



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Alexandre Costa Monteiro

**Modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC por ExoU de
*Pseudomonas aeruginosa***

Rio de Janeiro

2020

Alexandre Costa Monteiro

**Modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC por ExoU
de *Pseudomonas aeruginosa***

Tese, apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M921 Monteiro, Alexandre Costa.
Modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC por ExoU de
Pseudomonas aeruginosa / Alexandre Costa Monteiro – 2020.
92.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 2. Infecções por *Pseudomonas*
- Microbiologia - Teses. 3. Mucinas. 4. Mucina-1. 5. Mucina-5AC. I. Saliba,
Alessandra Mattos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alexandre Costa Monteiro

**Modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC por ExoU
de *Pseudomonas aeruginosa***

Tese, apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Lucimar Gonçalves Milagres
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Dra. Flávia Marcia de Castro e Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
Universidade Federal de Minas Gerais

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

À Débora, pelo apoio, companheirismo e encorajamento;

Aos meus pais, sogros, irmãos e cunhados, pelo apoio e incentivo;

À Dra. Alessandra Mattos Saliba, pelo acolhimento e orientação;

Às colegas de laboratório Miriam, Sabrina e Pamella, pela amizade e colaboração;

Ao corpo técnico-administrativo do Departamento de Microbiologia e Imunologia, cujo suporte foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, pelo conhecimento compartilhado.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de
compreender mais para temer menos

Marie Curie

RESUMO

MONTEIRO, Alexandre Costa. **Modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC por ExoU de *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. 92f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

ExoU é uma citotoxina que induz uma potente ativação da resposta inflamatória e interfere na sinalização intracelular do hospedeiro, alterando a resposta imune inata. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de ExoU estão associadas ao pior prognóstico da infecção e à maior letalidade. Mucinas são glicoproteínas expressas nas mucosas, onde atuam na proteção contra bactérias patogênicas. MUC1 é uma mucina transmembranar com papel imunomodulador durante a infecção bacteriana enquanto MUC5AC é uma das principais mucinas expressas no muco respiratório, considerado a primeira barreira das vias aéreas contra diversos agentes infecciosos. Neste trabalho, foi pesquisado o papel de ExoU na modulação da expressão de MUC1 e MUC5AC durante a infecção por *P. aeruginosa*, assim como o impacto dessa modulação na resposta hospedeira. Para isso, células epiteliais alveolares de carcinoma humano A549 foram infectadas com a cepa parental PA103 (produtora de ExoU) ou com suas mutantes PA103 Δ exoU (não produtora de ExoU) e PA103/S142A (complementada com ExoU sem atividade fosfolipase A2). Adicionalmente, foi avaliada a expressão de mRNA de Muc1 e Muc5AC nos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com PA103 ou PA103 Δ exoU. Em nossos resultados, ExoU inibiu a expressão de MUC1 nas células epiteliais respiratórias infectadas com PA103. Contudo, as células infectadas com PA103 Δ exoU apresentaram ativação da expressão de MUC1 de forma dependente de JNK. Esses resultados foram corroborados em modelo animal, uma vez que pulmões de camundongos infectados com PA103 apresentaram menores níveis de mRNA de Muc1 em comparação aos infectados com PA103 Δ exoU. Curiosamente, ExoU induziu a translocação nuclear de MUC1, envolvida na regulação da expressão de alvos da resposta antioxidante e inflamatória. O uso do inibidor da sinalização intracelular mediada por MUC1, GO-201, mostrou que MUC1 atenua os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), independentemente de ExoU. Mais importante, GO-201 reduziu a secreção de CXCL8 nas células infectadas com PA103, indicando que a translocação nuclear de MUC1 regula positivamente a secreção de CXCL8. Quanto a MUC5AC, 1h após a infecção, células infectadas com PA103 apresentaram níveis de mRNA significativamente maiores, e níveis proteicos intracelulares significativamente menores, em comparação às células infectadas com as cepas mutantes. Não foi observada diferença significativa na expressão de mRNA de Muc5ac entre camundongos infectados com as cepas produtora e a não produtora de ExoU. Assim, este estudo mostrou que ExoU inibe a expressão e promove a translocação nuclear de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa*. Além disso, a translocação nuclear de MUC1, induzida por ExoU, contribui para a ativação da expressão de CXCL8. Embora ExoU tenha modulado precocemente a expressão de MUC5AC nos ensaios *in vitro*, este resultado não foi corroborado nos ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, Mucinas, MUC1, MUC5AC.

ABSTRACT

MONTEIRO, Alexandre Costa. **Modulation of MUC1 and MUC5AC expression by ExoU of *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. 92f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

ExoU is a cytotoxin that induces a potent activation of the inflammatory response and interferes with the host intracellular signaling pathways, altering the innate immune response. ExoU-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with a worse infection prognosis and higher lethality. Mucins are glycoproteins expressed in mucous membranes, where they provide protection against pathogenic bacteria. MUC1 is a transmembrane mucin with an immunomodulatory role during bacterial infections, whereas MUC5AC is one of the main mucins expressed in the respiratory mucus, considered the first airway barrier against several infectious agents. This work investigated the role of ExoU on the modulation of MUC1 and MUC5AC expression during the infection by *P. aeruginosa* as well as the impact of this modulation on the host response. For this purpose, A549 adenocarcinomic human alveolar epithelial cells were infected with the parental strain PA103 (ExoU-producer), or with its mutants PA103 Δ exoU (ExoU non-producer) and PA103/S142A (complemented with ExoU without phospholipase A2 activity). Additionally, the mRNA expression of Muc1 and Muc5AC was evaluated in the lungs of C57BL/6 mice infected with PA103 or PA103 Δ exoU. In our results, ExoU inhibited the MUC1 expression in airway epithelial cells infected with PA103. However, PA103 Δ exoU-infected cells showed activation of MUC1 expression in a JNK-dependent manner. These results were supported by the animal model, as lungs from PA103-infected mice exhibited lower Muc1 mRNA levels compared to PA103 Δ exoU-infected mice. Interestingly, ExoU induced MUC1 nuclear translocation, which is involved in the regulation of the antioxidant and inflammatory responses. Cell treatment with an inhibitor of the MUC1-mediated intracellular signaling, GO-201, showed that MUC1 attenuates the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), regardless of ExoU. More importantly, GO-201 reduced the secretion of CXCL8 in PA103-infected cells, indicating that the nuclear translocation of MUC1 upregulates CXCL8 secretion. Concerning MUC5AC, 1 hour after infection, cells infected with PA103 showed higher levels of mRNA and lower levels of intracellular protein compared to those infected with the mutant strains. There was no significant difference in Muc5ac mRNA expression when mice infected by PA103 were compared to those infected by PA103 Δ exoU. In conclusion, this study showed that ExoU inhibits MUC1 expression and promotes its nuclear translocation during infection by *P. aeruginosa*. Also, the nuclear translocation of MUC1, induced by ExoU, contributes to the activation of CXCL8 expression. Although ExoU has been able to modulate the MUC5AC expression in the *in vitro* assays, this result was not corroborated by the *in vivo* model.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, Mucins, MUC1, MUC5AC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 – | Família de genes humanos que codificam as mucinas (MUC), mostrando a localização cromossômica e os tecidos onde há maior expressão..... | 28 |
| Tabela 2 – | Oligonucleotídeos iniciadores empregados na qPCR..... | 42 |
| Figura 1 – | Sistema de Secreção do Tipo 3 de <i>P. aeruginosa</i> | 22 |
| Figura 2 – | Superfície de epitélio respiratório ciliado..... | 30 |
| Figura 3 – | Estrutura de MUC1..... | 31 |
| Figura 4 – | Dimerização e translocação nuclear de MUC1..... | 34 |
| Figura 5 – | Estruturas de MUC5AC e de polímeros de mucinas formadoras de muco..... | 35 |
| Figura 6 – | Efeito de ExoU na transcrição de MUC1 em células epiteliais respiratórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 51 |
| Figura 7 – | Efeito da atividade PLA2 de ExoU na inibição da transcrição de MUC1..... | 53 |
| Figura 8 – | Efeito de ExoU nos níveis proteicos intracelulares de MUC1 em células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P. aeruginosa</i> | 55 |
| Figura 9 – | Efeito de ExoU na transcrição de Muc1 nos pulmões de camundongos infectados por <i>P. aeruginosa</i> | 56 |
| Figura 10 – | Efeito dos inibidores de MAPK e NF- κ B sobre a expressão de mRNA de MUC1 durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 58 |
| Figura 11 – | Efeito de ExoU na translocação nuclear de MUC1 em células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P. aeruginosa</i> | 59 |
| Figura 12 – | Efeito do inibidor de MUC1 GO-201 na viabilidade celular e nos níveis de EROs durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 61 |
| Figura 13 – | Efeito do inibidor da MUC1 GO-201 nos níveis secretados de CXCL8 e IL-6, durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 63 |
| Figura 14 – | Efeito de ExoU na expressão de mRNA de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 – Efeito da atividade PLA2 de ExoU na indução da transcrição MUC5AC em células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P.aeruginosa</i> | 66 |
| Figura 16 – Efeito de ExoU nos níveis proteicos intracelulares de MUC5AC em células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P. aeruginosa</i> | 68 |
| Figura 17 – Efeito de ExoU na transcrição de Muc5AC nos pulmões de camundongos, durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| Abl | <i>Ableson leukemia oncogene cellular homolog</i> |
| ADP | adenosina difosfato |
| ADPR | ADP-ribosiltransferase |
| AP-1 | proteína ativadora-1 |
| AprA | protease alcalina |
| BCA | ácido bicinconínico |
| BSA | albumina de soro bovino |
| cDNA | DNA complementar |
| CFTR | regulador da condutância transmembranar da fibrose cística |
| COX | ciclooxigenase |
| cPLA2 | fosfolipase citosólica A2 dependente de cálcio |
| CQC | cisteína-glutamina-cisteína |
| CXCL8 | quimiocina motivo CXC ligante 8 |
| DAPI | 4',6'-diamino-2-fenil-indol |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DPOC | doença pulmonar obstrutiva crônica |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetraacético |
| EGFR | receptor do fator de crescimento epidérmico |
| EGTA | ácido tetracético etileno glicol |
| ELISA | ensaio imunoadsorvente ligado à enzima |
| EP | receptor de prostanóide do tipo E |
| ERK | quinase regulada por sinal extracelular |
| EROs | espécies reativas de oxigênio |
| ER- α | receptor de estrogênio alfa |
| GSK3 β | glicogênio quinase sintase 3 beta |
| H2O2 | peróxido de hidrogênio |
| HBSS | solução salina balanceada de Hank |
| HMEC | células epiteliais mamárias humanas |
| IgG | imunoglobulina G |

| | |
|----------------|---|
| IKK | quinase de I κ B |
| IL-13 | interleucina 13 |
| IL-17 | interleucina 17 |
| il-1 β | interleucina 1 beta |
| IL-6 | interleucina 6 |
| IL-8 | interleucina 8 |
| iPLA2 | fosfolipase A2 independente de cálcio humana |
| I κ B | Inibidor de NF- κ B |
| JNK | c-Jun N-terminal quinase |
| KC | quimioatraente de queratinócitos |
| LBA | líquido de lavagem broncoalveolar |
| LoxA | <i>P. aeruginosa</i> 15-LOX enzyme |
| LOXs | Lipoxigenases |
| MAPKs | proteína-quinases ativadas por mitógenos |
| MEK | MAPK/ERK quinase |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MTT | brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium |
| MUC1 | mucina 1 humana |
| Muc1 | mucina 1 animal |
| MUC1-C | MUC1 C-terminal |
| MUC1-CT | cauda citoplasmática de MUC1-C |
| MUC1-N | MUC1 N-terminal |
| MUC5AC | mucina 5AC humana |
| Muc5AC | mucina 5AC animal |
| MyD88 | fator de diferenciação mielóide 88 |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| Naip | proteína inibidora de apoptose neuronal |
| NF- κ B | fator nuclear kappa B |
| PAF | fator de ativação plaquetário |
| PAFR | receptor do fator de ativação plaquetário |
| PBS | tampão fosfato salino |
| PGD2 | prostaglandina D2 |
| PGE2 | prostaglandina E2 |

| | |
|--------------|---|
| PGF2A | prostaglandina F2-alfa |
| PGH2 | prostaglandina H2 |
| PGI2 | prostaglandina I2 |
| PI3K | fosfoinosítídeo 3-quinase |
| PKC | proteína quinase C |
| PKC δ | proteína quinase C-delta |
| PLA2 | fosfolipase A2 |
| PT4 | pili do tipo 4 |
| qPCR | reação em cadeia da polimerase quantitativa |
| RhoGap | <i>Rho-GTPase activating protein</i> |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RT-qPCR | transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio |
| SEM | erro padrão da média |
| SFB | soro fetal bovino |
| SpcU | chaperona de <i>Pseudomonas</i> específica para ExoU |
| sPLA2 | fosfolipase secretória A2 |
| SST3 | sistema de secreção do tipo 3 |
| STAT | transdutor de sinal e ativadores de transcrição |
| TBE | células traqueobrônquicas epiteliais |
| TBS-T | tampão tris-salino acrescido de 0,1% de Tween 20 |
| TIR | <i>Toll / interleukin-1 receptor</i> |
| TLR | receptores semelhantes a toll |
| TNF | fator de necrose tumoral |
| TXA2 | tromboxano A2 |
| UFC | unidade formadora de colônia |
| UTI | unidade de terapia intensiva |
| Vfr | fator regulador de virulência |
| VNTR | número variável de repetições em <i>tandem</i> |
| ZAP70 | proteína de 70 kD associada à cadeia zeta |

| | |
|------|-----------------------|
| LPS | lipopolissacarídeo |
| FLIc | flagelina |
| LB | meio Luria Broth Base |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------------|--------------------------|
| % | Porcentagem |
| ± | Mais ou menos |
| × | Multiplicação |
| β | Beta |
| H ₂ O | Molécula da água |
| mL | Mililitro |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetros quadrados |
| rpm | Rotações por minute |
| α | Alfa |
| μL | Microlitro |
| °C | Graus Celsius |
| G | Força g |
| V | Volts |
| mM | Milimolar |
| pH | Potencial hidrogeniônico |

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 | OBJETIVOS | 38 |
| 1.1 | Geral | 38 |
| 1.2 | Específicos | 38 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 2.1 | Cepas de <i>P. aeruginosa</i> | 39 |
| 2.2 | Células eucarióticas | 39 |
| 2.3 | Infecção de células epiteliais respiratórias humanas por <i>P. aeruginosa</i> | 40 |
| 2.4 | RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de MUC1 e MUC5AC nas células epiteliais respiratórias | 41 |
| 2.5 | Avaliação dos níveis proteicos de MUC1 e MUC5AC em extratos de proteínas totais de células A549 por <i>western blot</i> | 42 |
| 2.6 | Avaliação dos níveis proteicos de MUC1 em extratos de proteínas nucleares de células A549 por <i>western blot</i> | 43 |
| 2.7 | Avaliação do papel da ativação de MAPK na expressão de MUC1 | 44 |
| 2.8 | Avaliação do efeito da inibição de MUC1 sobre a produção de EROs durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 45 |
| 2.9 | Avaliação do efeito da inibição de MUC1 sobre a secreção de CXCL8, IL-6 e TNF, durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>, por ELISA | 46 |
| 2.10 | Camundongos | 47 |
| 2.11 | Modelo murino de pneumonia aguda por <i>P. aeruginosa</i> | 47 |
| 2.12 | RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de Muc1 e Muc5ac em pulmões murinos | 48 |
| 2.13 | Análise estatística | 49 |
| 3 | RESULTADOS | 50 |
| 3.1 | ExoU inibiu o aumento da transcrição de MUC1 em células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 50 |
| 3.2 | A inibição de MUC1 foi dependente da atividade PLA2 de ExoU | 52 |

| | | |
|------|---|-----------|
| 3.3 | ExoU inibiu a expressão da proteína MUC1 em células epiteliais respiratórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>..... | 54 |
| 3.4 | ExoU inibiu a expressão de mRNA de Muc1 nos pulmões de camundongos infectados por <i>P. aeruginosa</i>..... | 56 |
| 3.5 | A expressão de MUC1 durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> é regulada pelas vias de JNK e NF-kB..... | 57 |
| 3.6 | Pesquisa da translocação nuclear de MUC1 durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>..... | 59 |
| 3.7 | Efeito de MUC1 nos níveis de EROs durante a infecção por <i>P.aeruginosa</i>..... | 60 |
| 3.8 | Efeito de MUC1 na secreção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>..... | 62 |
| 3.9 | ExoU induziu o aumento da transcrição de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>..... | 64 |
| 3.10 | Durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>, o aumento da transcrição de MUC5AC induzido por ExoU depende de sua atividade PLA2..... | 65 |
| 3.11 | ExoU promoveu a redução dos níveis proteicos intracelulares de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i>..... | 67 |
| 3.12 | Avaliação da expressão de Muc5AC nos pulmões de camundongos infectados por <i>P. aeruginosa</i>..... | 69 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 70 |
| | CONCLUSÕES..... | 79 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa

Taxonomicamente classificada na família Pseudomonadaceae, *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa asporogênica, em forma de bastonete, com 0,5 a 0,7 µm de espessura por 1,5 a 3 µm de comprimento, podendo produzir pigmentos como piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina, e móvel devido à expressão de um flagelo polar e pili do tipo IV. É um micro-organismo ubíquo, podendo sobreviver em diferentes nichos ecológicos como solos, águas, plantas e animais (KAZMIERCZAK; SCHNIEDERBEREND; JAIN, 2015; ORLANDI *et al.*, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; WU *et al.*, 2015).

P. aeruginosa é um micro-organismo anaeróbio facultativo, podendo utilizar NO_3^- ou NO_2^- como aceptores de elétrons alternativos na ausência de oxigênio respiratório (PANMANEE *et al.*, 2019). Além disso, *P. aeruginosa* é pouco exigente nutricionalmente, podendo crescer em meios com baixa complexidade. Este micro-organismo pode crescer bem até mesmo em um meio cujas únicas fontes de carbono e nitrogênio sejam, respectivamente, acetato e sulfato de amônio. *P. aeruginosa* tem bom crescimento entre 25 e 37°C, porém é capaz de crescer em até 42°C, característica essa que a distingue de outras espécies do mesmo gênero. *P. aeruginosa* é resistente a altas concentrações de sais, corantes e a antissépticos fracos, além de possuir resistência intrínseca a vários antibióticos comumente usados. Somadas, estas características de *P. aeruginosa* contribuem para o seu sucesso ecológico, ajudando a explicar a natureza ubíqua do organismo e sua proeminência como patógeno nosocomial (WU; LI, 2015).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista que dificilmente causa doenças em indivíduos imunocompetentes que possuam barreiras epiteliais intactas (ENGEL; BALACHANDRAN, 2009; RUMBAUGH; HAMOOD; GRISWOLD, 1999). Em indivíduos saudáveis, as infecções causadas por *P. aeruginosa* normalmente só acontecem após exposição a elevadas cargas bacterianas. Estas infecções são, predominantemente, superficiais, agudas e não invasivas, podendo ser autolimitadas (MENSA *et al.*, 2018).

Por outro lado, *P. aeruginosa* é capaz de causar infecções severas em organismos imunodeprimidos, como é o caso de pacientes com queimaduras graves,

tuberculose, câncer, AIDS ou fibrose cística (CROUSILLES *et al.*, 2015; WU; LI, 2015). Entre os patógenos Gram-negativos, *P. aeruginosa* é a causa mais comum de infecções nosocomiais e daquelas associadas a tratamentos de saúde (PONCE DE LEON *et al.*, 2020; RAMAN *et al.*, 2018), sendo capaz de infectar praticamente qualquer superfície de mucosa humana e de invadir tecidos e sangue de pacientes com comprometimento da imunidade inata (DIAZ; HAUSER, 2010). Em hospitais, *P. aeruginosa* frequentemente é a causa de processos infecciosos agudos, como infecções do trato urinário, de queimaduras e feridas cirúrgicas, além de endocardite, bacteremia e sepse (BUCIOR; PIELAGE; ENGEL, 2012; GOMILA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; OECHSLIN *et al.*, 2017; PHE *et al.*, 2019; ROSTAMI *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* é uma das principais causas de pneumonia em pacientes hospitalizados (BERUBE; RANGEL; HAUSER, 2016; YANG, Y. W. *et al.*, 2017), levando a evoluções clínicas adversas, com elevados índices de morbidade e letalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com doenças respiratórias crônicas, como fibrose cística, bronquiectasia e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (CABRAL *et al.*, 2020; JACOBS *et al.*, 2020; KATO; LILLEHOJ; KIM, 2016; YOUSEFI-AVARVAND *et al.*, 2015).

A pneumonia é o segundo tipo de infecção mais comum em pacientes hospitalizados (SADER *et al.*, 2019). Ao chegar ao pulmão, os micro-organismos envolvidos colonizam e invadem a região. Em indivíduos imunocomprometidos, até mesmo bactérias de média e baixa virulência podem estar relacionadas. Assim, levam a um quadro de infecção do parênquima pulmonar, região importante para as trocas gasosas de competência do sistema respiratório. Logo, os bronquíolos e alvéolos são preenchidos por exsudato inflamatório, dificultando a hematose e levando ao quadro clássico de insuficiência respiratória. (ASSUNÇÃO; PEREIRA; ABREU, 2018). *P. aeruginosa* responde por quase 20% de todos os casos de pneumonia em unidades de terapia intensiva (UTIs), liderando os casos de pneumonia associada ao uso de ventiladores artificiais. Segundo levantamentos realizados a partir de dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* coletados em 258 centros médicos de 45 países num período de 20 anos, de 1997 a 2016, *P. aeruginosa* foi a principal causa de pneumonia em pacientes hospitalizados na América Latina (27,4%), Europa (21,8%) e região da Ásia/Pacífico (20,3%), e a segunda maior causa na América do Norte (20,6%) (SADER *et al.*, 2019). No mesmo período, *P. aeruginosa* foi também o

quarto causador de bacteremia, respondendo por 5,3% de todos os casos, e por 7,4% dos casos em hospital (DIEKEMA *et al.*, 2019).

Devido à gravidade das infecções causadas por este micro-organismo e à sua resistência natural a agentes antimicrobianos, há considerável interesse na elucidação da patogênese das infecções causadas por *P. aeruginosa* (CHASTRE; FAGON, 2002; RELLO; DIAZ; RODRIGUEZ, 2005; SALIBA *et al.*, 2005).

Fatores de Virulência de *P. aeruginosa*

O genoma de *P. aeruginosa* codifica um arsenal de fatores de virulência que lhe permitem estabelecer diferentes tipos de infecções. (WU *et al.*, 2015). Alguns desses fatores, como flagelo, pili tipo IV, lipopolissacarídeo (LPS), lectinas e alginato são constituintes da própria estrutura microbiana, servindo como adesinas e/ou contribuindo para a formação de biofilmes. Outros são secretados para atuar nos tecidos do hospedeiro, como exotoxina A, protease alcalina, elastases, fenazinas, vesículas da membrana externa, exotoxinas do sistema de secreção do tipo III (SST3), piocianina, pioverdina, piochelina e sideróforos (LEE; YOON, 2017; LIN *et al.*, 2018). Os fatores de virulência secretados não apenas lesionam a barreira epitelial do hospedeiro, mas também induzem alterações na fisiologia e na função celular, afetando a permeabilidade da membrana, a síntese proteica e a morfologia da célula (BALLOK; O'TOOLE, 2013).

A expressão dos diversos fatores de virulência é coordenada por complexos mecanismos de regulação, de modo que sejam expressos seletivamente, conforme as condições do ambiente em cada momento, favorecendo a capacidade bacteriana de estabelecer a infecção. A adesão da bactéria à célula hospedeira serve como um sinal para a ativação da expressão dos fatores de virulência. Esse mecanismo de ativação é vantajoso, pois permite que a bactéria despenda energia e recursos para expressar estes fatores apenas no momento oportuno (BERTRAND; WEST; ENGEL, 2010; WU *et al.*, 2015).

As principais adesinas envolvidas na adesão de *P. aeruginosa* ao epitélio do hospedeiro são o flagelo, o LPS e, especialmente, pili do tipo IV, que responde por aproximadamente 90% da capacidade de adesão de *P. aeruginosa* às células hospedeiras. A flagelina (FliC), principal constituinte do flagelo, liga-se a mucinas associadas às membranas das células epiteliais e a receptores semelhantes a Toll

(TLR) tipo 5 (TLR5). O oligossacarídeo central do LPS medeia a adesão bacteriana ao regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR). A pilina do tipo IV liga-se a glicosfingolípidos (asialo GM1 e asialo GM2) presentes nas superfícies de células epiteliais (BUCIOR; PIELAGE; ENGEL, 2012; LEE *et al.*, 1994; WU *et al.*, 2015). O pilus do tipo IV é constituído por longas fímbrias contráteis que conferem à bactéria a capacidade de aderir e se mover sobre a superfície. Quando o pilus do tipo IV adere à superfície, suas contrações geram uma tensão mecânica sobre suas fímbrias. Esta tensão induz proteínas que constituem a porção basal dos pili do tipo IV, no periplasma, a desencadear sinais intracelulares para a ativação do fator de transcrição Vfr (*virulence factor regulator*). O Vfr regula a expressão de múltiplos fatores de virulência em *P. aeruginosa*, incluindo os sistemas de secreção do tipo II e III e o sistema de *quorum sensing*, que favorecem a invasão ou a formação de biofilmes (BERTRAND; WEST; ENGEL, 2010; PERSAT *et al.*, 2015). Flagelo, pili e LPS também ativam receptores semelhantes a Toll (TLR5, TLR2, e TLR4, respectivamente), que desencadeiam a ativação da resposta imune (BASSET *et al.*, 2013; BEN MOHAMED *et al.*, 2012; PARK; LEE, 2013).

P. aeruginosa é uma bactéria conhecida por produzir biofilmes robustos. Um biofilme é uma comunidade microbiana que tipicamente habita superfícies e é envolta em uma matriz extracelular. Os micro-organismos que compõem biofilmes apresentam características muito diferentes das suas contrapartes planctônicas. Os biofilmes de *P. aeruginosa* causam problemas graves em indivíduos imunocomprometidos, como os portadores de fibrose cística ou de feridas infeccionadas. Geralmente, isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística, bronquiectasia e DPOC produzem um polissacarídeo extracelular, alginato, conferindo um fenótipo mucóide às colônias, e são capazes de formar biofilmes. O estabelecimento do biofilme dificulta a erradicação da infecção, levando ao desenvolvimento de infecções crônicas. Isso é especialmente grave em pacientes com fibrose cística em que *P. aeruginosa* é a principal causa de mortalidade. O desenvolvimento de biofilmes de *P. aeruginosa* é regulado por vários fatores, sendo o sistema de *quorum sensing* um dos principais mecanismos envolvidos em sua regulação (GOMEZ; PRINCE, 2007; LEE; YOON, 2017; MENSA *et al.*, 2018).

Os sistemas de secreção de proteínas são aparatos moleculares usados por bactérias Gram-negativas para liberar enzimas que hidrolisam fontes complexas de carbono em compostos utilizáveis ou para liberar proteínas que capturam íons

essenciais, como o ferro. Eles também são empregados para colonizar e sobreviver em hospedeiros eucarióticos, causando infecções agudas ou crônicas, subvertendo a resposta da célula hospedeira e escapando do sistema imunológico (FILLOUX, 2011).

Sete sistemas de secreção (tipo I ao tipo VII) evoluíram nas bactérias Gram-negativas, e *P. aeruginosa* apresenta cinco destes sistemas (tipos I, II, III, V e VI) (DENG *et al.*, 2017). O sistema de secreção do tipo I está relacionado à secreção, para o meio extracelular, da protease alcalina AprA e do hemóforo HasAp, um captador do grupo heme como meio de aquisição de íons ferro (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2012). O sistema de secreção do tipo II é responsável pela secreção extracelular da maioria das proteínas de *P. aeruginosa*, incluindo exotoxina A, elastases (LasA, LasB), lipases (LipA, LipC), lipoxigenase (LoxA), fosfatases alcalinas (PhoA, LapA), fosfolipases (PlcB, PlcH, PlcN), proteína ligadora de quitina (CbpD) e proteases (FILLOUX, 2011). O sistema de secreção do tipo V secreta lipases, adesinas e proteases. O sistema de secreção do tipo VI injeta efetores tóxicos (Tse1, Tse2, Tse3, VgrG) diretamente em bactérias vizinhas, causando lise celular ou interrupção do crescimento de micro-organismos competidores (CORBITT *et al.*, 2018; CROUSILLES *et al.*, 2015; FILLOUX, 2011).

Sistema de Secreção do Tipo III (SST3)

Dentre os sistemas de secreção apresentados por *P. aeruginosa*, o SST3 é um dos mais sofisticados e mais estudados, devido ao seu papel central na virulência desta bactéria. O SST3 desperta grande interesse graças à sua quase onipresença entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e à sua relação direta com piores prognósticos e maior taxa de mortalidade em pacientes infectados. O SST3 confere à bactéria a capacidade de injetar citotoxinas diretamente no citosol das células eucarióticas infectadas (DENG *et al.*, 2017; HAUSER, 2009).

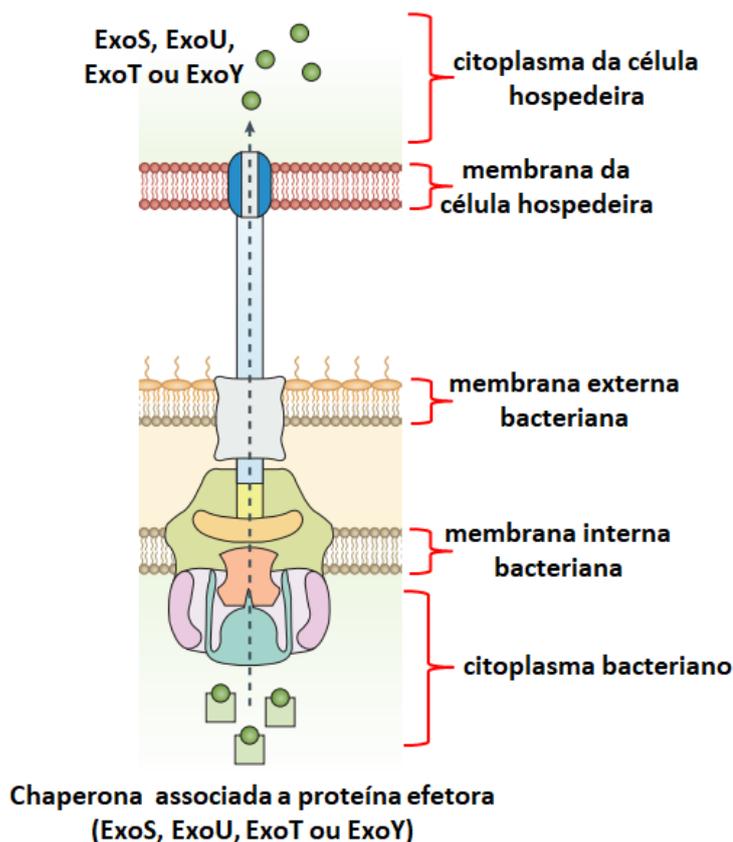
Aproximadamente 40 genes codificam o conjunto de proteínas que constituem o SST3 de *P. aeruginosa*. Os genes que codificam o aparato de secreção e as proteínas reguladoras estão agregados em vários *operons*. Por outro lado, os genes que codificam as proteínas efetoras estão dispersos ao longo do cromossomo. A expressão desses genes é diretamente controlada pelo ativador transcricional ExsA, essencial para a expressão do SST3. As cepas de *P. aeruginosa* com deleção do gene *exsA* mostram uma completa inexpressividade do SST3 e significativa

atenuação da citotoxicidade. A expressão do SST3 dependente de ExsA é induzida em condições de baixa concentração de Ca^{2+} ou pelo contato de *P. aeruginosa* com células hospedeiras (FILLOUX, 2011; KROKEN *et al.*, 2018; MARSDEN *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2020).

O SST3 pode ser funcionalmente dividido em cinco componentes: o complexo da agulha, o poro de translocação, as proteínas reguladoras, as proteínas efetoras e as chaperonas. Estes componentes atuam conjuntamente para injetar as proteínas efetoras na célula hospedeira (HAUSER, 2009). O complexo da agulha compreende várias subestruturas, incluindo ATPases citosólicas, um anel citoplasmático (anel C), um aparelho de exportação de membrana interna, um corpo basal formado por anéis concêntricos oligomerizados embebidos nas membranas interna e externa e uma agulha oca formada pela polimerização helicoidal de uma única proteína, que se projeta para além da superfície bacteriana. O poro de translocação, situado na extremidade distal da agulha, é formado por três proteínas, PopB, PopD and PcrV, que se inserem na membrana da célula hospedeira, formando um poro através do qual as proteínas efetoras são entregues (DENG *et al.*, 2017). Antes de serem translocadas para a célula hospedeira, as proteínas efetoras permanecem associadas às chaperonas, bloqueando sua atividade no interior bacteriano e facilitando seu transporte (GALLE *et al.*, 2012).

O SST3 de *P. aeruginosa* pode secretar quatro proteínas efetoras, denominadas ExoS, ExoT, ExoU e ExoY. Estas proteínas atuam como citotoxinas capazes de manipular processos celulares comuns do hospedeiro, como reorganização do citoesqueleto, transporte de vesículas e vias de transdução de sinal, subvertendo a resposta imune inata, especialmente de células epiteliais e fagocíticas (DENG *et al.*, 2017; FOULKES *et al.*, 2019).

Figura 1 - Sistema de Secreção do Tipo 3 de *P. aeruginosa*.



Legenda: Representação do aparato injetor do sistema de secreção do tipo 3 de *P. aeruginosa*. Adaptado de DENG *et al.* (2017).

Em geral, os isolados clínicos de *P. aeruginosa* podem ser classificados como portadores de ExoS ou portadores de ExoU, mas não de ambos. Aproximadamente 70% dos isolados clínicos produzem ExoS e 28%, ExoU. É frequente que ExoT ou ExoY sejam expressas em associação a ExoS ou a ExoU (FELTMAN *et al.*, 2001; FOULKES *et al.*, 2019).

ExoS e ExoT são citotoxinas bifuncionais que compartilham 76% de homologia de aminoácidos primários, induzindo efeitos semelhantes ao serem injetadas nas células do hospedeiro. Em ambas, são encontrados um domínio Rho-*GTPase activating protein* (RhoGAP) N-terminal e um domínio ADP-ribosiltransferase C-terminal. O domínio RhoGAP inibe a funcionalidade das proteínas Rho, Rac e Cdc42, necessárias para a montagem dos filamentos contráteis de actina e miosina do citoesqueleto. Dessa maneira, o domínio RhoGAP desestabiliza o citoesqueleto, interferindo em seu funcionamento (BARBIERI; SUN, 2004; HALL, 1998; SIT; MANSER, 2011). Os domínios ADP-ribosiltransferase (ADPR) de ExoS e ExoT,

embora atuando sobre substratos diferentes, induzem a apoptose e interrompem a via de sinalização da ativação e montagem da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase no fagossomo dos neutrófilos, bloqueando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, a queima respiratória, o que favorece a sobrevivência do patógeno no interior da célula hospedeira. Em ExoS, a integração dos domínios RhoGAP e ADPR promovem a internalização endocítica de *P. aeruginosa* e formação de bolhas de sobrevivência do patógeno na célula hospedeira. Por outro lado, em ExoT, essa integração de domínios inibe a fagocitose (BARBIERI; SUN, 2004; HALL, 1998; KAMINSKI *et al.*, 2018; KROKEN *et al.*, 2018; SIT; MANSER, 2011; VAREECHON *et al.*, 2017).

ExoY atua como uma nucleotidil-ciclase, promovendo o acúmulo intracelular de nucleotídeos cíclicos. ExoY aumenta a permeabilidade vascular, favorecendo a formação de edema tecidual. Apesar de ExoY ser expressa em 89% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, o seu papel na infecção ainda não está claro (COWELL; EVANS; FLEISZIG, 2005; FOULKES *et al.*, 2019; KLOTH *et al.*, 2018).

ExoU

Das proteínas efetoras entregues pelo SST3, ExoU é a mais citotóxica. ExoU possui atividade de fosfolipase tipo A2 (PLA2), e hidrolisa fosfolípidos da membrana plasmática, levando à rápida lise celular e à liberação de mediadores inflamatórios (CABRAL *et al.*, 2020; DIAZ; HAUSER, 2010; SALIBA *et al.*, 2006; SALIBA *et al.*, 2005). Dentre os vários fenótipos de isolados clínicos de *P. aeruginosa*, o fenótipo ExoU-positivo é o que oferece piores prognósticos. Este fator de virulência está relacionado ao aumento da severidade e da mortalidade durante a infecção. A capacidade de *P. aeruginosa* de causar danos agudos ao epitélio pulmonar, disseminação bacteriana na circulação e sepse está altamente relacionada à expressão de ExoU, especialmente em pacientes com comprometimento da resposta imune (DIAZ; HAUSER, 2010; FELTMAN *et al.*, 2001; FOULKES *et al.*, 2019; SAWA, 2014; SAWA *et al.*, 2016).

ExoU é uma proteína solúvel de 74-kDa, constituída por 687 aminoácidos. A resolução da estrutura de ExoU por cristalografia de raios-X demonstrou que esta proteína possui quatro domínios distintos, definidos por diferenças de estrutura e função. O domínio de ligação à chaperona (domínio 1) é composto por peptídeos de

duas regiões distintas e descontínuas: a região dos resíduos 55 a 101, na extremidade N-terminal, que forma a interação mais íntima com SpcU (*specific Pseudomonas chaperone for ExoU*), e uma segunda região do resíduo 472 ao 502. O domínio catalítico (domínio 2), que contém o sítio ativo, se estende do resíduo 102 ao 471. Os domínios 3 (resíduos 503 a 603) e 4 (resíduos 604 a 683), na extremidade C-terminal formam uma estrutura funcional que confere a ExoU a capacidade de se inserir na membrana celular do hospedeiro após a sua ativação. Esta estrutura foi denominada anteriormente como “domínio de localização na membrana”, quando se acreditava ser constituída por um único domínio estrutural (HALAVATY *et al.*, 2012; HAUSER, 2009; SATO; FRANK, 2004).

ExoU apresenta sequências homólogas a outras enzimas PLA2 como a patatina, uma proteína solúvel encontrada nos tubérculos de batatas, a PLA2 citosólica dependente de cálcio (cPLA2) e a PLA2 independente de cálcio (iPLA2). Estas enzimas apresentam uma característica conservada em comum: a presença de uma díade catalítica serina-aspartato, indispensável para a atividade fosfolipase. A díade catalítica de ExoU é formada por uma serina na posição 142 e um aspartato na posição 344. A mutagênese específica na posição S142 ou D344 suprime totalmente a toxicidade de ExoU (NALEFSKI *et al.*, 1994; ROLSMA; FRANK; BARBIERI, 2015; SATO; FRANK, 2004; SATO *et al.*, 2003).

No citoplasma bacteriano, ExoU se mantém complexada a SpcU, uma chaperona de 137 aminoácidos com afinidade específica por ExoU. A ligação a SpcU e a ausência de cofatores eucarióticos ativadores mantém ExoU em um estado inativo e, portanto, não letal à própria bactéria. SpcU direciona a citotoxina para o mecanismo de secreção, permitindo que ela se desdobre e passe pela agulha do SST3. Contudo, SpcU não entra na célula hospedeira juntamente com ExoU (FINCK-BARBANCON; YAHR; FRANK, 1998; FOULKES *et al.*, 2019).

ExoU é ativada no citosol da célula hospedeira pela interação com ubiquitina ou com proteínas ubiquitinadas, que atuam como cofatores. ExoU não requer ativação alostérica de Ca^{2+} , como acontece na patatina e na cPLA2. Após sua ativação, ExoU se insere na membrana celular, onde catalisa a hidrólise da ligação éster de fosfolipídios na posição sn-2, liberando ácidos graxos, como o ácido araquidônico, e lisofosfolipídios (ANDERSON *et al.*, 2011; HALAVATY *et al.*, 2012; SATO; FRANK, 2004; SIX; DENNIS, 2000).

O ácido araquidônico liberado a partir dos fosfolípidios da membrana celular pode ser metabolizado para produzir mediadores lipídicos pelas vias das cicloxigenases ou das lipoxigenases. As cicloxigenases COX-1 e COX-2 catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ em si não desempenha um papel significativo como mediador inflamatório. Em vez disso, serve como substrato para várias enzimas específicas que produzem prostanóides mais estáveis. Esses prostanóides incluem as prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF_{2A}, a prostaciclina PGI₂ e o tromboxano TXA₂, produzidos a partir de PGH₂ pelas enzimas PGE₂, PGD₂, PGF_{2A}, PGI₂ e TXA₂ sintases, respectivamente. O ácido araquidônico também pode ser oxidado pelas lipoxigenases para produzir leucotrienos e lipoxinas (DENNIS *et al.*, 2011; PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006; WANG; DUBOIS, 2018).

A acetilação de lisofosfolípidios na posição sn-2 resulta na síntese do fator de ativação plaquetário (PAF), um potente agonista que, mesmo em concentrações muito baixas, desempenha um papel importante nas funções vasculares (PLOTKOWSKI *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a atividade PLA₂ de ExoU exibe atividade pró-inflamatória associada à liberação de ácido araquidônico, produção de eicosanóides, formação de PAF, secreção de citocinas e indução do desbalanço REDOX. Assim, os estudos descritos a seguir comprovam que o potencial de ExoU para causar dano tecidual vai além da lise direta das células hospedeiras.

Saliba *et al.* (2005) demonstraram que ExoU promoveu uma rápida e intensa liberação de ácido araquidônico por células endoteliais HMEC-1 infectadas com PA103, uma cepa de *P. aeruginosa* produtora de ExoU, promovendo um expressivo aumento na produção de PGE₂ e PGI₂ pela ação de cicloxigenases. ExoU também promoveu um marcante influxo de neutrófilos e linfócitos e um expressivo aumento na concentração de PGE₂ nos pulmões de camundongos infectados por PA103.

Em um modelo de pneumossepe em camundongos infectados com PA103, Machado *et al.* (2010, 2011) demonstraram que ExoU induziu maior infiltração de leucócitos, maior expressão de IL-6 e TNF e elevação dos níveis de PAF no lavado broncoalveolar. ExoU também induziu manifestações inflamatórias sistêmicas relacionadas à produção de PAF, como hiperpermeabilidade vascular, ativação plaquetária e coagulação.

Mallet de Lima *et al.* (2012, 2014) demonstraram que ExoU ativa NF- κ B pela via de sinalização do receptor de PAF (PAFR). Em contrapartida, NF- κ B induz ainda mais a expressão de PAFR, além de promover o aumento na expressão de CXCL8 (IL-8) em células epiteliais respiratórias A549 e em células endoteliais HMEC-1, e de KC em pulmões de camundongos infectados com PA103.

Em outro estudo, ExoU promoveu o aumento da peroxidação lipídica nos pulmões de camundongos infectados com PA103. ExoU também induziu o aumento significativo da concentração de hidroperóxidos lipídicos, 8-isoprostano, intermediários reativos de oxigênio, peroxinitrito e óxido nítrico em células A549 infectadas com PA103. ExoU foi associada a um aumento da atividade de superóxido dismutase e à diminuição dos níveis do antioxidante glutathiona reduzida, favorecendo o desequilíbrio redox e o estresse oxidativo em células epiteliais das vias aéreas (DA CUNHA *et al.*, 2015).

Mucinas

As mucosas revestem as cavidades do corpo e fornecem a superfície de interação entre a microbiota comensal, micro-organismos patogênicos e o hospedeiro. A função de barreira da camada mucosa é amplamente mantida pelas mucinas formadoras de gel, que são secretadas pelas células caliciformes. Além disso, as células epiteliais da mucosa expressam mucinas transmembranares que têm funções de barreira e sinalização (VAN PUTTEN; STRIJBIS, 2017).

Um total de 21 genes de mucinas humanas foram identificados, sendo que 14 deles são expressos nas vias aéreas. As mucinas compreendem uma família de glicoproteínas caracterizadas pela presença de um domínio proteico central com sequências repetidas de aminoácidos ricos em serina e treonina, onde ocorre uma densa O-glicosilação. Os glicanos ligados ao domínio proteico formam cadeias laterais que constituem de 50 a 90% da massa molecular das mucinas (BALDUS; ENGELMANN; HANISCH, 2004; GENDLER, 2001; MA; RUBIN; VOYNOW, 2018). As cadeias de glicano conferem importantes propriedades estruturais e biológicas às mucinas, incluindo resistência a proteases, sequestro de patógenos e retenção de íons e água (THORNTON; ROUSSEAU; MCGUCKIN, 2008).

Há três categorias de mucinas: aquelas que são secretadas, mas não polimerizam; aquelas que são secretadas e polimerizam para formar géis; e aquelas

que possuem domínios transmembranares e estão associadas à superfície celular. As principais mucinas expressas nas vias aéreas são duas mucinas formadoras de gel (MUC5AC, MUC5B); quatro mucinas transmembranares (MUC1, MUC4, MUC16, MUC20); e uma mucina secretada não formadora de gel (MUC7) (MA; RUBIN; VOYNOW, 2018).

Tabela 1 - Família de genes humanos que codificam as mucinas (MUC), mostrando a localização cromossômica e os tecidos onde há maior expressão

| Mucina | Cromossomo | Tecidos com maior expressão |
|---|------------|--|
| <i>Mucinas Secretadas — formadoras de gel</i> | | |
| MUC2 | 11p15.5 | Jejuno, íleo, cólon, endométrio |
| MUC5AC | 11p15.5 | Trato respiratório, estômago, conjuntiva, endocérvice, endométrio |
| MUC5B | 11p15.5 | Trato respiratório, glândulas submandibulares, endocérvice |
| MUC6 | 11p15.5 | Estômago, íleo, vesícula biliar, endocérvice, endométrio |
| MUC19 | 12q12 | Não relatado |
| <i>Mucinas Secretadas — não formadoras de gel</i> | | |
| MUC7 | 4q13–q21 | Glândulas sublinguais e submandibulares |
| MUC8 | 12q24.3 | Trato respiratório, útero, endocérvice, endométrio |
| MUC9 | 1p13 | Trompas uterinas |
| <i>Mucinas Membranares</i> | | |
| MUC1 | 1q21 | Mama, pâncreas, duodeno, íleo, cólon, traqueia, brônquios, córnea, conjuntiva, trompas de falópio, útero, endométrio, endocérvice, ectocérvice, vagina |
| MUC3A/B | 7q22 | Intestino delgado, cólon, vesícula biliar |
| MUC4 | 3q29 | Mama, trato respiratório, intestino delgado, cólon, conjuntiva, córnea, endocérvice, ectocérvice, vagina, endométrio |
| MUC12 | 7q22 | Cólon, pâncreas, próstata, útero |
| MUC13 | 3q21.2 | Colon, traqueia, rins, intestino delgado |
| MUC15 | 11p14.3 | Cólon, trato respiratório, intestino delgado, próstata |
| MUC16 | 19p13.2 | Ovário, córnea, conjuntiva, trato respiratório, endométrio |
| MUC17 | 7q22 | Estômago, duodeno, cólon |
| MUC20 | 3q29 | Placenta, cólon, trato respiratório, próstata, fígado |
| MUC21 | 6p21 | Trato respiratório, timo, cólon |

Fonte: Tabela adaptada de CORFIELD (2015)

As mucinas poliméricas formadoras de gel apresentam estruturas proteicas semelhantes. A região central da proteína apresenta domínios ricos em resíduos de serina, treonina e prolina, onde ocorrem as O-glicosilações. As regiões N-terminal e C-terminal apresentam domínios ricos em resíduos de cisteína. Estes resíduos de cisteína medeiam a formação de pontes de dissulfeto entre as extremidades de moléculas diferentes, formando polímeros de mucina (THORNTON; ROUSSEAU; MCGUCKIN, 2008).

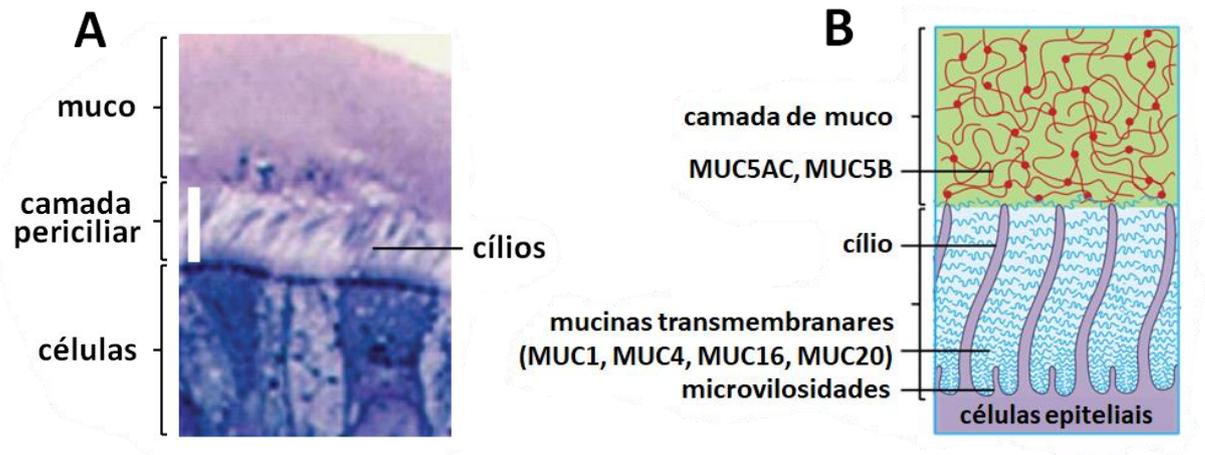
O muco é uma secreção viscoelástica complexa composta por proteínas, lipídios, íons e água, e as principais macromoléculas que compõem o muco são as mucinas. O muco forma uma camada de revestimento protetora das superfícies epiteliais não queratinizadas e a manutenção desta barreira é vital para a proteção do

epitélio das vias aéreas. O muco é um componente essencial da defesa inata contra patógenos, pois aprisiona patógenos inalados, evitando a aderência e a invasão de células hospedeiras por micro-organismos e consequentes danos aos tecidos subjacentes. Os micro-organismos, partículas e toxinas aprisionados no muco são removidos das vias aéreas pela depuração mucociliar e pela tosse (RIDLEY; THORNTON, 2018; THORNTON; ROUSSEAU; MCGUCKIN, 2008).

A depuração mucociliar é um processo em que o muco é removido das vias aéreas pela ação das células ciliadas do epitélio respiratório, que movimentam o muco para fora das vias aéreas através do batimento coordenado de seus cílios. Este processo é essencial para manter as vias aéreas livres de infecção e desobstruídas, sendo que a sua eficácia depende da atividade ciliar e da adequada secreção do muco (BONSER; ERLE, 2017; THORNTON; SHEEHAN, 2004). Anormalidades quantitativas e qualitativas na secreção de muco exercem um papel central na fisiopatologia de doenças das vias aéreas (BUTTON; ANDERSON; BOUCHER, 2016).

Estímulos como a inflamação podem induzir uma hipersecreção de muco nas vias aéreas. Embora a secreção aguda de muco seja um mecanismo de defesa respiratória, a secreção patológica de muco e sua má depuração podem levar à obstrução das vias aéreas, limitando o fluxo de ar. A hipersecreção de muco está correlacionada com a inflamação crônica em algumas fisiopatologias, mas também pode ser induzida em resposta à inalação de alérgenos ou substâncias irritantes, como fumaça de tabaco, e a agentes infecciosos. A produção anormal de muco é um importante fator para a morbidade e mortalidade observadas em doenças respiratórias crônicas, como asma, fibrose cística e DPOC (LEE *et al.*, 2017; RUBIN *et al.*, 2014; THORNTON; ROUSSEAU; MCGUCKIN, 2008).

Figura 2 - Superfície de epitélio respiratório ciliado



Legenda: A) Imagem de microscopia de luz da superfície de culturas epiteliais brônquicas, compreendendo a camada de muco e a camada periciliar fixadas e coradas com Richardson. A barra de escala indica 7 μm . B) Representação da camada de muco e da camada periciliar de células epiteliais respiratórias ciliadas. Imagens A e B adaptadas de BUTTON *et al.* (2012).

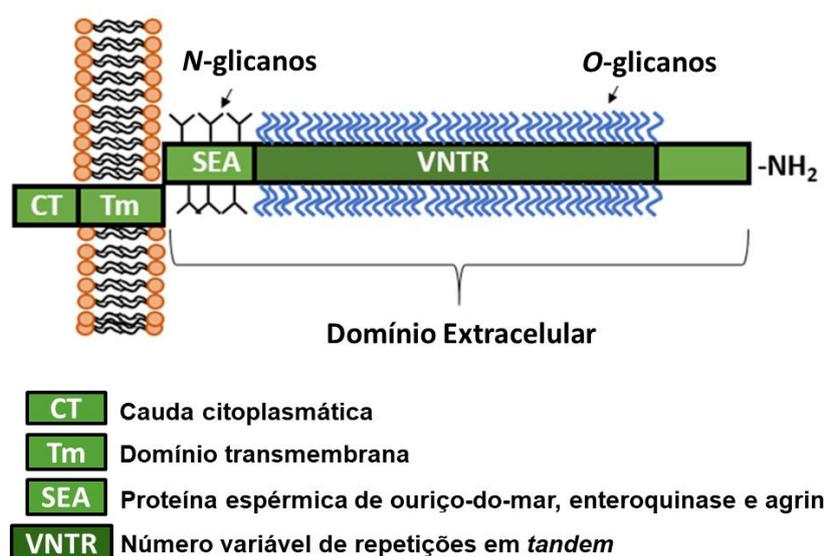
Mucina 1 (MUC1 / Muc1)

A mucinas transmembranares constituem uma família de moléculas que compartilham características comuns. Estas mucinas apresentam domínios extracelulares altamente glicosilados, que inibem a invasão por bactérias patogênicas. Além disso, possuem caudas intracelulares que podem ser fosforiladas e interferir nas vias de sinalização que regulam a inflamação, as interações célula-célula, a diferenciação e a apoptose. Adicionalmente, estas mucinas são conhecidas por suas contribuições para o desenvolvimento, progressão e metástase de adenocarcinomas (VAN PUTTEN; STRIJBIS, 2017).

As mucinas transmembranares MUC1, MUC4, MUC16 e MUC20, por exemplo, são acopladas à superfície apical da maioria das células epiteliais, onde entram em contato com patógenos, contribuindo para a prevenção de infecções nas superfícies das mucosas (DHAR; MCAULEY, 2019; RIDLEY; THORNTON, 2018; VAN PUTTEN; STRIJBIS, 2017; YUAN-CHEN WU *et al.*, 2007). As mucinas transmembranares também desempenham um papel importante na camada periciliar, onde formam uma interface aquosa sobre a qual o muco desliza para que possa ser adequadamente removido (BUTTON *et al.*, 2012).

Codificada no cromossomo 1q21, MUC1 (MUC1 em humanos, Muc1 em animais) é uma glicoproteína transmembranar expressa normalmente em baixos níveis na superfície apical de células epiteliais. Contudo, MUC1 é superexpressa na maioria dos adenocarcinomas e em doenças inflamatórias de tecidos epiteliais. MUC1 consiste de duas subunidades associadas não covalentemente por interações hidrofóbicas. A porção N-terminal (MUC1-N) é uma grande subunidade extracelular composta por 20 a 200 repetições em *tandem* de 20 aminoácidos altamente O-glicosilados nos resíduos de serina e treonina (domínio VNTR: número variável de repetições em *tandem*). A porção C-terminal (MUC1-C) compreende um domínio extracelular de 53 aminoácidos, um domínio transmembranar de 28 aminoácidos e uma cauda citoplasmática de 72 aminoácidos (CASCIO; ZHANG; FINN, 2011; KATO; LILLEHOJ; *et al.*, 2017; KUFÉ, 2013; LILLEHOJ *et al.*, 2001).

Figura 3 - Estrutura de MUC1.



Legenda: Representação da estrutura de MUC1. Adaptado de DHAR e MCAULEY (2019).

Desde que foi estruturalmente caracterizada, MUC1 tem sido amplamente estudada devido ao seu papel no câncer. Porém, em anos recentes, estudos vêm demonstrando que MUC1 exerce um papel na resposta imune inata, seja dificultando o contato entre o patógeno e a membrana celular do hospedeiro ou modulando a

inflamação induzida pela infecção (DHAR; MCAULEY, 2019; KIM; LILLEHOJ, 2008). A regulação positiva de Muc1 em pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa* tem sido associada à redução de níveis de mediadores pró-inflamatórios e à atenuação de lesões pulmonares, sugerindo que Muc1 desempenha um papel anti-inflamatório durante a fase de resolução da infecção (KATO; HANSS; *et al.*, 2017). MUC1-N se estende para além da membrana plasmática, protegendo o epitélio ao agir como uma barreira contra bactérias, pois funciona como um ligante descartável de micro-organismos e impede a aderência de bactérias a outros componentes da célula eucariótica por interferência estérica (GENDLER, 2001; LINDEN *et al.*, 2009).

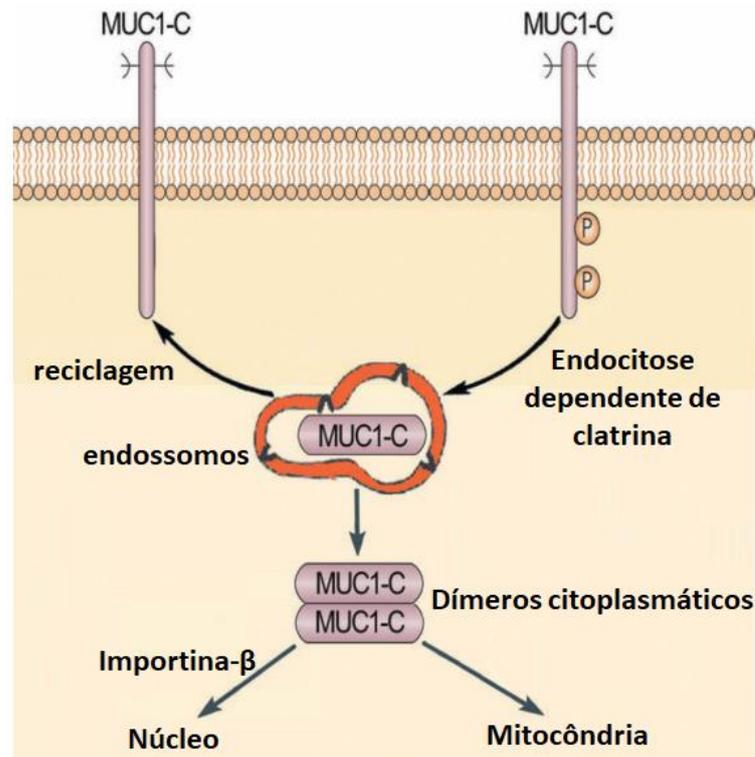
MUC1 é um sítio de ligação a *P. aeruginosa* no epitélio pulmonar normal (KATO *et al.*, 2010), e para *Escherichia coli* (BOLL *et al.*, 2017), *Campylobacter jejuni* (MCAULEY *et al.*, 2007) e *Helicobacter pylori* (NG *et al.*, 2016) no epitélio gastrointestinal. A flagelina foi identificada como a principal adesina envolvida na ligação de *P. aeruginosa* a MUC1. Após se ligar à flagelina de *P. aeruginosa*, MUC1-N pode ser clivada e descartada, carreando consigo a bactéria (LILLEHOJ *et al.*, 2015; LILLEHOJ; KIM; KIM, 2002). Assim, a subunidade MUC1-N pode ser liberada, incorporando-se ao muco, ou permanecer complexada à subunidade MUC1-C (LI *et al.*, 2001). A perda de MUC1-N da superfície celular libera MUC1-C para atuar como um receptor putativo de sinalização de estresse no interior da célula eucariótica (KUFE, 2013).

A cauda citoplasmática de MUC1-C (MUC1-CT) medeia funções de sinalização intracelular (JEONG *et al.*, 2018). MUC1-CT contém resíduos altamente conservados de serina e tirosina que podem ser fosforilados por receptores tirosina-quinase, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ou por quinases intracelulares. Estes resíduos de fosfoserina e fosfotirosina atuam como sítios de ligação para moléculas como PI3K, c-Src, NF- κ B e β -catenina (LI *et al.*, 2001; NATH; MUKHERJEE, 2014). Assim, MUC1-CT pode iniciar cascatas de transdução de sinal e desempenhar um importante papel biológico na sinalização celular (DHAR; MCAULEY, 2019).

MUC1 também pode exercer atividade anti-inflamatória durante a infecção bacteriana. O efeito anti-inflamatório de MUC1 nas vias aéreas ocorre principalmente pela inibição de diferentes TLRs que ativam a resposta inflamatória durante processos infecciosos (UENO *et al.*, 2008). MUC1-CT se liga aos domínios citoplasmáticos dos TLRs, bloqueando o recrutamento do adaptador MyD88 (KATO; LILLEHOJ; *et al.*,

2017; NG *et al.*, 2016), que medeia a ativação de NF- κ B e a subsequente indução da expressão de genes de citocinas inflamatórias a partir de todos os TLRs, exceto TLR3 (TAKEDA; AKIRA, 2015; ZHU *et al.*, 2018). MUC1-CT pode, também, atenuar a resposta inflamatória pelo bloqueio da fosforilação de I κ B α , inibindo, assim, a ativação da via canônica de NF- κ B e as subseqüentes respostas inflamatórias (GUANG *et al.*, 2010; OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Além disso, MUC1 pode translocar para o núcleo, onde interfere na expressão gênica. MUC1-C desloca-se da membrana celular através de endossomos, formados por um processo de endocitose mediado por clatrina (KINLOUGH *et al.*, 2004). No citoplasma, MUC1-C forma homodímeros por um mecanismo dependente de um motivo CQC (cisteína-glutamina-cisteína) localizado na cauda citoplasmática (AHMAD *et al.*, 2009). Estes homodímeros interagem com a importina- β e são transportados para o núcleo. No núcleo, MUC1-C se associa a vários fatores de transcrição, como STAT1/3, NF- κ B p65 e ER α , e contribui para a transativação de genes alvos (KUFU, 2013). Finalmente, a molécula completa de MUC1 também pode formar um complexo com a subunidade p65 de NF- κ B e migrar para o núcleo, onde promove a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (CASCIO; ZHANG; FINN, 2011).

Figura 4 - Dimerização e translocação nuclear de MUC1



Legenda: Representação do processo de dimerização e translocação de MUC1-C para o núcleo. Adaptado de KUFÉ (2013).

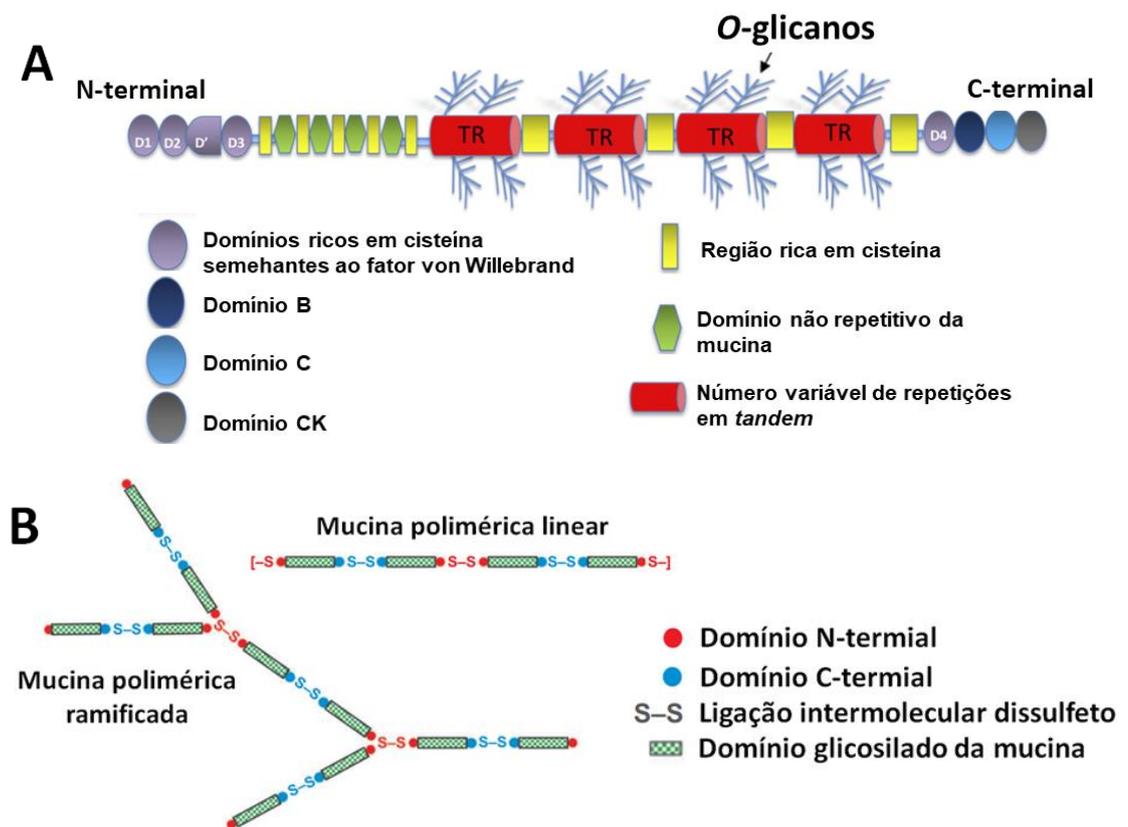
Mucina 5AC (MUC5AC / Muc5AC)

Codificada no cromossomo 11p15.5, MUC5AC é uma das principais mucinas do epitélio respiratório. A expressão aberrante desta mucina está relacionada à obstrução das vias aéreas devido às suas características altamente viscosas (CORFIELD, 2015; SAMSUZZAMAN *et al.*, 2019). A expressão de MUC5AC é induzida por uma grande variedade de fatores, tanto ambientais quanto do hospedeiro, relevantes nas doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, incluindo proteases, micro-organismos, EROs, poluentes atmosféricos, fumaça de cigarro e citocinas (ZHANG *et al.*, 2018).

A região N-terminal de MUC5AC possui 4 domínios ricos em cisteína responsáveis pela formação de ligações de dissulfeto entre moléculas da mucina. Na região central de MUC5AC, encontram-se quatro domínios VNTR ricos em resíduos de serina e treonina que se constituem como sítios de O-glicosilação. A região C-

terminal de MUC5AC contém 2 domínios ricos em cisteína que propiciam a formação de ligações de dissulfeto entre diferentes moléculas de MUC5AC, permitindo a polimerização da mucina (DENNENY *et al.*, 2020; LILLEHOJ *et al.*, 2013).

Figura 5 - Estruturas de MUC5AC e de polímeros de mucinas formadoras de muco



Legenda: Representação da estrutura de MUC5AC. Adaptado de DENNENY *et al.* (2020). B) Representação das estruturas poliméricas de mucinas formadoras de muco. Adaptado de THORNTON; ROUSSEAU e MCGUCKIN (2008).

Na hipersecreção de muco, ocorre o aumento da expressão gênica das duas principais mucinas que o compõe: MUC5AC e MUC5B (BONSER; ERLE, 2017). MUC5AC é secretada sobretudo pelas células epiteliais caliciformes, enquanto que o MUC5B é produzido em grande parte nas glândulas sub-mucosas (ZHANG *et al.*, 2018). Estudos indicam que a citocina IL-13, secretada por células Th2, aumenta significativa e consistentemente a expressão de MUC5AC em células epiteliais respiratórias humanas e de Muc5ac em camundongos (BONSER *et al.*, 2016; KUPERMAN *et al.*, 2002). Em outro estudo, envolvendo diversas citocinas, IL-6 e IL-17 induziram o aumento da expressão de MUC5B e MUC5AC em células traqueobrônquicas humanas (TBE), e o aumento de Muc5b em células TBE primárias de macaco e camundongo (CHEN *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram também que a exposição do epitélio respiratório de mamíferos a fosfolipases A₂ (cPLA2 e sPLA2) induz a hipersecreção de muco nas vias aéreas, em decorrência do ácido araquidônico liberado por essas enzimas (DIF *et al.*, 2010; OKAMOTO; KIM; RUBIN, 2007).

Alterações qualitativas do muco também prejudicam a depuração mucociliar. As propriedades viscoelásticas do muco dependem, sobretudo, do seu grau de hidratação. Normalmente, a camada de muco consiste em 2-3% de sólidos (mucinas, sais e outras macromoléculas) e 97-98% de água (BOUCHER, 2007; FAHY; DICKEY, 2010). Nas doenças respiratórias muco-obstrutivas como asma, fibrose cística, DPOC e bronquite crônica, ocorre uma diminuição do grau de hidratação do muco, causada pelo aumento na proporção de mucinas em relação à quantidade de água, tornando o muco mais espesso e viscoso. Essa desidratação do muco é drasticamente acentuada na fibrose cística, em que a deficiência de CFTR gera um desequilíbrio no mecanismo de absorção de Na⁺ e secreção de Cl⁻, responsável pela manutenção da hidratação adequada da camada de muco (BOUCHER, 2007). Estas alterações reológicas do muco prejudicam a depuração mucociliar, favorecendo sua estagnação nas vias aéreas. O muco estagnado se torna um meio propício ao crescimento bacteriano, resultando em infecção e inflamação (RIDLEY; THORNTON, 2018; THORNTON; ROUSSEAU; MCGUCKIN, 2008).

Foi constatado em casos de asma fatal, uma relação entre a obstrução das vias aéreas e o desequilíbrio na proporção de MUC5AC e MUC5B presentes no muco, ocorrendo predomínio acentuado da expressão de MUC5AC. Estas alterações resultam num gel rico em MUC5AC que adere às células mucosas epiteliais

prejudicando severamente a depuração mucociliar. A adesão de MUC5AC conduz, provavelmente, ao acúmulo progressivo de muco no lúmen e à obstrução das vias respiratórias. Assim, a expressão aberrante de MUC5AC pode contribuir grandemente para a obstrução das vias aéreas, levando a piores prognósticos em doenças respiratórias (BONSER *et al.*, 2016).

Tendo em vista a relevância de *P. aeruginosa* no contexto das infecções respiratórias e a capacidade de seu SST3 de interferir na resposta hospedeira, bem como o papel fundamental das mucinas na resposta a patógenos respiratórios, o presente estudo se propôs a investigar se ExoU interfere na expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC nas vias aéreas, durante a infecção por *P. aeruginosa*, e de que maneira isso poderia afetar a resposta inflamatória.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de ExoU na modulação da expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC, assim como o impacto dessa modulação na resposta hospedeira à infecção por *P. aeruginosa*.

1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar o efeito de ExoU na expressão de Muc1 e Muc5AC *in vivo*.
- b) Avaliar o efeito de ExoU na expressão de MUC1 e MUC5AC *in vitro*.
- c) Avaliar o impacto da modulação de MUC1 na produção de espécies reativas de oxigênio.
- d) Avaliar o impacto da modulação de MUC1 na secreção das citocinas inflamatórias TNF, IL-6 e CXCL8.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas de *P. aeruginosa*

Foram utilizadas 3 cepas não invasivas de *P. aeruginosa*: a cepa laboratorial PA103, secretora de ExoU; sua mutante isogênica PA103 Δ exoU (SALIBA *et al.*, 2005), deletada no gene *exoU*; e a cepa PA103/S142A, deletada e subsequentemente complementada com uma sequência de *exoU* contendo uma mutação pontual que produz ExoU sem atividade catalítica devido à substituição de serina por alanina na posição do aminoácido 142 na díade catalítica de ExoU (PHILLIPS *et al.*, 2003).

As bactérias foram estocadas em meio Luria Broth Base (LB, Invitrogen) contendo 20% de glicerol a -70°C.

Para realização de cada experimento, bactérias do estoque foram semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo meio LB ágar (Life Technologies) e incubadas por 12 a 14 horas, a 37°C, para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia do crescimento foi semeada em LB, acrescido de EGTA a 5 mM e MgCl₂ a 20 mM para favorecer a expressão das proteínas do SST3. Após incubação por 14 a 16 horas, sob agitação de 200 rpm, a 37°C, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, 15°C, 1260 x g, para a sedimentação bacteriana e descarte do sobrenadante. O sedimento bacteriano foi recuperado e empregado na preparação das suspensões bacterianas utilizadas nos experimentos de infecção.

2.2 Células eucarióticas

Células epiteliais alveolares de carcinoma humano da linhagem A549 (ATCC CCL-185) foram cultivadas em garrafas para cultura de células de 75 cm² contendo meio F12 (Sigma-Aldrich) acrescido de 10% de soro fetal bovino, glutamina (250µg/mL), gentamicina (50µg/mL) e fungizona (anfotericina B; 2,5µg/mL). As

culturas celulares foram mantidas em temperatura de 37°C, em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂.

Aproximadamente 48 horas antes da infecção bacteriana, as células foram lavadas com tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS), e dissociadas da garrafa de cultura com uma solução de tripsina a 0,1% e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 0,01%, em tampão fosfato salino Dulbecco sem cálcio ou magnésio, com 1% de vermelho de fenol (solução de tripsina-EDTA). As suspensões celulares obtidas foram padronizadas pela adição de azul de trypan a 0,4% (vol/vol) e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. As células foram semeadas em garrafas de 25 cm² ou em microplacas para cultura de células com poços de diferentes áreas, de acordo com o ensaio a ser realizado, e incubadas a 37°C, com 5% de CO₂.

Para realização dos nossos experimentos, as suspensões celulares foram distribuídas em garrafas de cultura de células de 25cm², ou em microplacas de 6, 24 ou 96 poços, nas respectivas concentrações: 2,25 x 10⁵ células/mL (5mL/garrafa); 1,43 x 10⁵ células/mL (3mL/poço); 1,7 x 10⁵ células/mL (1mL/poço); 7,2 x 10⁴ células/mL (200µL/poço).

2.3 Infecção de células epiteliais respiratórias humanas por *P. aeruginosa*

Suspensões padronizadas de *P. aeruginosa* foram obtidas pela ressuspensão do sedimento bacteriano, descrito anteriormente, em meio F12 contendo 10% de SFB e glutamina (250µg/mL), sem antibióticos (meio F12 para teste). As concentrações das suspensões bacterianas foram padronizadas por espectrofotometria, de modo a se obter suspensões com absorvância igual a 0,1 em comprimento de onda de 680nm (A_{680nm} = 0,1), que corresponde a aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

As culturas de células epiteliais foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* (multiplicidade de infecção igual a 100), ou tratadas com meio de cultura (controle), e centrifugadas (1260 x g, por 10 minutos, a 15°C), para favorecer o contato entre as bactérias e as células hospedeiras. Após 1 hora, a 37°C, em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂, as culturas foram tratadas com gentamicina a 300 µg/mL em meio F12 contendo 10% de SFB, glutamina (250µg/mL), para eliminação

dos micro-organismos extracelulares. Seguiu-se incubação por diferentes períodos de tempo (1, 2, 5, 17 ou 19 horas), de acordo com o ensaio realizado.

2.4 RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de MUC1 e MUC5AC nas células epiteliais respiratórias

Após 3, 6 ou 18 horas de infecção, o RNA total das culturas controle e infectadas foi extraído com o kit RNeasy Plus (Qiagen) e eluído em água livre de nucleases, conforme as recomendações do fabricante. A concentração e pureza das amostras de RNA foram determinadas por leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm, 230 nm e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare). O RNA recuperado foi acondicionado a -70°C até o momento de síntese do DNA complementar (cDNA).

Uma alíquota do RNA total obtido, contendo cerca de 2 μg , foi utilizada para a síntese de cDNA, empregando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), conforme as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi estocado a -70°C para ser utilizado posteriormente.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) destas amostras de cDNA utilizou oligonucleotídeos iniciadores específicos (**Tabela 2**) para os genes *MUC1*, *MUC5AC* ou *GAPDH*, empregado como controle endógeno e fator normalizador. Foram utilizados, conforme as instruções dos fabricantes, o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e o sistema de amplificação e detecção StepOne Plus Detection System (Applied Biosystems). Todos os resultados de quantificação relativa de expressão gênica foram determinados pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando-se o *software* StepOne 2.0 (Applied Biosystems)

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores empregados na qPCR

| Gene Alvo | Oligonucleotídeos Iniciadores |
|--|---|
| <i>MUC1</i> humano | Senso: 5'- CTA GCA GTA CCG ATC GTA GCC - 3' Antissenso 5'- CCA CTG CTG GGT TTG TGT AA - 3' |
| <i>MUC5AC</i> humano | Senso: 5'- CTG AGG GTC TCA GGA ATG ACG C - 3' Antissenso: 5'- TTT ATG CAA CAG ATT GGC CGT G - 3' |
| <i>GAPDH</i> humano <i>Gapdh</i> murino | Senso: 5'- TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC - 3' Antissenso: 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG - 3' |
| <i>Muc1</i> murino | Senso: 5'- CCC TAT GAG GAG GTT TCG GC - 3' Antissenso 5'- GTG GGG TGA CTT GCT CCT AC - 3' |
| <i>Muc5ac</i> murino | Senso: 5'- AAC TGC GGG GAC AGC ATC TC - 3' Antissenso: 5'- TGC AGC TCC TGG CAA CAC TC - 3' |

2.5 Avaliação dos níveis proteicos de MUC1 e MUC5AC em extratos de proteínas totais de células A549 por *western blot*

Para avaliar a modulação dos níveis de expressão de MUC1 e MUC5AC por *western blot*, células epiteliais cultivadas em garrafas de 25 cm² foram infectadas ou tratadas com meio de cultura, por 1 hora, e incubadas com meio F12 para teste contendo gentamicina a 300 µg/mL por mais 1 hora, para MUC5AC, ou 19 horas, para MUC1. Após o período de infecção, os tapetes celulares foram lavados com PBS a 4°C, lisados em 100 µL de tampão de lise (Pierce™ RIPA Buffer, Thermo Scientific) acrescido de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, Calbiochem), diluído 1:100, e raspados com espátula. Os lisados obtidos foram transferidos para microtubos e incubados em gelo por 30 minutos, vortexando-se a cada 5 minutos durante este período. Seguiu-se centrifugação dos lisados a 18500 x g, por 30 min, a 4°C, para recuperação dos sobrenadantes, que foram armazenados a -80°C para serem utilizados posteriormente. A concentração de proteínas nestes extratos foi determinada utilizando-se o kit Pierce™ BCA protein assay (Thermo Scientific), conforme instruções do fabricante.

Alíquotas dos extratos contendo 30 µg de proteínas foram desnaturadas em tampão de amostra, a 95°C, durante 4 minutos, em banho seco. Em seguida, as amostras foram fracionadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10%

(SDS-PAGE), utilizando-se o sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD). Para estimar o peso molecular das proteínas presentes nas amostras, um padrão de peso molecular foi aplicado no gel, em paralelo às amostras. As frações foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose a 30V, por 16 horas, a 4°C, em tampão de transferência (25mM de Tris, pH 8.3, 192mM de glicina, 20% de metanol, 0,1% de SDS), utilizando-se o sistema tipo tanque Mini Transfer Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD). A membrana foi bloqueada com tampão TBS-T (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi incubada em TBS-T, acrescido de leite desnatado a 5%, contendo anticorpo primário anti-MUC1 (1:1000, Cell Signalling – 4538), ou anti-MUC5AC (1:200, Abcam - ab24070), ou anti- β -actina (1:8000, Sigma), *overnight*, sob agitação, a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T, sendo 5 minutos cada lavagem, e incubada durante 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:8000, KPL 474-1806), para MUC1 e β -actina, ou anti- IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:8000, KPL 474-1516), para MUC5AC. Após incubação, foram realizadas 5 lavagens de 5 minutos com TBS-T, e o substrato com quimioluminescência aumentada ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, referência: RPN 2232) foi depositado sobre a membrana. A membrana foi, então, fotografada com o aparelho ChemiDoc/BIO-RAD, e as bandas foram avaliadas por densitometria, utilizando-se o *software* Image Lab 4.1.

2.6 Avaliação dos níveis proteicos de MUC1 em extratos de proteínas nucleares de células A549 por *Western Blot*

Células epiteliais respiratórias cultivadas em garrafas de 25 cm² foram infectadas ou tratadas com meio de cultura por 1 hora e, em seguida, tratadas com meio F12 para teste contendo gentamicina a 300 μ g/mL, conforme descrito anteriormente, para completar 20 horas.

Para a extração das proteínas nucleares, foi empregado o kit de extração Nuclear Extract Kit (Active Motif), conforme as instruções do fabricante. Ao final da incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram desprezados, o tapete

celular foi lavado com 3 ml de PBS gelado contendo inibidor de fosfatase e, por fim, foram adicionados mais 2 mL de PBS contendo inibidor de fosfatase gelado em cada garrafa. As células foram, então, mecanicamente dissociadas, transferidas para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 500 µl de tampão hipotônico e incubado por 15 minutos, em gelo. Depois da incubação, foram adicionados 25 µl de detergente e as amostras foram vortexadas e centrifugadas por 30 segundos, a 14000 x g, 4°C. O sedimento foi ressuspenso em tampão de lise e as amostras foram vortexadas e incubadas por 30 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 14000 x g, 4°C, e o sobrenadante, contendo o extrato nuclear, foi recuperado e armazenado a -80°C.

Após a dosagem da concentração de proteínas dos extratos nucleares, realizada como descrito no **item 2.5**, 30 µg de proteínas foram fracionados em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, conforme descrito anteriormente (**item 2.5**). A membrana foi bloqueada com tampão TBS-T, contendo 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi incubada em TBS-T, acrescido com leite desnatado 5%, contendo anticorpo primário anti-MUC1 (1:1000, Cell Signalling, referência: 4538), ou em TBS-T, 5% de soro albumina bovina (BSA), contendo anticorpo primário anti-lamina A/C (1:1000, Cell Signalling, referência: 4C11), *overnight*, sob agitação, a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T, sendo 5 minutos cada lavagem, e incubada, sob agitação, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:8000, KPL, referência: 474-1806), em temperatura ambiente, durante uma hora. Após incubação, foram realizadas 5 lavagens de 5 minutos com TBS-T, e o substrato com quimioluminescência aumentada ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent foi depositado sobre a membrana. A membrana foi, então, fotografada com o aparelho ChemiDoc/BIO-RAD, e as bandas foram avaliadas por densitometria, utilizando-se o *software* Image Lab 4.1.

2.7 Avaliação do papel da ativação de MAPK na expressão de MUC1

Para avaliar o papel de vias de sinalização intracelular na expressão de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa*, células A549 cultivadas em microplacas de 6 poços foram tratadas durante 1h antes da infecção bacteriana com o inibidor de IKK γ , wedelolactona (Santa Cruz Biotechnology, referência: sc-200648), a 10 μ M; o inibidor de MEK1 e MEK2, UO126 (Calbiochem, referência: 662005), a 20 μ M; o inibidor de P38, SB203580 (Calbiochem, referência: 559389) a 10 μ M; o inibidor de JNK, SP600125 (ENZO, referência: BML-EI305), a 10 μ M; ou dimetilsulfóxido (DMSO), solvente de todos os inibidores, como controle. Após tratamento, os sobrenadantes foram descartados e as células foram infectadas ou tratadas com meio de cultura por 1 hora, conforme descrito no **item 2.3**. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados e as células foram tratadas com meio F12 para teste contendo gentamicina, acrescido dos inibidores ou DMSO, nas mesmas concentrações utilizadas no pré-tratamento, e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂, para completar o tempo de 20 horas a partir da infecção. Posteriormente, procedeu-se à extração do RNA total, síntese do cDNA e avaliação da expressão gênica de *MUC1* por qPCR, conforme descrito no **item 2.4**.

2.8 Avaliação do efeito da inibição de MUC1 sobre a produção de EROs durante a infecção por *P. aeruginosa*

Células epiteliais respiratórias cultivadas em microplacas de 96 poços pretas de fundo transparente foram tratadas, durante 1 hora antes da infecção, com 50 μ L de meio F12 para teste contendo 5 μ M do inibidor de MUC1, GO-201 (Sigma-Aldrich), ou com meio sem inibidor (controle). Os sobrenadantes foram descartados e as células foram infectadas ou tratadas com meio de cultura por 1 hora, conforme descrito no **item 2.3**. Após 1 h, os sobrenadantes foram desprezados e as células foram tratadas com 100 μ L de meio F12 para teste contendo gentamicina e GO-201 (5 μ M), ou apenas

gentamicina, e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂, até completar 18 horas de infecção.

Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS, tratadas com 50µL de meio Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) sem soro, contendo ou não GO-201 a 5µM, e incubadas por 1 hora, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com 100µL de HBSS sem soro contendo a sonda para a detecção da produção de EROs, CM-H₂DCFDA (5mM, Molecular Probes), e incubadas por 1 hora, a 37°C, com 5% de CO₂. Após lavagem com HBSS e adição de 100µL de meio F12 para teste, as células foram incubadas por 10 minutos. Seguiu-se monitoramento da fluorescência a cada 10 minutos, durante 120 minutos, utilizando o equipamento GLOMAX Multi Detection System (PROMEGA), com excitação a 495nm e emissão a 525nm.

Concomitantemente, foram conduzidos ensaios de avaliação da citotoxicidade do GO 201 pelo método de redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) (DENIZOT; LANG, 1986), para avaliar se o inibidor de MUC1 afetaria a viabilidade celular.

2.9 Avaliação do efeito da inibição de MUC1 sobre a secreção de CXCL8, IL-6 e TNF, durante a infecção por *P. aeruginosa*, por ELISA

Células epiteliais respiratórias cultivadas em microplacas de 24 poços foram tratadas durante 1 hora antes da infecção com 200µL de meio F12 para teste, contendo ou não o inibidor GO-201 a 5µM. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram infectadas ou tratadas com meio de cultura por 1 hora, conforme descrito no **item 2.3**. Foram utilizadas 2 microplacas em cada experimento, sendo uma delas empregada para a recuperação dos sobrenadantes e a outra para a contagem de células viáveis.

Após 1 h de infecção, os sobrenadantes da primeira microplaca foram desprezados e as células foram tratadas com 300µL de meio F12 para teste contendo gentamicina (300 µg/mL) e GO-201 (5µM), ou apenas gentamicina (300 µg/mL), e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂, para completar 20 horas a partir da infecção. Após este período, os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 1260 x g, por 10 min, a 4°C, e armazenados a -80°C para uso posterior.

Como ExoU possui um potente efeito citotóxico para as culturas celulares, a segunda microplaca foi utilizada para contagem de células viáveis, de forma a permitir a correção do número de células capazes de secretar citocinas presentes em cada variável. Após 1h de infecção, as células foram lavadas com PBS e dissociadas da microplaca com uma solução de tripsina-EDTA (descrito no **item 2.2**). A ação da tripsina foi neutralizada com 300 µL de meio completo contendo gentamicina a 300 µg/mL, e as suspensões celulares foram recuperadas em microtubos. Após centrifugação a 1260 x g, por 10 min, a 4°C, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 100 µL de meio completo contendo gentamicina a 300 µg/ml, de modo a serem obtidas suspensões celulares homogêneas. Em seguida, foi realizada a contagem de células viáveis com azul de trypan a 0,4% (vol/vol), em câmara de Neubauer.

Para a determinação das concentrações das citocinas IL8, IL6 e TNF dos sobrenadantes celulares recuperados após 20h de infecção, foram empregados os kits comerciais de ELISA (Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima) DuoSet DY208-05, DY206-05 e DY210-05 (R&D Systems), respectivamente, conforme as instruções do fabricante. As dosagens obtidas foram normalizadas pelos valores obtidos na contagem de células viáveis, para cada variável.

2.10 Camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com idade entre 8 e 10 semanas e peso médio de 24 g. Estes animais ficaram acondicionados em gaiolas estéreis e receberam ração e água à vontade.

Todos os experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo CEUA/015/2016), e realizados de acordo com o protocolo deste Comitê.

2.11 Modelo murino de pneumonia aguda por *P. aeruginosa*

Os camundongos foram anestesiados com cetamina a 50 mg/kg (Kensol, Konig S.A) e xilazina a 13 mg/kg (Vetanarcol, Konig S.A.), diluídos em salina estéril, por via intraperitoneal. Em seguida procedeu-se à exposição da traqueia e à infecção dos animais por injeção intratraqueal de 10^4 UFC de PA103 ou PA103 Δ *exoU*, em 50 μ l de solução salina, utilizando-se uma seringa agulhada de 0,5mL (BD Ultra-Fine II). Como controle, camundongos foram tratados apenas com solução salina estéril. Após inoculação dos animais, o local de incisão foi suturado com dois pontos, utilizando-se fio de sutura nylon 3.0, e os animais foram colocados em posição de decúbito vertical até recuperação da anestesia.

Após 18 horas de infecção, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por punção cardíaca, para a retirada de fragmentos dos lóbulos direitos dos pulmões, que foram imediatamente acondicionados em microtubos contendo RNA Later (QIAGEN), na proporção de 10 μ L de RNA Later para cada miligrama de tecido, para estabilizar e proteger o RNA presente nos tecidos. O material coletado foi acondicionado a 4°C, *overnight*, e em seguida armazenado a -20°C até o momento da extração do RNA.

2.12 RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de *Muc1* e *Muc5ac* em pulmões murinos

Para a extração de RNA do tecido pulmonar murino, um fragmento com cerca de 20 mg foi seccionado, imerso em 600 μ L de tampão RLT, fornecido no Kit Rneasy Plus Mini (QIAGEN), e triturado com o auxílio do equipamento Tissue Ruptor (QIAGEN). Após completa trituração do tecido, a amostra foi transferida para uma coluna para a eliminação do DNA genômico e isolamento do RNA, de acordo com as recomendações do fabricante. Ao final da extração, o RNA total foi eluído em água livre de nucleases e sua concentração e pureza foram determinadas em leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm, 230 nm e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare). Para evitar a degradação do RNA,

o material foi acondicionado a temperatura de -70°C até o momento de síntese do cDNA.

Uma amostra do RNA total obtido, contendo cerca de 2 μg , foi utilizada para a síntese de cDNA, empregando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), conforme as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi estocado a -70°C para ser utilizado posteriormente.

A qPCR foi realizada nestas amostras de cDNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *Muc1*, *Muc5ac* e *Gapdh* (**Tabela 2**), este último empregado como controle endógeno e fator normalizador. Foram utilizados o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e o sistema de amplificação e detecção StepOne Plus Detection System (Applied Biosystems), conforme instruções dos fabricantes. Os resultados de expressão gênica relativa foram determinados pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando o *software* StepOne 2.0 (Applied Biosystems).

2.13 **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão obtido pela realização de pelo menos três experimentos independentes. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software* Graphpad Prism, A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$, de acordo com o método “one-way ANOVA” para análise de grupos múltiplos com ajuste de Bonferroni.

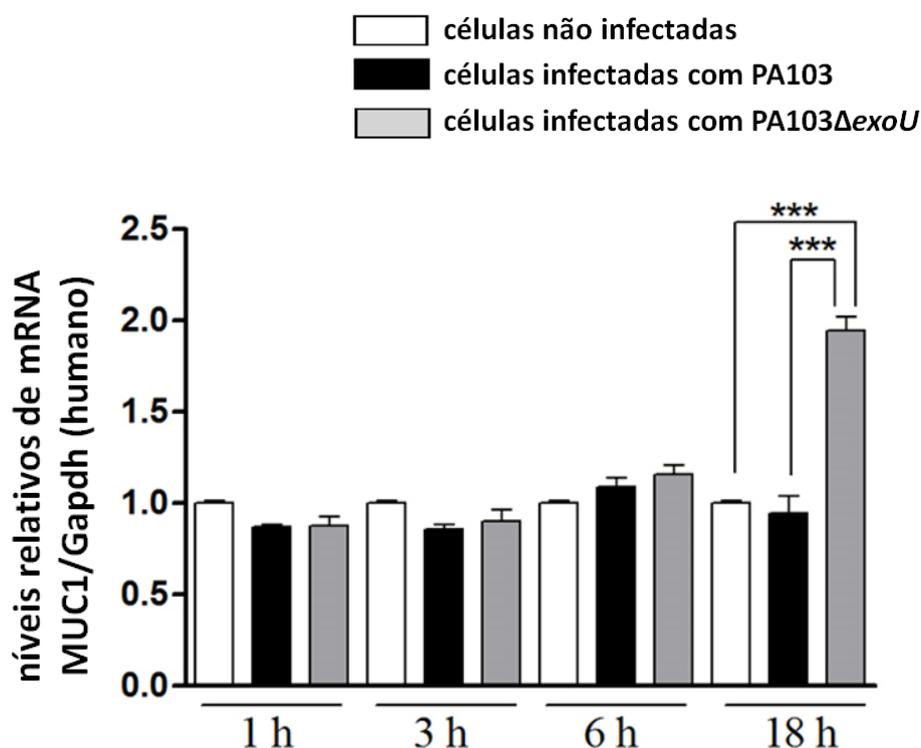
3 RESULTADOS

3.1 ExoU inibiu o aumento da transcrição de MUC1 em células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por *P. aeruginosa*

Células A549 foram infectadas por diferentes períodos de tempo com a cepa produtora de ExoU, PA103, ou com a cepa não produtora de ExoU, PA103 Δ exoU, ou tratadas com meio de cultura (controle), para avaliação dos níveis de mRNA de MUC1 por RT-qPCR.

Após 18 horas, as células infectadas com PA103 Δ exoU expressaram o dobro dos níveis de mRNA exibidos pelas células infectadas com PA103 e pelo controle. Para os outros tempos de infecção, não foram observadas diferenças significativas entre culturas infectadas com PA103, PA103 Δ exoU e controle (**Figura 6**).

Figura 6 - Efeito de ExoU na transcrição de MUC1 em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *P. aeruginosa*



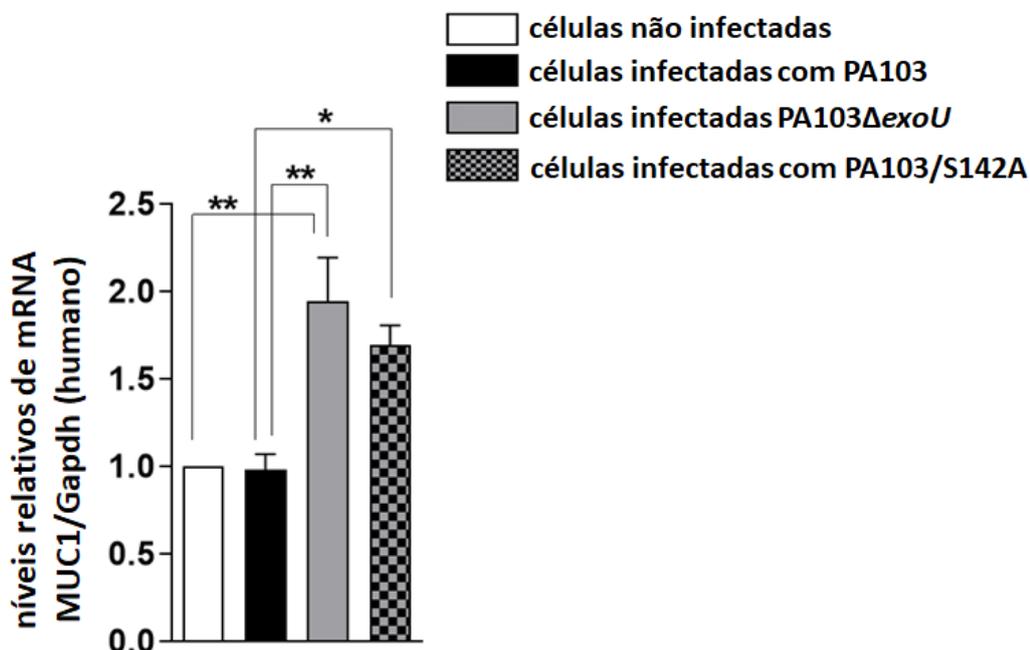
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas PA103 ou PA103ΔexoU de *P. aeruginosa*, por 1, 3, 6 e 18h, para avaliação dos níveis de mRNA de MUC1 por RT-qPCR. O gráfico representa as médias ± SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de MUC1 obtidas em 3 ensaios independentes, usando o método $\Delta\Delta C_t$. *** $p < 0,001$ quando células infectadas pela cepa PA103ΔexoU foram comparadas às células infectadas com a cepa PA103 ou às células não infectadas.

3.2 A inibição de MUC1 foi dependente da atividade PLA2 de ExoU

Para esclarecer se a variação na expressão de MUC1 observada anteriormente decorreu da atividade PLA2 de ExoU, as culturas celulares foram infectadas por 18h com as cepas PA103, PA103 Δ exoU ou PA103/S142A (cepa produtora de ExoU sem atividade catalítica), ou tratadas com meio de cultura (controle de células não infectadas).

A análise por RT-qPCR mostrou que as células infectadas com PA103 Δ exoU expressaram níveis de mRNA de MUC1 ligeiramente maiores do que aquelas infectadas com PA103/S142A, porém, esta diferença não apresentou significância estatística. Em contrapartida, a expressão de MUC1 nas células infectadas com PA103 foi 2 vezes menor que nas infectadas com PA103 Δ exoU, e 1,7 vezes menor que nas infectadas com PA103/S142A. Assim, foi evidenciado que a menor expressão de MUC1 observada nas células infectadas com PA103 estava diretamente relacionada à atividade PLA2 de ExoU (**Figura 7**).

Figura 7 - Efeito da atividade PLA2 de ExoU na inibição da transcrição de MUC1



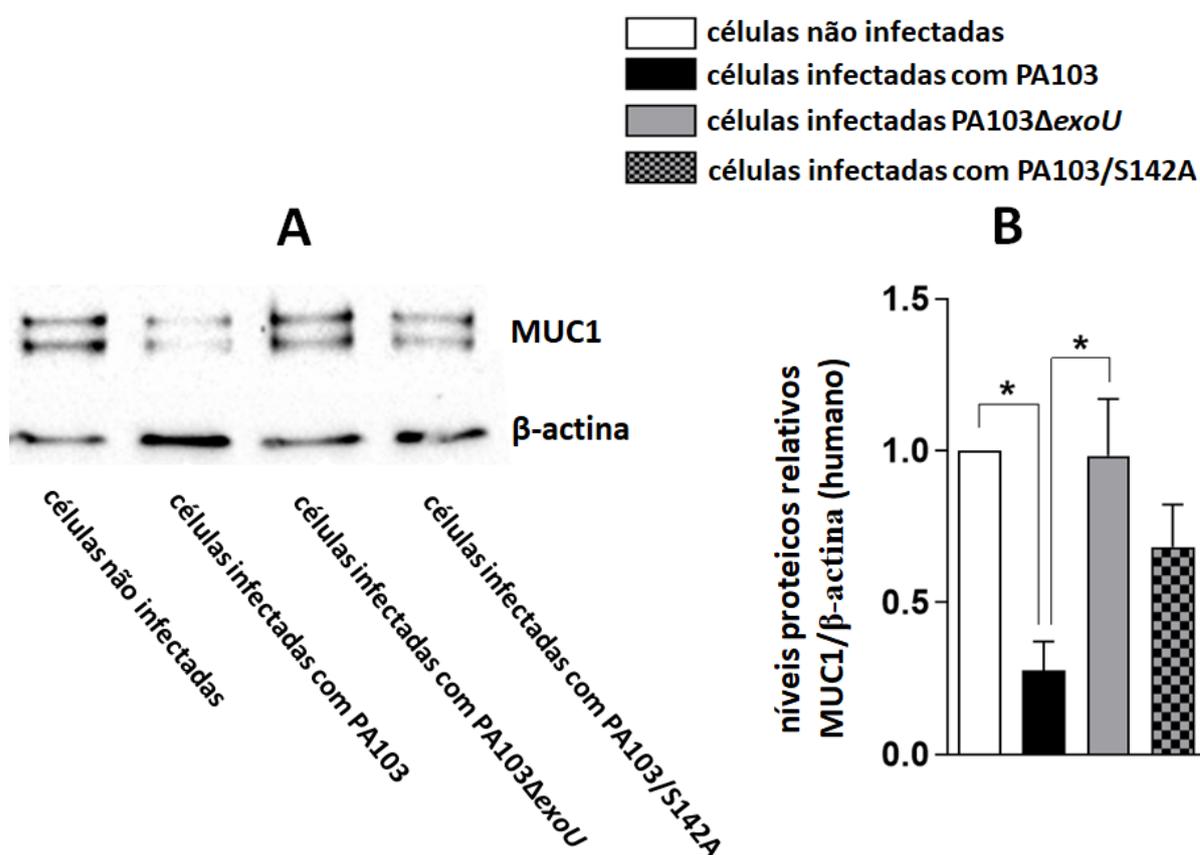
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, PA103ΔexoU ou PA103/S142A, ou tratadas apenas com meio de cultura (não infectadas), por 18h, para avaliação dos níveis de mRNA de MUC1 por RT-qPCR. O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de MUC1 obtidas em 3 ensaios independentes, usando o método $\Delta\Delta Ct$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando células infectadas pela cepa PA103 foram comparadas às células infectadas pela cepa PA103/S142A e PA103ΔexoU, respectivamente.

3.3 ExoU inibiu a expressão da proteína MUC1 em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *P. aeruginosa*

Para avaliar se a redução dos níveis de mRNA de MUC1 foi acompanhada da diminuição dos níveis desta proteína, foram realizados ensaios de *western blot* a partir de extratos proteicos de células A549 não infectadas ou infectadas por 20h com as cepas PA103, PA103ΔexoU ou PA103/S142A. Como mostrado na **Figura 8**, os níveis

da proteína MUC1 nas células infectadas com a cepa PA103 foram em média 70% menores do que os observados nas células infectadas com PA103 Δ exoU e nas células não infectadas, e 40% menores do que naquelas infectadas com PA103/S142A. Em conjunto, os resultados obtidos por RT-qPCR e *western blot* demonstraram que a ExoU selvagem levou à inibição significativa da transcrição e tradução de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa* em relação à cepa não produtora de ExoU.

Figura 8 - Efeito de ExoU nos níveis proteicos intracelulares de MUC1 em células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*



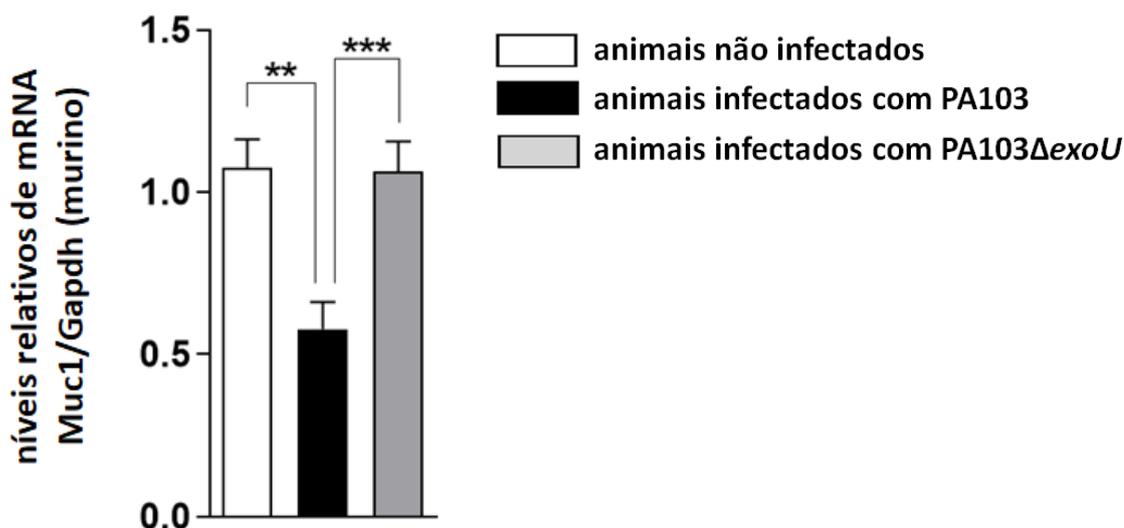
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, PA103 Δ exoU ou PA103/S142A, ou tratadas apenas com meio de cultura (não infectadas), por 20h, para avaliação dos níveis de proteína de MUC1 por *western blot*. **A)** Imagem representativa de 1 dos 3 ensaios independentes de *western blot*. **B)** O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de proteína de MUC1 de 3 ensaios independentes, obtidas por densitometria das bandas. * $p < 0,05$ quando células infectadas pela cepa PA103 foram comparadas às células infectadas com a cepa PA103 Δ exoU ou às células não infectadas.

3.4 ExoU inibiu a expressão de mRNA de Muc1 nos pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa*

Para avaliar se o efeito de ExoU sobre a expressão de MUC1 observado nos ensaios *in vitro* seria reproduzido *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram inoculados intratraquealmente com as cepas de *P. aeruginosa* PA103 ou PA103 Δ exoU, ou com soro fisiológico estéril (controle), por 18 horas, para análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR.

Conforme mostrado na **Figura 9**, os camundongos infectados com a cepa PA103 apresentaram a metade da expressão de mRNA de Muc1 observada nos animais infectados com PA103 Δ exoU ou no grupo controle. O grupo controle e os camundongos infectados com PA103 Δ exoU apresentaram a mesma expressão média de Muc1.

Figura 9 - Efeito de ExoU na transcrição de Muc1 nos pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa*



Legenda: Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados intratraquealmente com as cepas de *P. aeruginosa* PA103 (N = 19) ou PA103 Δ exoU (N = 12), ou com salina (N = 8), por 18h, para pesquisa dos níveis de mRNA de Muc1 nos pulmões, por RT-qPCR. O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de Muc1, usando o método $\Delta\Delta$ Ct. **p<0,01 e ***p<0,001 quando animais infectados pela cepa PA103 foram comparados aos animais controle ou infectados pela cepa PA103 Δ exoU, respectivamente.

3.5 A expressão de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa* é regulada pelas vias de JNK e NF-κB

Para compreender quais vias de sinalização celular estariam envolvidas na inibição da expressão de MUC1 por ExoU, as culturas celulares foram pré-tratadas com inibidores de MAPK e NF-κB e infectadas por 18 horas para avaliar a expressão de mRNA de MUC1 por RT-qPCR.

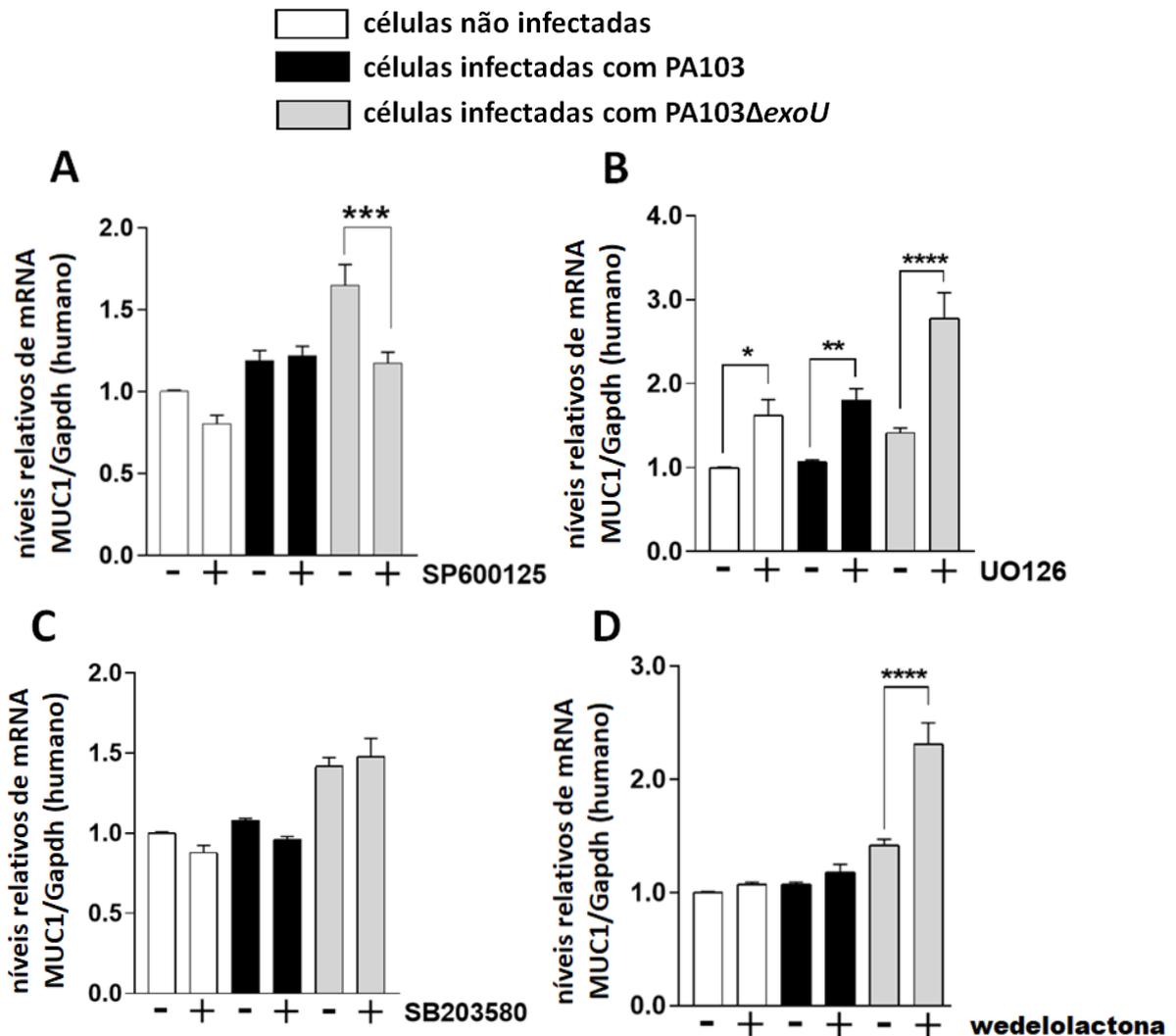
As culturas celulares tratadas com o inibidor de JNK (SP600125) e infectadas com PA103Δ*exoU* apresentaram menor expressão de mRNA de MUC1 do que aquelas tratadas apenas com DMSO e infectadas com a mesma cepa. Além disso, as células tratadas com SP600125 e infectadas com PA103Δ*exoU* e as células tratadas com SP600125 e infectadas com PA103 expressaram níveis equivalentes de mRNA de MUC1. Dessa maneira, SP600125 reduziu a expressão de MUC1 em culturas infectadas com a cepa não produtora de ExoU ao mesmo nível expresso por culturas infectadas pela cepa produtora de ExoU. Portanto, a regulação positiva de MUC1 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* dependeu da ativação de JNK. Esses achados sugerem que ExoU suprime a capacidade celular de aumentar a expressão de MUC1 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* mediante a inibição da via de sinalização de JNK. O tratamento com SP600125 não afetou a expressão de MUC1 nas células infectadas com PA103, possivelmente porque ExoU já havia inibido a sinalização abaixo de JNK (**Figura 10A**).

O inibidor de MEK, UO126, aumentou a expressão de MUC1 em todas as variáveis, indicando que a via de sinalização de MEK inibe a expressão de MUC1 de um modo que não é afetado pela infecção por *P. aeruginosa* (**Figura 10B**).

Não foram observadas mudanças na expressão de MUC1 quando as culturas foram tratadas com inibidor de P38, SB203580, indicando que a expressão de MUC1 por estas células não depende da ativação de P38 (**Figura 10C**).

O inibidor da ativação de NF-κB P50/p65, wedelolactona, elevou ainda mais a expressão de MUC1 nas células infectadas pela cepa não produtora de ExoU. Assim, a ativação de NF-κB inibiu a parcialmente a expressão de MUC1 na infecção por PA103Δ*exoU* (**Figura 10D**).

Figura 10- Efeito dos inibidores de MAPK e NF- κ B sobre a expressão de mRNA de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa*



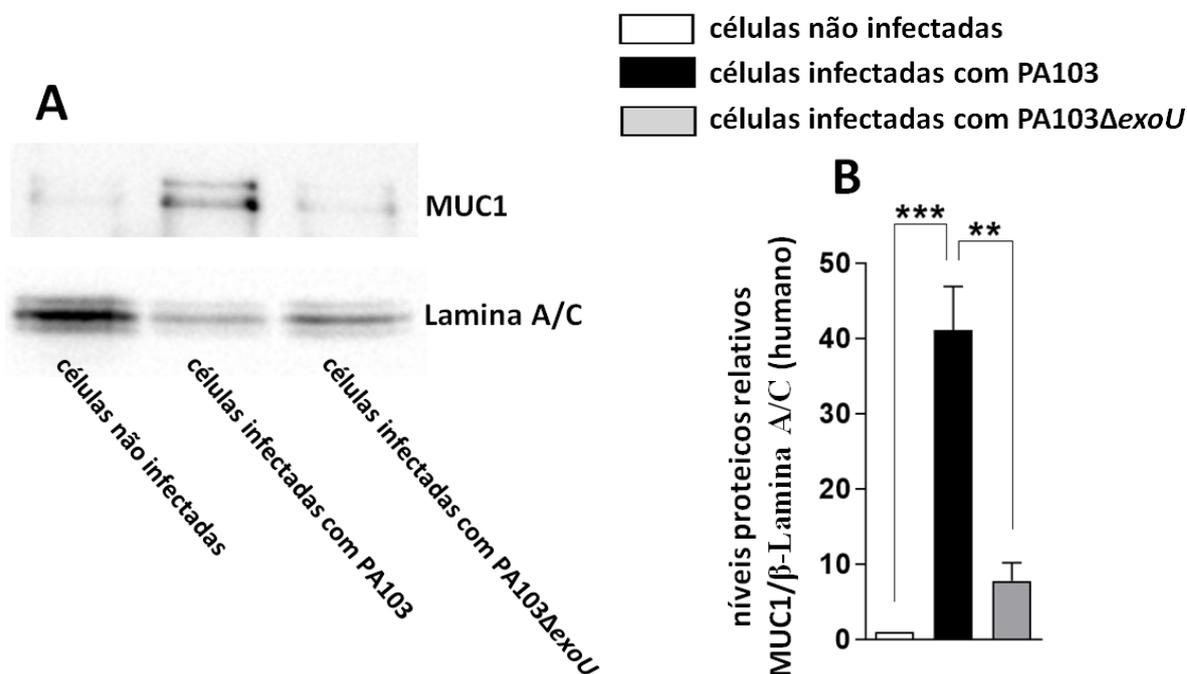
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com inibidores de JNK (SP600125) (A), MEK1/2 (UO126) (B), P38 (SB203580) (C) ou NF- κ B (wedelolactona) (D) e infectadas com as cepas PA103 ou PA103 Δ exoU de *P. aeruginosa*, por 18h, para avaliação dos níveis de mRNA de MUC1 por RT-qPCR. Os gráficos representam as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de MUC1 obtidos em 3 ensaios independentes, usando o método $\Delta\Delta$ Ct. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001.

3.6 Pesquisa da translocação nuclear de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa*

Para investigar se ExoU seria capaz de interferir na translocação nuclear de MUC1, células A549 foram infectadas com as cepas PA103 ou PA103 Δ exoU de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura, por 20 horas, para análise das proteínas nucleares por *western-blot*.

A quantidade de MUC1 no núcleo das células infectadas com a cepa PA103 foi, em média, 41 vezes maior do que a encontrada nas células controle e 5,3 vezes maior do que nas células infectadas com PA103 Δ exoU (Figura 11).

Figura 11 - Efeito de ExoU na translocação nuclear de MUC1 em células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103 ou PA103 Δ exoU, ou tratadas apenas com meio de cultura (não infectadas), por 20 horas, para avaliação dos níveis nucleares de MUC1 por *western blot*. **A)** Imagem representativa de 1 dos 3 ensaios independentes de *western blot*. **B)** O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis nucleares de proteína de MUC1 de 3 ensaios independentes, obtidas por densitometria das bandas. ** p < 0,01, *** p < 0,001, quando células infectadas pela cepa PA103 foram comparadas às células infectadas com a cepa PA103 Δ exoU ou às células não infectadas.

A descoberta de que ExoU desencadeou um aumento na translocação nuclear de MUC1 levantou a hipótese de que esse evento poderia afetar a resposta inflamatória durante a infecção por *P. aeruginosa*. Para esclarecer essa questão, as culturas foram tratadas com GO-201, um inibidor da translocação de MUC1, e avaliadas quanto à geração de EROs e citocinas inflamatórias.

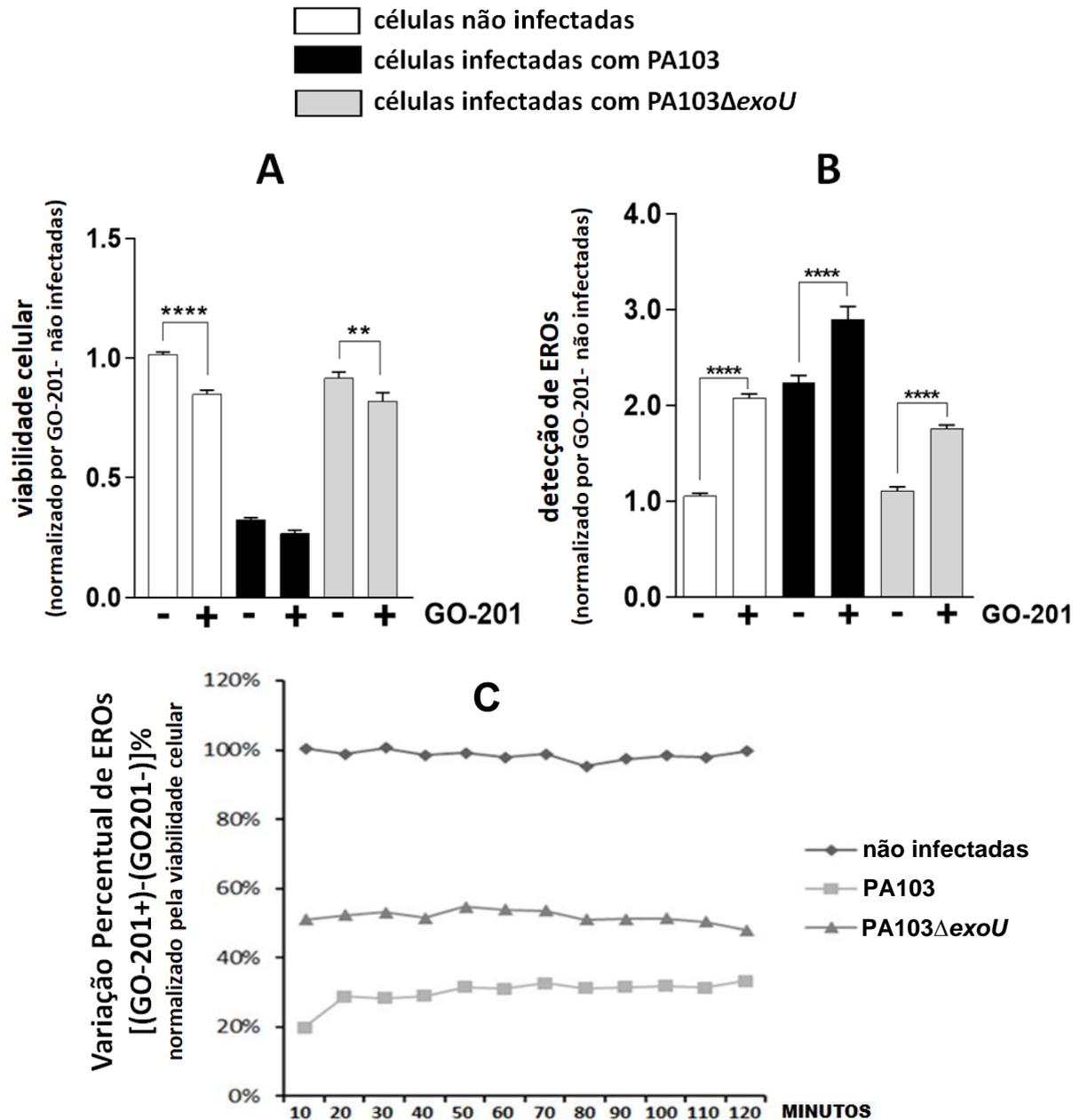
3.7 Efeito de MUC1 nos níveis de EROs durante a infecção por *P. aeruginosa*

Para avaliar o efeito de MUC1 na produção de EROs durante a infecção por *P. aeruginosa*, culturas de células A549 foram infectadas usando-se GO-201 ou não. Concomitantemente, foram realizados ensaios de redução de MTT para avaliar se o inibidor afetou a viabilidade celular.

Com base nos ensaios de MTT, as culturas infectadas com PA103 apresentaram viabilidade celular aproximadamente 70% menor que as células não infectadas, confirmando o efeito citotóxico de ExoU. O inibidor de MUC1, GO-201, causou uma redução da viabilidade celular de 16,85%, 5,7% e 9,5%, nas culturas controle, infectadas com PA103 e infectadas com PA103 Δ exoU, respectivamente (**Figura 12A**).

Foram observados níveis de EROs notavelmente mais elevados em culturas infectadas com PA103 em comparação com aqueles observados no controle e nas células infectadas pela cepa deficiente em ExoU, com e sem tratamento com GO-201. As células infectadas com PA103 Δ exoU e o controle mostraram níveis semelhantes de EROs, com ou sem tratamento com GO-201. O tratamento com GO-201 aumentou significativamente os níveis de EROs em todos os casos (**Figura 12B**). O aumento dos níveis de EROs observado foi de aproximadamente 100% no controle, 30% nas células infectadas com PA103 e 51% nas infectadas com PA103 Δ exoU, mostrando-se relativamente estável ao longo de todo o período de 120 minutos nos quais foram realizadas as leituras de detecção (**Figura 12C**).

Figura 12 - Efeito do inibidor de MUC1 GO-201 na viabilidade celular e nos níveis de EROs durante a infecção por *P. aeruginosa*



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com meio de cultura (controle) ou infectadas com as cepas PA103 ou PA103ΔexoU, usando ou não o inibidor de MUC1, GO-201. Após 19h de infecção, as células foram tratadas com a sonda CM-H2DCFDA para detecção de EROs, incubadas por mais 1h e analisadas por leitura de fluorescência. Concomitantemente, foi realizado o ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular. **(A)** O gráfico representa as médias ± SEM da viabilidade celular detectada em 3 ensaios independentes de redução do MTT, normalizando as variáveis de acordo com as leituras obtidas em células não infectadas e não tratadas com GO-201 (100% de viabilidade). **(B)** GO-201 promoveu um aumento significativo dos níveis de EROs em todas as variáveis. O gráfico representa as médias ± SEM de 3 ensaios independentes de detecção de EROs, realizada 60 minutos após a incubação com a sonda CM-H2DCFDA. Os valores foram normalizados de acordo com as leituras obtidas em células não infectadas e não tratadas com GO-201. **(C)** O gráfico representa as médias, obtidas a partir de 3

experimentos independentes, da diferença percentual entre a detecção de EROs em células tratadas e não tratadas com o inibidor GO-201. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

3.8 Efeito de MUC1 na secreção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por *P. aeruginosa*

Para verificar se a translocação nuclear de MUC1 interfere na secreção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por *P. aeruginosa*, células A549 foram tratadas com GO-201 durante os ensaios de infecção. Os níveis de IL8, IL-6 e TNF acumulados nos sobrenadantes, recuperados 20 horas após a infecção, foram analisados por ELISA e normalizados pelo número de células em cada variável após o período de infecção.

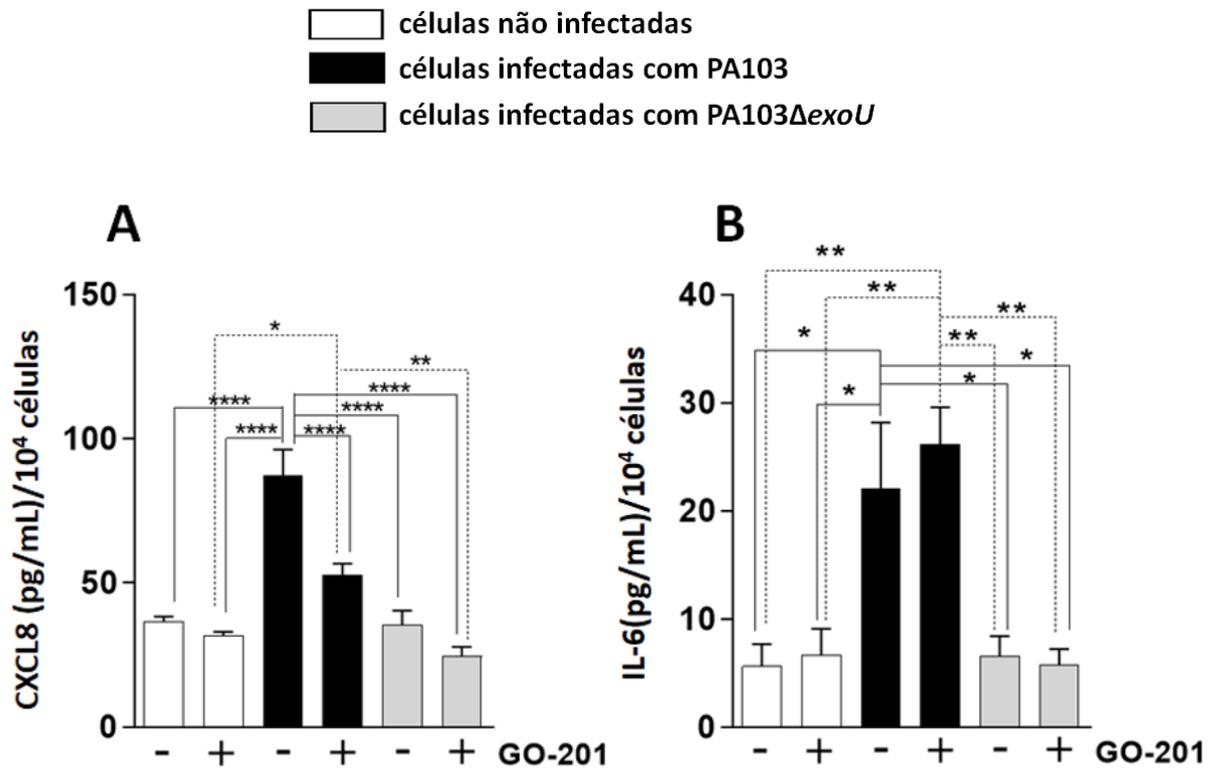
As culturas infectadas com a cepa produtora de ExoU mostraram um aumento significativo na secreção de CXCL8 e IL-6, enquanto as culturas infectadas com a cepa deficiente em ExoU secretaram os mesmos níveis que as células não infectadas (**Figura 13**). Assim, ExoU regulou positivamente a secreção de CXCL8 e IL-6.

O tratamento com GO-201 promoveu uma diminuição média de 40% nos níveis de CXCL8 nos sobrenadantes das células infectadas com PA103. Entretanto, o tratamento com GO-201 não provocou diminuição significativa nos níveis de CXCL8 secretados pelas células infectadas com PA103 Δ exoU, nem pelas células não infectadas (**Figura 13A**).

Embora as células infectadas com a cepa PA103 tenham secretado quantidades significativamente maiores de IL-6 do que as infectadas com a cepa PA103 Δ exoU e do que o controle, o inibidor GO-201 não afetou significativamente a expressão de IL-6 em nenhuma das variáveis (**Figura 13B**).

Os níveis de TNF nos sobrenadantes das diferentes culturas celulares foram indetectáveis aos ensaios de ELISA.

Figura 13 - Efeito do inibidor da MUC1 GO-201 nos níveis secretados de CXCL8 e IL-6, durante a infecção por *P. aeruginosa*



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas PA103 ou PA103 Δ exoU de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura, por 20 horas, usando ou não o inibidor de MUC1, GO-201, para detecção da concentração de CXCL8 e IL-6 acumulados nos sobrenadantes, por ELISA. Os gráficos representam as médias \pm SEM das concentrações de CXCL8 (**A**) e IL-6 (**B**), presentes nos sobrenadantes de culturas celulares de 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.9 ExoU induziu o aumento da transcrição de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *P. aeruginosa*

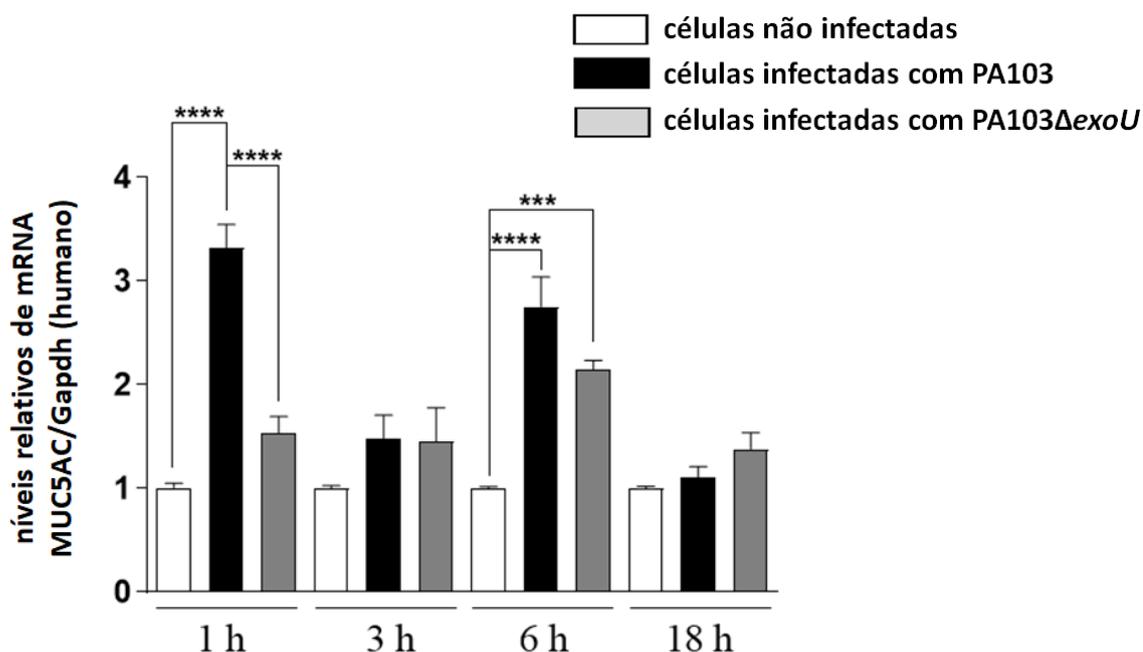
Para avaliar se ExoU é capaz de interferir na expressão de MUC5AC durante a infecção por *P. aeruginosa*, inicialmente, células A549 foram infectadas por 1, 3, 6 e 18h com as cepas PA103 ou PA103 Δ exoU, ou tratadas com meio de cultura (controle), para detecção dos níveis de mRNA de MUC5AC por RT-qPCR.

Conforme apresentado na **Figura 14**, após 1h da infecção, as células infectadas com a cepa PA103 expressaram níveis de mRNA de MUC1 significativamente maiores do que o controle e as células infectadas com a mutante PA103 Δ exoU.

Após 6h da infecção, tanto as células infectadas com PA103 quanto aquelas infectadas com PA103 Δ exoU apresentaram níveis de mRNA de MUC5AC significativamente maiores do que o controle, porém não apresentaram diferença significativa entre si (**Figura 14**).

Nos tempos de 3 e 18 horas após a infecção, não se observou diferença significativa na expressão de mRNA de MUC5AC entre as células infectadas e o controle (**Figura 14**).

Figura 14 - Efeito de ExoU na expressão de mRNA de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *P. aeruginosa*.



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas PA103 ou PA103ΔexoU de *P. aeruginosa*, por 1, 3, 6 e 18h, para avaliação dos níveis de mRNA de MUC5AC por RT-qPCR. O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de MUC5AC obtidas em 3 ensaios independentes, usando o método $\Delta\Delta Ct$. ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

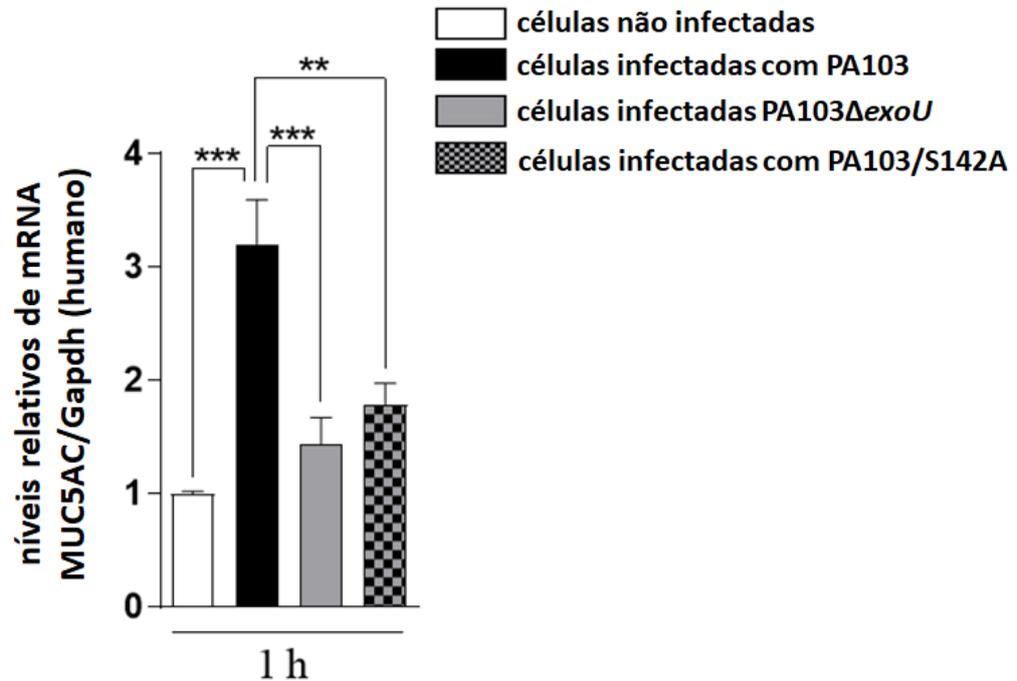
3.10 Durante a infecção por *P. aeruginosa*, o aumento da transcrição de MUC5AC induzido por ExoU depende de sua atividade PLA2

Para esclarecer se o aumento da transcrição de MUC5AC observado anteriormente decorreu da atividade PLA2 de ExoU, as culturas celulares foram infectadas, por 1h, com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, PA103ΔexoU ou PA103/S142A, ou tratadas com meio de cultura (controle), para avaliação dos níveis de mRNA por RT-qPCR.

Os resultados obtidos mostraram que células infectadas com a cepa PA103 expressaram níveis de mRNA de MUC5AC significativamente maiores do que o controle e as células infectadas com as cepas mutantes PA103/S142A e PA103ΔexoU. Não foram observadas diferenças significativas entre células infectadas com a cepa PA103/S142A, células infectadas com a cepa PA103ΔexoU e células não

infectadas (**Figura 15**). Estes resultados mostram que a indução na expressão de MUC5AC causada por ExoU está relacionada à sua atividade PLA2.

Figura 15 - Efeito da atividade PLA2 de ExoU na indução da transcrição MUC5AC em células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*.



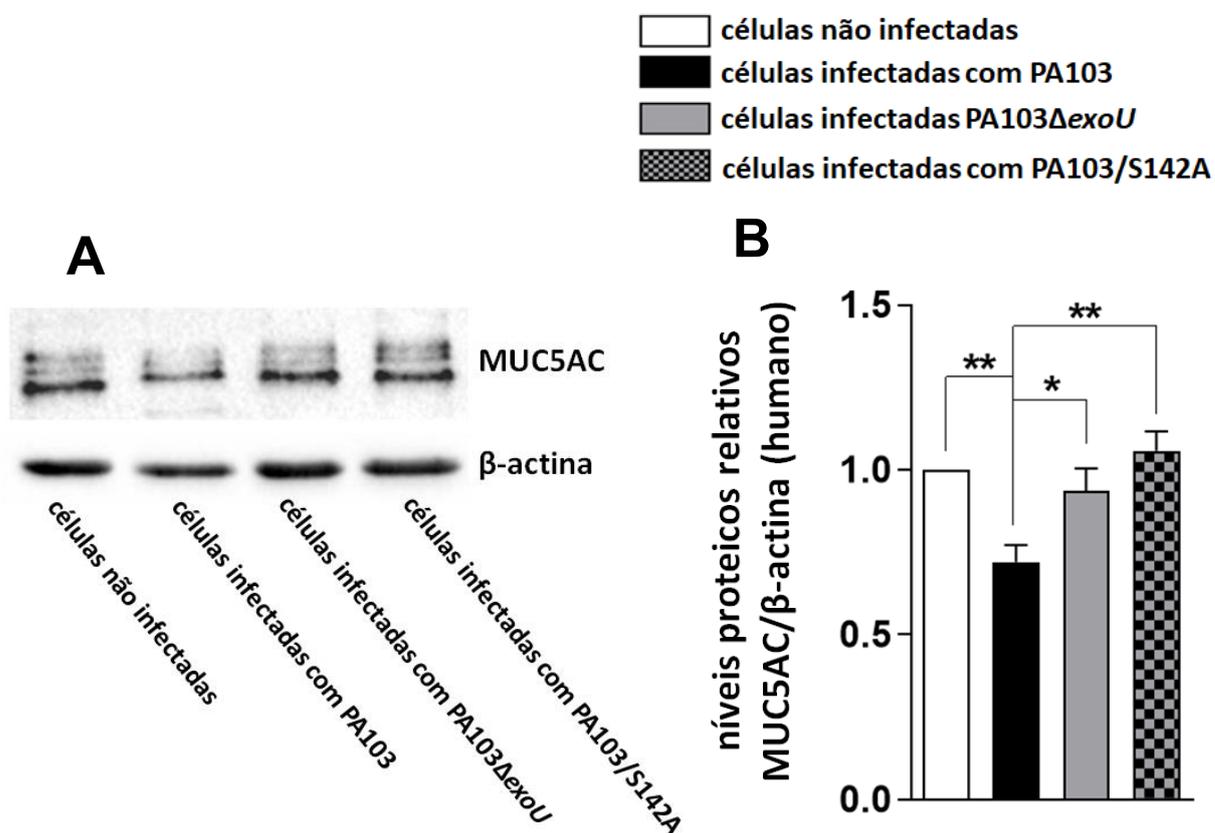
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, PA103ΔexoU ou PA103/S142A, ou tratadas apenas com meio de cultura (não infectadas), por 1h, para avaliação dos níveis de mRNA de MUC5AC por RT-qPCR. O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de MUC5AC obtidas em 3 ensaios independentes, usando o método $\Delta\Delta Ct$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.11 ExoU promoveu a redução dos níveis proteicos intracelulares de MUC5AC em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *P. aeruginosa*

Complementarmente, os níveis de proteína de MUC5AC em culturas de células A549 foram avaliados 2h após a infecção com as cepas PA103, PA103 Δ exoU ou PA103/S142A, por *western blot*.

Conforme mostrado na **Figura 16**, as células infectadas com a cepa PA103 apresentaram menores níveis proteicos de MUC5AC, em comparação ao controle e às células infectadas com as cepas PA103/S142A e PA103 Δ exoU. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis proteicos de MUC5AC entre as células controle e as células infectadas com as cepas PA103/S142A ou PA103 Δ exoU.

Figura 16 - Efeito de ExoU nos níveis proteicos intracelulares de MUC5AC em células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*.



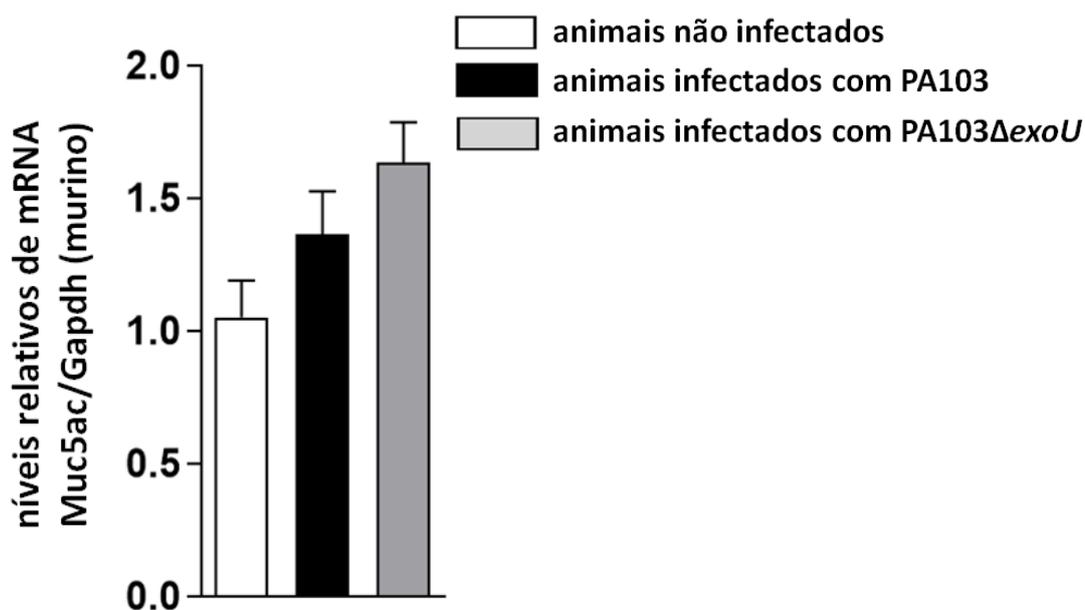
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, PA103 Δ exoU ou PA103/S142A, ou tratadas apenas com meio de cultura (não infectadas), por 2 horas, para avaliação dos níveis de proteína de MUC5AC por *western blot*. **A)** Imagem representativa de 1 dos 3 ensaios independentes de *western blot*. **B)** O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de proteína de MUC5AC de 3 ensaios independentes, obtidas por densitometria das bandas. *p < 0,05, **p < 0,01.

3.12 Avaliação da expressão de Muc5AC nos pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa*

Para avaliar se o perfil da expressão de MUC5AC observado em culturas celulares seria reproduzido em modelo animal, camundongos C57BL/6 foram inoculados intratraquealmente com as cepas PA103 ou PA103 Δ exoU, ou com soro fisiológico estéril (controle), para análise dos níveis de mRNA de Muc5AC, por RT-qPCR.

Os resultados mostraram que, após 1h de infecção, os pulmões dos camundongos infectados com as cepas PA103 e PA103 Δ exoU e o grupo controle, não apresentaram níveis de mRNA de MUC5AC significativamente diferentes entre si (Figura 17).

Figura 17- Efeito de ExoU na transcrição de Muc5AC nos pulmões de camundongos, durante a infecção por *P. aeruginosa*



Legenda: Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados intratraquealmente com as cepas de *P. aeruginosa* PA103 (N = 9) ou PA103 Δ exoU (N = 5), ou com salina (N = 5), por 1h, para pesquisa dos níveis de mRNA de Muc5AC nos pulmões, por RT-qPCR. O gráfico representa as médias \pm SEM das quantificações relativas dos níveis de mRNA de Muc5AC, usando o método $\Delta\Delta$ Ct.

4 DISCUSSÃO

A expressão das mucinas é influenciada por uma variedade de mediadores infecciosos e inflamatórios, como por exemplo, os fatores de virulência dos patógenos, o balanço REDOX e as citocinas liberadas pelo hospedeiro (LILLEHOJ *et al.*, 2013). Como ExoU é capaz de induzir o estresse oxidativo e de modular a secreção de citocinas inflamatórias, avaliamos aqui o seu efeito na expressão de MUC1 e MUC5AC, duas mucinas importantes na resposta imune das vias respiratórias.

No contexto das infecções bacterianas, MUC1 pode atuar tanto como um ligante direto aos patógenos, quanto como um regulador da resposta imune. Alguns patógenos são capazes de induzir alterações na expressão de MUC1 durante o processo infeccioso, e esta modulação pode favorecer ou restringir a infecção (BOSE; MUKHERJEE, 2020).

Durante a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, MUC1 regula a resposta inata, reduzindo a inflamação e o dano tecidual (LU *et al.*, 2006; UMEHARA *et al.*, 2012). Estudos realizados com uma cepa *exoU*- de *P. aeruginosa* demonstraram que a flagelina bacteriana se liga a MUC1 (LILLEHOJ; KIM; KIM, 2002), promovendo a clivagem e a liberação do ectodomínio desta mucina (LILLEHOJ *et al.*, 2015), o que afeta as propriedades adesivas de MUC1. Porém, os fatores de virulência de *P. aeruginosa* que interferem na expressão de MUC1 para modular as vias de sinalização celular do hospedeiro ainda não foram identificados. Como a expressão de MUC1 é induzida por EROs (KUWAHARA *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2003) e por citocinas inflamatórias (GAEMERS *et al.*, 2001; KOGA *et al.*, 2007; LAGOW; CARSON, 2002; LI *et al.*, 2003), duas características acentuadas na infecção por cepas produtoras de ExoU, investigamos se esta exotoxina seria capaz de induzir alterações na expressão de MUC1 durante a infecção por *P. aeruginosa*.

Dado que MUC1 é predominantemente expressa por células epiteliais (LILLEHOJ *et al.*, 2013) e que a resposta das células epiteliais alveolares é crucial para a evolução da pneumonia, avaliou-se o efeito de ExoU na produção de MUC1 em células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549. Os resultados mostraram que estas células respondem à infecção por *P. aeruginosa* aumentando a expressão de MUC1, porém, quando a bactéria secreta ExoU, a atividade PLA2 deste fator de virulência inibe a expressão tanto do mRNA quanto da proteína MUC1.

Ensaio *in vitro* permitem o aprofundamento do estudo da resposta de tipos celulares específicos, mas, assim como todos os modelos de pesquisa, também apresentam limitações, como a ausência de interação entre os diferentes tipos celulares e moléculas solúveis que compõem os organismos vivos. Com o objetivo de validar o achado inicial obtido *in vitro*, camundongos foram infectados com as cepas produtora e não produtora de ExoU para avaliar a expressão de Muc1 nos pulmões. Estes experimentos *in vivo* corroboraram os resultados obtidos *in vitro*, já que os animais infectados pela cepa produtora de ExoU apresentaram aproximadamente metade dos níveis de mRNA de Muc1 presentes nos animais infectados pela cepa mutante deficiente em ExoU.

Embora estudos anteriores tenham relatado o aumento da expressão de Muc1 nas vias aéreas de camundongos (CHOI *et al.*, 2011) e de MUC1 em células humanas (KATO; HANSS; *et al.*, 2017) infectados por *P. aeruginosa*, todos esses estudos foram realizados com cepas não produtoras de ExoU. Portanto, o presente trabalho descreve, pela primeira vez, o efeito inibitório de um fator de virulência de *P. aeruginosa* sobre a expressão de MUC1.

ExoU é capaz de interferir em várias vias de sinalização celular, inclusive AP-1 (MCMORRAN *et al.*, 2003) e NF- κ B (MALLET DE LIMA *et al.*, 2012), que podem regular a expressão de MUC1 (AHMAD *et al.*, 2009; LAGOW; CARSON, 2002; LEE *et al.*, 2017). Assim, buscou-se esclarecer se a inibição da expressão de MUC1 por PA103 teria sido provocada pela interferência de ExoU em alguma dessas vias.

Os resultados mostraram que, na ausência de ExoU, outro fator de virulência de *P. aeruginosa* induz a expressão de MUC1 pela ativação de JNK, já que a inibição desta via reduziu a expressão de MUC1 em culturas infectadas com a cepa deficiente em ExoU ao mesmo nível expresso por culturas infectadas com a cepa produtora ExoU. Assim, ExoU provavelmente inibe a via de JNK, suprimindo a capacidade da célula de aumentar a expressão de MUC1 em resposta à infecção. Já a via de NF- κ B parece inibir parcialmente a ativação da expressão de MUC1 em resposta ao outro fator de virulência de *P. aeruginosa*, uma vez que a inibição de IKK aumentou ainda mais os níveis de mRNA de MUC1 em culturas infectadas com a cepa deficiente em ExoU.

P. aeruginosa possui vários fatores de virulência que podem induzir alterações na síntese de proteínas do hospedeiro, como LPS, fosfolipases, exoproteases, fenazinas, vesículas da membrana externa, SST3, flagelo e pili (BALLOK; O'TOOLE,

2013). Diferentes trabalhos mostraram que o LPS induz a ativação de JNK pela via LPS-TLR4-JNK (JANG *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018). O LPS induz, também, a ativação da expressão de MUC1 (ZHANG *et al.*, 2014). Células A549 estimuladas com LPS exibiram aumento na expressão de mRNA e proteína de MUC1. Além disso, camundongos C57BL/6 tratados com LPS apresentaram um aumento da concentração de MUC1 no líquido de lavagem broncoalveolar (LBA), bem como no tecido pulmonar (ZHANG *et al.*, 2014). Assim, é possível que, no modelo de infecção do presente trabalho, o LPS de *P. aeruginosa* estimule a expressão de MUC1, enquanto ExoU a inibe.

Vários estudos relatam que o fator de transcrição Sp1 ativa a expressão de MUC1 (KOGA *et al.*, 2007; KOVARIK *et al.*, 1996; KUWAHARA *et al.*, 2005; KUWAHARA *et al.*, 2007; MORRIS; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, 2001). Além disso, foi demonstrado que JNK promove a fosforilação de Sp1 e a transativação de seus genes alvo (BENASCIUTTI *et al.*, 2004; CHUANG *et al.*, 2008; HIGUCHI *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2009; SROKA; NAGLE; BOWDEN, 2007). Adicionalmente, ensaios *in vitro* mostraram que JNK1 fosforila Sp1 diretamente na presença de ATP (CHU; FERRO, 2006). A importância da ativação de Sp1 para a indução da expressão de MUC1 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* e a capacidade de ExoU de interferir nesta via de sinalização celular são pontos que ainda precisam ser investigados.

A cauda citoplasmática de MUC1 contém vários sítios que podem ser fosforilados por receptores tirosina-quinases, como o EGFR, ou por outras tirosina-quinases, como a família Src, Abl, PKC δ , GSK3 β e ZAP70. A fosforilação da MUC1-CT regula sua capacidade de interferir nas vias de sinalização intracelular, inibindo ou estimulando a inflamação por meio da interação com TLR e fatores de transcrição (AHMAD *et al.*, 2009; DENNENY *et al.*, 2020; KUFÉ, 2009). Após sofrer fosforilação, MUC1-CT pode se associar a fatores transcricionais, como a subunidade p65 de NF- κ B, STAT1/3 e ER α , contribuindo para a transativação de seus genes-alvo (KUFÉ, 2013).

Levando-se em conta esta capacidade de MUC1 de translocar para o núcleo e atuar junto a fatores de transcrição, buscou-se elucidar se ExoU seria capaz de interferir no endereçamento nuclear de MUC1. Curiosamente, embora ExoU tenha reduzido a expressão total de MUC1, a quantidade de MUC1 no núcleo das células

infectadas com PA103 foi notavelmente maior do que no controle e nas células infectadas com a cepa não produtora de ExoU, PA103 Δ exoU.

O transporte de MUC1-C da membrana celular para o núcleo ocorre através de um processo de endocitose mediado pela clatrina (KINLOUGH *et al.*, 2004). No citoplasma, MUC1-C dimeriza, formando ligações dissulfeto entre os motivos Cys-Gln-Cys (CQC) localizados na sua cauda citoplasmática. A importina- β associa-se a esses oligômeros de MUC1-C e os entrega à nucleoporina Nup62, que, finalmente, transporta MUC1-C ao núcleo (LENG *et al.*, 2007).

A dimerização de MUC1-C é necessária à sua translocação nuclear. No entanto, em condições normais, as altas concentrações citosólicas de glutathiona reduzida impedem a formação de ligações dissulfeto (CHAKRAVARTHI; JESSOP; BULLEID, 2006), mantendo um ambiente desfavorável à dimerização do MUC1-C. Um estudo mostrou que o tratamento de culturas de células com agentes redutores bloqueou a dimerização de MUC1-C, enquanto que o tratamento com H₂O₂, para induzir estresse oxidativo, aumentou significativamente a formação de dímeros de MUC1-C (RAINA *et al.*, 2012). Nossos ensaios mostraram que ExoU promoveu um aumento nos níveis intracelulares de EROs. Além disso, um estudo anterior demonstrou que ExoU induz uma redução significativa nos níveis intracelulares de glutathiona reduzida (DA CUNHA *et al.*, 2015). Assim, ExoU fornece condições favoráveis para a formação de ligações dissulfeto necessárias para a dimerização e translocação nuclear de MUC1-C, o que poderia explicar o maior acúmulo de MUC1 observado no núcleo das células infectadas com a cepa PA103.

Além de ser regulado por EROs (YIN *et al.*, 2003) e citocinas inflamatórias (GAEMERS *et al.*, 2001; LAGOW; CARSON, 2002; LI *et al.*, 2003), MUC1 também pode interferir nas vias de sinalização envolvidas no estresse oxidativo e na inflamação (KATO; LILLEHOJ; *et al.*, 2017; KIM; LILLEHOJ, 2008; UENO *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2003). Sendo assim, foi avaliada a participação de MUC1 no aumento da produção de EROs e da secreção de citocinas inflamatórias induzido por ExoU (DA CUNHA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2011; MALLET DE LIMA *et al.*, 2012), pelo tratamento das culturas celulares com GO-201, um inibidor de MUC1.

Um estudo anterior demonstrou que, 1h após a infecção, ExoU foi capaz de induzir um desequilíbrio REDOX com um aumento de mais de 50% na produção de EROs pelas células infectadas (DA CUNHA *et al.*, 2015). Em nossos ensaios, as células infectadas com PA103 apresentaram níveis de EROs notavelmente mais altos

do que aquelas infectadas com PA103 Δ exoU ou o controle, mesmo decorridas 20 horas após a infecção, indicando que ExoU exerce um efeito prolongado no equilíbrio REDOX.

MUC1 leva à atenuação dos níveis endógenos e intracelulares de EROs, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (YIN *et al.*, 2003). Em nossos ensaios, o tratamento das células epiteliais com GO-201 aumentou significativamente os níveis de EROs em todas as variáveis, indicando que MUC1 interfere no balanço REDOX, atenuando os níveis de EROs, de maneira independente de infecção ou de ExoU.

Como ExoU é um potente ativador da inflamação durante o processo infeccioso, buscou-se avaliar o papel de MUC1 na indução da secreção de citocinas inflamatórias mediada por ExoU.

Em modelo murino de pneumossepe, ExoU promoveu o aumento da secreção de IL-6 no LBA de camundongos infectados (MACHADO *et al.*, 2011). Nossos ensaios mostraram que ExoU também é capaz de induzir a secreção de IL-6 por células epiteliais respiratórias. No entanto, o tratamento com GO-201 não interferiu significativamente na secreção de IL-6 em nenhuma das variáveis estudadas, indicando que, no nosso modelo, MUC1 não afeta a secreção desta citocina.

Modelos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a prostaglandina-E2 induz a secreção de IL-6 nas vias aéreas de maneira dose dependente, ativando os receptores EP-1, EP-2 e EP-4 (CHO *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2010; TAVAKOLI *et al.*, 2001). Como ExoU promove uma potente liberação de prostaglandina-E2 em culturas celulares e no LBA de camundongos infectados por *P. aeruginosa* (SALIBA *et al.*, 2005), é possível que o aumento da secreção de IL-6 desencadeado por ExoU seja decorrente da produção de prostaglandina-E2 induzida por este fator de virulência.

Como relatado em estudos anteriores (MALLET DE LIMA *et al.*, 2014), ExoU induziu o aumento da secreção de CXCL8 em nosso estudo. Mais importantemente, o tratamento com GO-201, que bloqueia o motivo CQC na cauda citoplasmática de MUC1-C, inibindo a homodimerização e translocação de MUC1 para o núcleo e a formação do complexo MUC1/p65 (AHMAD *et al.*, 2017; AHMAD *et al.*, 2009), inibiu a expressão de CXCL8, evidenciando a relação entre o endereçamento nuclear de MUC1 induzido por ExoU e a maior expressão de CXCL8 durante a infecção pela cepa PA103. Portanto, este resultado demonstrou que o aumento da secreção de CXCL8 promovido por ExoU é dependente da translocação nuclear de MUC1.

Mallet de Lima *et al.* (2014) demonstraram que, durante a infecção pela cepa PA103, ExoU induz a expressão de CXCL8 em células A549 e de KC em camundongos, ao promover a translocação nuclear do heterodímero p65/p50 de NF- κ B. Este mesmo estudo também mostrou a ligação de p65 ao sítio κ B localizado no promotor de CXCL8. Possivelmente, a translocação nuclear de MUC1 induziu a formação do complexo MUC1/p65, que pode ter agido sinergicamente com p65/p50 na ativação de CXCL8.

Assim, ExoU induziu um efeito pro-inflamatório de MUC1 ao utilizá-la como um mediador da expressão de CXCL8. Em diferentes contextos, como em malignidades ou infecções crônicas, MUC1 pode contribuir para a inflamação e lesão tecidual (BOSE; MUKHERJEE, 2020; CASCIO; ZHANG; FINN, 2011). A superexpressão de MUC1 pode desorganizar as junções intercelulares pela inibição da formação do complexo E-caderina/ β -catenina. MUC1-CT compete com a E-caderina pela ligação à β -catenina. Além disso, MUC1 inibe a expressão da E-caderina (KONDO *et al.*, 1998; KUFU, 2009; LILLEHOJ *et al.*, 2007). Desse modo, MUC1 compromete a integridade epitelial, facilitando a invasão por patógenos (BOSE; MUKHERJEE, 2020), a perda de polaridade celular e a transformação celular (KUFU, 2009; YUAN *et al.*, 2007). No núcleo, MUC1-C pode se complexar com β -catenina e ativar alvos transcricionais da via Wnt/ β -catenina, como ciclina D1 e c-Myc, que induzem hiperplasia no tecido mamário (LI *et al.*, 2011). Além disso, MUC1-C pode se associar a p65 ou a STAT1/3 e promover a transcrição de mediadores inflamatórios (AHMAD *et al.*, 2009; AHMAD *et al.*, 2007; CASCIO; ZHANG; FINN, 2011; KUFU, 2013).

O muco é um importante componente da imunidade inata, conferindo proteção às superfícies das mucosas do hospedeiro contra patógenos e agentes irritantes. Porém, quando produzido em excesso, o muco constitui um fator de risco ao sistema respiratório. A secreção excessiva de muco pode causar obstrução das vias aéreas, comprometimento das trocas gasosas e pneumonia obstrutiva, levando à insuficiência respiratória progressiva (IMAMURA *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2011). A hipersecreção de muco é uma manifestação marcante de doenças inflamatórias das vias aéreas, decorrendo principalmente do aumento da expressão de mucinas como parte da resposta inata das vias aéreas de mamíferos. O gene *MUC5AC* é altamente induzível, enquanto *MUC5B* se expressa constitutivamente nas células epiteliais e caliciformes das vias aéreas (GRAY *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2008; YANG, D. *et al.*, 2017). A expressão de *MUC5AC* pode ser induzida por compostos irritantes,

alérgenos, poluentes ou patógenos. Produtos microbianos, tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, podem desencadear processos de sinalização intracelular que levam à indução da secreção de MUC5AC (DOHRMAN *et al.*, 1998; KOHRI *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2018).

Clinicamente, a infecção dos pulmões por *P. aeruginosa* é, frequentemente, acompanhada pelo aumento da produção de muco. No contexto da infecção por *P. aeruginosa*, a hiperprodução de MUC5AC é mediada pela ativação de EGFR, induzida pela produção de EROs (CERVANTES-SANDOVAL *et al.*, 2009; CHIBA *et al.*, 2011; KOHRI *et al.*, 2002). As EROs são cruciais para a resposta inflamatória e podem modular vias de sinalização intracelular, como as de EGFR e MAPKs (NA *et al.*, 2018; YANG, D. *et al.*, 2017). A cascata de sinalização do EGFR é uma via comum pela qual diferentes estímulos induzem a expressão de MUC5AC nas vias aéreas (KOHRI *et al.*, 2002).

Vários trabalhos já demonstraram que o LPS de *P. aeruginosa* induz a produção de MUC5AC nas vias respiratórias, mediante a ativação da produção de EROs pela NADPH oxidase (DOHRMAN *et al.*, 1998; IMAMURA *et al.*, 2004; KOHRI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2013; SHAO; UEKI; NADEL, 2003). Neste processo, o reconhecimento do LPS pelo TLR4 induz a dimerização do complexo TLR4–MD2, promovendo a dimerização dos domínios TIR intracelulares de TLR4 e o recrutamento de moléculas adaptadoras, como MyD88 e a proteína quinase C (PKC). Subsequentemente, a PKC ativa a produção de EROs pela NADPH oxidase. O aumento dos níveis de EROs induz a expressão de EGFR e a secreção de seu agonista TGF- α , que, por sua vez, levam à regulação positiva da expressão de MUC5AC (PARK; LEE, 2013; PARK *et al.*, 2004; RONAN *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2008).

Citocinas e outros mediadores inflamatórios, como IL-1 β , TNF e elastase neutrofílica, podem estimular a hiperprodução de MUC5AC de um modo independente da ativação de EGFR, pela via COX2-PGE2. Estes mediadores induzem a produção de PGE2 pelas fosfolipases A₂ (PLA₂), iniciando a via da ciclooxigenase e estimulando a secreção de muco (AKABA *et al.*, 2018; GRAY *et al.*, 2004).

As fosfolipases A₂ citosólica (cPLA₂) e secretória (sPLA₂), são enzimas chave que controlam a liberação de ácido araquidônico. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é metabolizado pelas ciclooxigenases (COXs) e lipoxigenases (LOXs) para gerar mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (GARCIA-VERDUGO

et al., 2012; TANABE *et al.*, 2015). A prostaglandina E2 (PGE2) é um ligante dos receptores de prostanóides do tipo E (EP1-4). PGE2 ativa os receptores EP2 e EP4, que desencadeiam sinais que induzem a produção de MUC5AC nas vias aéreas (AKABA *et al.*, 2018; CHUNG *et al.*, 2009; GRAY *et al.*, 2004).

Outro fator de *P. aeruginosa* capaz de induzir a produção de MUC5AC é a flagelina, cujo reconhecimento pelos receptores extracelular TLR5 ou intracelular Naip, ativam a expressão de MUC5AC pela via MEK1/2-ERK (BEN MOHAMED *et al.*, 2012). Contudo, as cepas de *P. aeruginosa* empregadas neste trabalho são deficientes para expressão de flagelina.

Em nosso estudo, ExoU induziu a expressão do mRNA de MUC5AC de forma precoce, após apenas 1 hora de infecção. Da Cunha *et al.* (2015) demonstraram que, a partir de apenas 10 minutos de infecção, ExoU induziu um aumento significativo de EROs em células A549 infectadas com *P. aeruginosa*. Saliba *et al.* (2005) demonstraram que ExoU promoveu uma intensa liberação de ácido araquidônico em células endoteliais HMEC-1 infectadas com a cepa PA103 a partir de apenas 1h de infecção, promovendo um acentuado aumento na produção de PGE2 e PGI2 pela ação de COX. Assim, é possível que a expressão significativamente maior de MUC5AC, desencadeada por ExoU após 1h de infecção, seja decorrente dos maiores níveis de EROs e PGE2 induzidos por este fator de virulência.

Apesar de, após 1h de infecção, ExoU haver induzido os maiores níveis de mRNA de MUC5AC, as células infectadas com PA103 apresentaram níveis proteicos da mucina inferiores àquelas infectadas com PA103 Δ exoU ou PA103/S142A. Embora este resultado seja aparentemente incoerente, é possível que as células infectadas com a cepa PA103 tenham secretado maiores quantidades de MUC5AC neste período da infecção, resultando em níveis intracelulares mais baixos desta mucina. Estudos adicionais são necessários para elucidar esta questão.

Os estudos *in vivo* não mostraram diferença significativa nos níveis de mRNA de Muc5ac nos pulmões de camundongos infectados com PA103 ou com PA103 Δ exoU ou do grupo controle, após 1h de infecção. Dessa maneira, o resultado obtido no modelo animal não corroborou o observado nas culturas celulares. No modelo animal há mais variáveis envolvidas, pois a infecção se dá em um ambiente mais complexo, constituído por diversos tipos celulares e sujeito a ação de diversas citocinas e de outros mediadores que podem induzir um perfil de resposta diferenciado do modelo *in vitro*.

O estudo do papel das mucinas secretadas é fundamental para a compreensão da patogênese de infecções respiratórias. Embora a produção de MUC5AC seja importante para a evolução do processo infeccioso causado por *P. aeruginosa*, a compreensão do papel de ExoU nesse fenômeno ainda depende do aprofundamento deste estudo.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a atividade PLA2 de ExoU reduz os níveis de mRNA e proteína de MUC1, descrevendo-se, pela primeira vez, o efeito inibitório de um fator de virulência de *P. aeruginosa* sobre a expressão de MUC1. Além disso, ExoU induziu a translocação nuclear de MUC1, levando ao aumento da secreção de CXCL8. Aqui, sugerimos que a translocação nuclear de MUC1, induzida por ExoU, permita a formação do complexo MUC1/p65, o que contribui para a ativação da expressão de CXCL8.

Em relação a MUC5AC, embora ExoU tenha modulado sua expressão em um tempo precoce nos ensaios *in vitro*, o mesmo não foi observado nos ensaios em modelo animal.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; ALAM, M.; HASEGAWA, M.; UCHIDA, Y. *et al.* Targeting MUC1-C inhibits the AKT-S6K1-eIF4A pathway regulating TIGAR translation in colorectal cancer. **Mol Cancer**, 16, n. 1, p. 33, Feb 2 2017.
- AHMAD, R.; RAINA, D.; JOSHI, M. D.; KAWANO, T. *et al.* MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. **Cancer Res**, 69, n. 17, p. 7013-7021, Sep 1 2009.
- AHMAD, R.; RAINA, D.; TRIVEDI, V.; REN, J. *et al.* MUC1 oncoprotein activates the I kappa B kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. **Nat Cell Biol**, 9, n. 12, p. 1419-1427, Dec 2007.
- AKABA, T.; KOMIYA, K.; SUZAKI, I.; KOZAKI, Y. *et al.* Activating prostaglandin E2 receptor subtype EP4 increases secreted mucin from airway goblet cells. **Pulm Pharmacol Ther**, 48, p. 117-123, Feb 2018.
- ANDERSON, D. M.; SCHMALZER, K. M.; SATO, H.; CASEY, M. *et al.* Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the Pseudomonas aeruginosa T3SS cytotoxin, ExoU. **Mol Microbiol**, 82, n. 6, p. 1454-1467, Dec 2011.
- ASSUNÇÃO, R. G.; PEREIRA, W. A.; ABREU, A. G. Pneumonia Bacteriana: Aspectos Epidemiológicos, Fisiopatologia E Avanços No Diagnóstico. **Revista de Investigação Biomédica**, 10, n. 1, 2018.
- BALDUS, S. E.; ENGELMANN, K.; HANISCH, F. G. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 41, n. 2, p. 189-231, 2004.
- BALLOK, A. E.; O'TOOLE, G. A. Pouring salt on a wound: Pseudomonas aeruginosa virulence factors alter Na⁺ and Cl⁻ flux in the lung. **J Bacteriol**, 195, n. 18, p. 4013-4019, Sep 2013.
- BARBIERI, J. T.; SUN, J. Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 152, p. 79-92, 2004.
- BASSET, A.; ZHANG, F.; BENES, C.; SAYEED, S. *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 mediates inflammatory responses to oligomerized RrgA pneumococcal pilus type 1 protein. **J Biol Chem**, 288, n. 4, p. 2665-2675, Jan 25 2013.
- BEN MOHAMED, F.; GARCIA-VERDUGO, I.; MEDINA, M.; BALLOY, V. *et al.* A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by Pseudomonas aeruginosa. **PLoS One**, 7, n. 7, p. e39888, 2012.
- BENASCIUTTI, E.; PAGES, G.; KENZIOR, O.; FOLK, W. *et al.* MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. **Blood**, 104, n. 1, p. 256-262, Jul 1 2004.
- BERTRAND, J. J.; WEST, J. T.; ENGEL, J. N. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa. **J Bacteriol**, 192, n. 4, p. 994-1010, Feb 2010.

- BERUBE, B. J.; RANGEL, S. M.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. **Curr Genet**, 62, n. 1, p. 109-113, Feb 2016.
- BOLL, E. J.; AYALA-LUJAN, J.; SZABADY, R. L.; LOUISSAINT, C. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence Fimbriae Drive Inflammatory Cell Recruitment via Interactions with Epithelial MUC1. **mBio**, 8, n. 3, Jun 6 2017.
- BONSER, L. R.; ERLE, D. J. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. **J Clin Med**, 6, n. 12, Nov 29 2017.
- BONSER, L. R.; ZLOCK, L.; FINKBEINER, W.; ERLE, D. J. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma. **J Clin Invest**, 126, n. 6, p. 2367-2371, Jun 1 2016.
- BOSE, M.; MUKHERJEE, P. Microbe-MUC1 Crosstalk in Cancer-Associated Infections. **Trends Mol Med**, 26, n. 3, p. 324-336, Mar 2020.
- BOUCHER, R. C. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. **Annu Rev Med**, 58, p. 157-170, 2007.
- BUCIOR, I.; PIELAGE, J. F.; ENGEL, J. N. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. **PLoS Pathog**, 8, n. 4, p. e1002616, 2012.
- BUTTON, B.; ANDERSON, W. H.; BOUCHER, R. C. Mucus Hyperconcentration as a Unifying Aspect of the Chronic Bronchitic Phenotype. **Ann Am Thorac Soc**, 13 Suppl 2, p. S156-162, Apr 2016.
- BUTTON, B.; CAI, L. H.; EHRE, C.; KESIMER, M. *et al.* A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. **Science**, 337, n. 6097, p. 937-941, Aug 24 2012.
- CABRAL, M. P.; CORREIA, A.; VILANOVA, M.; GARTNER, F. *et al.* A live auxotrophic vaccine confers mucosal immunity and protection against lethal pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathog**, 16, n. 2, p. e1008311, Feb 2020.
- CASCIO, S.; ZHANG, L.; FINN, O. J. MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor-kappaB p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. **J Biol Chem**, 286, n. 49, p. 42248-42256, Dec 9 2011.
- CERVANTES-SANDOVAL, I.; SERRANO-LUNA, J. J.; MEZA-CERVANTEZ, P.; ARROYO, R. *et al.* *Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation. **Microbiology**, 155, n. Pt 11, p. 3739-3747, Nov 2009.
- CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; BULLEID, N. J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. **EMBO Rep**, 7, n. 3, p. 271-275, Mar 2006.
- CHASTRE, J.; FAGON, J. Y. Ventilator-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, 165, n. 7, p. 867-903, Apr 1 2002.

- CHEN, Y.; THAI, P.; ZHAO, Y. H.; HO, Y. S. *et al.* Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. **J Biol Chem**, 278, n. 19, p. 17036-17043, May 9 2003.
- CHIBA, T.; UCHI, H.; TSUJI, G.; GONDO, H. *et al.* Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. **Pulm Pharmacol Ther**, 24, n. 1, p. 133-140, Feb 2011.
- CHO, J. S.; HAN, I. H.; LEE, H. R.; LEE, H. M. Prostaglandin E2 Induces IL-6 and IL-8 Production by the EP Receptors/Akt/NF-kappaB Pathways in Nasal Polyp-Derived Fibroblasts. **Allergy Asthma Immunol Res**, 6, n. 5, p. 449-457, Sep 2014.
- CHOI, S.; PARK, Y. S.; KOGA, T.; TRELOAR, A. *et al.* TNF-alpha is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway Pseudomonas aeruginosa infection. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 44, n. 2, p. 255-260, Feb 2011.
- CHU, S.; FERRO, T. J. Identification of a hydrogen peroxide-induced PP1-JNK1-Sp1 signaling pathway for gene regulation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 291, n. 5, p. L983-992, Nov 2006.
- CHUANG, J. Y.; WANG, Y. T.; YEH, S. H.; LIU, Y. W. *et al.* Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. **Mol Biol Cell**, 19, n. 3, p. 1139-1151, Mar 2008.
- CHUNG, W. C.; RYU, S. H.; SUN, H.; ZELDIN, D. C. *et al.* CREB mediates prostaglandin F2alpha-induced MUC5AC overexpression. **J Immunol**, 182, n. 4, p. 2349-2356, Feb 15 2009.
- CORBITT, J.; YEO, J. S.; DAVIS, C. I.; LEROUX, M. *et al.* Type VI Secretion System Dynamics Reveals a Novel Secretion Mechanism in Pseudomonas aeruginosa. **J Bacteriol**, 200, n. 11, Jun 1 2018.
- CORFIELD, A. P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. **Biochim Biophys Acta**, 1850, n. 1, p. 236-252, Jan 2015.
- COWELL, B. A.; EVANS, D. J.; FLEISZIG, S. M. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on Pseudomonas aeruginosa invasion. **FEMS Microbiol Lett**, 250, n. 1, p. 71-76, Sep 1 2005.
- CROUSILLES, A.; MAUNDERS, E.; BARTLETT, S.; FAN, C. *et al.* Which microbial factors really are important in Pseudomonas aeruginosa infections? **Future Microbiol**, 10, n. 11, p. 1825-1836, 2015.
- DA CUNHA, L. G., Jr.; FERREIRA, M. F.; DE MORAES, J. A.; REIS, P. A. *et al.* ExoU-induced redox imbalance and oxidative stress in airway epithelial cells during Pseudomonas aeruginosa pneumosepsis. **Med Microbiol Immunol**, 204, n. 6, p. 673-680, Dec 2015.
- DENG, W.; MARSHALL, N. C.; ROWLAND, J. L.; MCCOY, J. M. *et al.* Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 6, p. 323-337, Jun 2017.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DENNENY, E.; SAHOTA, J.; BEATSON, R.; THORNTON, D. *et al.* Mucins and their receptors in chronic lung disease. **Clin Transl Immunology**, 9, n. 3, p. e01120, 2020.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V. *et al.* Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, 111, n. 10, p. 6130-6185, Oct 12 2011.

DHAR, P.; MCAULEY, J. The Role of the Cell Surface Mucin MUC1 as a Barrier to Infection and Regulator of Inflammation. **Front Cell Infect Microbiol**, 9, p. 117, 2019.

DIAZ, M. H.; HAUSER, A. R. Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. **Infect Immun**, 78, n. 4, p. 1447-1456, Apr 2010.

DIEKEMA, D. J.; HSUEH, P. R.; MENDES, R. E.; PFALLER, M. A. *et al.* The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, 63, n. 7, Jul 2019.

DIF, F.; WU, Y. Z.; BURGEL, P. R.; OLLERO, M. *et al.* Critical role of cytosolic phospholipase A2 α in bronchial mucus hypersecretion in CFTR-deficient mice. **Eur Respir J**, 36, n. 5, p. 1120-1130, Nov 2010.

DOHRMAN, A.; MIYATA, S.; GALLUP, M.; LI, J.-D. *et al.* Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1406, n. 3, p. 251-259, 1998.

ENGEL, J.; BALACHANDRAN, P. Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease. **Curr Opin Microbiol**, 12, n. 1, p. 61-66, Feb 2009.

FAHY, J. V.; DICKEY, B. F. Airway mucus function and dysfunction. **N Engl J Med**, 363, n. 23, p. 2233-2247, Dec 2 2010.

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S.; JAIN, M. *et al.* Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. **Microbiology**, 147, n. Pt 10, p. 2659-2669, Oct 2001.

FILLOUX, A. Protein Secretion Systems in Pseudomonas aeruginosa: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. **Front Microbiol**, 2, p. 155, 2011.

FINCK-BARBANCON, V.; YAHR, T. L.; FRANK, D. W. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. **J Bacteriol**, 180, n. 23, p. 6224-6231, Dec 1998.

FOULKES, D. M.; MCLEAN, K.; HANEEF, A. S.; FERNIG, D. G. *et al.* Pseudomonas aeruginosa Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. **Microorganisms**, 7, n. 12, Dec 16 2019.

GAEMERS, I. C.; VOS, H. L.; VOLDERS, H. H.; VAN DER VALK, S. W. *et al.* A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. **J Biol Chem**, 276, n. 9, p. 6191-6199, Mar 2 2001.

GALLE, M.; JIN, S.; BOGAERT, P.; HAEGMAN, M. *et al.* The Pseudomonas aeruginosa type III secretion system has an exotoxin S/T/Y independent pathogenic role during acute lung infection. **PLoS One**, 7, n. 7, p. e41547, 2012.

GARCIA-VERDUGO, I.; BENMOHAMED, F.; TATTERMUSCH, S.; LEDUC, D. *et al.* A role for 12R-lipoxygenase in MUC5AC expression by respiratory epithelial cells. **Eur Respir J**, 40, n. 3, p. 714-723, Sep 2012.

GENDLER, S. J. MUC1, the renaissance molecule. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 6, n. 3, p. 339-353, Jul 2001.

GOMEZ, M. I.; PRINCE, A. Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. **Curr Opin Pharmacol**, 7, n. 3, p. 244-251, Jun 2007.

GOMILA, A.; CARRATALA, J.; ELIAKIM-RAZ, N.; SHAW, E. *et al.* Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study. **Infect Drug Resist**, 11, p. 2571-2581, 2018.

GRAY, T.; NETTESHEIM, P.; LOFTIN, C.; KOO, J. S. *et al.* Interleukin-1beta-induced mucin production in human airway epithelium is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 receptors, and cyclic AMP-protein kinase A signaling. **Mol Pharmacol**, 66, n. 2, p. 337-346, Aug 2004.

GUANG, W.; DING, H.; CZINN, S. J.; KIM, K. C. *et al.* Muc1 cell surface mucin attenuates epithelial inflammation in response to a common mucosal pathogen. **J Biol Chem**, 285, n. 27, p. 20547-20557, Jul 2 2010.

HALAVATY, A. S.; BOREK, D.; TYSON, G. H.; VEESSENMEYER, J. L. *et al.* Structure of the type III secretion effector protein ExoU in complex with its chaperone SpcU. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e49388, 2012.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, 279, n. 5350, p. 509-514, Jan 23 1998.

HAUSER, A. R. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. **Nat Rev Microbiol**, 7, n. 9, p. 654-665, Sep 2009.

HIGUCHI, H.; GRAMBIHLER, A.; CANBAY, A.; BRONK, S. F. *et al.* Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1. **J Biol Chem**, 279, n. 1, p. 51-60, Jan 2 2004.

IMAMURA, Y.; YANAGIHARA, K.; MIZUTA, Y.; SEKI, M. *et al.* Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the Pseudomonas aeruginosa autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 Cells. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, n. 9, p. 3457-3461, Sep 2004.

JACOBS, D. M.; OCHS-BALCOM, H. M.; NOYES, K.; ZHAO, J. *et al.* Impact of Pseudomonas aeruginosa Isolation on Mortality and Outcomes in an Outpatient Chronic Obstructive Pulmonary Disease Cohort. **Open Forum Infect Dis**, 7, n. 1, p. ofz546, Jan 2020.

JANG, S. I.; KIM, H. J.; KIM, Y. J.; JEONG, S. I. *et al.* Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. **Eur J Pharmacol**, 542, n. 1-3, p. 1-7, Aug 7 2006.

JEONG, S. J.; KIM, J. H.; LIM, B. J.; YOON, I. *et al.* Inhibition of MUC1 biosynthesis via threonyl-tRNA synthetase suppresses pancreatic cancer cell migration. **Exp Mol Med**, 50, n. 1, p. e424, Jan 12 2018.

JIN, M.; ANDE, A.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. **Cell Death Dis**, 4, p. e554, Mar 21 2013.

KAMINSKI, A.; GUPTA, K. H.; GOLDFUSKY, J. W.; LEE, H. W. *et al.* Pseudomonas aeruginosa ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That is Dependent on its GAP Domain Activity. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 14047, Sep 19 2018.

KATO, K.; HANSS, A. D.; ZEMSKOVA, M. A.; MORGAN, N. E. *et al.* Pseudomonas aeruginosa increases MUC1 expression in macrophages through the TLR4-p38 pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 492, n. 2, p. 231-235, Oct 14 2017.

KATO, K.; LILLEHOJ, E. P.; KAI, H.; KIM, K. C. MUC1 expression by human airway epithelial cells mediates Pseudomonas aeruginosa adhesion. **Front Biosci (Elite Ed)**, 2, p. 68-77, Jan 1 2010.

KATO, K.; LILLEHOJ, E. P.; KIM, K. C. Pseudomonas aeruginosa stimulates tyrosine phosphorylation of and TLR5 association with the MUC1 cytoplasmic tail through EGFR activation. **Inflamm Res**, 65, n. 3, p. 225-233, Mar 2016.

KATO, K.; LILLEHOJ, E. P.; LU, W.; KIM, K. C. MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. **J Clin Med**, 6, n. 12, Nov 29 2017.

KAZMIERCZAK, B. I.; SCHNIEDERBEREND, M.; JAIN, R. Cross-regulation of Pseudomonas motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Curr Opin Microbiol**, 28, p. 78-82, Dec 2015.

KHAN, M. A.; FARAHVASH, A.; DOUDA, D. N.; LICHT, J. C. *et al.* JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 3409, Jun 13 2017.

KIM, K. C.; LILLEHOJ, E. P. MUC1 mucin: a peacemaker in the lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 39, n. 6, p. 644-647, Dec 2008.

KINLOUGH, C. L.; POLAND, P. A.; BRUNS, J. B.; HARKLEROAD, K. L. *et al.* MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. **J Biol Chem**, 279, n. 51, p. 53071-53077, Dec 17 2004.

KLOTH, C.; SCHIRMER, B.; MUNDER, A.; STELZER, T. *et al.* The Role of Pseudomonas aeruginosa ExoY in an Acute Mouse Lung Infection Model. **Toxins (Basel)**, 10, n. 5, May 4 2018.

KOGA, T.; KUWAHARA, I.; LILLEHOJ, E. P.; LU, W. *et al.* TNF-alpha induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 293, n. 3, p. L693-701, Sep 2007.

KOHRI, K.; UEKI, I. F.; SHIM, J. J.; BURGEL, P. R. *et al.* Pseudomonas aeruginosa induces MUC5AC production via epidermal growth factor receptor. **Eur Respir J**, 20, n. 5, p. 1263-1270, Nov 2002.

KONDO, K.; KOHNO, N.; YOKOYAMA, A.; HIWADA, K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. **Cancer Res**, 58, n. 9, p. 2014-2019, May 1 1998.

- KOVARIK, A.; LU, P. J.; PEAT, N.; MORRIS, J. *et al.* Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. **J Biol Chem**, 271, n. 30, p. 18140-18147, Jul 26 1996.
- KROKEN, A. R.; CHEN, C. K.; EVANS, D. J.; YAHR, T. L. *et al.* The Impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Epithelial Cells Is Independent of fleQ and Correlates with Bistability of Type Three Secretion System Gene Expression. **mBio**, 9, n. 3, May 1 2018.
- KUFE, D. W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 12, p. 874-885, Dec 2009.
- KUFE, D. W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. **Oncogene**, 32, n. 9, p. 1073-1081, Feb 28 2013.
- KUMAR, D.; HOSSE, J.; VON TOERNE, C.; NOESSNER, E. *et al.* JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1. **J Immunol**, 182, n. 2, p. 1011-1020, Jan 15 2009.
- KUPERMAN, D. A.; HUANG, X.; KOTH, L. L.; CHANG, G. H. *et al.* Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. **Nat Med**, 8, n. 8, p. 885-889, Aug 2002.
- KUWAHARA, I.; LILLEHOJ, E. P.; HISATSUNE, A.; LU, W. *et al.* Neutrophil elastase stimulates MUC1 gene expression through increased Sp1 binding to the MUC1 promoter. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 289, n. 2, p. L355-362, Aug 2005.
- KUWAHARA, I.; LILLEHOJ, E. P.; KOGA, T.; ISOHAMA, Y. *et al.* The signaling pathway involved in neutrophil elastase stimulated MUC1 transcription. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 37, n. 6, p. 691-698, Dec 2007.
- LAGOW, E. L.; CARSON, D. D. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J Cell Biochem**, 86, n. 4, p. 759-772, 2002.
- LEE, C. W.; WU, C. H.; CHIANG, Y. C.; CHEN, Y. L. *et al.* Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-induced ROS-dependent ICAM-1 expression in human pulmonary alveolar epithelial cells. **Redox Biol**, 18, p. 93-103, Sep 2018.
- LEE, J. W.; KIM, Y. I.; IM, C. N.; KIM, S. W. *et al.* Grape Seed Proanthocyanidin Inhibits Mucin Synthesis and Viral Replication by Suppression of AP-1 and NF-kappaB via p38 MAPKs/JNK Signaling Pathways in Respiratory Syncytial Virus-Infected A549 Cells. **J Agric Food Chem**, 65, n. 22, p. 4472-4483, Jun 7 2017.
- LEE, K.; YOON, S. S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **J Microbiol Biotechnol**, 27, n. 6, p. 1053-1064, Jun 28 2017.
- LEE, K. K.; SHETH, H. B.; WONG, W. Y.; SHERBURNE, R. *et al.* The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. **Mol Microbiol**, 11, n. 4, p. 705-713, Feb 1994.
- LENG, Y.; CAO, C.; REN, J.; HUANG, L. *et al.* Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. **J Biol Chem**, 282, n. 27, p. 19321-19330, Jul 6 2007.

- LI, J.; LONG, D.; WU, S.; WU, X. *et al.* Association of CFH polymorphism with susceptibility to sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Chinese Han populations: A multi-center study. **Gene**, 722, p. 144127, Jan 5 2020.
- LI, W.; YAN, F.; ZHOU, H.; LIN, X. *et al.* *P. aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 in vitro and in vivo. **PLoS One**, 8, n. 5, p. e63945, 2013.
- LI, X.; WANG, L.; NUNES, D. P.; TROXLER, R. F. *et al.* Pro-inflammatory cytokines up-regulate MUC1 gene expression in oral epithelial cells. **J Dent Res**, 82, n. 11, p. 883-887, Nov 2003.
- LI, Y.; KUWAHARA, H.; REN, J.; WEN, G. *et al.* The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. **J Biol Chem**, 276, n. 9, p. 6061-6064, Mar 2 2001.
- LI, Y.; YI, H.; YAO, Y.; LIAO, X. *et al.* The cytoplasmic domain of MUC1 induces hyperplasia in the mammary gland and correlates with nuclear accumulation of beta-catenin. **PLoS One**, 6, n. 4, p. e19102, Apr 20 2011.
- LILLEHOJ, E. P.; HYUN, S. W.; KIM, B. T.; ZHANG, X. G. *et al.* Muc1 mucins on the cell surface are adhesion sites for *Pseudomonas aeruginosa*. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 280, n. 1, p. L181-187, Jan 2001.
- LILLEHOJ, E. P.; HYUN, S. W.; LIU, A.; GUANG, W. *et al.* NEU1 Sialidase Regulates Membrane-tethered Mucin (MUC1) Ectodomain Adhesiveness for *Pseudomonas aeruginosa* and Decoy Receptor Release. **J Biol Chem**, 290, n. 30, p. 18316-18331, Jul 24 2015.
- LILLEHOJ, E. P.; KATO, K.; LU, W.; KIM, K. C. Cellular and molecular biology of airway mucins. **Int Rev Cell Mol Biol**, 303, p. 139-202, 2013.
- LILLEHOJ, E. P.; KIM, B. T.; KIM, K. C. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 282, n. 4, p. L751-756, Apr 2002.
- LILLEHOJ, E. P.; LU, W.; KISER, T.; GOLDBLUM, S. E. *et al.* MUC1 inhibits cell proliferation by a beta-catenin-dependent mechanism. **Biochim Biophys Acta**, 1773, n. 7, p. 1028-1038, Jul 2007.
- LIN, C. C.; LEE, I. T.; YANG, Y. L.; LEE, C. W. *et al.* Induction of COX-2/PGE(2)/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: Role of TLR4-dependent NADPH oxidase activation. **Free Radic Biol Med**, 48, n. 2, p. 240-254, Jan 15 2010.
- LIN, J.; CHENG, J.; WANG, Y.; SHEN, X. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. **Front Cell Infect Microbiol**, 8, p. 230, 2018.
- LINDEN, S. K.; SHENG, Y. H.; EVERY, A. L.; MILES, K. M. *et al.* MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. **PLoS Pathog**, 5, n. 10, p. e1000617, Oct 2009.
- LU, W.; HISATSUNE, A.; KOGA, T.; KATO, K. *et al.* Cutting edge: enhanced pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by Muc1 knockout mice. **J Immunol**, 176, n. 7, p. 3890-3894, Apr 1 2006.

MA, J.; RUBIN, B. K.; VOYNOW, J. A. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. **Chest**, 154, n. 1, p. 169-176, Jul 2018.

MACHADO, G. B.; DE ASSIS, M. C.; LEO, R.; SALIBA, A. M. *et al.* ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. **Shock**, 33, n. 3, p. 315-321, Mar 2010.

MACHADO, G. B.; DE OLIVEIRA, A. V.; SALIBA, A. M.; DE LIMA, C. D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU induces a PAF-dependent impairment of alveolar fibrin turnover secondary to enhanced activation of coagulation and increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in the course of mice pneumosepsis. **Respir Res**, 12, p. 104, Aug 5 2011.

MALLET DE LIMA, C. D.; CALEGARI-SILVA, T. C.; PEREIRA, R. M.; SANTOS, S. A. *et al.* ExoU activates NF-kappaB and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **PLoS One**, 7, n. 7, p. e41772, 2012.

MALLET DE LIMA, C. D.; DA CONCEICAO COSTA, J.; DE OLIVEIRA LIMA SANTOS, S. A.; CARVALHO, S. *et al.* Central role of PAFR signalling in ExoU-induced NF-kappaB activation. **Cell Microbiol**, 16, n. 8, p. 1244-1254, Aug 2014.

MARSDEN, A. E.; KING, J. M.; SPIES, M. A.; KIM, O. K. *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA DNA-Binding Activity by N-Hydroxybenzimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 60, n. 2, p. 766-776, Feb 2016.

MCAULEY, J. L.; LINDEN, S. K.; PNG, C. W.; KING, R. M. *et al.* MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. **J Clin Invest**, 117, n. 8, p. 2313-2324, Aug 2007.

MCMORRAN, B.; TOWN, L.; COSTELLOE, E.; PALMER, J. *et al.* Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Infect Immun**, 71, n. 10, p. 6035-6044, Oct 2003.

MENSA, J.; BARBERÁN, J.; SORIANO, A.; LLINARES, P. *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. **Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, 31, n. 1, p. 78-100, 2018.

MORRIS, J. R.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. The Sp1 transcription factor regulates cell type-specific transcription of MUC1. **DNA Cell Biol**, 20, n. 3, p. 133-139, Mar 2001.

NA, H. G.; KIM, Y. D.; CHOI, Y. S.; BAE, C. H. *et al.* Allethrin and prallethrin stimulates MUC5AC expression through oxidative stress in human airway epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 503, n. 1, p. 316-322, Sep 3 2018.

NAKAMURA, S.; YANAGIHARA, K.; ARAKI, N.; YAMADA, K. *et al.* High-dose tobramycin inhibits lipopolysaccharide-induced MUC5AC production in human lung epithelial cells. **Eur J Pharmacol**, 659, n. 1, p. 67-71, May 20 2011.

NALEFSKI, E. A.; SULTZMAN, L. A.; MARTIN, D. M.; KRIZ, R. W. *et al.* Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain. **J Biol Chem**, 269, n. 27, p. 18239-18249, Jul 8 1994.

NATH, S.; MUKHERJEE, P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. **Trends Mol Med**, 20, n. 6, p. 332-342, Jun 2014.

NG, G. Z.; MENHENIOTT, T. R.; EVERY, A. L.; STENT, A. *et al.* The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome. **Gut**, 65, n. 7, p. 1087-1099, Jul 2016.

OECHSLIN, F.; PICCARDI, P.; MANCINI, S.; GABARD, J. *et al.* Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. **J Infect Dis**, 215, n. 5, p. 703-712, Mar 1 2017.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1, n. 4, p. a000034, Oct 2009.

OKAMOTO, K.; KIM, J. S.; RUBIN, B. K. Secretory phospholipases A2 stimulate mucus secretion, induce airway inflammation, and produce secretory hyperresponsiveness to neutrophil elastase in ferret trachea. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 292, n. 1, p. L62-67, Jan 2007.

ORLANDI, V. T.; BOLOGNESE, F.; CHIODAROLI, L.; TOLKER-NIELSEN, T. *et al.* Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology**, 161, n. 12, p. 2298-2309, Dec 2015.

PANMANEE, W.; SU, S.; SCHURR, M. J.; LAU, G. W. *et al.* The anti-sigma factor MucA of *Pseudomonas aeruginosa*: Dramatic differences of a mucA22 vs. a DeltamucA mutant in anaerobic acidified nitrite sensitivity of planktonic and biofilm bacteria in vitro and during chronic murine lung infection. **PLoS One**, 14, n. 6, p. e0216401, 2019.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp Mol Med**, 45, p. e66, Dec 6 2013.

PARK, H. S.; JUNG, H. Y.; PARK, E. Y.; KIM, J. *et al.* Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. **J Immunol**, 173, n. 6, p. 3589-3593, Sep 15 2004.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. **Clin Immunol**, 119, n. 3, p. 229-240, Jun 2006.

PERSAT, A.; INCLAN, Y. F.; ENGEL, J. N.; STONE, H. A. *et al.* Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, n. 24, p. 7563-7568, Jun 16 2015.

PHE, K.; BOWERS, D. R.; BABIC, J. T.; TAM, V. H. Outcomes of empiric aminoglycoside monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 93, n. 4, p. 346-348, Apr 2019.

PHILLIPS, R. M.; SIX, D. A.; DENNIS, E. A.; GHOSH, P. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. **J Biol Chem**, 278, n. 42, p. 41326-41332, Oct 17 2003.

PLOTKOWSKI, M. C.; ESTADO, V.; SANTOS, S. A.; DA SILVA, M. C. *et al.* Contribution of the platelet activating factor signaling pathway to cerebral microcirculatory dysfunction during experimental sepsis by ExoU producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathog Dis**, 73, n. 7, Oct 2015.

PONCE DE LEON, A.; MERCHANT, S.; RAMAN, G.; AVENDANO, E. *et al.* Pseudomonas infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis**, 20, n. 1, p. 250, Mar 27 2020.

RAINA, D.; AHMAD, R.; RAJABI, H.; PANCHAMOORTHY, G. *et al.* Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. **Int J Oncol**, 40, n. 5, p. 1643-1649, May 2012.

RAMAN, G.; AVENDANO, E. E.; CHAN, J.; MERCHANT, S. *et al.* Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrob Resist Infect Control**, 7, p. 79, 2018.

RELLO, J.; DIAZ, E.; RODRIGUEZ, A. Etiology of ventilator-associated pneumonia. **Clin Chest Med**, 26, n. 1, p. 87-95, Mar 2005.

RIDLEY, C.; THORNTON, D. J. Mucins: the frontline defence of the lung. **Biochem Soc Trans**, 46, n. 5, p. 1099-1106, Oct 19 2018.

ROLSMA, S.; FRANK, D. W.; BARBIERI, J. T. Pseudomonas aeruginosa toxins. *In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 2015. p. 133-160.

RONAN, T.; MACDONALD-OBERMANN, J. L.; HUELSMANN, L.; BESSMAN, N. J. *et al.* Different Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Agonists Produce Unique Signatures for the Recruitment of Downstream Signaling Proteins. **J Biol Chem**, 291, n. 11, p. 5528-5540, Mar 11 2016.

ROSTAMI, S.; FARAJZADEH SHEIKH, A.; SHOJA, S.; FARAHANI, A. *et al.* Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. **J Chin Med Assoc**, 81, n. 2, p. 127-132, Feb 2018.

RUBIN, B. K.; PRIFTIS, K. N.; SCHMIDT, H. J.; HENKE, M. O. Secretory hyperresponsiveness and pulmonary mucus hypersecretion. **Chest**, 146, n. 2, p. 496-507, Aug 2014.

RUMBAUGH, K. P.; HAMOOD, A. N.; GRISWOLD, J. A. Analysis of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates for possible variations within the virulence genes exotoxin A and exoenzyme S. **J Surg Res**, 82, n. 1, p. 95-105, Mar 1999.

SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M.; ARENDS, S. J. R.; GOOSSENS, H. *et al.* Geographical and temporal variation in the frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bacterial pneumonia: results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). **J Antimicrob Chemother**, 74, n. 6, p. 1595-1606, Jun 1 2019.

SALIBA, A. M.; DE ASSIS, M. C.; NISHI, R.; RAYMOND, B. *et al.* Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of Pseudomonas aeruginosa ExoU. **Microbes Infect**, 8, n. 2, p. 450-459, Feb 2006.

SALIBA, A. M.; NASCIMENTO, D. O.; SILVA, M. C.; ASSIS, M. C. *et al.* Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of Pseudomonas aeruginosa ExoU. **Cell Microbiol**, 7, n. 12, p. 1811-1822, Dec 2005.

SAMSUZZAMAN, M.; UDDIN, M. S.; SHAH, M. A.; MATHEW, B. Natural inhibitors on airway mucin: Molecular insight into the therapeutic potential targeting MUC5AC expression and production. **Life Sci**, 231, p. 116485, Aug 15 2019.

SATO, H.; FRANK, D. W. ExoU is a potent intracellular phospholipase. **Mol Microbiol**, 53, n. 5, p. 1279-1290, Sep 2004.

SATO, H.; FRANK, D. W.; HILLARD, C. J.; FEIX, J. B. *et al.* The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. **EMBO J**, 22, n. 12, p. 2959-2969, Jun 16 2003.

SAWA, T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. **J Intensive Care**, 2, n. 1, p. 10, 2014.

SAWA, T.; HAMAOKA, S.; KINOSHITA, M.; KAINUMA, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretory Toxin ExoU and Its Predicted Homologs. **Toxins (Basel)**, 8, n. 11, Oct 26 2016.

SHAO, M. X.; UEKI, I. F.; NADEL, J. A. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 20, p. 11618-11623, Sep 30 2003.

SIT, S. T.; MANSER, E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. **J Cell Sci**, 124, n. Pt 5, p. 679-683, Mar 1 2011.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SROKA, I. C.; NAGLE, R. B.; BOWDEN, G. T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is regulated by sp1 through the differential activation of AKT, JNK, and ERK pathways in human prostate tumor cells. **Neoplasia**, 9, n. 5, p. 406-417, May 2007.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Curr Protoc Immunol**, 109, p. 14 12 11-14 12 10, Apr 1 2015.

TANABE, T.; SHIMOKAWAJI, T.; KANO, S.; RUBIN, B. K. Secretory phospholipases A2 are secreted from ciliated cells and increase mucin and eicosanoid secretion from goblet cells. **Chest**, 147, n. 6, p. 1599-1609, Jun 2015.

TAVAKOLI, S.; COWAN, M. J.; BENFIELD, T.; LOGUN, C. *et al.* Prostaglandin E(2)-induced interleukin-6 release by a human airway epithelial cell line. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 280, n. 1, p. L127-133, Jan 2001.

THORNTON, D. J.; ROUSSEAU, K.; MCGUCKIN, M. A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. **Annu Rev Physiol**, 70, p. 459-486, 2008.

THORNTON, D. J.; SHEEHAN, J. K. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. **Proc Am Thorac Soc**, 1, n. 1, p. 54-61, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015. 920 p.

- TSAI, M. K.; LIN, Y. C.; HUANG, M. Y.; LEE, M. S. *et al.* The effects of asthma medications on reactive oxygen species production in human monocytes. **J Asthma**, 55, n. 4, p. 345-353, Apr 2018.
- UENO, K.; KOGA, T.; KATO, K.; GOLENBOCK, D. T. *et al.* MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 38, n. 3, p. 263-268, Mar 2008.
- UMEHARA, T.; KATO, K.; PARK, Y. S.; LILLEHOJ, E. P. *et al.* Prevention of lung injury by Muc1 mucin in a mouse model of repetitive *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Inflamm Res**, 61, n. 9, p. 1013-1020, Sep 2012.
- VAN PUTTEN, J. P. M.; STRIJBIS, K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. **J Innate Immun**, 9, n. 3, p. 281-299, 2017.
- VAREECHON, C.; ZMINA, S. E.; KARMAKAR, M.; PEARLMAN, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. **Cell Host Microbe**, 21, n. 5, p. 611-618 e615, May 10 2017.
- WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Haemophore functions revisited. **Mol Microbiol**, 85, n. 4, p. 618-631, Aug 2012.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Role of prostanoids in gastrointestinal cancer. **J Clin Invest**, 128, n. 7, p. 2732-2742, Jul 2 2018.
- WU, M.; LI, X. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *In: Molecular Medical Microbiology*, 2015. p. 1547-1564.
- WU, W.; JIN, Y.; BAI, F.; JIN, S. *Pseudomonas aeruginosa*. *In: Molecular Medical Microbiology*, 2015. p. 753-767.
- WU, Y.; LIU, Y.; DONG, K.; LI, Q. Effects of human beta-defensin 3 fused with carbohydrate-binding domain on the function of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Braz J Microbiol**, 51, n. 1, p. 29-35, Mar 2020.
- YAN, F.; LI, W.; JONO, H.; LI, Q. *et al.* Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF- α signaling pathways in human airway epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 366, n. 2, p. 513-519, Feb 8 2008.
- YANG, D.; JIN, M.; BAI, C.; ZHOU, J. *et al.* Peroxiredoxin 6 suppresses Muc5ac overproduction in LPS-induced airway inflammation through H₂O₂-EGFR-MAPK signaling pathway. **Respir Physiol Neurobiol**, 236, p. 84-90, Feb 2017.
- YANG, Y. W.; JIANG, Y. Z.; HSU, C. M.; CHEN, L. W. *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia Induces Lung Injury through TNF- α /c-Jun NH₂-Terminal Kinase Pathways. **PLoS One**, 12, n. 1, p. e0169267, 2017.
- YIN, L.; LI, Y.; REN, J.; KUWAHARA, H. *et al.* Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. **J Biol Chem**, 278, n. 37, p. 35458-35464, Sep 12 2003.
- YOUSEFI-AVARVAND, A.; KHASHEI, R.; SEDIGH EBRAHIM-SARAIE, H.; EMAMI, A. *et al.* The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of

Pseudomonas aeruginosa in Shiraz, Iran %J International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 4, n. 3, p. 167-173, 2015. Original Article.

YUAN-CHEN WU, D.; WU, R.; REDDY, S. P.; LEE, Y. C. *et al.* Distinctive epidermal growth factor receptor/extracellular regulated kinase-independent and -dependent signaling pathways in the induction of airway mucin 5B and mucin 5AC expression by phorbol 12-myristate 13-acetate. **Am J Pathol**, 170, n. 1, p. 20-32, Jan 2007.

YUAN, Z.; WONG, S.; BORRELLI, A.; CHUNG, M. A. Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation. **Biochem Biophys Res Commun**, 362, n. 3, p. 740-746, Oct 26 2007.

ZHANG, K.; WANG, J.; JIANG, H.; XU, X. *et al.* Tanshinone IIA inhibits lipopolysaccharide-induced MUC1 overexpression in alveolar epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, 306, n. 1, p. C59-65, Jan 1 2014.

ZHANG, Y.; TANG, H.; YUAN, X.; RAN, Q. *et al.* TGF-beta3 Promotes MUC5AC Hyper-Expression by Modulating Autophagy Pathway in Airway Epithelium. **EBioMedicine**, 33, p. 242-252, Jul 2018.

ZHU, M.; YU, K.; WANG, L.; YU, S. Contribution of drugs acting on the TLRs/MyD88 signaling pathway on colitis-associated cancer. **Pharmazie**, 73, n. 7, p. 363-368, Jul 1 2018.