão de SHIP-1. Sendo assim, eles demonstraram uma baixa regulação de SHIP-1 em células infectadas com *F. novicida* quando comparadas com o grupo controle. Em contraste, verificou-se que o tipo bacteriano altamente virulento *Francisella tularensis* não ocasionava o aumento de expressão do miR-155 e assim apresentava uma incapacidade para regular SHIP-1, o que poderia ser responsável pela virulência de *F. tularensis*. (CREMER et al., 2009). Dessa forma, novos estudos são necessários para observarmos se a cepa PA14 da *P.*

*aeruginosa* utilizada neste estudo pode evadir do sistema imunológico do hospedeiro da mesma maneira encontrada pela bactéria *F. tularensis*. Outro trabalho demonstrou que em condições de infecção com *C. neoformans* morto por calor houve um aumento da expressão de miR-155. Na condição de infecção com *C. neoformans* vivos, os níveis de miR-155 apresentaram uma redução, sugerindo uma modulação exercida pela levedura na resposta imune (GARCIA,2013).

Os resultado da expressão diferencial do miR-146, foi possível observar um aumento de expressão deste miRNA no pulmão dos animais infectados com ambas as cepas (Figura 14B). Mais uma vez, é possível sugerir que a cepa PA14 pode estar modulando a resposta do hospedeiro através da indução de um miRNA com características anti-inflamatórias, evitando dessa forma a sua eliminação. Um resultado semelhante foi descrito, onde um aumento da expressão do miR 99b em células dendríticas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* inibia a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , e estes resultados confirmaram um novo mecanismo de evasão do sistema imune pelo *Mycobacterium tuberculosis* (CHATTERJEE et al., 2013).

Em uma avaliação da resposta de murinos a modelos de infecção pela *P. aeruginosa*, os animais foram tratados com IFN- $\gamma$  exógeno antes e após o desafio com a bactéria e observou-se que os animais que receberam o IFN- $\gamma$  após a infecção apresentaram uma inflamação pulmonar mais branda em comparação com os animais controle que não receberam a citocina (JOHANSEN et al., 1996). De fato, ao observar o aumento de expressão de IFN- $\gamma$  nos animais infectados com a cepa ATCC (figura 15D), as análises histopatológicas e análises do infiltrado inflamatório pulmonar do mesmo grupo, (figura 17B e 18B) nota-se um processo inflamatório de menor gravidade quando comparado ao grupo infectado com a cepa PA14 onde ocorreu um processo inflamatório difuso (Figura 17 C), com elevado infiltrado inflamatório tecidual (Figura 18 B), ausência de expressão de IFN- $\gamma$  (Figura 14 D) e presença da bactéria nas análises de contagem de UFCs neste órgão (Figura 13). Dessa forma, a produção de IFN-  $\gamma$  é importante na eliminação da infecção.

Em um estudo de Gosselin e colaboradores (1995) foram investigados os mecanismos de resistência de camundongos à infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, para isso, camundongos resistentes à infecção por *P. aeruginosa* foram tratados com anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ , e conseqüentemente, ocorreu um aumento do número de unidades formadoras de colônia nos pulmões dos animais. De um modo geral, este resultado indica que o TNF- $\alpha$  exerce proteção em resposta à infecção por *P. aeruginosa*. No presente estudo, o aumento do nível de expressão de TNF- $\alpha$  produzido no pulmão dos animais infectados com a

cepa ATCC (Figura 15 E), da mesma forma que o aumento de expressão de IFN- $\gamma$ , pode estar contribuindo para um processo inflamatório de menor gravidade em comparação com o grupo infectado com a cepa PA14 (Figura 17 e 18).

O aumento da citocina IL-6 no pulmão dos grupos infectados com as cepas ATCC e PA14 pode estar relacionado com a indução de um perfil de células T<sub>H</sub>17 onde ocorre o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Percebe-se na figura 16 B e C e na figura 17 B, que há um recrutamento de leucócitos no tecido pulmonar, porém não foi possível afirmar a porcentagem de leucócitos polimorfos e mononucleares. Para isto, deve ser feito a realização de testes confirmatórios para cada população celular, como por exemplo, testes de imunofenotipagem.

Nota-se que os níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias no pulmão dos animais infectados com a cepa PA14, onde não houve aumento de expressão de *mmu-miR-155-5p*, no geral se apresentaram mais baixos que no grupo de animais infectados com a cepa ATCC onde ocorreu aumento de expressão deste miRNA. Dessa maneira, podemos inferir que a cepa PA14 é capaz de modular a expressão de miR-155, que compreende um miRNA que desempenha papel crucial na resposta imune e inflamação.

Yu e colaboradores (1996) realizaram análises histopatológicas do tecido pulmonar de camundongos expostos repetidamente a duas cepas diferentes de *P. aeruginosa* e a exposição às cepas promoveram infiltrado inflamatório no tecido pulmonar. Cigana e colaboradores (2016) infectaram intratraquealmente camundongos com *P. aeruginosa*, e foi observado fibrose das vias aéreas, incluindo hiperplasia epitelial e degeneração estrutural. Além disso, a infecção intratraqueal por *P. aeruginosa* foi capaz de levar a um processo inflamatório. Neste estudo, os animais infectados pela cepa PA14 da *P. aeruginosa* apresentaram intenso processo inflamatório difuso formado por células mononucleares e polimorfonucleares além de obstrução bronquiolar, congestão vascular, infiltrado inflamatório alveolar e exsudato seroso, além de estreitamento do espaço alveolar. Todos os animais infectados apresentaram alterações patológicas na estrutura pulmonar, porém de maior comprometimento nos animais infectados com a cepa PA14, alterações estas evidenciadas pela drástica redução de densidade de superfície, do volume da estrela e do número de alvéolos, além de maior porcentagem de septos em sua composição pulmonar, motivo pelo qual, provavelmente estes animais apresentaram altas contagens de bactérias nos seus pulmões e vieram a óbito em aproximadamente 16 horas de infecção. No grupo infectado pela cepa ATCC 27853, foi possível observar um processo inflamatório com focos inflamatórios leucocitários. Entretanto, a inflamação e o aumento do número de septos, indicativos de espessamento septal no pulmão

dos animais infectados com a cepa ATCC 27853 não é tão evidente e excessivo quanto o que ocorreu nos animais infectados com a cepa PA14, (Figura 17 e 18). Além disso, nos animais infectados pela ATCC 27853, foi possível observar um aumento de expressão do miR-155 diferentemente dos animais infectados com a cepa virulenta. O aumento de miR-155 já foi descrito por induzir um processo inflamatório, e o miR-146 já foi descrito como um microRNA que regula o processo inflamatório. Analisando os resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir que, como há um aumento de miR-155 e miR-146 no pulmão dos animais infectados com a cepa ATCC 27853, é possível que estes miRNAs estejam agindo em conjunto para controlar a resposta inflamatória. A patologia pulmonar mais grave ocorreu no grupo infectado pela cepa PA14 e há a possibilidade da infecção pulmonar pela cepa virulenta da *P. aeruginosa* modular a expressão de *mmu-miR-155-5p*.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento permite sugerir que a infecção por *P. aeruginosa* exerce uma modulação na expressão de miRNAs e conseqüentemente na resposta imune contra esta bactéria e que a virulência de diferentes cepas de *P. aeruginosa* influenciam na expressão dos miRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p, de citocinas pró-inflamatórias e na patologia causada. Os resultados sugerem uma forte modulação do mmu-miR-155-5p pela cepa PA14, sendo necessários mais estudos para compreender a relação entre a expressão diferencial destes miRNAs durante a infecção por *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A .H.; PILAI,S. **Imunologia Celular e Molecular**.8 ed.USA: Saunders, 2015.536p.
- AHMED, C. M. I.; LARKIN, J.; JOHNSON, H. M. SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. April, 2015.
- ALMEIDA, M.G.C.; et al., Perfil de sensibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar e ambulatorial oriundas de laboratórios público e privado , em Belém , estado do Pará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 44, n. 1, 2012.
- ALMEIDA, L. A. **O papel do interferon do tipo I e sua sinalização na resposta imune inata contra a infecção por *Brucella abortus***. 2010. 125f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horixonte, 2010.
- AMANO, H.; MORIMOTO, K.; SENBA, M.; et al. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 1, p. 398–409, 2004.
- BARTEL, D .P; MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell** vol. 116, 281–297, 2004.
- BAPTISTA, M. G. F. M, **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013
- BENTZMANN, S. DE; PLÉSIAT, P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1655–1665, 2011.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biology**, v. 3, n. 3, p. 0404–0418, 2005.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 23, p. 175–205, 2007.

BAYES, H. K.; BICKNELL, S.; MACGREGOR, G.; EVANS, T. J. T helper cell subsets specific for *Pseudomonas aeruginosa* in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

CALDAS, R.R; et al., *Pseudomonas aeruginosa* and Periodontal Pathogens in the Oral Cavity and Lungs of Cystic Fibrosis Patients: a Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1898–1907, 2015.

CARRIGAN, S. O.; YANG, Y. J.; ISSEKUTZ, T.; et al. Depletion of natural CD4+CD25+ T regulatory cells with anti-CD25 antibody does not change the course of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection in mice. **Immunobiology**, v. 214, n. 3, p. 211–222, 2009.

CARTER, M. Q.; CHEN, J.; LORY, S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3249–3258, 2010.

CASTELO, A.A.M.C; et al., Resposta imune a doenças infecciosas. **Revista Medicina Ribeirão Preto** v. 42, n. 2, p. 127–142, 2009.

CHASTRE, J.; FAGON, J. State of the Art Ventilator-associated Pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 23, p. 867–903, 2002.

CIGANA, C.; LORÈ, N. I.; RIVA, C.; et al. Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections. Scientific reports,. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 02, p. 21465, 2016

CIANCIARULLO, Marco Antonio et al . Mediadores pró-inflamatórios e antinflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.**, São Paulo , v. 18, n. 2, p. 135-147, ago. 2008 .

CREMER, T. J.; RAVNEBERG, D. H.; CLAY, C. D.; et al. MiR-155 Induction by *F. novicida* but Not the Virulent *F. tularensis* Results in SHIP Down-Regulation and Enhanced Pro-Inflammatory Cytokine Response. **Plos one**, v. 4, n. 12, 2009.

CRUZ-ORIVE, L., KARLSSON, L., LARSEN, S., WAINSCHEIN, F., Characterizing anisotropy: a new concept. **Micron Microsc. Acta** **23**, 75-76, 1992

DALPKE, A. H.; ECKERLE, S.; FREY, M.; HEEG, K. Triggering of toll-like receptors modulates IFN signalling: Involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and

suppressors of cytokine signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 7, p. 1776–1787, 2003.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J.-P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 117–128, 2010.

DOGGET, R.G. **Microbiology of Pseudomonas aeruginosa. In Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy.** Dogget R. G. editor, New York: Academic Press. p. 1-7, 1979

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M.; et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of  $\beta$ -lactam resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2072–2078, 2001.

DUVAL, M.; COSSART, P.; LEBRETON, A. Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2016.

EULALIO, A.; SCHULTE, L.; VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 742–750, 2012.

FABBRI, E.; BORGATTI, M.; MONTAGNER, G.; et al. Expression of microRNA-93 and interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 6, p. 1144–1155, 2014.

FERREIRA, L.L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*.** 2005.99f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FIEDLER, S.D, CARLETTI, M.Z, CHRISTENSON, L.K. Quantitative RT-PCR methods for mature microRNA expression analysis. **Methods Mol. Biol.** v p.49-64, 2010

FIGUEIREDO, E.A.P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE, **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.4, p. 421-427, 2007.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, 2012. Elsevier Inc.

GARCIA A.W.A. **Análises de miRNAs diferencialmente expressos em macrófagos infectados com *Cryptococcus neoformans***. 2013. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

GOVAN, J. R.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 3, p. 539–574, 1996.

GRISHIN, A.V; et al., *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. **Acta Naturae**, v. 7, n. 25, p. 29–41, 2015.

GRUNDMANN, H.; SCHNEIDER, C.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F. D.; PITT, T. L. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 528–534, 1995.

HA, T.-Y. The Role of MicroRNAs in Regulatory T Cells and in the Immune Response. **Immune network**, v. 11, n. 1, p. 11–41, 2011.

HAJ KHALIFA, A. BEN; MOISSENET, D.; VU THIEN, H.; KHEDHER, M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Annales de biologie clinique**, v. 69, n. 4, p. 393–403, 2011.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes and Development**, v. 18, n. 24, p. 3016–3027, 2004.

HARTL, D.; GRIESE, M.; KAPPLER, M.; et al. Pulmonary TH2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 204–211, 2006.

HAUSER, A. R.; JAIN, M.; BAR-MEIR, M.; MCCOLLEY, S. A. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 29–70, 2011.

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, 2014.

HIRCHE, T. O.; BENABID, R.; DESLEE, G.; et al. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 7, p. 4945–4954, 2008.

HOWARD, M.; GARRA, A. O.; HOWARD, M. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v. 10, n. 6, p. 198–200, 1992.

HUANG et al., MicroRNA-155 enhances ocular inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. **The Journal of Immunology**, 2011.

HUNTER, J. D. Ventilator associated pneumonia. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 965, p. 172–178, 2006.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, 2011.

JACOMÉ, P. R.L.A, et al., Major Article Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife , State of Pernambuco, Brazil.,**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707–712, 2012.

JAWETZ, MELNICK, ADALBERG'S. **Medical Microbiology**. 27 ed. McGraw-Hill Education, 2016.867p.

JOHANSEN, H. K.; HOUGEN, H. P.; RYGAARD, J.; HOIBY, N. Interferon-gamma (IFN- g ) Treatment Decreases the Inflammatory Response in Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Rats. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 103, n. 2, p. 212–218, 1996.

KELLY, B. G.; VESPERMANN, A.; BOLTON, D. J. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 951–968, 2009.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78–91, 2006.

KOH, A. Y.; PRIEBE, G. P.; RAY, C.; ROOIJEN, N. VAN; PIER, G. B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5300–5310, 2009.

LAU, G. W.; HASSETT, D. J.; RAN, H.; KONG, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, 2004.

LAU, G. W.; RAN, H.; KONG, F.; HASSETT, D. J.; MAVRODI, D. *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4275–4278, 2004.

LAVOIE, E. G.; WANGDI, T.; KAZMIERCZAK, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 14-15, p. 1133–1145, 2011

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LEID, J. G.; WILLSON, C. J.; SHIRTLIFF, M. E.; et al. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 11, p. 7512–7518, 2005.

LIMA, B.C. **Participação dos receptores do tipo Nod na ativação da iNOS em macrófagos estimulados com flagelina**. 2009. 67f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LIN, KAZMIERCZAK. Inflammation: A double-edged sword in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Innate Immunity**, 2017.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms, **Clinical Microbiology Reviews** v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009.

LIU, J.; FENG, Y.; YANG, K.; et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 179–188, 2011.

LODISH, H. F.; ZHOU, B.; LIU, G.; CHEN, C.-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 2, p. 120–130, 2008.

LOUIE, A. et al., Pharmacodynamics of Levofloxacin in Murine Pneumonia Model of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Determination of Epithelial Lining Fluid Targets. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n.8, p. 3325-3330, 2009.

LUND, E.; GÜTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5654, p. 95–98, 2004.

LUTZ, J. K.; LEE, J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 2, p. 554–564, 2011

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.

MACHADO, P. R. L.; et al., Immune response mechanisms to infections **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; TAN, M.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa* – *Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. **Cell**, v. 96, p. 47–56, 1999.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 981–988, 2000.

MARÇOLA, M. **Perfil circadiano da expressão de microRNAs em células progenitoras CD133<sup>+</sup>**. 2014. 58f. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MASHIMA, R. Physiological roles of miR-155. **Immunology**, v. 19, n. 2, p. 69–75, 2015.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 289–314, 2002.

MEHTA, A.; BALTIMORE, D. MicroRNAs as regulatory elements. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 5, p. 279–294, 2016.

MELO, K. M.; TAVARES, B.; CARVALHO, C. Células T regulatórias : mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, p. 184–188, 2009.

MENEZES, E.A., et al., Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram Negativos Não Fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 4, p. 209–212, 2004.

MIJARES, L.A.; et al., Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an interleukin-1 dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

MOSCHOS, S. A.; WILLIAMS, A. E.; PERRY, M. M.; et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. **BMC genomics**, v. 8, p. 240, 2007.

MOSER, C.; JENSEN, P. Ø.; PRESSLER, T.; et al. Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Apms**, v. 113, n. 6, p. 400–409, 2005.

MOSER, C.; JENSEN, P. O.; KOBAYASHI, O.; et al. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127, n. 2, p. 206–213, 2002.

MUN, J.; TAM, C.; CHAN, G.; et al. MicroRNA-762 Is Upregulated in Human Corneal Epithelial Cells in Response to Tear Fluid and *Pseudomonas aeruginosa* Antigens and Negatively Regulates the Expression of Host Defense Genes Encoding RNase7 and ST2. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2013.

MURPHY, K; TRAVERS, P; WALPORT M; **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Artmed, 2010. 885 p.

MURRAY, P.R.; et al., Manual of clinical microbiology 8th edition. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 4, p. 625–626, 2003.

NAVARRO A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. **Science**. v.312 p.436-439, 2006 .

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

OLIVEIRA, A L.; SOUZA, M. DE; CARVALHO-DIAS, V. M. H.; et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Bone marrow transplantation**, v. 39, n. 12, p. 775–781, 2007.

O'TOOLE, G. A; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA, A. C.; MELO, H. A. DE; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflamassoma e sua repercussão clínica : revisão da literatura. , v. 18, n. Figura 1, p. 96–102, 2012.

PAULEY, K. M.; CHAN, E. K. L. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, p. 226–239, 2008.

PÈNE, F.; ZUBER, B.; COURTINE, E.; et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. **Journal of immunology**, v. 181, n. 12, p. 8513–20, 2008.

PEREIRA, C,T. **Introdução ao mundo dos microRNAs**. 1 ed. SBG, 2015. 342p.

PITT, T. L.; SIMPSON, A. J. H. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: GILLESPIE, S. (Ed); HAWKEY, P. M. (Ed). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. England: **John Wiley & Sons**, Ltd, 2006. cap. 36, p. 427-443.

PRITCHETT, C. L.; LITTLE, A. S.; OKKOTSU, Y.; et al. Expression Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR Two-Component Regulatory System. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 4, p. 736–748, 2015.

RAJARAM, M. V. S.; NI, B.; MORRIS, J. D.; et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 42, p. 17408–13, 2011

RAOUST, E.; BALLOY, V.; GARCIA-VERDUGO, I.; et al. Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

REGINA, P.; ARAÚJO, L. DE; ALVES, L. R.; et al. Major Article Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Recife , State of Pernambuco , Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 45, n. 6, p. 707–712, 2012.

RELLO J MARCH F, JUBERT P, SANCHEZ F, VALLES J, COLL P, M. D. Recurrent Pseudomonas aeruginosa pneumonia in ventilated patients: relapse o reinfection? **Ajrccm**, v. 157, p. 912–916, 1998.

RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.; et al. Identification the Cystic Fibrosis Gene : Cloning and Characterization of Complementary DNA. **Science**, v. 245, p. 1066–73, 1989.

ROMAGNANI, S. Human Th17 cells. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 2, p. 206, 2008.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

RUGGIERO, T.; TRABUCCHI, M.; SANTA, F. DE; et al. LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 9, p. 2898–2908, 2009.

SCHOENIGER, A.; FUHRMANN, H.; SCHUMANN, J. LPS- or Pseudomonas aeruginosa - mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. **PeerJ**, v. 4, p. e1663, 2016.

SINGH, Y.; et al., Mycobacterium tuberculosis Controls MicroRNA-99b ( miR-99b ) Expression in Infected Murine Dendritic Cells to Modulate Host Immunity. **Journal of Biological Chemistry** , v. 288, n. 7, p. 5056–5061, 2013.

SIMÕES, M.C.M. **Identificação e caracterização de microRNAs de Schistosoma mansoni**. 2009.140f. Tese de Doutorado - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SIQUEIRA, V.L.D; et al., High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp . isolated in a public hospital in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 49–56, 2013.

SKERRETT, S. J.; LIGGITT, H. D.; HAJJAR, A. M.; WILSON, C. B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 6, p. 3377–3381, 2004.

SKERRETT, S.J; et al.; Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. **J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 98104, p. 312–322, 2007.

SONG, Z.; WU, H.; CIOFU, O.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. **Journal of Medical Microbiology** , v.52, n. 2003, p. 731–740, 2016.  
STAEDEL, C.; DARFEUILLE, F. MicroRNAs and bacterial infection. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1496–1507, 2013.

STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D. DA; LEITE, D. D. S. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 86–88, 2008.

STOVER, C.; PHAM, X.; ERWIN, A; MIZOGUCHI, S. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. August, p. 959–964, 2000.

SUN, L.; GUO, R. F.; NEWSTEAD, M. W.; et al. Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 76–84, 2009.

TAGANOV, K. D.; BOLDIN, M. P.; CHANG, K.-J.; BALTIMORE, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12481–12486, 2006.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–721, 2005.

TORRES, J. C. N.; MENEZES, E. A.; ÂNGELO, M. R. F.; et al. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 313–319, 2006.

WANG, J.; WU, M.; WEN, J.; et al. MicroRNA-155 induction by *Mycobacterium bovis* BCG enhances ROS production through targeting SHIP1. **Molecular Immunology**, v. 62, n. 1, p. 29–36, 2014. Elsevier Ltd.

WÖLBELING, F.; MUNDER, A.; KERBER-MOMOT, T.; et al. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. **Immunobiology**, v. 216, n. 8, p. 901–908, 2011.

WOLFGANG, M. C.; JYOT, J.; GOODMAN, A. L.; RAMPHAL, R.; LORY, S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6664–6668, 2004.

WOLFGANG, M. C.; KULASEKARA, B. R.; LIANG, X.; et al., Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8484–8489, 2003.

WONNENBERG, B.; JUNGNIKKEL, C.; HONECKER, A.; et al. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. **Innate immunity**, 2016.

ZEMANIK E.T.; et al., Measuring and Improving Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis Lung Disease: Opportunities and Challenges to Therapy. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2011.

ZHANG, B; et al., MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Animals and Plants. **Journal of Cellular Physiology**, v. 210, p. 279-289, 2007.

ZHOU, X.; LI, X.; YE, Y.; et al., MicroRNA-302b augments host defense to bacteria by regulating inflammatory responses via feedback to TLR/IRAK4 circuits. **Nature communications**, v. 5, p. 3619, 2014.

ZIMMERER, J.M; et al; IFN--Induced Signal Transduction, Gene Expression, and Antitumor Activity of Immune Effector Cells Are Negatively Regulated by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. **The Journal of Immunology**. v 178. n8. p. 4832-4845, 2007.