



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Sabrina Alves Oliveira Lima Santos

**Modulação da expressão da beta-defensina humana 2 (hBD-2) por  
ExoU durante a infecção de células epiteliais respiratórias por  
*Pseudomonas aeruginosa***

Rio de Janeiro  
2021

Sabrina Alves Oliveira Lima Santos

**Modulação da expressão da beta-defensina humana 2 (hBD-2) por ExoU durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *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.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Mattos Saliba

Rio de Janeiro

2021

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

S237 Santos, Sabrina Alves Oliveira Lima.  
Modulação da expressão da beta-defensina humana 2 (hBD-2) por ExoU durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa* / Sabrina Alves Oliveira Lima Santos – 2021.  
89 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> 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. Células epiteliais - Teses. 3. Toxinas bacterianas - Teses. 4. beta-Defensinas. 5. Epigenômica. 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

Sabrina Alves Oliveira Lima Santos

**Modulação da expressão da beta-defensina humana 2 (hBD-2) por ExoU durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *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 29 de novembro de 2021.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Mattos Saliba (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila Soares Sabbadini

Universidade Centro Universitário do Maranhão

---

Prof. Dr. Maurício Costa Alves da Silva

Universidade Federal da Bahia

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu amado pai, meu maior incentivador, sempre preocupado com o meu futuro, atento à minha caminhada, cuidando de mim e me aconselhando para a vida, te-amo para sempre papai. À minha mãe e irmã, que sempre estão e estiveram ao meu lado, acreditando e torcendo por mim para que esse momento se concretizasse, amo vocês eternamente. O meu mais sincero obrigada. Minha gratidão de todo o coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida orientadora, professora Alessandra, que vai muito além de mentora científica, mas sim uma verdadeira amiga, paciente e generosa que não hesitou em nenhum momento abrir seus braços para me acolher... minha gratidão é eterna pelo apoio, força, ensinamentos, broncas e tudo que passamos durante esses anos!! No momento em que me vi tão confusa e a ponto de desistir de tudo a senhora me estendeu o braço, a mão, o coração me fornecendo a ajuda que eu precisava pois eu nem sabia por onde começar. A melhor coisa que me aconteceu, sem sombra de dúvida foi ter a senhora na minha vida! Obrigada por tudo, absolutamente por tudo, por me fazer crescer e amadurecer como pessoa!! A senhora me inspira, te-amo professora!

Ao prof. Ulisses Gazes Lopes, pelo auxílio e ajuda para a realização dos experimentos, muito obrigada pela paciência e generosidade!

Às minhas amigas queridas, Miriam e Pamella!! Vocês não existem! Muito além do companheirismo nas atividades laboratoriais, há uma amizade tão forte entre nós e eu amo vocês de todo o coração! Obrigada pelos conselhos, apoio e força!! Serão sortudos aqueles que tiverem vocês na vida e ainda bem que eu sou sortuda!! Nossa amizade vai muito além da ciência! É para vida toda! obrigada por me aguentar! Ao Alexandre, que tive o prazer em conhecer, conviver e trabalhar! Obrigada pela amizade e generosidade! Você é muito especial!

A todo corpo técnico que durante esses anos sempre estiveram comigo, me auxiliando, ensinando e tornando todos os experimentos possíveis!! Amo cada um de vocês! Tão pacientes e amorosos!! Obrigada por cada palavra de carinho e incentivo! Ao pessoal da cultura de células, do biotério, muito obrigada por tudo em todos os momentos!! Denílson, grande professor, sempre levando alegria e ensinando a gente! Muito obrigada por sempre estar disponível! Rose sempre tão gentil e pronta para ajudar!! Vocês são minha família!!

Ao corpo docente, gratidão por trazerem conhecimentos para a nossa teórica e prática científica, muito obrigada professores! Não há profissão mais importante que a de ensinar!

Ao corpo administrativo, em especial à Carlinha, tão radiante e paciente, sempre pronta a nos ajudar e a esclarecer nossas dúvidas!! Obrigada por tudo!

A todos os membros da banca examinadora, muito obrigada por terem gentilmente aceitado ao convite.

À Fundação CAPES pela concessão de bolsa.

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.

*Paulo Freire*

## RESUMO

SANTOS, Sabrina Alves Oliveira Lima. **Modulação da expressão da beta-defensina humana 2 (hBD-2) por ExoU durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa***. 2021. 89 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, fatores de virulência bacterianos podem subverter vias de sinalização intracelular, levando à modulação de genes envolvidos na resposta ao patógeno, a fim de favorecer a persistência do micro-organismo e o sucesso do processo infeccioso. ExoU é uma potente citotoxina de *P. aeruginosa* que está associada a lesões pulmonares graves e a infecções invasivas em pacientes hospitalizados. Entre os mecanismos de defesa inata presentes nos pulmões, a beta-defensina humana 2 (hBD-2), um peptídeo antimicrobiano secretado em diversos epitélios em resposta a produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias, é uma das principais moléculas efetoras da resposta a *P. aeruginosa*, tanto por seu potencial citotóxico para esta bactéria como pela sua capacidade de estimular a resposta inflamatória. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito de ExoU na modulação da expressão de hBD-2, assim como as vias regulatórias envolvidas nesse fenômeno. Os resultados mostraram que a expressão de hBD-2 foi significativamente menor nas culturas de células epiteliais respiratórias da linhagem A549 infectadas por 30 horas com a cepa parental produtora de ExoU, PA103, do que nas culturas infectadas pela mutante PA103 $\Delta$ exoU, indicando que ExoU foi capaz de inibir a expressão de hBD-2. O tratamento com o inibidor de JNK, SP600125, diminuiu a expressão de hBD-2 tanto nas culturas infectadas pela cepa parental como nas culturas infectadas pela cepa mutante. Já o bloqueio da sinalização via IL-1 $\beta$  com anticorpo neutralizante, assim como o tratamento com inibidor de p38 MAPK (SB203580) ou de NF- $\kappa$ B (wedelolactona), reduziu significativamente os níveis de mRNA de hBD-2 apenas nas culturas infectadas pela cepa mutante, sugerindo que ExoU inibe estas vias e/ou regula outros mecanismos que impedem a ativação transcricional de hBD-2. Sabe-se que mecanismos epigenéticos participam da regulação da ativação transcricional de cada gene alvo. No presente estudo, o tratamento das culturas celulares com um inibidor de histona desacetilases (HDAC), tricostratina A (TSA), bloqueou a inibição da expressão de hBD-2 por ExoU, indicando que esse fator de virulência é capaz de promover modificações na cromatina que resultam na inibição da expressão de genes hospedeiros. As vias de AKT e de MEK/ERK não participaram da regulação da expressão de hBD-2 em resposta à infecção pelas cepas de *P. aeruginosa*. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a secreção de ExoU por *P. aeruginosa* é capaz de manipular as vias de sinalização celular que envolvem IL-1 $\beta$ , JNK e p38 MAPK, os fatores transcpcionais NF- $\kappa$ B e AP-1, e as enzimas HDAC de modificação de cromatina, para inibir a síntese de hBD-2 em resposta à infecção.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. ExoU. hBD-2. MAPK. IL-1 $\beta$ . Inflamação. Epigenética.

## ABSTRACT

SANTOS, Sabrina Alves Oliveira Lima. **Modulation of human beta-defensin 2 (hBD-2) expression by ExoU during *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory epithelial cells**. 2021. 86 f. Tese (Doutorado em Microbiologia ). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

During *Pseudomonas aeruginosa* infection, bacterial virulence factors can subvert intracellular signaling pathways, leading to the modulation of genes involved in the response to the pathogen, in order to favor the microorganism's persistence and the success of the infectious process. ExoU is a potent *P. aeruginosa* cytotoxin that is associated with severe lung injury and invasive infections in hospitalized patients. Among the innate defense mechanisms present in the lungs, human beta-defensin 2 (hBD-2), an antimicrobial peptide secreted in several epithelia in response to microbial products and pro-inflammatory cytokines, is one of the main effector molecules of the response to *P. aeruginosa*, both by its cytotoxic potential against this bacterium and by its ability to stimulate inflammation. The present study aimed to investigate the effect of ExoU in modulating hBD-2 expression, as well as the regulatory pathways involved in this phenomenon. The results showed that hBD-2 expression was significantly lower in cultures of respiratory epithelial cells of the A549 lineage infected for 30 hours with the ExoU-producing parental strain, PA103, than in cultures infected with the PA103 $\Delta$ exoU mutant, indicating that ExoU was capable to inhibit hBD-2 expression. Treatment with the JNK inhibitor, SP600125, decreased hBD-2 expression both in cultures infected by the parental strain and in cultures infected by the mutant strain. Blocking IL-1 $\beta$  signaling with a neutralizing antibody, as well as the treatment with a p38 MAPK (SB203580) or a NF- $\kappa$ B (wedelolactone) inhibitor, significantly reduced hBD-2 mRNA levels only in cultures infected by the mutant strain, suggesting that ExoU inhibits these pathways and/or regulates other mechanisms that prevent transcriptional activation of hBD-2. It is known that epigenetic mechanisms participate in the regulation of transcriptional activation of each target gene. In the present study, the treatment of cell cultures with a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, trichostatin A (TSA), blocked the inhibition of hBD-2 expression by ExoU, indicating that this virulence factor is able to promote changes in chromatin that result in inhibition of host gene expression. The AKT and MEK/ERK pathways did not participate in the regulation of hBD-2 expression in response to infection by the *P. aeruginosa* strains. Together, our results suggest that ExoU secretion by *P. aeruginosa* is able to manipulate the cell signaling pathways involving IL-1 $\beta$ , JNK and p38 MAPK, the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1, and the HDAC enzymes of chromatin modification to inhibit hBD-2 synthesis in response to infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. ExoU. hBD-2. MAPK. IL-1 $\beta$ . Inflammation. Epigenetic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Múltiplos fatores de virulência são produzidos por <i>P. aeruginosa</i> .....	17
Figura 2 -	Translocação de toxinas dependente de contato mediada pelo sistema de secreção do tipo III de <i>P. aeruginosa</i> .....	19
Figura 3 -	Mecanismo de toxicidade de ExoU.....	21
Figura 4 -	Defesas das vias aéreas em resposta à inalação de micro-organismos.....	23
Figura 5 -	Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos ativos.....	26
Figura 6 -	Subfamílias de defensinas.....	27
Figura 7 -	Sistema de fosforilação das vias das MAPK.....	32
Figura 8 -	Via de sinalização de GPCR.....	32
Figura 9 -	Esquema simplificado da via de ERK.....	34
Figura 10 -	Ativação da via de c-Jun N-terminal kinase (JNK).....	35
Figura 11 -	Região de ancoragem para JNK em c-Jun.....	36
Figura 12 -	Esquema simplificado da via de p38 MAPK.....	37
Figura 13 -	Estrutura do nucleossomo.....	39
Figura 14 -	Modificação epigenética de histonas pelas proteínas HDAC/HAT.....	40

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Diminuição dos níveis de mRNA de hBD-2, mediada por ExoU, em células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	50
Gráfico 2 -	A modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias, mediada por ExoU, foi independente da via de AKT.....	52
Gráfico 3 -	O aumento da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por <i>P. aeruginosa</i> , depende da via de JNK.....	54
Gráfico 4 -	A modulação da expressão de hBD-2 pela infecção com <i>P. aeruginosa</i> e a repressão parcial mediada por ExoU foram independentes da via de MEK/ERK.....	56
Gráfico 5 -	A via de p38 MAPK contribui para a maior expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa de <i>P. aeruginosa</i> não produtora de ExoU.....	58
Gráfico 6 -	A via de NF- $\kappa$ B contribui para a maior expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa de <i>P. aeruginosa</i> não produtora de ExoU.....	60
Gráfico 7 -	Importância de IL-1 $\beta$ na modulação da expressão de hBD-2 em resposta à infecção por <i>P. aeruginosa</i> produtora e não produtora de ExoU.....	62
Gráfico 8 -	A regulação negativa da expressão de hBD-2 por ExoU envolve a desacetilação da histona.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AA	Aedtaminoacetofenona
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAFF	Fator de ativação de células B
cDNA	DNA complementar
CFTR	Regulador transmembrana de fibrose cística
AKT	Protein kinase B
AP-1	Activator protein-1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
ERK	Extracelular signal related kinases
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
HAT	Histona acetiltransferase
HBD-2	Beta-defensina humana 2
HDAC	Histona desacetilase
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> amino-terminal kinases
LB	Luria Broth Base
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3k	Fosfatidilinositol 3-cinase
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Tirosina kinases

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa
TLR	Receptores semelhantes a toll
TSA	Tricostatina A
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de tratamento intensivo
UV	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	42
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
2.1 Cepas bacterianas.....	43
2.2 Células epiteliais alveolares.....	43
2.3 Preparo das suspensões bacterianas.....	44
2.4 Infecção das células epiteliais respiratórias com <i>P. Aeruginosa</i> .....	44
2.5 Tratamento das culturas celulares para pesquisa do papel de vias de sinalização intracelular na modulação da expressão de hBD-2 por ExoU.....	45
2.6 Tratamento das culturas celulares para pesquisa do papel da modificação de histonas na modulação da expressão de hBD-2 por ExoU.....	45
2.7 Análise do efeito de ExoU na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias.....	46
2.7.1 <u>Extração do RNA total</u> .....	46
2.7.2 <u>Síntese de DNA complementar (cDNA)</u> .....	47
2.7.3 <u>Análise dos níveis de mRNA de hBD-2 pelo sistema de detecção TaqMan - RT-qPCR</u> .....	47
2.8 Análise estatística.....	47
<b>3 RESULTADOS</b> .....	49
3.1 Avaliação da cinética da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas com <i>P. aeruginosa</i> .....	49
3.2 Efeito de ExoU na modulação dos níveis de mRNA de hBD-2 em culturas de células epiteliais respiratórias infectadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	49
3.3 Papel de AKT na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i>	51

3.4	Papel de c-Jun N-terminal cinase (JNK) na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i> .....	52
3.5	Papel de ERK na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i>	55
3.6	Papel de p38 MAPK na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i> .....	57
3.7	Papel de NF- $\kappa$ B na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i>	59
3.8	Importância de IL-1 $\beta$ na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por <i>P. aeruginosa</i> .....	61
3.9	Importância da desacetilação de histonas na regulação da expressão de hBD-2 por ExoU durante a infecção por <i>P. aeruginosa</i> .....	63
4	DISCUSSÃO.....	65
	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

## INTRODUÇÃO

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que se apresenta em forma de bastonete Gram-negativo, móvel e oportunista, prosperando em diversos ambientes naturais. Apresenta um amplo genoma que é capaz de expressar diversos mecanismos de patogenicidade e vias metabólicas, permitindo, assim, infectar muitos organismos, incluindo plantas, amebas, nematódeos e animais vertebrados (Williams *et al.*, 2010). Além disso, em ambiente hospitalar, pias, encanamentos e demais ambientes úmidos são importantes reservatórios para *P. aeruginosa* e frequentemente representam fontes de contaminação (Huszczynski *et al.*, 2019).

Apesar de raramente estabelecer processos infecciosos em indivíduos saudáveis, *P. aeruginosa* é capaz de colonizar indivíduos imunocomprometidos, como pessoas portadoras de fibrose cística, câncer ou AIDS, ou, ainda, que apresentem alguma lesão na barreira epitelial, como vítimas de queimaduras ou com feridas pós-operatórias. Nestes pacientes, *P. aeruginosa* causa diversas infecções oportunistas, que geralmente são associadas a altos índices de morbidade e mortalidade. As infecções por *P. aeruginosa* podem ser agudas ou crônicas, e incluem as de córnea, tecidos moles e tratos urinário e respiratório. De fato, *P. aeruginosa* representa a principal causa de pneumonia adquirida em unidades de terapia intensiva (UTI) e o trato respiratório é a principal porta de entrada para a invasão da corrente sanguínea (Foulkes *et al.*, 2019).

Notoriamente, *P. aeruginosa* é um patógeno de grande importância médica por seu papel crítico na morbidade e mortalidade não somente em pacientes que apresentam quadros clínicos de infecções agudas do trato respiratório mas também acometidos por doenças crônicas pulmonares, como a fibrose cística, caracterizada por uma desordem genética autossômica recessiva no canal transportador de íons cloreto e bicarbonato, responsáveis em manter o equilíbrio osmótico de múltiplas superfícies epiteliais, como a dos pulmões, resultando em um desequilíbrio iônico nesse ambiente e levando à formação de um muco espesso que dificulta a eliminação de micro-organismos. Uma vez infectados por esse patógeno oportunista com

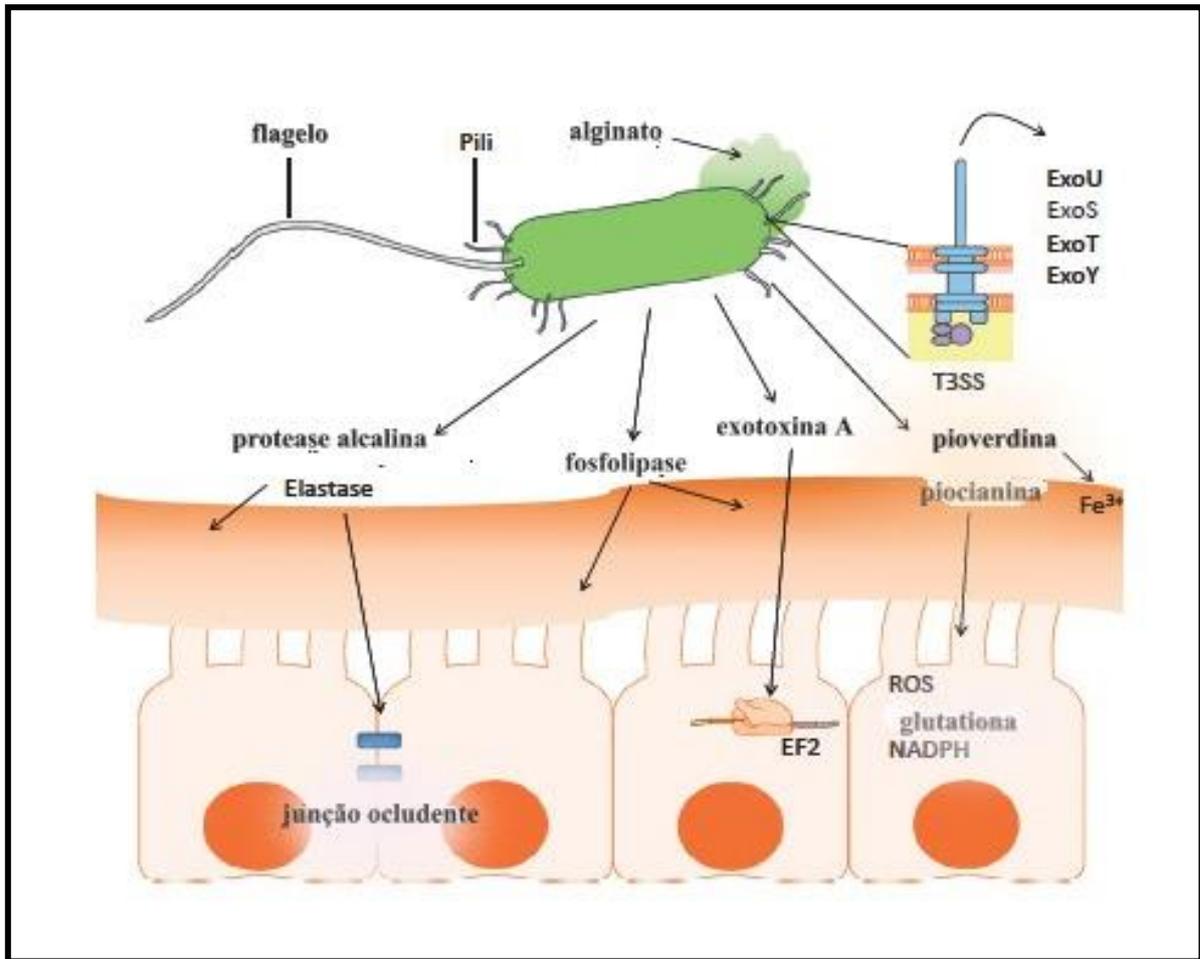
significativa resistência a antibióticos, o quadro clínico dos portadores de fibrose cística pode evoluir para dano pulmonar progressivo, falha do sistema respiratório, necessidade de transplante de pulmão e eventual óbito (Malhotra *et al.*, 2019).

As bactérias patogênicas produzem uma variedade de efetores que modificam o organismo do hospedeiro, atenuando a resposta imunológica e facilitando sua própria sobrevivência e disseminação. *P. aeruginosa* produz vários fatores de virulência que, juntamente a uma complexa rede regulada por sinalizações intracelulares e intercelulares, favorecem a adaptação bacteriana ao meio ambiente, o escape das defesas do hospedeiro e o sucesso do processo infeccioso (Foulkes *et al.*, 2019).

Como possui um grande número de reguladores transcricionais em seu genoma, *P. aeruginosa* consegue se adaptar a diferentes ambientes (Augustin *et al.*, 2007). Em organismos hospedeiros, o sucesso de *P. aeruginosa* como patógeno se deve aos seus mecanismos de resistência, tanto intrínsecos como adquiridos, a diversas classes de antimicrobianos, à sua capacidade de estabelecer biofilmes e a um grande repertório de fatores de virulência, que inclui numerosas enzimas secretadas e outras moléculas que são capazes de causar um extenso dano tecidual (Ilustração 1) (Huszczynski *et al.*, 2019).

O biofilme é caracterizado pela formação de uma estrutura que acomoda comunidades bacterianas contidas em uma matriz protetora constituída de polissacarídeos extracelulares. Esse ambiente fornece à bactéria um aumento da tolerância à dissecação e à ação de agentes oxidantes e de mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose, além de prejudicar a difusão de antibióticos. *P. aeruginosa* é capaz de formar biofilme não só em superfícies inertes, como ventiladores mecânicos e cateteres, mas também em pulmões de pacientes com fibrose cística, e esta propriedade facilita a colonização pelo patógeno (Franklin *et al.*, 2011).

Figura 1 - Múltiplos fatores de virulência são produzidos por *P. aeruginosa*.



Legenda: Flagelo e pili do tipo 4 são as principais adesinas capazes de se ligarem às células epiteliais do hospedeiro. Uma vez em contato com a célula hospedeira, o sistema de secreção do tipo III é ativado, injetando citotoxinas diretamente no citosol da célula. Os diversos fatores de virulência secretados pela bactéria apresentam um variado repertório de efeitos no hospedeiro, como (i) proteases que degradam efetores do sistema complemento, mucinas e junções ocludentes entre as células hospedeiras, favorecendo a disseminação do microorganismo, (ii) lipases e fosfolipases, que têm como alvo lipídeos de membranas celulares, (iii) piocianina, um pigmento azul-esverdeado capaz de interferir em vias de transporte de elétrons e no balanço redox, e (iv) pioverdina, que captura íons de ferro livres do ambiente.

Fonte: Adaptado de Gellatly & Hancock, 2013.

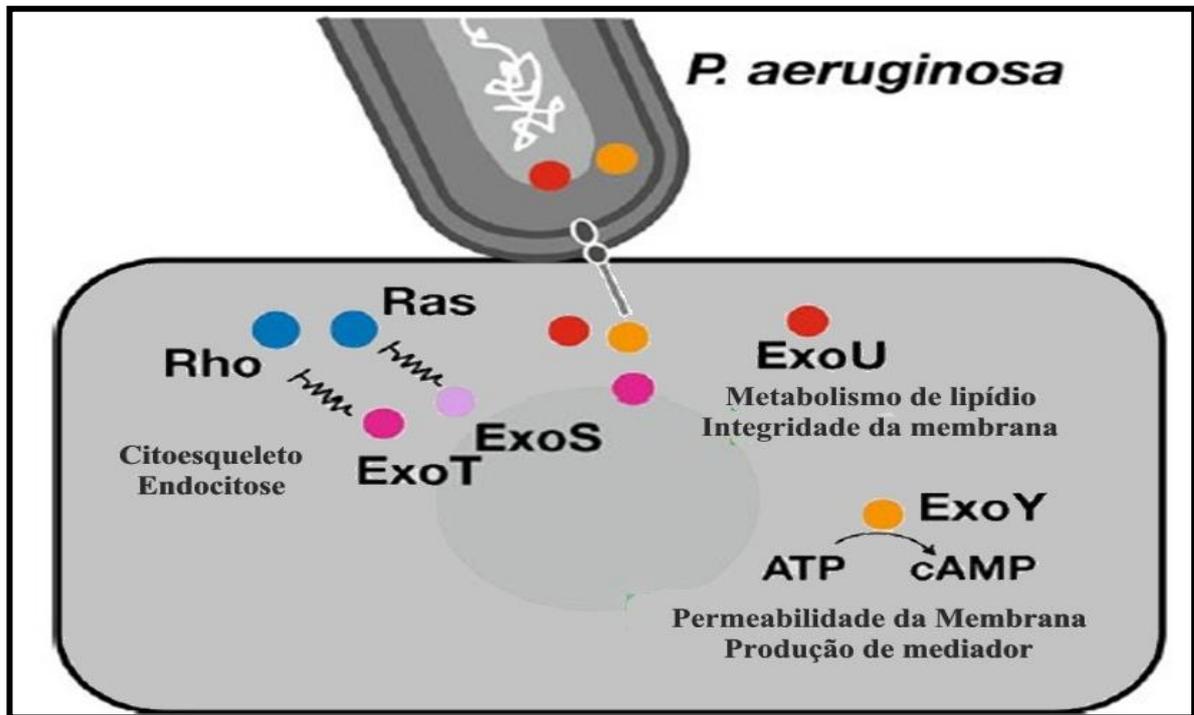
Dentre os vários fatores de virulência que contribuem para a patogênese de *P. aeruginosa*, o sistema de secreção do tipo III tem destacada importância, por permitir a injeção de toxinas bacterianas diretamente no citosol de células do hospedeiro, afetando as vias de sinalização celular eucarióticas de modo a favorecer o processo infeccioso (Coburn *et al.*, 2007).

Também chamado de “seringa molecular” ou “injectissoma”, o sistema de secreção do tipo III é um aparato complexo formado por várias subunidades proteicas que dão origem a uma estrutura translocadora em forma de agulha, que permite o transporte de fatores de virulência produzidos no citoplasma de bactérias Gram-negativas até o interior de células hospedeiras.

O “injectissoma” é um dos principais fatores de virulência de *P. aeruginosa* associado a infecções agudas do trato respiratório, e cepas que expressam um sistema de secreção do tipo III funcional capaz de secretar toxinas geralmente persistem em pulmões de pacientes hospitalizados, elevando o índice de mortalidade. Por outro lado, em pacientes com fibrose cística cronicamente colonizados, a atividade do sistema de secreção do tipo III pode mudar ao longo do tempo pela alteração da expressão de seus vários fatores de virulência, resultando na capacidade do patógeno em se adaptar a esse ambiente (Anantharajah *et al.*, 2016).

O sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa* é capaz de injetar quatro citotoxinas, denominadas ExoY, ExoS, ExoT e ExoU (Ilustração 2). Uma vez translocados para a célula hospedeira, estes fatores de virulência favorecem a persistência do micro-organismo, contribuindo para a evasão aos fagócitos, a invasão tecidual, a disseminação e a modulação da resposta inflamatória. A expressão do sistema de secreção do tipo III é altamente regulada, sendo induzida por baixa concentração de cálcio, presença de soro ou contato com células eucarióticas (Diaz & Hauser, 2010; Urbanowski *et al.*, 2005).

Figura 2 - Translocação de toxinas dependente de contato mediada pelo sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa*.



Legenda: *P.aeruginosa* transloca toxinas após contato direto com a superfície de células-alvo eucarióticas. ExoS e ExoT modulam o citoesqueleto e a endocitose através da interação com Ras e/ou Rho GTPases, ExoU desestabiliza a integridade dos lipídios de membrana, por ter como alvo os fosfolipídios, e ExoY causa edema pelo aumento de AMP cíclico.

Fonte: Adaptado de Sawa, 2014.

Dentre as quatro exotoxinas transportadas pelo sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa*, ExoU apresenta um efeito citotóxico único, o qual é rápido, potente e capaz de destruir monocamadas de vários tipos celulares após curtos períodos de infecção. Cepas de *P. aeruginosa* que são positivas para ExoU representam cerca de 28 a 48% dos isolados clínicos e são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões graves, além de estarem associadas ao aumento da resistência a múltiplas drogas, conforme relatado em vários estudos clínicos (Deruelle *et al.*, 2021), como o estudo de Subedi *et al.*, 2018 que mostrou o perfil de 22 isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com infecções oculares como a ceratite microbiana (inflamação da córnea) e de pacientes com fibrose cística pulmonar. Após o sequenciamento genético das amostras, o resultado mostrou que o gene *exoU* foi predominante (61,5%) nos isolados de ceratite, mas não nos isolados de fibrose cística pulmonar e que a presença do gene *exoU* está associado à alta resistência à algumas classes de antibióticos, onde todos os isolados com exceção de um apresentaram resistência à

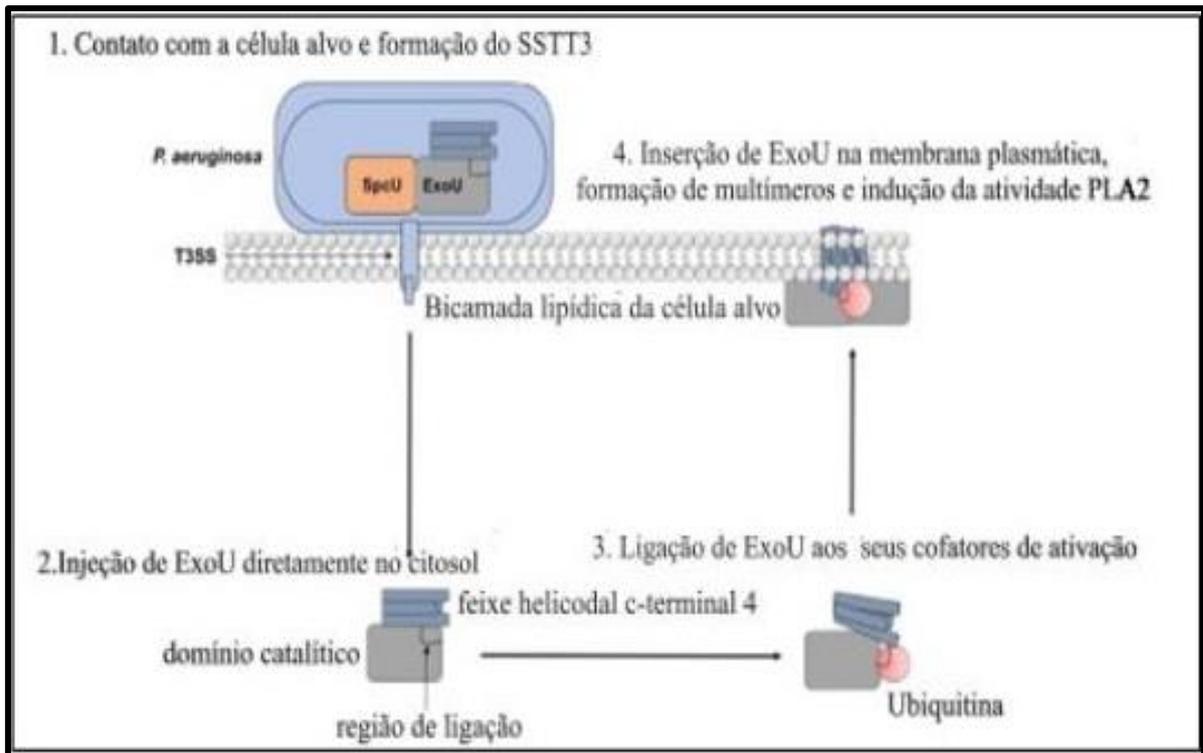
classe de antibióticos das fluoroquinolonas, ao passo que 100% destes foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos e 75% resistentes à quinolonas.

A produção de ExoU está associada à pneumonia aguda com grave lesão pulmonar em modelos animais de infecção e em pacientes com infecção aguda do trato respiratório, além de ser um importante agente em quadros de bacteremia e sepse (Lavoie *et al.*, 2011).

Os efeitos de ExoU são decorrentes de sua potente atividade enzimática do tipo fosfolipase A<sub>2</sub>. As fosfolipases são enzimas que medeiam diversas funções celulares, incluindo a manutenção de membranas, a renovação celular e a geração de resposta inflamatória. Fosfolipases são classificadas em quatro principais grupos de acordo com a posição em que clivam fosfolipídios de membrana. ExoU foi classificada como uma citotoxina com atividade tipo fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), pois hidrolisa ácidos graxos na posição sn-2. Os produtos resultantes da clivagem, como lisofosfolipídeos e ácido araquidônico, participam de diversas vias de sinalização e são precursores de potentes mediadores da resposta inflamatória (Sitkiewicz *et al.*, 2007).

ExoU é um marcador para cepas altamente virulentas e está associada à morte celular por necrose *in vitro* e *in vivo*. De fato, infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* capazes de expressar ExoU estão relacionadas a quadros clínicos graves e mau prognóstico, devido ao rápido e irreversível dano exercido pela atividade de PLA<sub>2</sub> deste fator de virulência (Foulkes *et al.*, 2019). A atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> de ExoU requer a participação de cofatores eucarióticos intracelulares (Ilustração 3), como ubiquitina, proteínas ubiquitinadas e o fosfolipídio fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, um lipídio de membrana biologicamente importante para vias de sinalização, organização e dinâmica do citoesqueleto, adesão, mobilidade e tráfego de membranas. A especificidade de cofatores eucarióticos permite que *P. aeruginosa* intoxique seletivamente células hospedeiras sem afetar a sua própria estrutura ao produzir a toxina (Sato & Frank, 2014).

Figura 3 - Mecanismos de toxicidade de ExoU



Legenda: **(1)** - *P. aeruginosa* se liga à célula alvo, o que estimula a formação do sistema de secreção do tipo III. **(2)** - ExoU é injetada na célula alvo pelo sistema de secreção do tipo III. **(3)** - Uma vez no citoplasma celular interage com cofator eucariótico ubiquitinizado. **(4)** - ExoU uma vez situado na membrana plasmática, sofre oligomerização para estimular sua total atividade catalítica, levando à lise celular.

Fonte: Adaptado de Foulkes *et al.*, 2019.

## Resposta inflamatória desencadeada por *Pseudomonas aeruginosa* no trato respiratório

Em média, o ser humano inala dez mil litros de ar diariamente. A respiração é uma porta de entrada não somente para gases atmosféricos, mas também para partículas nocivas difundidas no ambiente. Dessa forma, o epitélio pulmonar é continuamente exposto a micro-organismos, mas se mantém estéril sob condições fisiológicas normais (Dalcin & Ulanova, 2013).

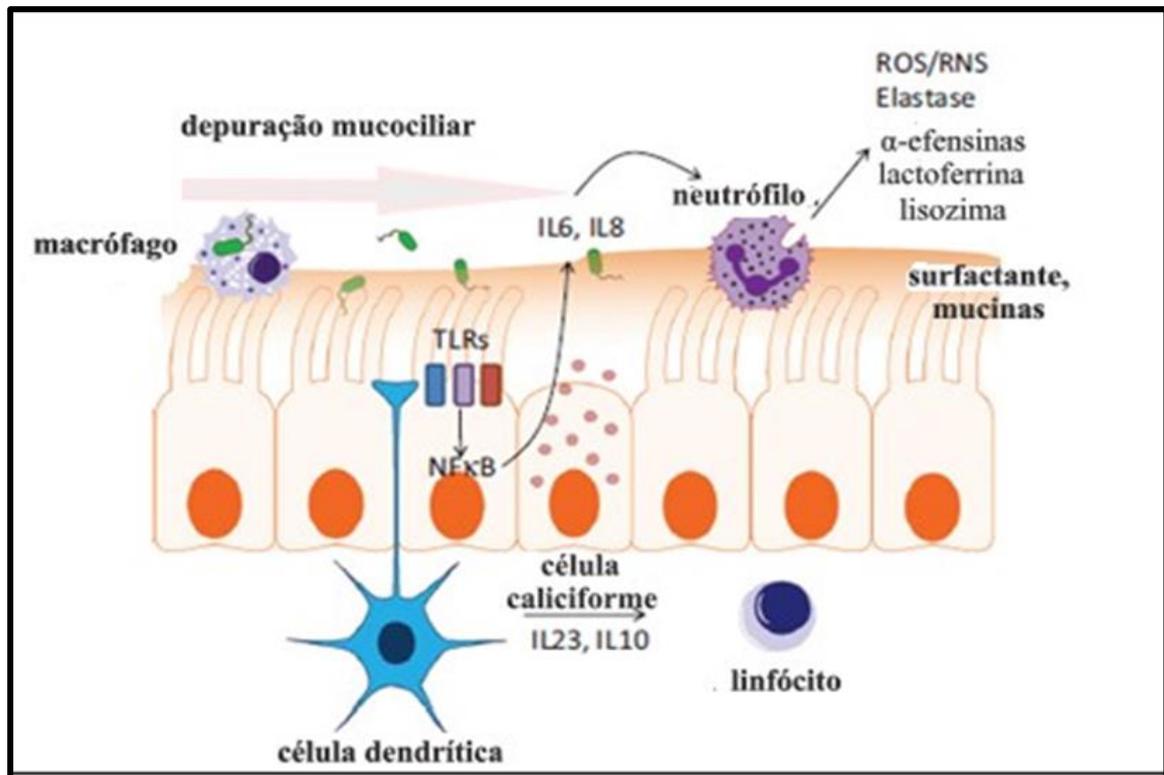
A primeira defesa do hospedeiro é a barreira física, que compreende a integridade do epitélio respiratório e o fluido de superfície das vias aéreas, que é viscoso e contém várias substâncias antimicrobianas. O fluido de superfície das vias

aéreas flui continuamente da região periférica do pulmão até a traqueia e em direção ao esôfago pelo movimento mucociliar, onde a força motriz desse fluxo ocorre pela batida sincronizada de cílios na superfície das células epiteliais das vias aéreas. Dessa forma, quaisquer partículas presas nas vias aéreas são transportadas por esse fluxo para fora do pulmão, em direção ao esôfago, em menos de 24 horas. Contudo, muitos micro-organismos conseguem ultrapassar as defesas das vias aéreas superiores, e a manutenção da esterilidade do pulmão contra patógenos bacterianos recai sobre macrófagos alveolares residentes e leucócitos recrutados, como as células polimorfonucleares (Laube *et al.*, 2006).

Diversos tipos celulares participam da proteção das vias aéreas, gerando efetores imunológicos. Esses efetores incluem citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos que são secretados em resposta ao estímulo inflamatório e regulam a ativação e o recrutamento de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e células dendríticas (Gellatly & Hancock, 2013).

Assim, quando *P. aeruginosa* penetra nas vias aéreas, há um encontro direto com células epiteliais respiratórias e leucócitos, que iniciam uma série de respostas imunológicas induzidas e direcionadas para a erradicação da bactéria, como a liberação de citocinas e quimiocinas que atraem fagócitos para o sítio de infecção (Ilustração 4). Desta forma, uma eficiente erradicação de *P. aeruginosa* depende do reconhecimento do patógeno pelas células hospedeiras através dos receptores semelhantes a Toll (TLR), que são capazes de reconhecer estruturas microbianas conservadas ou Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP). *P. aeruginosa* expressa vários PAMP que estimulam TLR, como o lipopolissacarídeo (LPS), que pode ser detectado por TLR4, ou a flagelina, detectada por TLR5 (Raoust *et al.*, 2009).

Figura 4 - Defesas das vias aéreas em resposta à inalação de micro-organismos



Legenda: Bactéria fica presa na camada viscosa de muco e é impulsionada para fora dos pulmões pelo batimento rítmico e unidirecional dos milhares de cílios das células epiteliais. Flagelo, LPS e pili de *P. aeruginosa* são altamente inflamatórios e podem ser reconhecidos pelos TLR de várias células do hospedeiro, iniciando a resposta inflamatória pela sinalização via NF-κB. Macrófagos alveolares ativados, bem como neutrófilos recrutados por IL-8, fagocitam *P. aeruginosa*. Células dendríticas na lâmina basal pulmonar ativam a resposta imune adaptativa, constituída de células T e B. O lúmen pulmonar se torna inóspito para micro-organismos pela presença de peptídeos antimicrobianos secretados, como as defensinas, lactoferrinas e lisozimas.

Fonte: Adaptado de Gellatly & Hancock, 2013.

As citocinas produzidas por células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, podem elevar a produção local dos peptídeos antimicrobianos, os quais participam da defesa do hospedeiro em superfícies epiteliais. Os peptídeos antimicrobianos atuam contra bactérias extracelulares através da permeabilização da membrana bacteriana, opsonização, quimiotaxia e modulação da produção de citocinas. Assim, os peptídeos antimicrobianos estão envolvidos no reconhecimento do patógeno invasor, inflamação, eliminação do patógeno e resolução do processo inflamatório (Castellheim *et al.*, 2009).

A descoberta dos peptídeos antimicrobianos data de 1939, quando o microbiologista Dubos extraiu um agente antimicrobiano de uma cepa do gênero *Bacillus* encontrada no solo, e demonstrou que esse extrato protegia camundongos

da infecção causada por pneumococo. Mais tarde, em parceria com o bioquímico Hotchkiss, outros peptídeos antimicrobianos foram descobertos, como a gramicidina, efetiva no tratamento de feridas e úlceras, e a tirocidina, efetiva contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas tóxica para células sanguíneas humanas. O primeiro peptídeo antimicrobiano de origem animal descoberto foi a defensina, isolada primeiramente a partir de leucócitos de coelho, em 1956. Nos anos posteriores, foram descritos outros peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de animais, como a bombinina, isolada da pele do sapo-de-pele-amarela europeu, e a lactoferrina, isolada do leite bovino (Bahar & Ren, 2013). Até o momento, mais de 19 mil peptídeos antimicrobianos foram descritos, incluindo os isolados de fontes naturais e os sintetizados artificialmente. Essas moléculas têm sido consideradas promissoras substitutas dos antibióticos convencionais, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos nas populações bacterianas (Liu *et al.*, 2017).

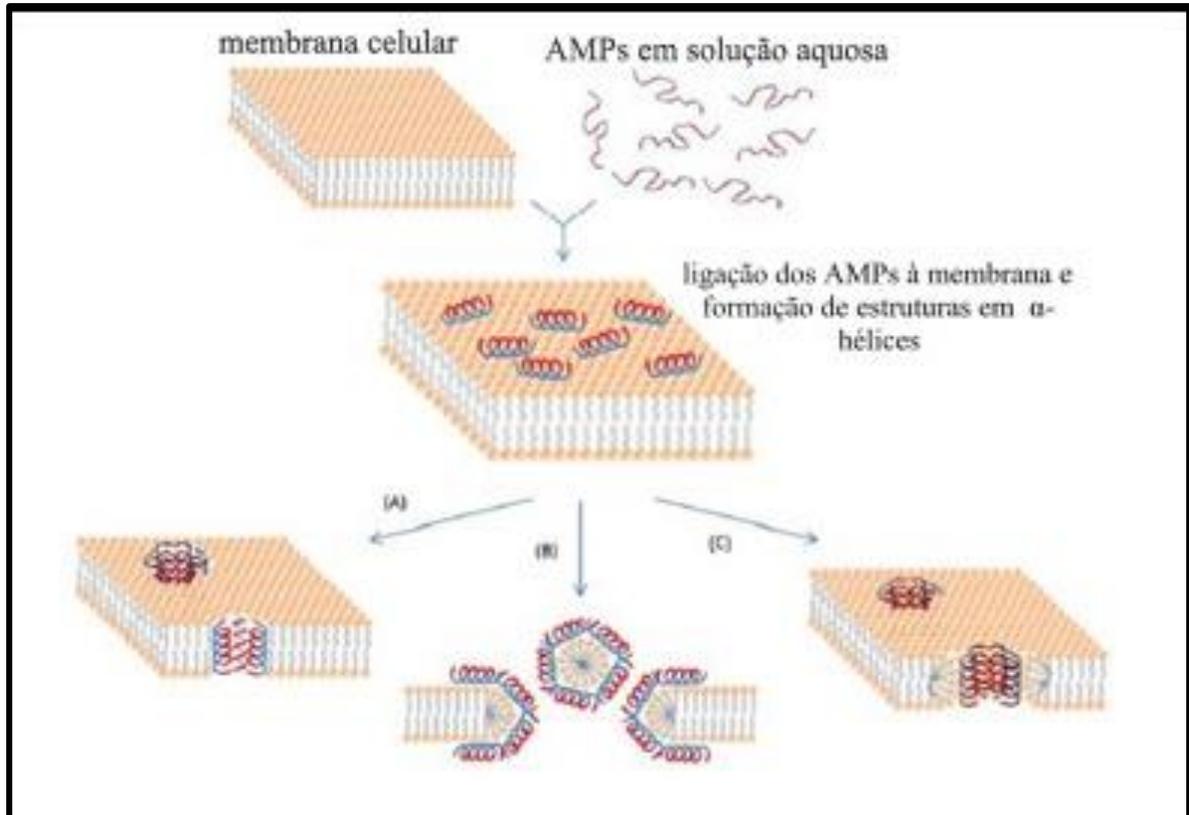
Peptídeos antimicrobianos são oligopeptídeos que apresentam um número variado de aminoácidos em sua constituição (de cinco a mais de 100 aminoácidos) e um amplo espectro de ação antimicrobiana, que pode abranger de vírus até parasitas. Peptídeos antimicrobianos naturais podem ser encontrados tanto em procariontes (bactérias) como em eucariontes (protozoários, fungos, plantas e animais). Em animais, os peptídeos antimicrobianos são principalmente encontrados em tecidos e órgãos que são expostos a patógenos presentes no ar. Os peptídeos antimicrobianos são componentes da primeira linha de defesa do sistema imune inato contra alguns vírus envelopados e não envelopados, bactérias e fungos, desempenhando um importante papel no controle de infecções. Outra importante característica dos peptídeos antimicrobianos é a sua capacidade de eliminar rapidamente o patógeno, pois podem matar micro-organismos segundos após o contato inicial com a membrana celular do agente invasor, além de potencializarem a ação de antibióticos através de efeitos sinérgicos (Bahar & Ren 2013).

Em sua maioria, os peptídeos antimicrobianos são catiônicos e anfipáticos, ou seja, apresentam tanto um domínio hidrofílico como um domínio hidrofóbico, permitindo-os se ligarem aos componentes lipídicos (região hidrofóbica) e a grupos de fosfolípidios (região hidrofílica) nas membranas bacterianas (Ilustração 5), levando à desintegração da estrutura da bicamada lipídica e à criação de poros que liberam o conteúdo celular, levando à consequente morte do micro-organismo invasor (Hielpos *et al.*, 2015).

De uma forma geral, os peptídeos antimicrobianos catiônicos são atraídos por forças eletrostáticas de carga negativa de grupos de fosfolípidios na superfície da membrana microbiana, como o LPS em bactérias Gram-negativas, ou ácido teicóico, ácido lipoteicóico e lisilfosfatidilglicerol em bactérias Gram-positivas. Uma vez que ganham acesso à membrana citoplasmática, os peptídeos antimicrobianos interagem com a bicamada lipídica, levando à sua ruptura (Lai & Gallo, 2009).

A porção hidrofóbica do peptídeo antimicrobiano ajuda a inserí-lo na membrana bacteriana, e esse mecanismo de interação depende de duas propriedades: estado catiônico e hidrofobicidade do peptídeo (Kang *et al.*, 2017). O rompimento de membranas bacterianas pode ocorrer por diferentes mecanismos, que incluem (i) a ruptura da bicamada lipídica pela inserção perpendicular dos peptídeos antimicrobianos às membranas celulares microbianas; (ii) o revestimento de uma pequena área da bicamada lipídica por micelas de peptídeos, que se inserem e formam poros; e (iii) o alinhamento perpendicular de peptídeos antimicrobianos à bicamada lipídica com associação de sua porção hidrofóbica à região central da bicamada e orientação da sua porção hidrofílica para a região do poro (Bahar & Ren, 2013).

Figura 5 - Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos ativos



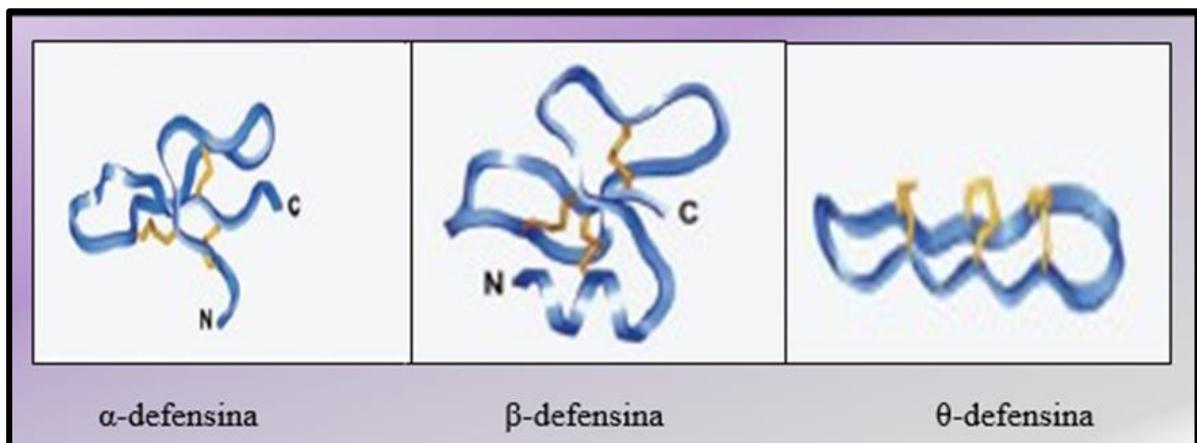
Legenda: (A)- Modelo "Barrel-Stave": inserção perpendicular de peptídeos antimicrobianos na membrana. (B)- Modelo Carpet: pequenas áreas da membrana cobertas por peptídeos antimicrobianos com a porção hidrofóbica voltada para o centro da bicamada lipídica e formação de poros. (C)- Modelo Toroidal: poro que se assemelha ao modelo "Barrel-Stave", mas os peptídeos antimicrobianos ficam em contato com fosfolípidios na membrana. Em azul porção, hidrofóbica dos peptídeos antimicrobianos e, em vermelho, porção hidrofílica. AMP: peptídeos antimicrobianos.

Fonte: Adaptado de Bahar & Ren, 2013.

Entre os peptídeos antimicrobianos, destacam-se as defensinas, que são pequenos peptídeos com peso molecular entre 3 e 5 kDa, que compartilham várias características entre si, incluindo uma curta sequência polipeptídica de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, carga positiva nos aminoácidos arginina e lisina, e atividade antimicrobiana decorrente da permeabilização das membranas bacterianas. As defensinas são ativadas por proteólise de seu precursor inativo (Lee & Lee, 2014; Selsted & Ouellette, 2005).

As defensinas são divididas em três subfamílias:  $\alpha$ -defensinas ( $\alpha$ - hélice),  $\beta$ -defensinas (folha  $\beta$  pregueada) e  $\theta$ -defensinas. As subfamílias diferem entre si pela composição dos aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais, como o posicionamento das três pontes dissulfeto intramoleculares, que estabilizam o peptídeo, e a conectividade da sequência dos seis resíduos de cisteína, que são conservados nas três subfamílias (Ilustração 6) (Ishii & Nagaoka, 2003; Lai & Gallo, 2009).

Figura 6 - Subfamílias de defensinas



Legenda: Defensinas maduras (em azul), com destaque dos diferentes arranjos das pontes dissulfeto (em amarelo).

Fonte: Adaptado de Selsted, 2005.

As  $\alpha$ -defensinas são expressas por neutrófilos, células de Paneth e pelas criptas intestinais (Laube *et al.*, 2006). As  $\theta$ -defensinas exibem uma única estrutura circular e foram isoladas de leucócitos de macacos rhesus e babuínos. Por análise genômica, também foi possível identificar genes das  $\theta$ -defensinas em outros macacos, como nos macacos colobus, gibão e orangotangos. Porém, nos genomas

de humanos, chimpanzés, gorilas e bonobos, há múltiplos pseudogenes da  $\theta$ -defensina com códons de parada que impedem o efetivo processo de tradução. Apesar dessa defensina não ser expressa de forma natural em humanos, tanto as formas sintética e natural do peptídeo codificadas por pseudogenes humanos, denominadas de retrociclinas, apresentam potente atividade antiviral e antibacteriana *in vitro* (Holly *et al.*, 2017).

As  $\beta$ -defensinas humanas (hBDs) são produzidas por células epiteliais de diversos órgãos, como pele, pulmões, rins, pâncreas, útero, olhos e mucosas nasal e oral. As  $\beta$ -defensinas hBD-1, hBD-2, hBD-3 e hBD-4 são expressas nas vias aéreas, enquanto hBD-5 e hBD-6 são expressas nos epidídimos (Smet & Contreras, 2005).

No trato respiratório, tanto na porção superior como na inferior, as células epiteliais ciliadas são responsáveis pela produção das quatro  $\beta$ -defensinas. HBD-1 é constitutivamente expressa por vários tecidos e sua produção pode ser modulada pela inflamação, ao passo que hBD-2, hBD-3 e hBD-4 são expressas por células estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1  $\beta$  (o indutor mais potente), TNF e IFN- $\gamma$ , por micro-organismos ou por produtos microbianos (Smet & Contreras, 2005; Laube *et al.*, 2006).

A hBD-2 é um peptídeo antimicrobiano catiônico monomérico, contendo seis resíduos conservados de cisteína ligados por três pontes dissulfeto. Constituída por 41 aminoácidos com peso molecular de 4 kDa, a hBD-2 foi o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado e identificado a partir de uma lesão na pele com psoríase (Dalcin & Ulanova, 2013). A produção de hBD-2 por células epiteliais e macrófagos é induzida por fatores bacterianos ou mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-17 e IL-22. HBD-2 apresenta uma ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e alguns vírus, atuando de forma sinérgica com outras moléculas antimicrobianas, como lactoferrina e lisozima (Ishii & Nagaoka, 2003).

Além disso, hBD-2 possui atividade quimiotática para células dendríticas imaturas e células T de memória, sugerindo que esse peptídeo contribui para a imunidade adaptativa por induzir a migração de células imunes (Scharf *et al.*, 2010). O estudo realizado por Niyonsaba *et al.*, 2002, revelou que hBD-2 é um potente quimioatraente para mastócitos, por apresentar receptores específicos expressos nessa população celular. Assim, a migração de mastócitos induzida por hBD-2 pode ser um mecanismo envolvido na resposta inflamatória mediado por essa defensina.

HBD-2 pode ser detectada em pacientes com doenças pulmonares infecciosas, mas não em indivíduos saudáveis, pois essa defensina é continuamente expressa em níveis muito baixos por células não estimuladas (Dalcin & Ulanova, 2013). Esse peptídeo antimicrobiano é mais concentrado no epitélio pulmonar, nas amídalas e na traqueia, desempenhando um papel crítico na prevenção de infecções pulmonares. Apesar de hBD-2 ser um importante efetor da imunidade inata pulmonar, há uma diminuição da expressão de hBD-2 e o comprometimento da sua funcionalidade durante infecções crônicas pulmonares causadas por *P. aeruginosa* em indivíduos com fibrose cística, o que contribui para a patogênese desse micro-organismo e eleva os índices de morbidade e mortalidade de pacientes acometidos por essa disfunção pulmonar (Ishii & Nagaoka, 2003).

A disfunção do regulador transmembrana de fibrose cística (CFTR), é responsável pela inabilidade de regular o transporte dos íons cloreto e bicarbonato através do epitélio, resultando em funcionamento anormal de diversos órgãos. A principal manifestação clínica da fibrose cística inclui um alto teor de cloreto que pode levar a infecções pulmonares crônicas e recorrentes por patógenos oportunistas (Malhotra *et al.*, 2019).

A elevada concentração do íon cloreto em pacientes com fibrose cística diminui a eficácia da hBD-2, devido à redução da interação eletrostática entre esse peptídeo antimicrobiano catiônico e a membrana de micro-organismos invasores. Neutrófilos são granulócitos que desempenham um papel chave na imunidade inata. Contudo, em indivíduos com fibrose cística, o acúmulo anormal e a persistência desses fagócitos no pulmão produzem uma resposta inflamatória que causa danos a esse órgão. Durante a infecção, *P. aeruginosa* induz a rápida morte de neutrófilos, estimulando a secreção de proteases, como a catepsina, pelos macrófagos pulmonares. Isso leva à clivagem das pontes dissulfeto de hBD-2, que são suscetíveis à atividade proteolítica das catepsinas, resultando em degradação e perda da atividade antimicrobiana de hBD-2 e favorecendo a infecção bacteriana (Dalcin & Ulanova, 2013).

As respostas imunológicas envolvem uma variedade de tipos celulares que reconhecem estímulos externos por meio de receptores e respondem a esses estímulos, ativando vias de transdução de sinais e fatores transcricionais que regulam a expressão de genes envolvidos nas respostas imunes.

NF- $\kappa$ B compreende uma família de fatores transcricionais diméricos com papel central na coordenação da resposta inflamatória e da diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. A ativação de NF- $\kappa$ B é finamente regulada, e sua desregulação está associada a uma variedade de doenças, desde o câncer às desordens imunológicas e inflamatórias. Em mamíferos, NF- $\kappa$ B consiste em uma família de cinco monômeros proteicos (p65/RelA, RelB, cRel, p50 e p52), que formam homo ou heterodímeros que se ligam ao DNA e regulam a transcrição de genes-alvo (Mitchell *et al.*, 2016).

Diversos estímulos podem ativar NF- $\kappa$ B, tais como PAMP, a exemplo do LPS, e citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Christman *et al.*, 2000). Células em repouso mantêm NF- $\kappa$ B sequestrado no citosol, pela associação de inibidores proteicos (I $\kappa$ B) aos dímeros de NF- $\kappa$ B, e impedem sua ligação ao DNA, bloqueando sua atividade de regulador transcricional. Após estímulo, a ativação da I $\kappa$ B kinase (IKK) resulta na fosforilação de I $\kappa$ B, levando à sua ubiquitinação e subsequente degradação via proteassoma 26S, com a consequente liberação dos dímeros de NF- $\kappa$ B, que migram para o núcleo e se ligam a sítios  $\kappa$ B na região promotora dos genes-alvo (Shih *et al.*, 2011).

Nas células, existem duas vias de ativação de NF- $\kappa$ B, que são: (i) a via canônica, que é induzida pela maioria dos estímulos, como, por exemplo, sinais provindos de receptores de citocinas (TNFR e IL-1R) e receptores de PAMP, mediando as respostas inflamatórias, e (ii) a via não canônica, que é induzida por membros específicos da família TNF, bem como pelo fator de ativação de células B (BAFF) e ligante de CD40, e está envolvida na diferenciação e maturação de células do sistema imune (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

AKT, também conhecida como proteína cinase B (PKB), modula a função de numerosos substratos envolvidos na regulação da sobrevivência, progressão e crescimento celulares. A ativação de AKT, que é estimulada por citocinas e fatores de crescimento, ocorre pela via de sinalização de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), membro de uma família de lipídeos com atividade de cinase caracterizados por sua habilidade em fosforilar o grupo trihidroxi do anel de fosfatidilinositol, gerando fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5) P<sub>3</sub>) e fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PI(3,4)P<sub>2</sub>) na face interna da membrana plasmática celular (Vara *et al.*, 2004). Uma vez fosforilado e ativado pela proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos-1 e -2 (PDK1 e PDK2), AKT se dissocia da membrana celular e é translocado para o citosol e o

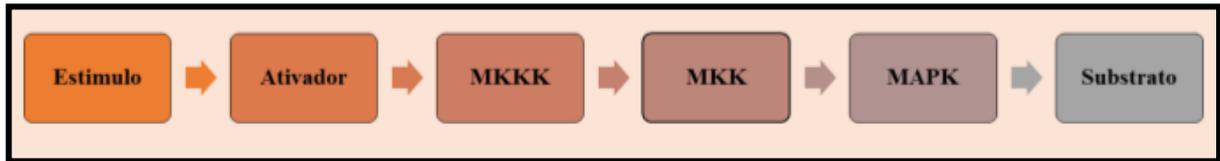
núcleo, onde pode ativar vias de sinalização através da fosforilação de vários substratos (Hers *et al.*, 2011).

As células eucarióticas também apresentam um vasto repertório de proteínas cinases, referidas como “mitogen-activated protein kinases” (MAPK), que estão envolvidas em vias de transdução de sinais intracelulares que resultam em diversas funções biológicas (Cuadrado & Nebreda, 2010). As cascatas envolvendo as MAPK estão entre as mais antigas e conservadas vias de sinalização das respostas imunológicas (Dong *et al.*, 2002) e são consideradas cruciais para a regulação da expressão de hBD-2 (Gan *et al.*, 2014).

As vias de sinalização das MAPK são compartilhadas por três cascatas distintas, que são classificadas de acordo com seus componentes, a saber: (i) ERK (extracellular signal-related kinases, ERK1/ERK2), (ii) c-Jun NH<sub>2</sub> amino-terminal kinases (JNK1/JNK2/JNK3) e (iii) p38 MAPK (Sun *et al.*, 2015). Essas vias são ativadas pela dupla fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina conservados nos grupos das MAPK, diferindo em um resíduo de aminoácido, sendo treonina-glutamina-tirosina (ERK), treonina-glicina-tirosina (p38) ou treonina-prolina-tirosina (JNK). A dupla fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina é mediada por uma cascata de proteínas cinase conservadas. Por exemplo, a via de ERK é ativada pelas MAP cinase cinases (MKK), MKK1 e MKK2. Essa ativação ocorre por várias MAP cinase cinase cinases (MKKK) diferentes (Dong *et al.*, 2002).

Assim, as atividades das MAPK são reguladas por três cascatas ou módulos, compostos por: i) MAPK, ii) MAPKK (MKK ou MEK) e iii) MAPKKK (MKKK ou MEKK) (Ilustração 7) (Chang & Karin 2001). Os módulos das MAPK podem ser ativados pelos receptores acoplados à proteínas G (GPCR).

Figura 7 - Sistema de fosforilação das vias das MAPK

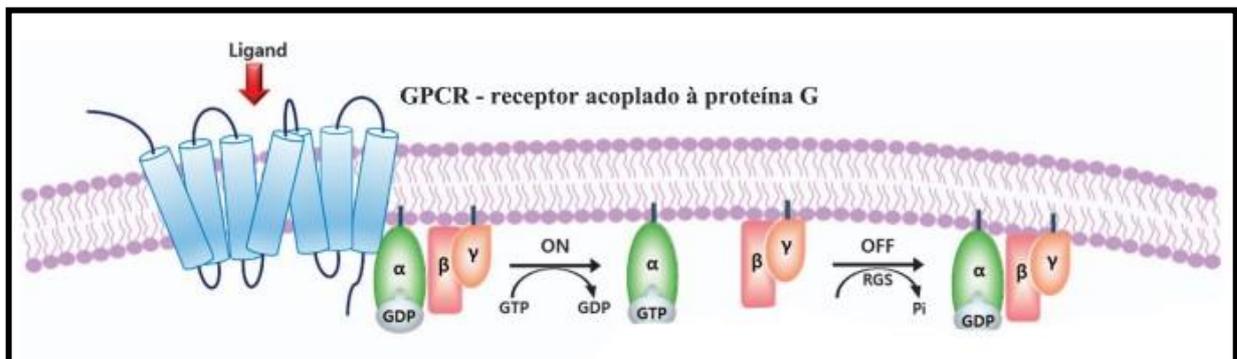


Legenda: Os módulos representam as conexões entre os respectivos componentes de cada uma das vias das MAPK.

Fonte: Adaptado de Johnson & Lapadat, 2002.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) são codificados por mais de 800 genes e constituem uma grande família de moléculas expressas na superfície celular, que estão envolvidas na transmissão de sinais via proteínas de ligação a GTP (guanosina 5'-trifosfato), que interagem com diferentes efetores subcelulares (Ilustração 8). Esses receptores desempenham papéis fisiológicos chave que resultam em uma rede funcional de vias de sinalização intracelulares. Porém, a disfunção desses receptores pode desempenhar diferentes papéis na origem e na progressão de diversas doenças, incluindo doença inflamatória intestinal, diabetes mellitus, câncer de mama e Parkinson (Crespo & Gutkind, 2004; Zeng *et al.*, 2020).

Figura 8 - Via de sinalização de receptores acoplados à proteína G



A desativação das MAPK é mediada por fosfatases que removem o grupo fosfato que havia sido transferido para o substrato alvo por uma MAPK. Dessa maneira, as ações das MAPK e das proteínas fosfatases regulam de forma rápida e coordenada a forma como as células respondem às mudanças em seu ambiente (Johnson & Lapadat, 2002).

As vias de ERK1 e ERK2 são amplamente expressas, e estão envolvidas na regulação de processos como a meiose, mitose, diferenciação, migração, senescência e apoptose celular. Diferentes estímulos que incluem fatores de

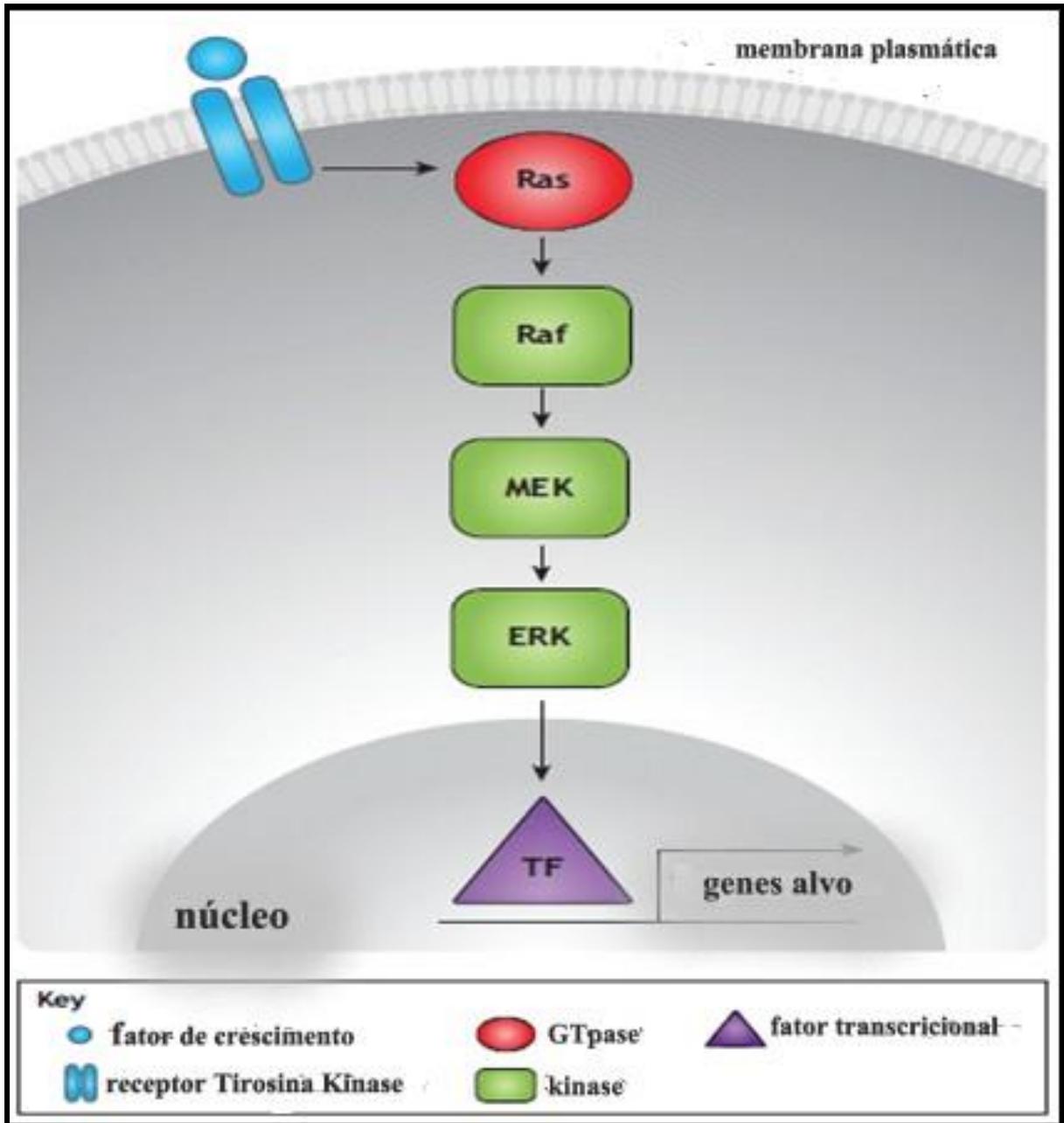
crescimento, citocinas, infecções e agentes cancerígenos, podem ativar essas vias (Chang & Karin 2001).

Na ausência de estímulos, ERK se encontra na forma inativa, ancorada no citoplasma por MKK ou proteínas âncora reguladoras. Uma vez fosforilada por MEK, ERK se dissocia das proteínas reguladoras e, dentro de poucos minutos, é translocada para o núcleo, onde regula a transcrição gênica por diversos mecanismos (Yang *et al.*, 2013).

A via de ERK se inicia quando diversas moléculas estimuladoras se ligam a receptores de transmembrana tirosina kinases (RTK), que, uma vez fosforilados, ancoram proteínas adaptadoras e sinalizadoras, como Ras, gerando uma sinalização complexa na membrana plasmática e estimulando a transdução de sinais intracelulares (Eblen, 2018). A ativação de Ras (Ilustração 9) facilita sua interação com uma variedade de substratos efetores, como Raf kinase, que, ao ser ativada, fosforila e ativa MEK 1 e MEK2, que ativam, respectivamente, ERK 1 e ERK 2 (Yaeger & Corcoran, 2019).

As cinases JNK são altamente responsivas a diversos estímulos celulares, incluindo citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, radiação ultravioleta (UV), infecções bacterianas e virais, choque térmico e estresse osmótico e genotóxico. JNK (Ilustração 10) é ativado por JNKK (JNK kinases) que por sua vez é regulada por JNKKK (JNK kinase kinases) (Hammouda *et al.*, 2020).

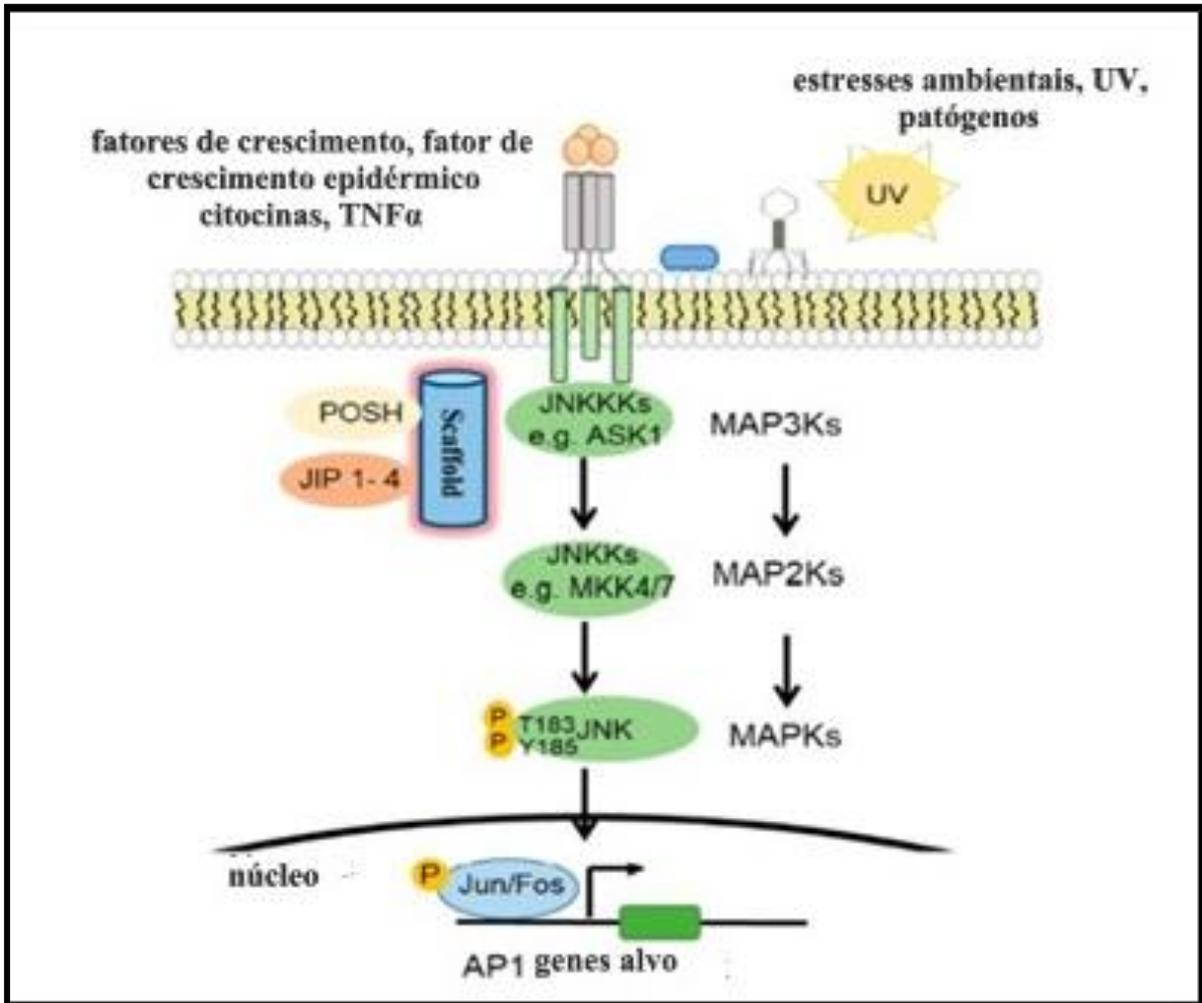
Figura 9 - Esquema simplificado da via de ERK



Legenda: Fatores de crescimento ativam a via de ERK pela ligação a receptores transmembrana tirosina cinases (RTK). O sinal é transmitido dos RTK à GTPase Ras, que, por sua vez, fosforila e ativa Raf cinase, que fosforila e ativa MEK, que fosforila e ativa ERK. ERK pode ser translocado para o núcleo, onde interage com fatores transcricionais e regula a expressão de genes alvo.

Fonte: Adaptado de Patel & Shvartsman, 2018.

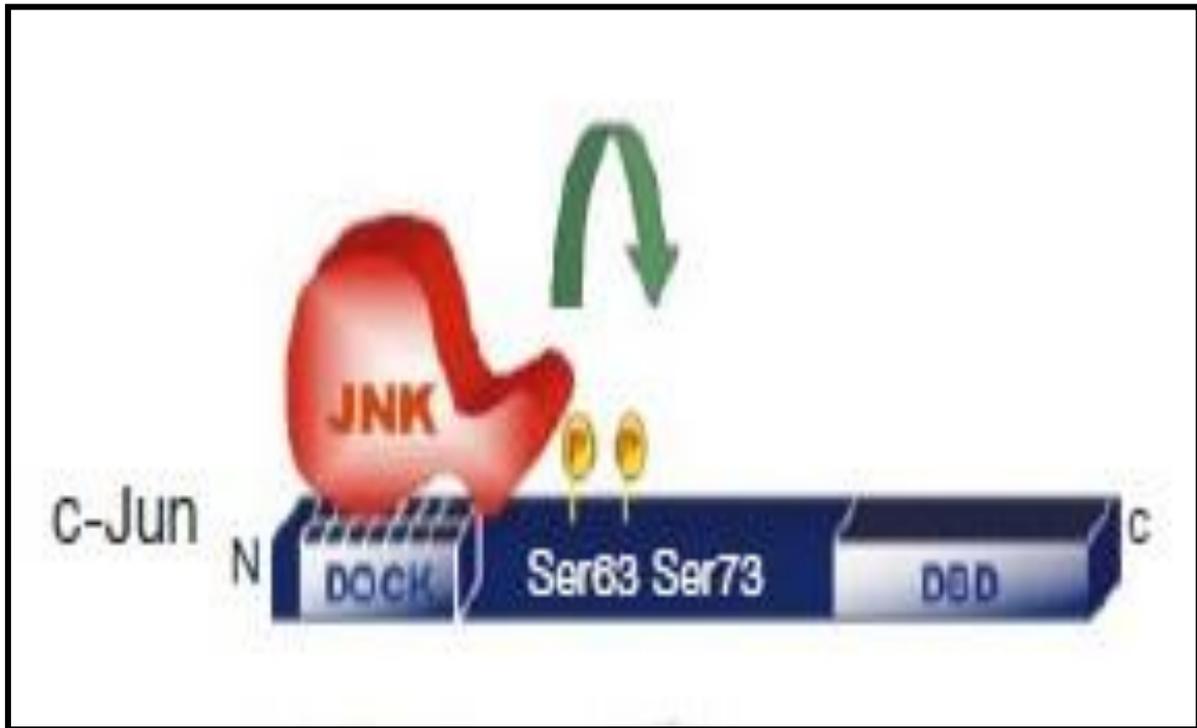
Figura 10 - Ativação da via de c-Jun N-terminal kinase (JNK)



Legenda: Em resposta ao estresse ambiental, fatores de crescimento e citocinas, JNKKK com ASK1 fosforila JNKK, especificamente MKK4 e MKK7, as quais ativam JNK e, finalmente, AP1.  
 Fonte: Adaptado de Hammouda *et al.*, 2020.

Uma vez ativada, JNK fosforila proteínas alvo, como o fator transcricional AP-1 (ativador protein-1). JNK fosforila os sítios aceptores de fosfato, serina 63 e serina 73, presentes em c-Jun, um componente do complexo transcricional de AP-1 (Ilustração 11) que se liga ao DNA e ativa a transcrição de genes, como os que codificam citocinas e fatores relacionados à apoptose (Johnson & Lapadat, 2002).

Figura 11 - Região de ancoragem para JNK em c-Jun



Legenda: Região de ancoragem para JNK em c-Jun. Local de c-Jun que determina a fosforilação específica de seus aceptores em serina 63 e serina 73 por JNK.

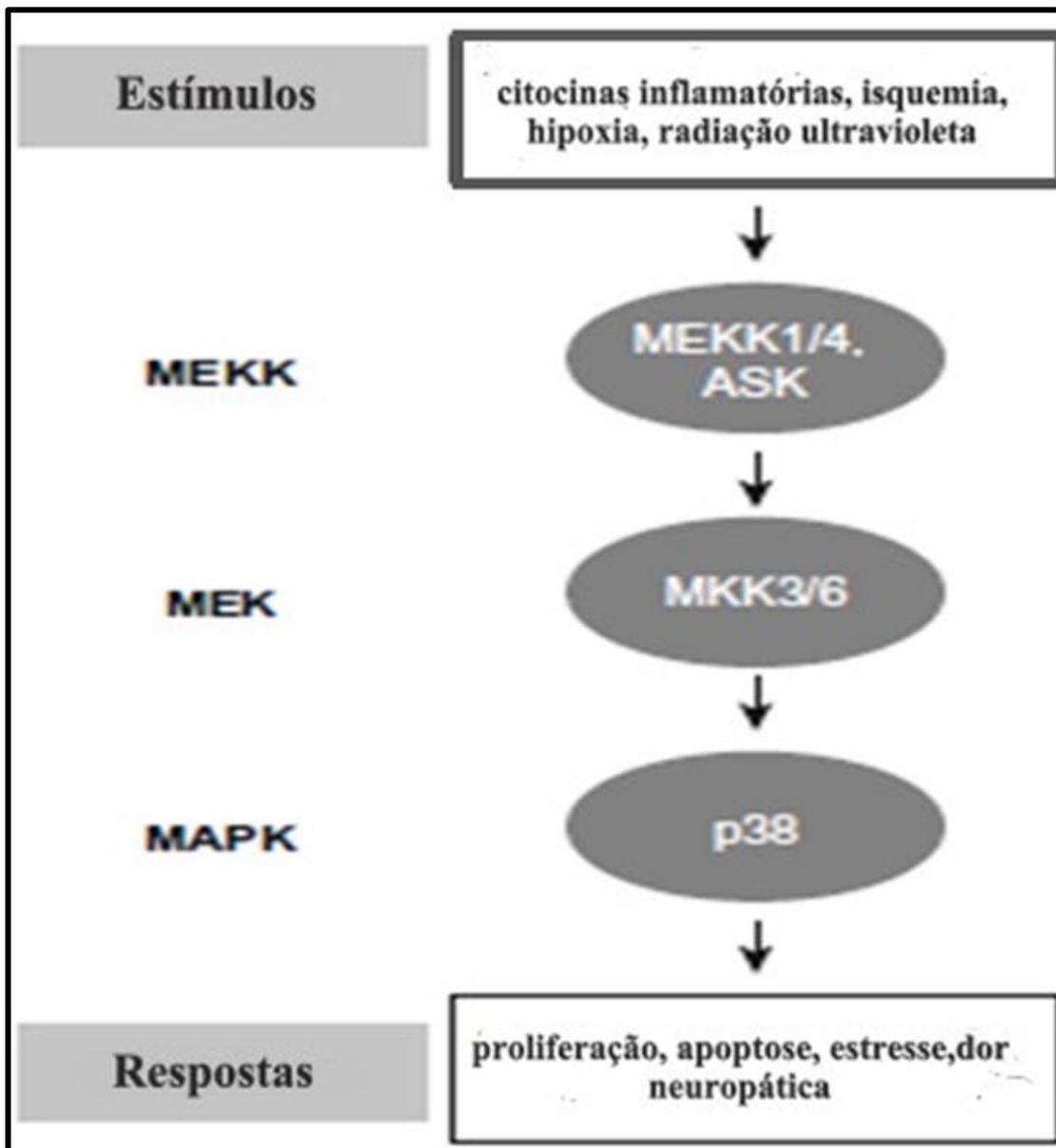
Fonte: Adaptado de Chang & Karin, 2001.

AP-1 é um fator transcricional dimérico composto por proteínas que pertencem às famílias Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2). A ativação dos membros da família do ativador transcricional AP-1 ocorre em resposta a diferentes estímulos, como citocinas inflamatórias, estresse ou patógenos, e leva ao estímulo das respostas imunes inata e adaptativa. Além disso, AP-1 também está envolvido em vários eventos celulares, incluindo diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose (Gazon *et al.*, 2018). Uma vez expressas, as proteínas c-Jun e c-Fos formam dímeros que se ligam a sequências de DNA. Porém, essas proteínas precisam ser fosforiladas por uma MAPK para que ocorra a ligação de AP-1 em seus sítios presentes nos promotores dos genes alvo, ativando a transcrição desses genes (Gustems *et al.*, 2014).

Com papel central na regulação da inflamação e de outros processos tais como proliferação celular, apoptose, estresse ambiental e dor neuropática, a p38 MAPK foi inicialmente identificada como uma quinase ativada por LPS. Atualmente, sabe-se que a p38 MAPK existe em quatro isoformas (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ ), que são

codificadas por genes distintos e apresentam diferenças em relação à especificidade pelo substrato e à distribuição tecidual, e é fortemente ativada por condições de estresse e citocinas inflamatórias, incluindo estresse osmótico e oxidativo, radiação UV, choque térmico, hipoxia, isquemia, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Uma vez ativada, a p38 MAPK pode ser translocada do citosol para o núcleo, ativando outras cinases e diversos fatores transcricionais (Sun & Nan, 2016) (Ilustração 12).

Figura 12 - Esquema simplificado da via de p38 MAPK



Legenda: P38MAPK é ativada por uma MAPK Kinase, a qual é regulada por MAPKK. MAPKK3 e MAPKK6 são as principais proteínas quinases responsáveis pela ativação de p38, mas não ativam as vias de JNK ou ERK.

Fonte: Adaptado de Sun & Num, 2016

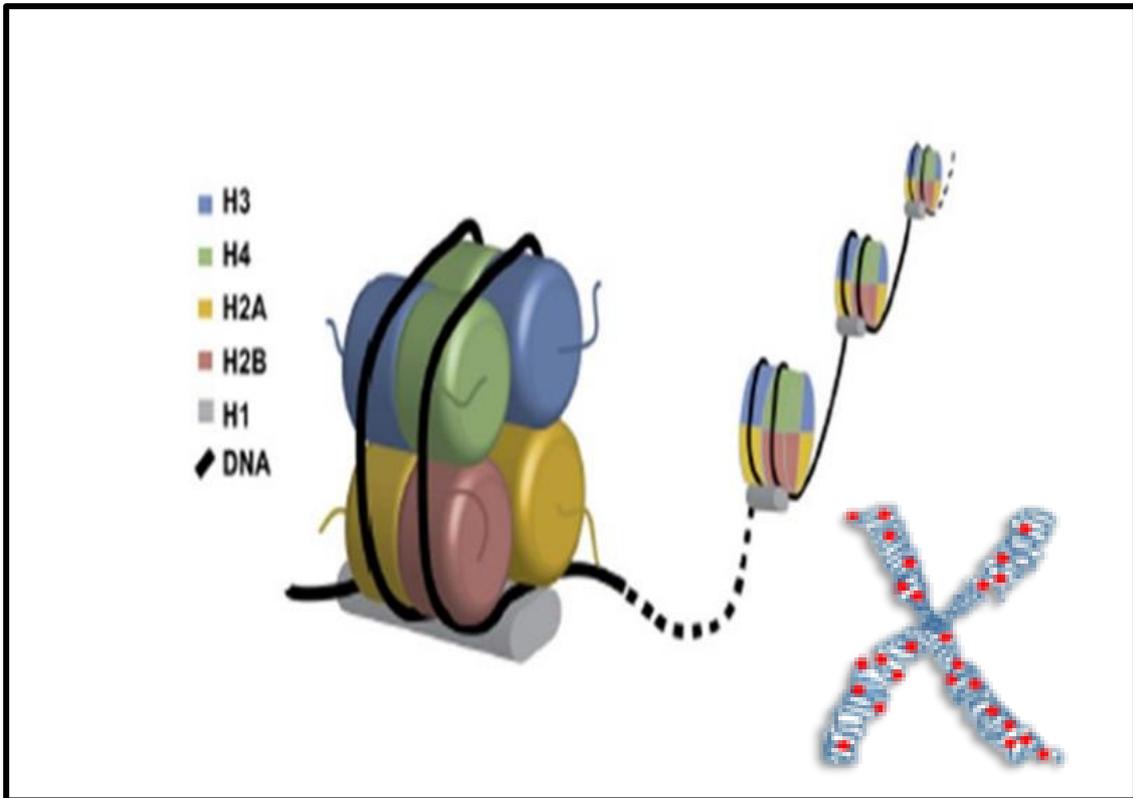
## Eventos epigenéticos na regulação da expressão da beta defensina humana 2

O termo epigenética foi introduzido por Conrad Waddington em 1942, através do estudo da interação ocasional entre os genes e seus produtos e do controle de mudanças fenotípicas que ocorrem ao longo do processo de desenvolvimento. Após décadas de descobertas científicas, a epigenética evoluiu através de estudos focados em mudanças herdadas durante a mitose e a meiose, sem alteração das sequências de DNA. A expressão de genes em mamíferos é regulada por múltiplos mecanismos epigenéticos e os principais processos são metilação do DNA, modificações das histonas, características da conformação da cromatina e moléculas de RNA não codificante (Zhang & Pradhan, 2014).

A regulação dos genes que codificam os peptídeos antimicrobianos envolve mecanismos epigenéticos de remodelamento da cromatina, através da condensação (“fechamento”) ou afrouxamento (“abertura”) resultante de modificações de estruturas nucleossômicas. Os nucleossomos (Ilustração 13) compreendem a unidade fundamental da cromatina e são constituídos pelo DNA que se associa a um cerne de histonas (H3, H4, H2A, H2B), formando um octâmero (Fischer *et al.*, 2016). O DNA “gira” em torno do octâmero de histonas, em aproximadamente duas voltas e a cada duzentos pares de base. Para estabilizar essa associação, a histona 1 (H1) auxilia a compactação do DNA e a separação de uma unidade de nucleossomo de outra (Hamon & Cossart, 2008).

O cerne das histonas é predominantemente globular, com exceção de sua cauda N-terminal ( $\epsilon$ -NH<sub>3</sub>) não estruturada com resíduos de lisina, que são os sítios onde ocorrem diversas modificações, incluindo os processos de metilação, fosforilação, ubiquitinação e acetilação. As modificações nas histonas afetam sua interação com o DNA e com outras proteínas, promovendo a mudança estrutural da cromatina, com exposição de regiões promotoras para o acesso de fatores transcricionais, reparo, replicação e condensação cromossômica (Kouzarides, 2007).

Figura 13 - Estrutura do nucleossomo



Legenda: Aproximadamente 147 pares de base giram em torno do cerne de histonas. Histona H1 separa uma unidade de nucleossomo do outro.

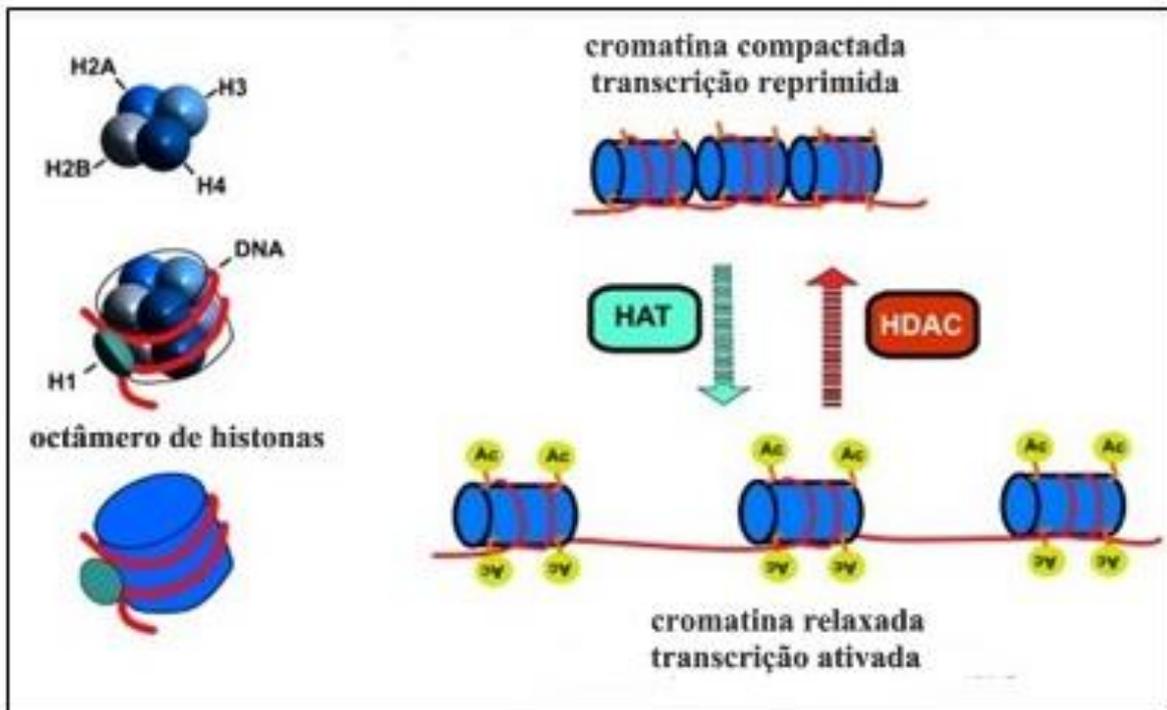
Fonte: Adaptado de Hamon & Cossart, 2008 e Zhang & Pradhan, 2014.

A acetilação das histonas e outras proteínas é um importante evento epigenético em células eucarióticas, de caráter reversível e capaz de regular a expressão de genes e atividades proteicas. Os níveis de acetilação de proteínas são controlados pelo dinâmico equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação das histonas, que são processos mediados pelas enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC), respectivamente. Uma variedade de substratos proteicos são alvos para a atuação das enzimas HAT e HDAC e estes incluem fatores transcricionais, como NF- $\kappa$ B. A acetilação de resíduos específicos das subunidades de NF- $\kappa$ B desempenha diferentes papéis, que vão desde a regulação de sua capacidade transcricional até sua habilidade em se ligar ao DNA e a duração de suas ações (Ghizzoni *et al.*, 2011).

As enzimas HAT catalisam a adição de grupos acetil aos resíduos de lisina na cauda N-terminal da histona, ao passo que as enzimas HDAC removem os grupos

acetil. Geralmente, pode ser feita uma correlação positiva entre o nível de acetilação e a atividade transcricional, pois esse processo promove o relaxamento da cromatina pela diminuição de carga positiva que interage com a carga negativa do DNA, facilitando, assim, a transcrição de genes. As enzimas HAT foram classificadas em famílias, sendo a família p300 a mais conhecida. Já as enzimas HDAC atuam como repressores transcricionais, ao promover a condensação da cromatina (Ilustração 14). A maioria das enzimas HDAC, que são 18 em humanos, é dependente de zinco e sua atividade enzimática pode ser inibida por compostos como a tricostatina A (TSA) (Fischer *et al.*, 2016).

Figura 14 - Modificação epigenética de histonas pelas proteínas HDAC/HAT



Legenda: A histona acetiltransferase estimula a ativação transcricional pela acetilação de resíduos de lisina na porção N-terminal das histonas, levando ao relaxamento da cromatina e à facilitação do acesso de fatores transcricionais à região promotora do gene. A histona desacetilase induz a repressão transcricional pela desacetilação de resíduos de histona, que leva à compactação do DNA e inibe a transcrição do gene alvo.

Fonte: Adaptado de Elmallah & Micheau, 2019.

Durante o processo evolutivo, diversos patógenos adquiriram a capacidade de explorar as funções celulares do hospedeiro para garantir sua sobrevivência, replicação e escape da resposta imune. A modificação de histonas e o remodelamento

da cromatina em células infectadas estão entre os mecanismos utilizados por patógenos para alterar o programa transcricional, muitas vezes levando à diminuição da eficácia da resposta imune inata (Hamon & Cossart, 2008).

De fato, um número crescente de estudos sugere que mudanças no epigenoma das células hospedeiras estão relacionadas a processos infecciosos agudos e crônicos. Adicionalmente, é possível que mudanças epigenéticas associadas a infecções sejam capazes de alterar as funções das células hospedeiras mesmo após o processo infeccioso ter sido resolvido (Fischer, 2020).

Estudos recentes têm associado o remodelamento da cromatina dependente de modificações da histona com a patogênese bacteriana, discutindo como esse processo influencia a expressão de genes relacionados à divisão, à diferenciação celular ou à inflamação. As modificações mais descritas em infecções por patógenos com vida intracelular obrigatória ou facultativa foram a acetilação, desacetilação, fosforilação e desfosforilação das histonas H3 e H4 (Fischer, 2020).

Em 2016 Bandyopadhyaya e colaboradores mostraram que uma molécula secretada pelo sistema *quorum sensing* de *P. aeruginosa*, denominada 2-aminoacetofenona (2-AA), foi capaz de regular a expressão e a atividade da HDAC-1, resultando na hipoacetilação da lisina 18 da histona H3 no *locus* de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que a inibição de HDAC1 evitou os efeitos imunomodulatórios de 2-AA que incluem a depleção das respostas imunológicas do hospedeiro e modulação do metabolismo o que permite a persistência de uma alta carga bacteriana. Além disso, o sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa* foi capaz de induzir eventos de desfosforilação e desacetilação da histona H3 em um mecanismo dependente da inserção de PopB e PopD, que são as proteínas do aparato de translocação que formam poros na membrana celular hospedeira (Dortet *et al.*, 2018).

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos são importantes efetores da imunidade inata e exibem uma ampla atividade microbicida contra uma variedade de bactérias, sendo hBD-2 um dos principais efetores da imunidade inata nos pulmões. Como ExoU é uma potente citotoxina associada ao mau prognóstico de infecções agudas causadas por *P. aeruginosa*, principalmente pneumonia em indivíduos hospitalizados, o presente estudo teve como foco investigar o papel de ExoU na regulação da expressão de hBD-2 por células humanas do epitélio pulmonar, avaliando diferentes mecanismos intracelulares envolvidos nesse fenômeno.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Avaliar a importância de ExoU na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Pesquisar a modulação da expressão de hBD-2 por ExoU;
- b) Investigar as vias de sinalização celular envolvidas na regulação da expressão de hBD-2 por ExoU;
- c) Pesquisar alterações epigenéticas envolvidas na modulação da expressão de hBD-2 por ExoU.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cepas bacterianas

Todos os experimentos de infecção foram realizados com a cepa laboratorial PA103 de *P. aeruginosa*, produtora da proteína ExoU, e sua mutante isogênica PA103 $\Delta$ exoU, que apresenta o gene *exoU* deletado (Saliba *et al.*, 2005). As cepas foram mantidas em estoque a -70°C, em meio Luria Broth Base (LB, Invitrogen) acrescido de 20% de glicerol.

### 2.2 Células epiteliais alveolares

As células epiteliais alveolares de carcinoma humano da linhagem A549 (ATCC: CCL-185) foram cultivadas em garrafas de culturas de células de 75 cm<sup>2</sup> contendo 5 ml de meio de cultura F-12 (Invitrogen) acrescido de soro fetal bovino a 10%, gentamicina a 50 µg/mL, fungizona a 2,5 µg/mL e glutamina a 250 µg/mL. Seguiu-se incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até a formação de tapetes celulares semi-confluentes.

Para realização dos experimentos, o número de células em cada variável foi padronizado. Para promover a dissociação das células aderidas às garrafas de cultura, os tapetes celulares foram tratados com uma solução contendo tripsina a 1% e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) a 0,1%, por 5 minutos, a 37°C. Após choque mecânico, as células dissociadas foram ressuspensas em meio de cultura F12 contendo 10% de soro fetal bovino, antibióticos e glutamina. Para verificar a viabilidade e a concentração das células, uma alíquota dessa suspensão celular foi analisada pela técnica de exclusão do azul de trypan (adição de azul de trypan a 0,4%, v/v, à suspensão celular) e contagem em câmara de Neubauer. Seguiu-se o ajuste da concentração celular e semeadura de 5 ml da suspensão celular contendo  $2,25 \times 10^5$

células/ml em cada garrafa de 25 cm<sup>2</sup>, para cultivo a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente 48h.

### 2.3 Preparo das suspensões bacterianas

Para cada experimento, as bactérias foram semeadas em LB ágar, pela técnica de esgotamento, e incubadas por 12 horas, a 37°C. Após esse período, uma colônia de cada cultivo bacteriano foi semeada em caldo LB acrescido de 30 µl de Ácido tetracético etileno glicol (EGTA-Sigma) a 0,5 M, um agente quelante de Ca<sup>2+</sup> do meio, e 30 µl de cloreto de magnésio a 1 M, e cultivada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, por 14 horas. Antes de cada procedimento experimental, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 1260 x g, por 15 minutos, a 15°C, para descarte dos sobrenadantes e ressuspensão dos sedimentos bacterianos em meio de cultura F-12 acrescido de soro fetal bovino a 10% e glutamina a 1%, de modo a serem obtidas suspensões bacterianas com densidade óptica igual a 0,1, em 680 nm de comprimento de onda, o que equivale a cerca de 1 x 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

### 2.4. Infecção das células epiteliais respiratórias com *P. Aeruginosa*

Para analisar o efeito da proteína ExoU na regulação da expressão do peptídeo catiônico hBD-2 durante a infecção por *P. aeruginosa*, células da linhagem A549 foram infectadas com 3 ml das suspensões bacterianas da cepa parental PA103 ou da mutante PA103Δ*exoU*, ou tratadas com 3 ml de meio de cultura F-12 acrescido de soro fetal bovino a 10% e glutamina (grupo controle). Após adição das suspensões bacterianas ou do meio de cultura, as células foram centrifugadas a 1260 x g, por 10 minutos, a 15°C, com o objetivo de favorecer o contato entre as bactérias e as células hospedeiras. Seguiu-se incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por 1 hora. Após esse período, os meios foram descartados e as culturas celulares foram tratadas com 3 ml de gentamicina a 300 µg/ml em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino

e glutamina, para eliminação de bactérias extracelulares. Seguiu-se incubação por mais 2, 5, 17, 29, 47 ou 71 horas, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2.5 Tratamento das culturas celulares para pesquisa do papel de vias de sinalização intracelular na modulação da expressão de hBD-2 por ExoU**

Para analisar as vias de sinalização intracelular envolvidas na regulação da expressão de hBD-2 por ExoU, 1 hora antes da infecção bacteriana, as culturas celulares foram tratadas com: (i) inibidor de AKT (Calbiochem) a 10 µM; (ii) inibidor de NF-κB, Wedelolactona (Santa Cruz), a 10 µM; (iii) inibidor de p38MAPK, SB203580 (Calbiochem), a 10 µM; (iv) inibidor de JNK, SP600125 (Calbiochem), a 10µM; (v) inibidor de MEK, UO126 (Calbiochem), a 10 µM; (vi) IL-1β (Abcam) a 20 ng/ml; (vii) anti-IL-1β (Abcam) a 500 µg/ml; ou (viii) dimetilsulfóxido (DMSO), quando este era o veículo. Todos os reagentes foram diluídos em meio de cultura F12 para obtenção das concentrações de uso. Após 1 hora com os tratamentos citados acima, as culturas celulares foram infectadas ou não com as cepas de *P. aeruginosa*, centrifugadas e incubadas por mais 1 hora, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os meios foram descartados e as culturas foram tratadas com gentamicina a 300 µg/ml, acrescida de cada reagente descrito acima, em meio F12 acrescido de 10% de soro fetal bovino e glutamina. Seguiu-se incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 29 horas.

## **2.6 Tratamento das culturas celulares para pesquisa do papel da modificação de histonas na modulação da expressão de hBD-2 por ExoU**

A acetilação das histonas promove o relaxamento da cromatina, facilitando a ativação transcricional. Por outro lado, as enzimas histona desacetilases (HDAC) atuam como repressores transcricionais, pela condensação da cromatina em decorrência da desacetilação de histonas (Fischer *et al.*, 2016).

Para analisar o papel da resposta epigenética mediada pelo fenômeno da desacetilação de histonas no efeito de ExoU sobre a expressão de hBD-2, culturas

celulares foram pré-tratadas com um inibidor potente e reversível de HDAC, a tricostatina A (TSA). Assim, 1 hora antes de infecção bacteriana, as células foram pré-tratadas com TSA a 883,3  $\mu\text{M}$ , ou DMSO no mesmo volume utilizado para o TSA, diluídos em meio de cultura F12. Após 1 hora de tratamento, as células foram infectadas ou não com as cepas de *P. aeruginosa*, centrifugadas e incubadas por mais 1 hora, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os meios foram descartados e as culturas celulares foram tratadas com gentamicina a 300  $\mu\text{g/ml}$ , acrescida de TSA ou DMSO, em meio F12 com 10% de soro fetal bovino e glutamina. Seguiu-se incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 29 horas.

## **2.7 Análise do efeito de ExoU na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias**

### **2.7.1 Extração do RNA total**

Para investigar o efeito de ExoU na modulação dos níveis de mRNA de hBD-2, assim como o papel das vias de sinalização intracelular e da desacetilação de histonas nesse fenômeno, as células epiteliais da linhagem A549 infectadas ou não, pré-tratadas ou não, foram lisadas para recuperação do RNA total usando o kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após eluição do RNA, uma alíquota de cada amostra de RNA foi submetida à leitura em espectrofotômetro (NanoVue plus – GE healthcare) para a obtenção de sua concentração e pureza, nos comprimentos de onda de 260nm e 28nm, respectivamente.

### 2.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada com o auxílio do kit GoScript Reverse Transcription System (Promega). Para cada amostra, uma alíquota com cerca de 5 µg de RNA foi acrescida de 1 µl de oligo (dT)<sub>15</sub> e água livre de nucleases, totalizando um volume final de 5 µl. Seguiu-se incubação a 70°C, por 5 minutos, seguida de transferência para banho de gelo por 10 segundos. Após essa etapa, as amostras receberam o mix composto por água livre de nucleases, tampão de reação GoScript™, MgCl<sub>2</sub>, mistura de nucleotídeos, inibidor de RNase e a transcriptase reversa GoScript. Seguiu-se incubação das amostras a 25°C, por 5 minutos, para a etapa de anelamento; 42°C, por 1 hora, para extensão; e 70°C, por 15 minutos, para inativação da enzima transcriptase reversa. Os cDNAs foram armazenados a -70°C.

### 2.7.3 **Análise dos níveis de mRNA de hBD-2 pelo sistema de detecção TaqMan-RT-qPCR**

O sistema TaqMan possibilita a quantificação de transcritos por meio de uma sonda com propriedade fluorogênica que permite a detecção de produtos de PCR específicos que vão se acumulando durante os ciclos da reação, o que torna esse método mais acurado e sensível.

No sistema Taqman, uma sonda de oligonucleotídeo é construída com uma molécula repórter fluorescente ligada à sua terminação 5' e um quencher ligado à sua terminação 3'. Enquanto a sonda estiver intacta, a sua proximidade com o "quencher" reduz significativamente a fluorescência emitida pela molécula repórter. Entretanto, se a sequência específica estiver presente, a sonda se anela entre os sítios de ligação dos oligonucleotídeos iniciadores e é clivada na porção 5' pela atividade da Taq DNA polimerase durante a etapa de extensão. A clivagem da sonda separa a molécula fluorescente do "quencher", aumentando seu sinal (fluorescência), e a sonda é removida da fita alvo, permitindo a extensão do oligonucleotídeo iniciador até o seu final. Assim, à medida que moléculas fluorescentes são clivadas de suas respectivas sondas, é detectado um aumento do sinal da intensidade de fluorescência, que é

proporcional à quantidade de produtos amplificados. Dessa forma, quanto maior for o número de cópias iniciais do alvo em análise, maior será a intensidade da fluorescência observada (Introduction to Gene Expression-Getting Started Guide, 2010 - Applied Biosystems).

Para análise dos níveis de mRNA de hBD-2 nas amostras tratadas ou não com os diferentes reagentes para pesquisa das vias de sinalização celular, cada cDNA foi diluído a 1:20 em água deionizada livre de nucleases estéril. Já para a análise do evento epigenético de desacetilação de histonas na regulação da expressão de hBD-2 induzida por ExoU, cada cDNA tratado ou não com TSA foi diluído a 1:3.

Para todas as reações, 4,5 µl de cada cDNA diluído ou pool de RNA (para o controle sem a enzima transcriptase reversa) foram adicionados a 5,0 µl de mix da reação (TaqMan Gene Expression Master Mix 2X) e 0,5 µl da mistura de oligonucleotídeos iniciadores e sonda (TaqMan Assay 20X) para hBD-2 ou Gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), totalizando um volume de 10 µl de reação.

Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas TaqMan utilizados para a reação foram: (i) hBD-2 humano – Hs00175474\_m1 e (ii) GAPDH humano – Hs02758991\_g1. Os níveis de mRNA da enzima GAPDH, que é expressa constitutivamente nas células, foram utilizados para a normalização dos níveis de mRNA de hBD-2.

As amplificações foram realizadas no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e a expressão relativa de hBD-2 foi calculada através do método  $\Delta\Delta C_t$  pelo software StepOne v2.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi avaliada em triplicata.

## 2.8 Análise estatística

A partir dos resultados obtidos, foram calculadas as médias e erros padrões da média (SEM). Para determinar diferenças estatisticamente significativas, os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc.), após aplicação dos testes “one way analysis of variance” (ANOVA) e Bonferroni (comparison test), sendo  $p < 0,05$  considerado como valor significativo.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da cinética da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas com *P. aeruginosa*

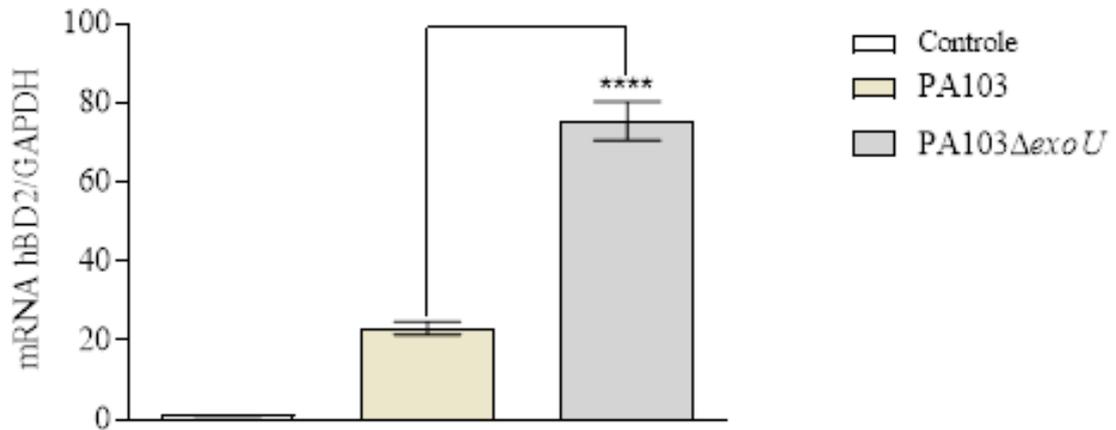
Células da linhagem A549 foram infectadas com a cepa parental de *P. aeruginosa*, produtora de ExoU, PA103, ou pela sua mutante isogênica, PA103 $\Delta$ exoU, com deleção do gene *exoU* (Saliba et al., 2005), ou tratadas com meio (controle), por diferentes períodos, a saber: 2, 5, 17, 29, 47 e 71 horas, de forma a se estabelecer o melhor período para infecção das culturas celulares e subsequente avaliação da expressão dos níveis do mRNA de hBD-2.

Durante as análises por RT-qPCR, verificou-se que, em tempos precoces de infecção (até 18 horas pós-infecção), a expressão do peptídeo antimicrobiano foi pouco estimulada pela infecção com *P. aeruginosa*, ao passo que, em tempos muito tardios (a partir de 48 horas pós-infecção), foi observada uma extensa morte das células hospedeiras (dados não mostrados). Desta forma, foi adotado o período de 30 horas de infecção para a análise da modulação da expressão dos níveis de mRNA de hBD-2 por ExoU.

#### 3.2 Efeito de ExoU na modulação dos níveis de mRNA de hBD-2 em culturas de células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*

A análise do efeito de ExoU mostrou que a infecção das células epiteliais respiratórias com a cepa parental de *P. aeruginosa*, PA103, levou a uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) dos níveis de mRNA de hBD-2 em comparação às culturas celulares infectadas com PA103 $\Delta$ exoU (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Diminuição dos níveis de mRNA de hBD-2, mediada por ExoU, em células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*



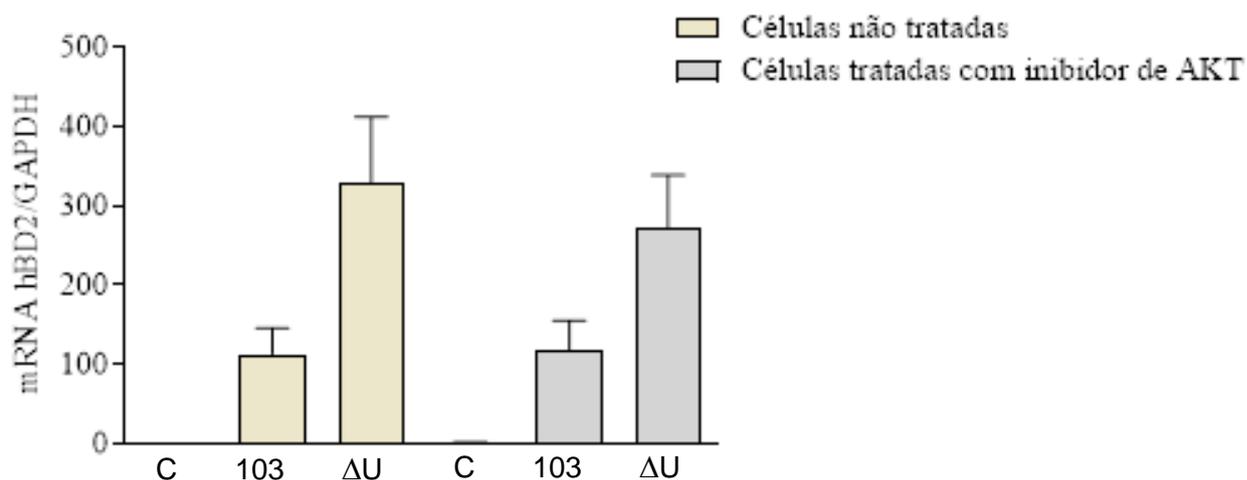
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com a cepa parental PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \*\*\*\* $P < 0,0001$  (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

### 3.3 Papel de AKT na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar a importância da sinalização celular dependente de AKT na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas, as culturas celulares foram tratadas com o inibidor de AKT 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado na Gráfico 2, a análise destes experimentos revelou que a inibição de Akt não afetou a modulação da expressão de hBD-2 por ExoU, já que houve uma redução dos níveis do mRNA de hBD-2 tanto nas culturas celulares previamente tratadas com o inibidor de Akt, quanto nas culturas não tratadas com o inibidor e infectadas com a cepa produtora de ExoU, PA103, em comparação às culturas infectadas pela cepa mutante não produtora de ExoU. Da mesma forma, os níveis de mRNA de hBD-2 nas culturas tratadas com o inibidor de Akt e infectadas com a cepa mutante e nas culturas controle não infectadas não diferiram significativamente das culturas não tratadas. Em conjunto, estes resultados mostram que a regulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias da linhagem A549, em resposta à infecção por *P. aeruginosa* produtora ou não de ExoU, é independente da sinalização mediada por Akt.

Gráfico 2 - A modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias, mediada por ExoU, foi independente da via de AKT



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de AKT a 10  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \* $p < 0,05$  (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

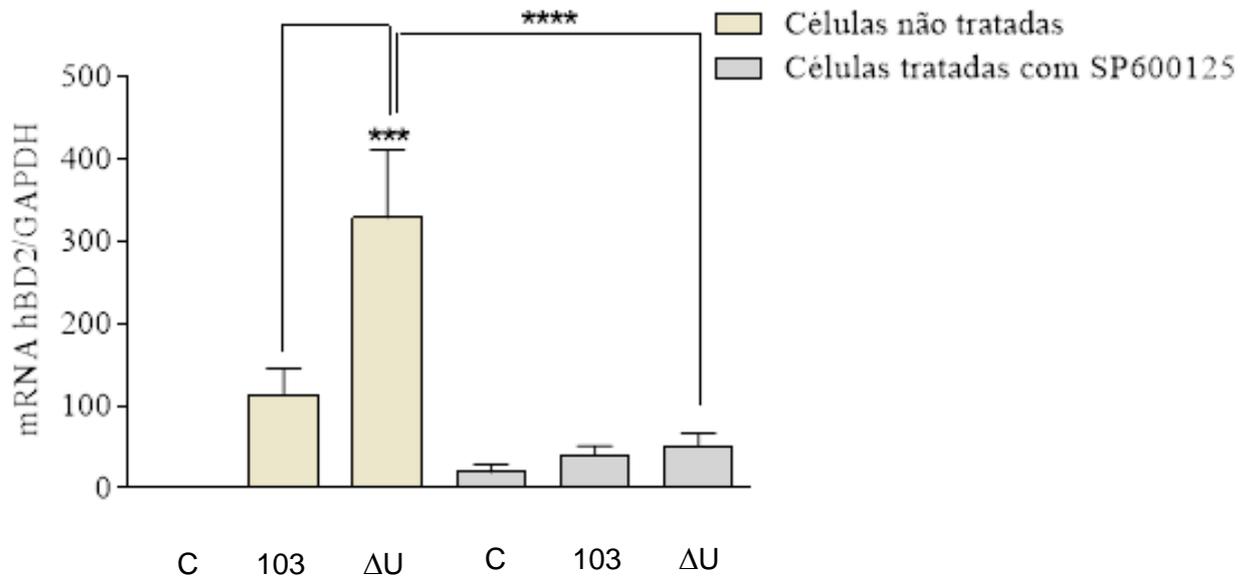
### 3.4 Papel de c-Jun N-terminal cinase (JNK) na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar o papel da sinalização celular dependente da via de JNK na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas, as culturas celulares foram tratadas com o inibidor de JNK, SP600125, 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado no Gráfico 3, a via de JNK é essencial para o aumento da expressão de hBD-2 nas células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por *P. aeruginosa*, pois o tratamento prévio com SP600125 levou a uma redução dos níveis do mRNA de hBD-2 nas culturas celulares infectadas pela cepa parental produtora de

ExoU, PA103, abolindo a diferença entre culturas infectadas pela cepa parental e culturas infectadas pela cepa mutante. Nas culturas celulares infectadas pela cepa mutante PA103 $\Delta$ exoU e não tratadas com SP600125 o nível do mRNA de hBD-2 foi significativamente maior quando comparadas às culturas celulares previamente tratadas com o inibidor de JNK e infectadas pela mesma cepa e ( $p < 0,0001$ ) quando os níveis do mRNA de hBD-2 das culturas infectadas pela cepa mutante foram comparados aos obtidos nas culturas celulares infectadas pela cepa produtora de ExoU, PA103.

Gráfico 3 - O aumento da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por *P. aeruginosa*, depende da via de JNK



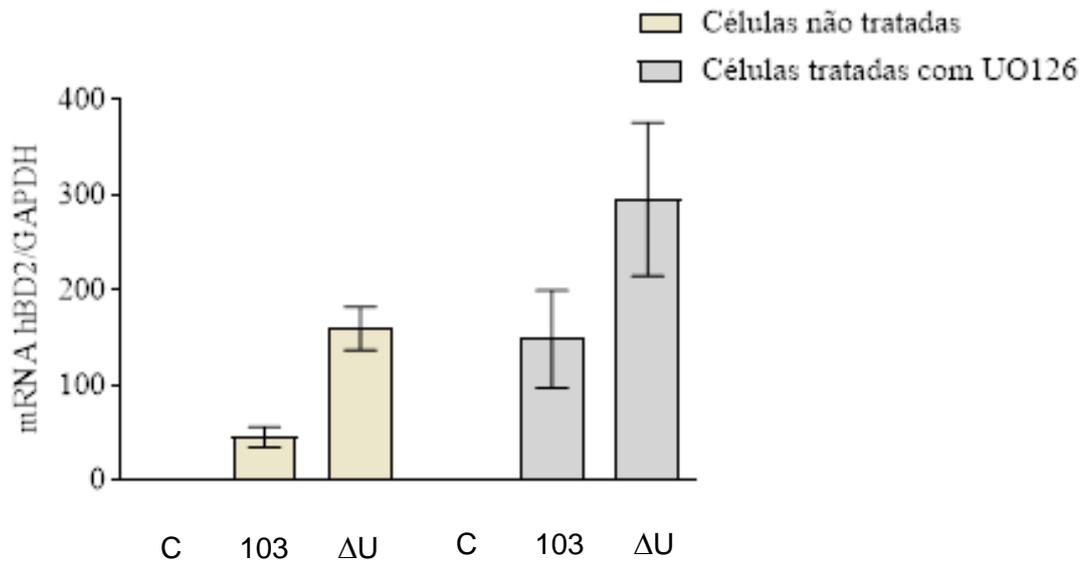
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de JNK, SP600125, a 10  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \*\*\* $p$ <0,001, \*\*\*\* $p$ <0,0001 (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

### 3.5 Papel de ERK na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar a importância da sinalização celular dependente de ERK na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas com *P. aeruginosa*, as culturas celulares foram tratadas com o inibidor de MEK1 e MEK2, UO126, 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Estes resultados mostraram que, embora a inibição da via de ERK tenha levado a um aumento dos níveis de mRNA de hBD-2 tanto de células infectadas com a cepa parental como de células infectadas com a cepa mutante, a diferença entre células tratadas e não tratadas com o inibidor não foi significativa. Além disso, assim como observado entre as células não tratadas, células tratadas com UO126 e infectadas com a cepa parental apresentaram menor expressão de hBD-2 do que células tratadas e infectadas pela cepa mutante (Gráfico 4). Dessa forma, os experimentos demonstraram que a via de ERK não interfere significativamente na modulação dos níveis de mRNA de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* e não contribui para a repressão da expressão de hBD-2 mediada por ExoU.

Gráfico 4 – Modulação da expressão de hBD-2 pela infecção com *P. aeruginosa* e a repressão parcial mediada por ExoU foram independentes da via de MEK/ERK



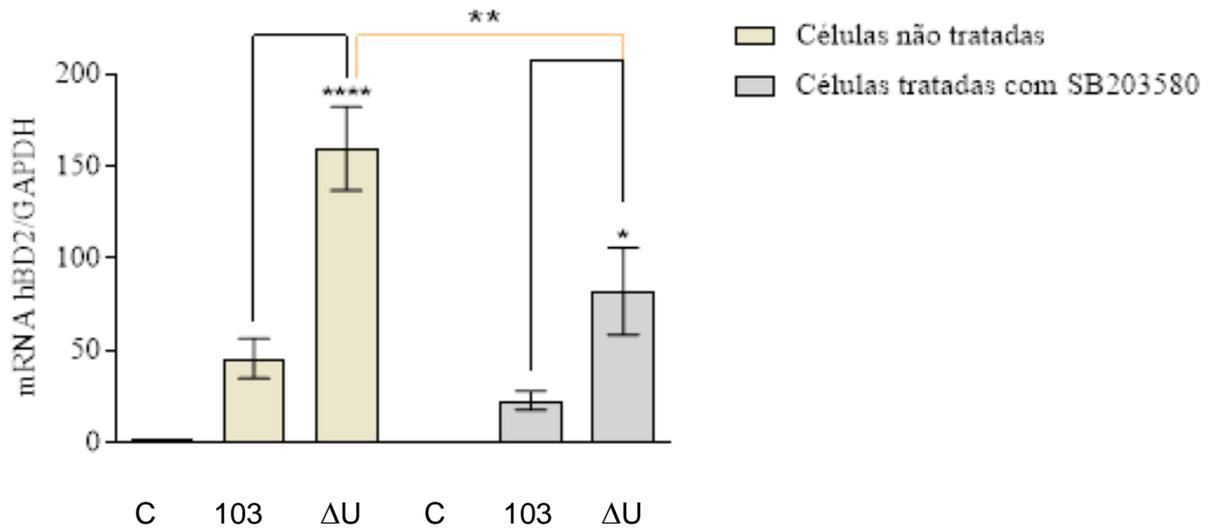
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de MEK, UO126, a 10  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

### 3.6 Papel de p38 MAPK na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar o papel da sinalização celular dependente de p38 MAPK na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas com *P. aeruginosa*, as culturas celulares foram tratadas com o inibidor SB203580, 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado na Gráfico 5, a análise destes experimentos revelou que a via de p38 MAPK é parcialmente responsável pelos maiores níveis de mRNA de hBD-2 detectados em células infectadas com a cepa mutante do que os detectados em células infectadas com a cepa parental, já que o tratamento com SB 203580 levou a uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) na expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa mutante. Entretanto, embora a diferença dos níveis de mRNA de hBD-2 observada entre as células infectadas pela cepa parental e as células infectadas pela cepa mutante tenha sido maior e mais significativa ( $p < 0,0001$ ) entre as culturas não tratadas, o tratamento com o inibidor de p38 MAPK não aboliu totalmente a diferença entre as cepas ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, os resultados sugerem uma possível interferência de ExoU na via de sinalização celular dependente de p38 MAPK, com a consequente redução da expressão de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa*.

Gráfico 5 - A via de p38 MAPK contribui para a maior expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa de *P. aeruginosa* não produtora de ExoU



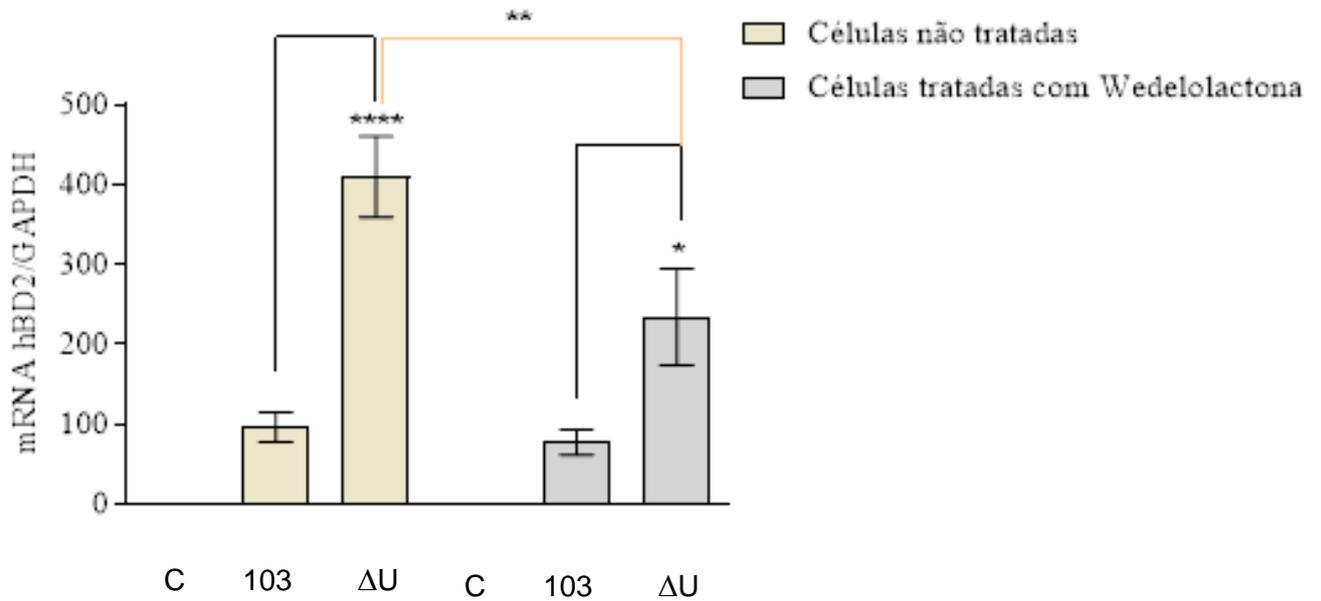
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de p38 MAPK, SB203580, a 10  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,0001 (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

### 3.7 Papel de NF- $\kappa$ B na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar o papel da ativação de NF- $\kappa$ B na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas com *P. aeruginosa*, as culturas celulares foram tratadas com o inibidor wedelolactona, 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado no Gráfico 6, os resultados revelaram que o tratamento com wedelolactona foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,01$ ) os níveis de mRNA de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa mutante PA103 $\Delta$ exoU, sugerindo a participação da via de NF- $\kappa$ B na modulação da expressão de hBD-2 por outros fatores de virulência de *P. aeruginosa* que não ExoU. No entanto, embora a diferença de expressão de hBD-2 entre as células infectadas pela cepa parental e as células infectadas pela cepa mutante tenha sido maior e mais significativa ( $p < 0,0001$ ) quando as culturas não tratadas foram comparadas, o tratamento com o inibidor de NF- $\kappa$ B não aboliu totalmente a diferença entre as cepas ( $p < 0,05$ ).

Gráfico 6 - A via de NF-  $\kappa$ B contribui para a maior expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa de *P. aeruginosa* não produtora de ExoU



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de NF-  $\kappa$ B, wedelolactona, a 10  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. As barras representam a média do erro padrão  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*\*p < 0,0001 (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

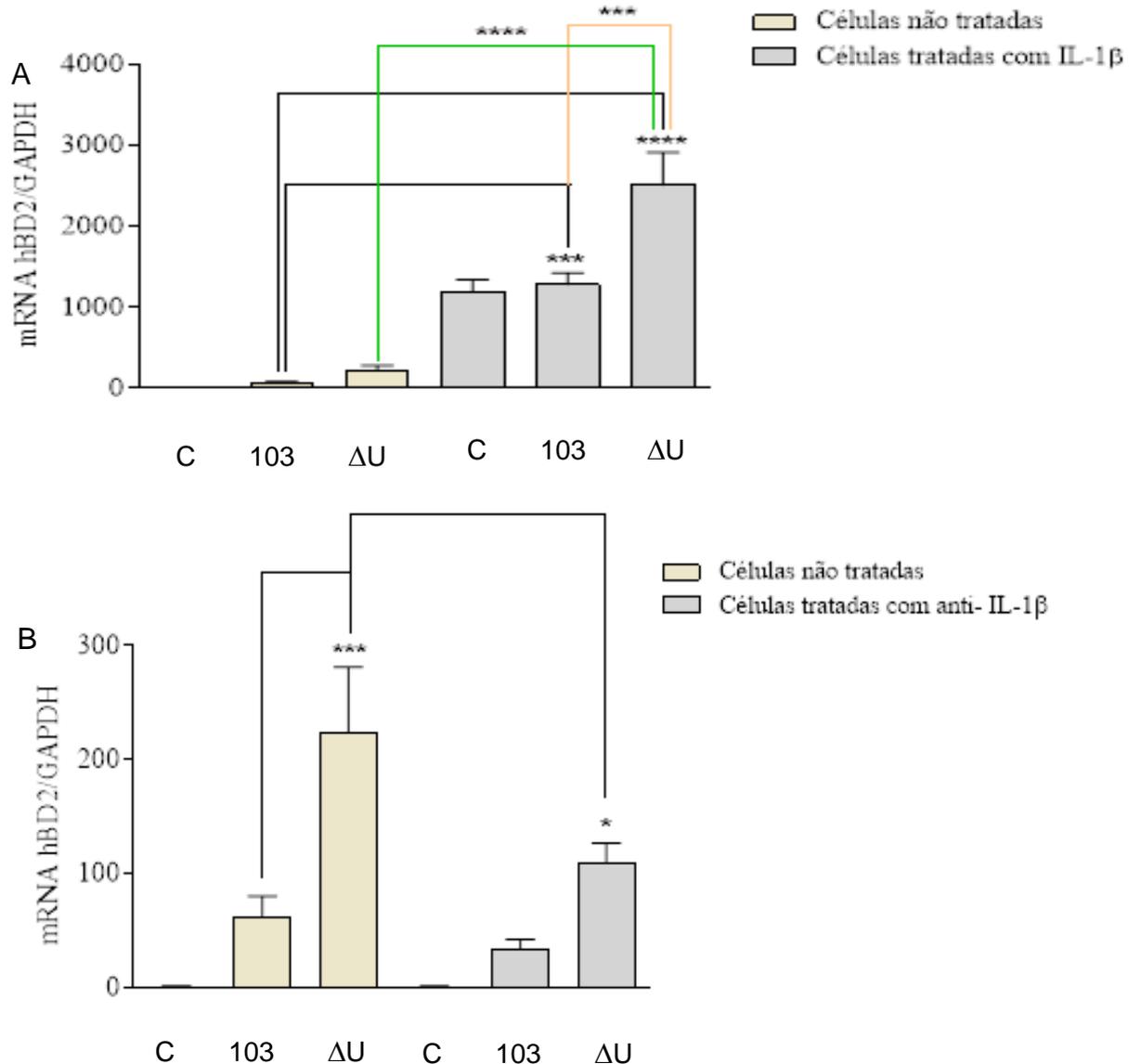
### 3.8 Importância de IL-1 $\beta$ na regulação da expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias por *P. aeruginosa*

Para avaliar o papel de IL-1 $\beta$  na modulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais respiratórias infectadas por *P. aeruginosa*, as culturas celulares foram tratadas com a proteína IL-1 $\beta$  humana recombinante ou com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$ , 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado no Gráfico 7A, o tratamento com a proteína recombinante levou a um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) dos níveis de mRNA de hBD-2 tanto nas culturas infectadas com a cepa parental ou mutante como nas culturas controle não infectadas. No entanto, a diferença na expressão de hBD-2 entre culturas tratadas com IL-1 $\beta$  e infectadas com PA103 e culturas tratadas com IL-1 $\beta$  e infectadas pela mutante PA103 $\Delta$ exoU manteve-se significativa ( $p < 0,001$ ).

Como mostrado no Gráfico 7 B, o tratamento com anti-IL-1 $\beta$  foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis do mRNA de hBD-2 nas culturas celulares infectadas pela cepa mutante não produtora de ExoU, PA103 $\Delta$ exoU. Além disso, embora tenha sido observada uma maior expressão de hBD-2 nas culturas tratadas com o anticorpo e infectadas com a cepa mutante do que nas culturas tratadas e infectadas com a cepa parental, esta diferença deixou de ser significativa com o tratamento.

Gráfico 7 – Importância de IL-1 $\beta$  na modulação da expressão de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* produtora e não produtora de ExoU



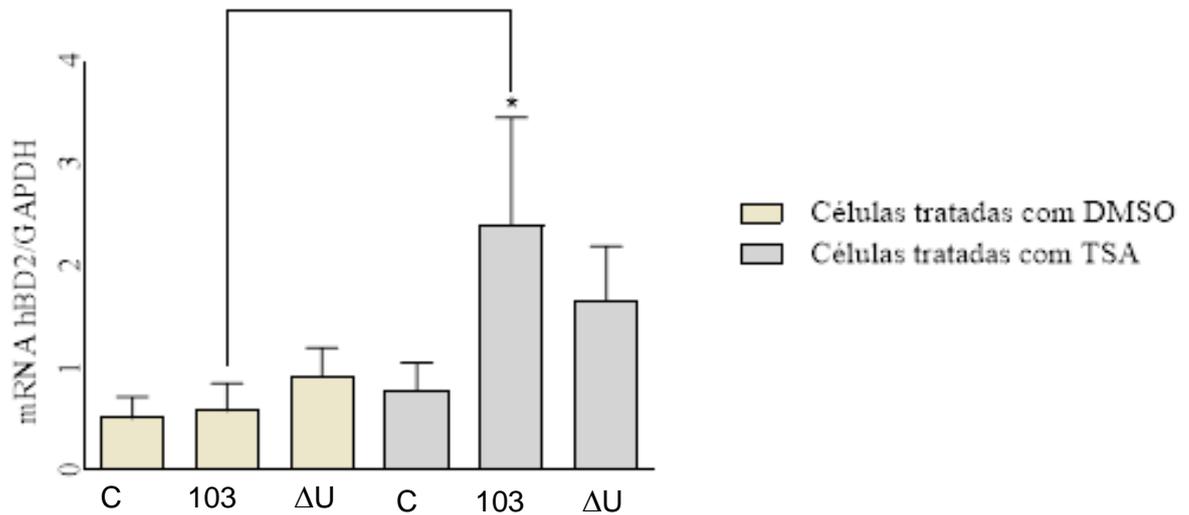
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com a proteína IL-1 $\beta$  recombinante a 20 ng/ml (A) ou com anticorpo anti-IL-1 $\beta$  a 500  $\mu$ g/ml (B), por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. O gráfico representa a média  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

### **3.9 Importância da desacetilação de histonas na regulação da expressão de hBD-2 por ExoU durante a infecção por *P. aeruginosa***

Para avaliar a importância da desacetilação de histonas na inibição da expressão de hBD-2, mediada por ExoU, em culturas de células epiteliais respiratórias infectadas com *P. aeruginosa*, as culturas celulares foram tratadas com tricostatina A (TSA), 1 hora antes da infecção com a cepa PA103 ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU, ou do tratamento com meio de cultura (controle), por 30 horas.

Como mostrado no Gráfico 8, o tratamento com TSA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a expressão de hBD-2, sugerindo que a desacetilação de histonas seja um dos mecanismos utilizados por ExoU para mediar a repressão da transcrição de hBD-2.

Gráfico 8 - A regulação negativa da expressão de hBD-2 por ExoU envolve a desacetilação da histona



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram tratadas com o inibidor de desacetilação de histonas, TSA, a 883,3  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora, e infectadas com a cepa parental PA103 (103) ou com a mutante PA103 $\Delta$ exoU ( $\Delta$ U) de *P. aeruginosa*, ou tratadas com meio de cultura (C), por 30 horas, para pesquisa da expressão de hBD-2 por RT-qPCR. O gráfico representa a média  $\pm$  SEM da quantificação relativa do mRNA de hBD-2, normalizado por GAPDH, após análise de 3 ensaios de infecção independentes, avaliados em triplicata. \*p < 0,05 (teste de Bonferroni). SEM: erro padrão da média.

## 4 DISCUSSÃO

*P. aeruginosa* é um dos principais micro-organismos associados às infecções nosocomiais, acometendo pacientes imunossuprimidos, como pacientes com neutropenia, AIDS ou fibrose cística. Dentre as infecções agudas causadas por esse patógeno, se destaca a pneumonia associada à ventilação mecânica (VAP) e as infecções do trato urinário, de feridas operatórias e de queimaduras, além de bacteremia e sepse (Berube *et al.*, 2016).

Para promover processos infecciosos agudos e crônicos, o patógeno oportunista *P. aeruginosa* possui uma variedade de fatores de virulência que permitem vantagens sobre o sistema imunológico do hospedeiro e conferem habilidades ao micro-organismo para sobreviver, persistir e colonizar vários sítios anatômicos (Wonnenberg *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa*, o sistema de secreção do tipo III é uma sofisticada maquinaria de secreção de proteínas capaz de injetar efetores bacterianos diretamente no citosol de células hospedeiras. As proteínas efetoras de *P. aeruginosa*, denominadas ExoS, ExoT, ExoY e ExoU, estão associadas à lesão tecidual e à disseminação bacteriana, participando de infecções invasivas, como a pneumonia (Sutterwala *et al.*, 2007; Faure *et al.*, 2018).

Entre as proteínas efetoras, ExoU se destaca por ser uma citotoxina capaz de causar danos irreversíveis às membranas das células hospedeiras, promovendo a morte rápida, por necrose, de células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Adicionalmente, por possuir atividade tipo fosfolipase A<sub>2</sub>, ExoU aumenta a produção de ácido araquidônico, que é precursor de potentes mediadores inflamatórios, os eicosanóides (Anantharajah *et al.*, 2016).

A atividade tipo fosfolipase A<sub>2</sub> de ExoU tem sido extensivamente estudada em diversos modelos de infecção experimental, como os que utilizam leveduras, amebas, culturas de células de mamíferos e animais. Esses estudos têm demonstrado que a expressão de ExoU por *P. aeruginosa* é um importante marcador de infecções agudas graves. De fato, ExoU é considerado o principal efetor proteico secretado pelo sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa*, devido à sua contribuição para a lesão pulmonar aguda grave, a sepse e a mortalidade (Sato & Frank., 2014).

Devido à contínua exposição às partículas suspensas no ar e a micro-organismos potencialmente patogênicos, que podem penetrar a barreira epitelial pela inalação ou após contato com as superfícies nasal ou oral, a resposta imune inata deve ser eficiente no trato respiratório. Assim, os mediadores da imunidade inata devem inibir a infecção e induzir uma resposta inflamatória moderada, a fim de evitar danos à superfície dos alvéolos pulmonares (Teclé *et al.*, 2010).

Nos pulmões, a primeira linha de defesa do sistema imune inato conta com a importante participação dos peptídeos antimicrobianos, que são produzidos em resposta a micro-organismos invasores. Entre os peptídeos antimicrobianos, destaca-se a hBD-2, que age como um antibiótico endógeno na defesa de tecidos epiteliais contra bactérias Gram-negativas, principalmente as que apresentam potencial patogênico, incluindo *P. aeruginosa* (Fusco *et al.*, 2017).

A hBD-2 é expressa em vários tecidos epiteliais, como o do trato respiratório, e é induzida em resposta a estruturas microbianas e a citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Cole *et al.*, 2002). Este peptídeo antimicrobiano pode ser detectado em pacientes com doenças pulmonares infecciosas (Dalcin & Ulanova, 2013) e é mais concentrado no epitélio pulmonar, nas amídalas e na traqueia, onde desempenha um papel crítico na prevenção de infecções respiratórias (Ishii & Nagaoka, 2003).

Em virtude da combinação das atividades antitoxina, microbicida e imunomoduladora, as beta-defensinas desempenham importantes papéis na proteção do hospedeiro durante o processo infeccioso (Kudryashova *et al.*, 2017). Por estimular o recrutamento de células inflamatórias e apresentar atividade antimicrobiana na infecção pulmonar causada por *P. aeruginosa*, a hBD-2 é de extrema importância para a proteção do trato respiratório na lesão pulmonar aguda, pneumonia, fibrose cística pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica (Sun *et al.*, 2016).

A busca pelo entendimento da patogênese das infecções causadas por *P. aeruginosa* produtora de ExoU tem sido o objetivo de vários estudos conduzidos em nosso laboratório. Estes estudos têm buscado identificar os mecanismos moleculares utilizados por ExoU para ativar a resposta inflamatória, desencadear o estresse oxidativo e induzir a morte celular.

O estudo realizado por Mallet de Lima *et al.*, em 2012, mostrou que, durante a infecção por *P. aeruginosa*, ExoU é capaz de ativar o fator transcricional NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel crítico na regulação de uma variedade de genes envolvidos

nas respostas imunológica e inflamatória. A ativação de NF- $\kappa$ B por ExoU foi fundamental para o aumento da expressão de CXCL-8, uma importante quimiocina que promove a infiltração de neutrófilos em tecidos infectados. Esses dados sugerem fortemente que reguladores transcricionais, como NF- $\kappa$ B, podem ser potenciais alvos de modulação da resposta do hospedeiro por *P. aeruginosa*.

Assim, considerando a importância de ExoU para o agravamento das infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa*, o papel fundamental dos peptídeos antimicrobianos na defesa inicial a patógenos Gram-negativos e a indução da expressão de hBD-2 em resposta a produtos bacterianos e citocinas inflamatórias, o presente estudo investigou se ExoU seria capaz de modular a expressão de hBD-2 durante a infecção de células epiteliais respiratórias humanas por *P. aeruginosa*. Como as cepas clínicas de *P. aeruginosa* são capazes de secretar um grande número de fatores de virulência, que podem vir a interferir na análise do papel de ExoU, em nosso modelo, a resposta das células epiteliais pulmonares foi avaliada frente ao desafio pela cepa laboratorial PA103 e sua mutante isogênica PA103 $\Delta$ ExoU.

De forma interessante, nossos resultados mostraram que, em resposta à infecção por *P. aeruginosa*, as células epiteliais respiratórias aumentaram a expressão de hBD-2. No entanto, a presença de ExoU durante a infecção bacteriana reduziu significativamente essa resposta.

Diversos fatores de virulência de *P. aeruginosa* e de outros micro-organismos são capazes de induzir a expressão de genes associados à inflamação e à resposta imune a patógenos. A indução da expressão de hBD-2 em diferentes tipos celulares por bactérias e seus produtos foi demonstrada em vários estudos. Han *et al.* (2008) mostraram que a infecção de células respiratórias da linhagem A549 com *Francisella tularensis* LVS induziu elevados níveis de mRNA de hBD-2. Similarmente, em um estudo empregando cepas mucoide e não mucoide de *P. aeruginosa*, e LPS, Harder *et al.* (2001) relataram um aumento na expressão de hBD-2 em diferentes linhagens de células epiteliais respiratórias humanas.

Ao avaliar os receptores de reconhecimento de micro-organismos envolvidos na ativação da produção de hBD-2 em resposta a patógenos, Scharf *et al.* (2012) mostraram que a síntese de hBD-2 foi induzida em células epiteliais brônquicas da linhagem BEAS-2B e em células epiteliais respiratórias primárias humanas após infecção por *Streptococcus pneumoniae*, em um mecanismo dependente de TLR2. Já MacRedmond *et al.* (2005) demonstraram que células epiteliais pulmonares da

linhagem A549 que expressavam TLR4 em suas superfícies responderam diretamente ao LPS de *P. aeruginosa*, o que resultou no aumento da expressão do gene e da secreção de hBD-2.

O reconhecimento da presença de micro-organismos invasores ativa diversos mecanismos de sinalização intracelular, resultando, por exemplo, na ativação da transcrição de genes associados à inflamação. Já a inibição destes genes de resposta hospedeira por patógenos ou seus produtos pode contribuir para a adaptação, persistência e evasão bacteriana das defesas imunes, que são fatores fundamentais para o estabelecimento de infecções (Foulkes *et al.*, 2019).

De fato, alguns fatores de virulência bacterianos podem reduzir a expressão de componentes da resposta hospedeira a patógenos. Estudos realizados por Dossel *et al.* (2012) mostraram que os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* foram capazes de inibir a expressão de hBD-2 por queratinócitos em resposta ao estímulo com o sobrenadante da bactéria. Além disso, este estudo revelou que a inibição de IL-1 $\beta$ , induzida pela flagelina de *P. aeruginosa*, contribuiu para esse fenômeno.

O presente estudo é o primeiro a reportar a capacidade de ExoU de modular negativamente a expressão de hBD-2. A estratégia do patógeno para sobreviver e persistir no sítio de infecção pode levar à diminuição significativa da expressão de hBD-2, e esse fato pode influenciar fortemente na defesa hospedeira aos micro-organismos, já que essa beta-defensina é bactericida para *P. aeruginosa* (Routsias *et al.*, 2010).

Em conjunto, os diversos estudos apresentados a seguir demonstram que, a depender do estímulo e do tipo celular envolvidos, a indução da expressão de hBD-2 pode ser determinada por diferentes vias de sinalização intracelular e fatores transcricionais que cooperam entre si. Assim, a etapa seguinte do presente estudo foi avaliar o papel de diferentes vias de sinalização celular, fatores transcricionais e alterações epigenéticas que poderiam contribuir para a ativação da transcrição do gene que codifica hBD-2.

As vias de sinalização celular dependentes de AKT podem ser ativadas por uma variedade de sinais de crescimento e mecanismos bioquímicos. Uma vez ativada, a via de AKT modula a função de proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como sobrevivência, proliferação, migração, metabolismo e angiogênese. De fato, AKT é considerado o cerne de diversas vias de sinalização e é

frequentemente desregulado em patologias como o câncer (Revathidevi & Munirajan, 2019).

Interessantemente, o estudo publicado por Jang *et al.* (2004) mostrou que a via de AKT/PI3K contribuiu para a modulação da expressão de hBD-2 em culturas de células epiteliais respiratórias humanas da linhagem A549 estimuladas com IL-1 $\beta$ . Os resultados desse estudo, obtidos após o tratamento das culturas celulares com IL-1 $\beta$  seguido pelo tratamento com um inibidor de PI3K, que é precursor na ativação da via de AKT, mostraram uma diminuição parcial dos níveis de mRNA de hBD-2, sugerindo que IL-1 $\beta$  ativa a via de PI3K, levando ao conseqüente aumento da expressão de hBD-2.

Entretanto, no nosso modelo de estudo, a via de AKT não parece contribuir para o aumento da expressão de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa* nem para a inibição da expressão dessa beta-defensina por ExoU, uma vez que os níveis de mRNA de hBD-2 não diferiram entre culturas tratadas ou não com o inibidor de AKT.

Resultado similar foi observado no estudo desenvolvido por Huang *et al.* (2014), que avaliou os efeitos da infecção por *P. aeruginosa* na expressão de hBD-2 e CXCL-8 por células epiteliais intestinais. Neste estudo, as células epiteliais intestinais da linhagem SW480 foram infectadas com a cepa PAO1, que não é capaz de produzir ExoU, para investigação das vias de sinalização intracelular envolvidas na regulação da expressão de hBD-2 e CXCL-8. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento prévio das culturas celulares com inibidores da via de AKT (wortmanina/LY294002) e ERK (PD98059) não foi capaz de reduzir a expressão de hBD-2. Nesse modelo, a modulação da expressão de hBD-2 foi dependente de NOD1.

As MAPK constituem uma família de serina/treonina-cinases que são ativadas por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo neurotransmissores, hormônios, fatores inflamatórios, condições de estresse, vírus e fatores de crescimento, resultando na regulação transcricional e não-transcricional de diversas respostas intracelulares. Assim, em resposta a esses estímulos, as vias das MAPK regulam a expressão genica em células eucarióticas, conectando sinais extracelulares a mecanismos que controlam processos celulares fundamentais, como crescimento, proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e apoptose (Sun & Nan, 2016).

As respostas imunológicas envolvem uma variedade de tipos celulares que funcionam como iniciadores, reguladores e efetores. Essas células interagem entre si

e regulam umas às outras, e, como consequência, as células respondem usando vias de transdução de sinais que modulam a expressão genica e medeiam suas funções no sistema imune. As cascatas reguladas pelas MAPK estão entre as mais antigas e conservadas vias de sinalização e estão envolvidas em muitos processos das respostas imunes (Dong et al., 2002).

A região promotora de hBD-2 contém sítios de ligação para os fatores transcricionais, NF- $\kappa$ B e AP-1. AP-1 é um dos fatores transcricionais ativados pela sinalização mediada pelas MAPK. Entretanto, nem todos os estímulos que induzem a expressão de hBD-2 ativam as mesmas vias de sinalização das MAPK (Moranta et al., 2010). Por exemplo, as vias de p38 MAPK e p44/p42 MAPK foram requeridas para a indução da expressão de hBD-2 por células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) em resposta à flagelina de *Salmonella enteritidis* *FliC* (Ogushi et al., 2001), enquanto que a expressão de hBD-2 de células epiteliais gengivais humanas infectadas por *Fusobacterium nucleatum* foi dependente das vias de p38 MAPK e JNK (Krisanaprakornkit et al., 2002), e a de células do epitélio intestinal tratadas com LPS ou peptidoglicano, ou infectadas pela cepa de *Escherichia coli* *Nissle* 1917, foi dependente de JNK (Moranta et al., 2010). Em conjunto, esses trabalhos mostram que, dependendo do estímulo e/ou tipo celular, diferentes vias das MAPK contribuem para a indução da expressão de hBD-2.

Interessantemente, Wehkamp et al. (2006) demonstraram, através de ensaios do gene repórter da luciferase, que o promotor de hBD-2 contém três sítios de ligação para o fator transcricional NF- $\kappa$ B e um sítio de ligação para AP-1, e que ambos os fatores transcricionais foram capazes de ativar fortemente o promotor de hBD-2 quando queratinócitos primários foram estimulados com IL-1 $\beta$  e sobrenadantes de cultura de *P. aeruginosa*. Porém, essa ativação foi completamente abolida quando todos os três sítios de ligação para NF- $\kappa$ B e o sítio de AP-1 foram mutados. Indo mais além, o grupo buscou entender qual ou quais etapas anteriores ao mecanismo de transcrição do promotor de hBD-2 poderiam estar envolvidas na sua regulação. Para isso, avaliaram algumas vias de indução da expressão do peptídeo antimicrobiano, tratando queratinócitos primários com inibidores das vias de JNK, p38 MAPK e ERK antes da estimulação com IL-1 $\beta$  e sobrenadantes de cultura de *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram uma completa abolição da expressão de hBD-2 quando as vias de JNK e p38 MAPK foram bloqueadas, mas não a de ERK. Dessa forma, o estudo concluiu que a ativação do heterodímero p65/p50 de NF- $\kappa$ B e de AP-1 seguida da

ligação desses fatores transcricionais ao promotor de hBD-2 foram eventos cruciais para a indução da expressão deste peptídeo antimicrobiano por queratinócitos estimulados por IL-1 $\beta$  e *P. aeruginosa*, em um mecanismo dependente das vias de p38 MAPK e JNK.

As cinases JNK são altamente responsivas a diversos estímulos celulares, incluindo citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, radiação UV, infecções bacterianas e virais, choque térmico e estresses osmótico e genotóxico. JNK é ativado por JNK cinases (JNKK), que por sua vez são reguladas por JNKKK (Hammouda *et al.*, 2020).

No presente estudo, a inibição de JNK pelo tratamento das culturas celulares com SP600125, que inibe a fosforilação de JNK, aboliu a indução da expressão de hBD-2 em resposta a *P. aeruginosa*. Na presença de SP600125, tanto as culturas infectadas com a cepa produtora de ExoU quanto as culturas infectadas com a mutante deficiente em ExoU apresentaram baixa expressão de hBD-2, indiferenciada das culturas controle não infectadas.

Alguns trabalhos também mostraram o papel de JNK na regulação da expressão de hBD-2, como o estudo desenvolvido por Krisanaprakornkit *et al.* (2002), que mostrou a importância do fator transcricional AP-1 na indução da expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela bactéria periodontal *Fusobacterium nucleatum*. Os dados obtidos no estudo mostraram que a indução da expressão de hBD-2 não foi inibida em células do epitélio gengival humano quando as culturas infectadas com *F. nucleatum* foram previamente tratadas com inibidores de NF- $\kappa$ B. No entanto, a regulação da expressão de hBD-2 foi dependente do fator transcricional AP-1, com ativação das vias de p38 MAPK e JNK.

Similarmente, no trabalho desenvolvido por Moranta *et al.* (2010), que observou a resposta de células epiteliais respiratórias da linhagem A549 após estímulo com cepas de *Klebsiella pneumoniae* selvagem e mutante deficiente na cápsula polissacarídica, os resultados revelaram que os maiores níveis de mRNA de hBD-2 observados nas culturas infectadas pela cepa mutante foram dependentes da ativação da via de JNK.

Também de acordo com nossos resultados, Kobatake *et al.* (2019) mostraram que, em resposta à proteína de superfície SLP da cepa *Lactobacillus helveticus*, células epiteliais de colón humano (Caco-2) aumentaram a expressão de hBD-2 de forma dependente da via de JNK, já que o pré-tratamento das células com o inibidor

SP600125 aboliu a expressão de hBD-2. Ainda neste estudo, os autores relataram que a expressão de hBD-2 também foi dependente de TLR2.

A via de ERK envolve a ativação de moléculas efetoras, como ERK1/ERK2 e ERK5, pela fosforilação de resíduos de aminoácidos de treonina e tirosina mediada por MEK. Após ativação, ERK controla diversas respostas através da fosforilação de uma variedade de substratos, incluindo fatores transcricionais (Patel & Shvartsman, 2018).

Comparada às outras vias das MAPK, como as vias de JNK e p38 MAPK, há poucos trabalhos que relatam a participação da via de ERK em processos inflamatórios (Karin, 2004). Dumitru *et al.*, 2000, mostraram que a resposta de macrófagos a LPS envolve a ativação da via de ERK pela MAP3K Tpl2/Cot. Já Hwang *et al.* (2019) mostraram que ERK participa da ativação da expressão do ativador do plasminogênio da uroquinase (uPA) por células da polpa dentária humana em resposta ao tratamento com a flagelina de *Vibrio vulnificus*.

Poucos estudos reportaram a participação da via de ERK na regulação da expressão de hBD-2. Em 2010, Kim *et al.* mostraram que, na presença de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , foi observada a indução da expressão do mRNA e a síntese de hBD-2 em células humanas da polpa dentária, dependentes da via de ERK e de outras vias, como a de PKC, p38, JNK e NF- $\kappa$ B. Em 2013, Madi *et al.* mostraram que a infecção por *Pseudomonas fluorescens* induziu a produção de hBD-2 em células do adenocarcinoma de cólon humano da linhagem Caco-2/TC7, em um mecanismo dependente das vias de p38 MAPK e ERK, mas independente da via de NF- $\kappa$ B. Em 2014, o estudo de Gan *et al.* mostrou que o componente ativo Paeoniflorina da erva medicinal chinesa *Paeonia lactiflora*, usada no tratamento de doenças inflamatórias, foi capaz de induzir a expressão de hBD-2 em células epiteliais brônquicas humanas, de maneira dependente das vias de NF- $\kappa$ B, p38 MAPK e ERK, mas não de JNK.

Já no nosso modelo, a avaliação da participação da via de ERK, pela inibição de MEK1 e MEK2 com UO126, mostrou que o tratamento com UO126 não afetou os níveis de mRNA de hBD-2 em resposta a ExoU ou à infecção por *P. aeruginosa*, indicando que a resposta gerada foi independente da via de ERK.

A via de sinalização da p38 MAPK é fortemente ativada por diversas condições de estresse celular, como estresse oxidativo, radiação UV, hipóxia e citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e permite que as células interpretem uma variedade

de sinais externos e resposta de forma apropriada, gerando vários efeitos biológicos (Cuenda & Rousseau, 2007; Cargnello & Roux, 2011).

A via de p38 MAPK desempenha um importante papel na resposta imune, atuando como um modulador da expressão de genes através da regulação de modificadores e remodeladores da cromatina que participam da ativação de promotores de vários genes associados à resposta inflamatória, como os que codificam IL-6, IL-8, IL12p40 e MCP-1 (Cuadrado & Nebreda, 2010).

Nossos resultados sugerem que, durante a infecção, um ou mais fatores de virulência de *P. aeruginosa* estimulam a expressão de hBD-2, mas, quando ExoU é secretada, essa ativação é parcialmente inibida. Curiosamente, em nosso modelo, a via de p38 MAPK foi, em grande parte, responsável pelo aumento da expressão de hBD-2 observado na ausência de ExoU. Esse resultado pode indicar uma possível inibição da via de p38 MAPK por ExoU. Entretanto, experimentos adicionais precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

Vários trabalhos relataram a participação da via de p38 MAPK na regulação da expressão de hBD-2. Em 2008, Samperio & Trejo mostraram que o aumento dos níveis do mRNA de hBD-2 em células epiteliais respiratórias humanas da linhagem A549 em resposta a *Mycobacterium bovis* foi dependente da via de p38 MAPK. Similarmente, em 2013, Kim *et al.* mostraram que a via de p38 MAPK foi responsável pela forte indução da expressão de hBD-2 em células da linhagem A549 em resposta à pneumolisina, um importante fator de virulência de *Streptococcus pneumoniae*. Também na resposta a *Legionella pneumophila* foi observado que o aumento dos níveis de mRNA de hBD-2 por células da linhagem A549 ocorreu em um mecanismo dependente da ativação da via de p38 MAPK, assim como de TLR2, TLR5, JNK, NF- $\kappa$ B e AP-1 (Scharf *et al.*, 2010).

Ao investigar o efeito de *Andrographis paniculata*, uma erva medicinal tradicional da China, na regulação da expressão de hBD-2 por células epiteliais de glândula pulmonar humana da linhagem SPC-A-1, Shao *et al.* (2012) descreveram um efeito antimicrobiano desta erva, por regular positivamente a expressão de hBD-2 em um mecanismo dependente das vias de p38 MAPK e NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B compreende uma família de fatores transcricionais diméricos que desempenham um papel chave na coordenação da resposta inflamatória, das imunidades inata e adaptativa e de outros processos celulares, tais como diferenciação, proliferação e sobrevivência. A sinalização dependente de NF- $\kappa$ B é

altamente regulada, e sua desregulação pode causar uma variedade de doenças que vão desde cânceres às desordens inflamatórias e imunológicas (Mitchell *et al.*, 2016).

A via de NF- $\kappa$ B está envolvida na iniciação e na amplificação da resposta inflamatória, e a inflamação também desencadeia a ativação desse fator transcricional. Vários receptores diferentes, como os da família TLR, levam à ativação de NF- $\kappa$ B por duas principais vias, conhecidas como “clássica” ou “canônica” e “alternativa”. A via canônica envolve a fosforilação do inibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, por IKK, o que provoca a degradação do inibidor e a consequente translocação do heterodímero transativador p65(RelA)/p50 para o núcleo (Karin, 2004).

Diversos trabalhos demonstraram a importância de NF- $\kappa$ B na regulação da expressão de hBD-2. A regulação transcricional mediada por NF- $\kappa$ B foi fundamental para a indução da expressão de hBD-2 em células epiteliais traqueobrônquicas humanas (hTBE), em resposta ao LPS de *E. coli* (Becker *et al.*, 2000). Da mesma forma, o heterodímero p65/p50 de NF- $\kappa$ B teve um papel central na ativação do promotor de hBD-2 em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 estimulados com LPS (Ishii & Nagaoka, 2002).

No nosso estudo, a importância de NF- $\kappa$ B na modulação da expressão de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa*, mais especificamente à proteína ExoU, foi avaliada pelo tratamento das células epiteliais respiratórias com wedelolactona, um componente encontrado nas ervas chinesas *Wedelia chinensis* e *Eclipta prostrata*, que é capaz de inibir a via de NF- $\kappa$ B pelo bloqueio da fosforilação e da consequente degradação dos inibidores I $\kappa$  $\alpha$  e I $\kappa$  $\beta$ , que mantêm NF- $\kappa$ B sequestrado no citosol (Yuan *et al.*, 2013).

Assim como foi observado para a via de p38 MAPK, nossos resultados mostraram que NF- $\kappa$ B também contribuiu para o aumento da expressão de hBD-2 detectado na ausência de ExoU. Embora estudos anteriores realizados por nosso grupo tenham demonstrado que ExoU ativa NF- $\kappa$ B (Mallet de Lima *et al.*, 2012), o acesso de fatores transcricionais a um determinado gene alvo é influenciado por diversos fatores, como as modificações na cromatina.

Em conjunto, a redução significativa nos níveis de mRNA de hBD-2 nas células infectadas com a cepa mutante - tanto após tratamento com wedelolactona como após tratamento com SB203580 - e a total inibição da expressão de hBD-2 nas células infectadas por ambas as cepas após tratamento com SP600125, observadas nos nossos ensaios, indicam que tanto NF- $\kappa$ B como AP-1 participam da ativação da

expressão de hBD-2 em resposta a *P. aeruginosa*, com papel fundamental de AP-1. A secreção de ExoU pela bactéria interfere nessas vias, inibindo a expressão de hBD-2 em resposta à infecção.

Outros estudos demonstraram a participação simultânea de AP-1 e NF- $\kappa$ B na ativação da expressão de hBD-2 em resposta a micro-organismos ou seus produtos. Quando queratinócitos foram estimulados com *P. aeruginosa* ou IL-1 $\beta$ , tanto AP-1 quanto NF- $\kappa$ B foram fortemente ativados, induzindo positivamente a expressão do mRNA de hBD-2. Nesse modelo, tanto NF- $\kappa$ B como AP-1 foram requeridos para a total expressão de hBD-2 (Wehkamp *et al.*, 2006). Em outro estudo, o tratamento com sobrenadantes de *Candida albicans* induziu altos níveis de hBD-2 em células do carcinoma escamoso esofágico da linhagem OE21, em um mecanismo depende de NF- $\kappa$ B e AP-1, que controlaram a expressão de hBD-2 de forma sinérgica (Steubesand *et al.*, 2009).

Durante a resposta a patógenos, as citocinas desempenham um importante papel na regulação da expressão de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória e em reações imunológicas em geral. A citocina IL-1 $\beta$  é um potente mediador inflamatório que é capaz de induzir a expressão de hBD-2 em células epiteliais através de múltiplas vias de sinalização (Ishii & Nagaoka, 2002; Jang *et al.*, 2004; Castejon & Brough, 2011).

O trabalho desenvolvido por Ayoub *et al.*, 2017, mostrou a relevância de IL-1 $\beta$  na regulação da expressão de hBD-2 ao avaliar os efeitos dos componentes do cigarro em amostras de polpas dentais de pacientes fumantes e não fumantes. Os resultados dessa pesquisa mostraram que componentes do cigarro, como a nicotina, levaram à supressão da produção de IL-1 $\beta$ . Como IL-1 $\beta$  é um potente indutor da expressão de hBD-2, também foi observada uma acentuada redução desse peptídeo antimicrobiano nas amostras de pacientes fumantes. Consequentemente, pacientes fumantes apresentaram uma menor capacidade de combater infecções orais causadas por micro-organismos patogênicos, enquanto pacientes não fumantes apresentaram um aumento dos níveis de hBD-2 na presença de micro-organismos.

As MAPK desempenham um importante papel no controle das respostas celulares às citocinas e estão associadas à regulação da expressão de hBD-2, a qual é induzida por vários estímulos, incluindo IL-1 $\beta$ . Já NF- $\kappa$ B regula positivamente a transcrição do gene que codifica IL-1 $\beta$ , embora a proteína seja inicialmente produzida como um precursor inativo (Liu & Malik, 2006). De fato, diversos trabalhos mostraram

que a expressão do mRNA de hBD-2 é dependente de IL-1 $\beta$  em diferentes tipos celulares e em resposta a diversos estímulos, que desencadeiam a sinalização intracelular por diversas vias, como a das MAPK, e a ativação de fatores transcricionais, como NF-kB e AP-1, que participam da ativação de genes associados à inflamação (Dong et al., 2002).

As ações biológicas de IL-1 $\beta$  requerem o processamento do precursor inativo de IL-1 $\beta$ , a pró-IL-1 $\beta$ . Assim, a forma madura de IL-1 $\beta$  é secretada após a clivagem da pró-IL-1 $\beta$  pela caspase-1. A caspase-1 faz parte de grandes complexos multiproteicos denominados de inflamassomas, que contêm membros da família de receptores tipo NOD, capazes de detectar a presença de componentes bacterianos (Galle et al., 2008).

Além de translocar exotoxinas para o citosol de células hospedeiras, o aparato do sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa* é capaz, por si só, de provocar diversos efeitos no hospedeiro, tais como citotoxicidade, inflamação, recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas e inibição da internalização bacteriana por macrófagos. Quando em contato com a célula hospedeira, o sistema de secreção do tipo III de *P. aeruginosa* é capaz de ativar o sensor citosólico interno denominado de NLRC4 e ativar o processamento de IL-1 $\beta$  pelo inflamassoma (Faure et al., 2014).

Entretanto, em estudos *in vivo*, foi observada uma maior produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 nos animais infectados com a cepa mutante PA103DexoU em comparação aos animais infectados com a cepa produtora de ExoU, PA103. Esse efeito foi mediado pela inibição da ativação da caspase-1 por ExoU. A inibição da atividade tipo fosfolipase A<sub>2</sub> de ExoU resultou no aumento da atividade da caspase-1 e da secreção de IL-1 $\beta$  (Sutterwala et al., 2007).

Ao avaliar a relação entre a citotoxicidade de *P. aeruginosa* produtora de efetores do sistema de secreção do tipo III e a ativação de caspase-1 e a secreção da forma madura de IL-1 $\beta$ , Anantharajah et al. (2015) utilizaram 20 isolados clínicos de *P. aeruginosa* coletados de pacientes acometidos por infecções agudas, e que variaram de acordo com a expressão das toxinas ExoS ou ExoU, para infectar monócitos humanos da linhagem THP-1. Os resultados mostraram que os isolados clínicos produtores de ExoU causaram uma extensa morte das células THP-1, mas com o mínimo de IL-1 $\beta$ , que é secretado principalmente na forma imatura (pró-IL-1b), ao passo que, quando as células foram infectadas com os isolados clínicos produtores

de ExoS ou não produtores de toxinas, foi observada a indução da ativação de caspase-1 e a secreção da forma madura de IL-1 $\beta$ .

Em nosso estudo, o tratamento com IL-1 $\beta$  induziu a expressão de hBD-2 em todas as variáveis testadas, mas não aboliu a diferença entre culturas infectadas pela cepa parental e culturas infectadas pela cepa mutante. Já o bloqueio da atividade celular mediada pela resposta a IL-1 $\beta$ , pelo tratamento com anticorpo anti-IL-1 $\beta$ , reduziu significativamente os níveis de mRNA de hBD-2 nas culturas infectadas pela cepa mutante, abolindo a significância da diferença entre culturas infectadas pela cepa parental e culturas infectadas pela cepa mutante. Esses resultados sugerem que a inibição da sinalização dependente de IL-1 $\beta$  por ExoU está envolvida na modulação negativa desta citocina pelo fator de virulência.

Como ExoU é uma potente citotoxina que leva à rápida morte celular, com perda da integridade da membrana celular hospedeira pelo efeito de sua atividade fosfolipase A<sub>2</sub>, é possível que a IL-1 $\beta$  produzida seja liberada para o meio extracelular ainda na sua forma precursora inativa. Alternativamente, ExoU poderia interferir em processos biológicos que levam à expressão, maturação e secreção de IL-1 $\beta$  na sua forma ativa.

O remodelamento da cromatina controla o acesso de fatores transcricionais à região promotora dos genes, e este é um dos mecanismos utilizado por bactérias para alterar o programa transcricional do hospedeiro, levando, na maioria dos casos, ao prejuízo da resposta imune inata (Hamon & Cossart, 2008).

O remodelamento da cromatina, que promove a “abertura” ou o “fechamento” de sua estrutura, é resultante da modificação de estruturas denominadas de nucleossomos, que constituem a unidade fundamental da cromatina e são formadas pela associação do octâmero de histonas à molécula de DNA (Fischer *et al.*, 2016). As alterações na estrutura da cromatina são resultantes de modificações enzimáticas nas histonas. Assim, resíduos específicos de lisina, arginina ou serina na região N-terminal das histonas podem ser modificados por mecanismos de acetilação e desacetilação, favorecendo a ativação ou a repressão da expressão gênica (Adcock *et al.*, 2007).

A acetilação ocorre nas histonas H2A, H3 e H4, e esse mecanismo está associado ao relaxamento da heterocromatina condensada, pois a carga negativa dos grupos acetil da cadeia de fosfato do DNA reduz a sua afinidade de ligação à histona. Dessa forma, a atividade da enzima histona-acetiltransferase (HAT) adiciona grupos

acetil aos resíduos de lisina presentes na cauda das histonas, relaxando a estrutura da cromatina e facilitando a ativação transcricional (Zhang & Pradhan, 2014).

Em contraste, a atividade enzimática da histona desacetilase (HDAC) leva à remoção de grupos acetil dos resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas, as quais se tornam positivamente carregadas e se ligam ao DNA por uma maior afinidade eletrostática, promovendo a condensação da cromatina com a consequente repressão da transcrição gênica (Adachi *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2016).

A desacetilação de histonas mediada pelas enzimas HDAC regula negativamente a expressão dos genes que codificam os peptídeos antimicrobianos. Assim, inibidores de HDAC aumentam a expressão de peptídeos antimicrobianos e, se usados na forma de moléculas sintéticas ou naturais, podem aumentar os níveis de peptídeos antimicrobianos nas superfícies de mucosa, apresentando grande potencial para aplicação terapêutica (Yedery & Jerse, 2015).

Vários estudos mostraram a importância de mecanismos epigenéticos na modulação da resposta imune inata a patógenos bacterianos. O estímulo de células epiteliais respiratórias das linhagens A549 e SAEC com flagelina de *Legionella pneumophila* induziu a expressão da quimiocina IL-8, em decorrência de modificações das histonas pelos mecanismos de acetilação e fosforilação (Schmeck *et al.*, 2008). Em outro estudo, a inibição de HDAC durante a infecção de células epiteliais da gengiva com *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, pelo tratamento com TSA, levou a uma maior acetilação de histonas associadas à cromatina, que culminou no aumento da expressão do promotor de hBD-2 em resposta às bactérias. Esse estudo concluiu que as modificações epigenéticas no epitélio gengival desempenharam um papel crítico na potencialização da resposta imune inata pela alteração da expressão gênica, marcada pelo aumento da atividade microbicida do peptídeo antimicrobiano na cavidade oral (Yin *et al.*, 2011).

Em nosso modelo, a inibição da desacetilação de histonas aumentou significativamente a expressão de hBD-2 em resposta à infecção pela cepa produtora de ExoU. Assim, esses resultados revelam que ExoU é capaz de induzir a desacetilação de histonas, que mantém o DNA em alto grau de condensação, como um mecanismo para inibir a expressão gênica e prejudicar a resposta imune. Estudos adicionais são requeridos para compreender a capacidade de ExoU de provocar alterações epigenéticas que resultem na modulação de genes envolvidos no processo inflamatório e nas respostas imunes em geral.

Por se tratar de um fator de virulência associado ao mau prognóstico de infecções do trato respiratório, com aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes, a investigação das respostas celulares desencadeadas por ExoU é essencial para o entendimento da patogênese das infecções agudas graves causadas por *P. aeruginosa*. Assim, a pesquisa dos mecanismos moleculares que tornam ExoU capaz de interferir na imunidade inata do hospedeiro é de extrema importância para a descoberta de estratégias que auxiliem as terapias antimicrobianas já existentes.

De fato, a disseminação da multirresistência a antibióticos é uma ameaça ao tratamento de diversas infecções bacterianas comuns e de importância médica, justificando a investigação de novas medidas terapêuticas, usadas isoladamente ou em combinação com antibióticos. No entanto, vale ressaltar que, apesar da efetividade dos peptídeos antimicrobianos, o tratamento terapêutico usando esses compostos enfrenta o desafio da degradação proteolítica e da toxicidade *in vivo*. Por esses motivos, novos peptídeos antimicrobianos mais seguros e mais econômicos têm sido sintetizados com o objetivo de permitir, futuramente, a aplicação desses compostos de forma eficaz (Kang *et al.*, 2017).

## CONCLUSÕES

A regulação da expressão de hBD-2 é complexa, pois depende de uma interação coordenada e hierarquizada entre várias moléculas que respondem aos estímulos externos e ativam cascatas de sinalização intracelular, que culminam nos eventos genéticos e epigenéticos que participam da regulação da transcrição desse peptídeo antimicrobiano durante o processo infeccioso.

O presente estudo demonstrou que a secreção do fator de virulência ExoU é capaz de manipular as vias de sinalização celular que envolvem IL-1 $\beta$ , JNK e p38 MAPK, os fatores transcricionais NF- $\kappa$ B e AP-1, e a modificação de cromatina mediada por enzimas HDAC, para inibir a síntese de hBD-2 em resposta à infecção por *P. aeruginosa*.

Embora sejam necessárias mais pesquisas para aprofundar o entendimento dos mecanismos moleculares que são desencadeados por ExoU e estão envolvidos na regulação da expressão de hBD-2, nosso estudo é o primeiro a descrever a manipulação desse importante mecanismo de defesa inata do trato respiratório por ExoU. Assim, a repressão transcricional de hBD-2 representa mais um mecanismo de subversão da sinalização intracelular do hospedeiro por ExoU. Importaneamente, esse novo efeito descrito para ExoU permite driblar a atividade bactericida de hBD-2 contra *P. aeruginosa* e atenuar a resposta imune inata, promovendo a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis e a colonização das superfícies epiteliais.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, T. et al. Histone deacetylase inhibitors stimulate the susceptibility of A549 cells to a plasma-activated medium treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016.
- ADCOCK, I. M. et al. Epigenetic regulation of airway inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 2007.
- ANANTHARAJAH, A. et al. Correlation between cytotoxicity induced by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from acute infections and IL-1 $\beta$  secretion in a model of human THP-1 monocytes. *Pathogens and Disease*, 2015.
- ANANTHARAJAH, A.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; VAN BAMBEKE, F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2016.
- AUGUSTIN, D. K. et al. Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2007.
- AUGUSTIN, D. K. et al. Role of defensins in corneal epithelial barrier function against *Pseudomonas aeruginosa* traversal. *Infection and Immunity*, 2011.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 2013.
- BANDYOPADHAYA, A. et al. A quorum-sensing signal promotes host tolerance training through HDAC1-mediated epigenetic reprogramming. *Nature Microbiology*, 2016.
- BECKER, M. N. et al. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced  $\beta$ -defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 2000.
- BERUBE, B. J.; RANGEL, S. M.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Current Genetics* Springer Verlag, 2016.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011.
- CASTELLHEIM, A. et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001.
- CHRISTMAN, J. W.; SADIKOT, R. T.; BLACKWELL, T. S. The role of nuclear factor- $\kappa$  B in pulmonary diseases. *Chest*, v. 117, n. 5, p. 1482–1487, 2000.

- COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III secretion systems and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007.
- COLE, A. M. et al. Cationic Polypeptides Are Required for Antibacterial Activity of Human Airway Fluid. *The Journal of Immunology*, 2002.
- CRESPO, P.; GUTKIND, J. S. Activation of MAPKs by G protein-coupled receptors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2004.
- CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 2010.
- CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2007.
- DALCIN, D.; ULANOVA, M. The Role of Human Beta-Defensin-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis Patients. *Infectious Diseases and Therapy*, 2013.
- DE LIMA, C. D. M. et al. ExoU activates NF- $\kappa$ B and increases IL-8/KC secretion during *pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS ONE*, 2012.
- DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, 2005.
- DERUELLE, V. et al. The bacterial toxin ExoU requires a host trafficking chaperone for transportation and to induce necrosis. *Nature Communications*, 2021.
- DIAZ, M. H.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infection and Immunity*, 2010.
- DONG, C.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology*, 2002.
- DORTET, L. et al. Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nature Microbiology*, 2018.
- DÖSSEL, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa*-derived rhamnolipids subvert the host innate immune response through manipulation of the human beta-defensin-2 expression. *Cellular Microbiology*, 2012.
- DUMITRU, C. D. et al. TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*, 2000.
- EBLEN, S. T. Substrates to Control Biological Outcomes. *Cancer Res*, 2018.
- ELMALLAH, M. I. Y.; MICHEAU, O. Epigenetic regulation of TRAIL signaling: Implication for cancer therapy. *Cancers*, 2019.

FAURE, E. et al. Pseudomonas aeruginosa type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2014.

FAURE, E.; KWONG, K.; NGUYEN, D. Pseudomonas aeruginosa in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? Frontiers in Immunology, 2018.

FISCHER, N. et al. Histone deacetylase inhibition enhances antimicrobial peptide but not inflammatory cytokine expression upon bacterial challenge. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016.

FISCHER, N. Infection-induced epigenetic changes and their impact on the pathogenesis of diseases. Seminars in Immunopathology, 2020.

FOULKES, D. M. et al. Pseudomonas aeruginosa toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. Microorganisms, 2019.

FUSCO, A. et al. Beta-Defensin-2 and Beta-Defensin-3 Reduce Intestinal Damage Caused by Salmonella typhimurium Modulating the Expression of Cytokines and Enhancing the Probiotic Activity of Enterococcus faecium. Journal of Immunology Research, 2017.

FRANKLIN, M. J. et al. Biosynthesis of the pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl Frontiers in Microbiology Frontiers Research Foundation, 2011.

FRESNO VARA, J. Á. et al. P13K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treatment Reviews, v. 30, n. 2, p. 193–204, 2004.

GALLE, M. et al. The Pseudomonas aeruginosa Type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 $\beta$  maturation. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008.

GAN, Y. et al. Paeoniflorin Upregulates  $\beta$ -Defensin-2 Expression in Human Bronchial Epithelial Cell Through the p38 MAPK, ERK, and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. Inflammation, 2014.

GAZON, H. et al. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. Frontiers in Microbiology, 2018.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and Disease, 2013.

GHATTAS AYOUB, C. et al. Comparison of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , hBD-2, and hBD-3 Expression in the Dental Pulp of Smokers Versus Nonsmokers. Journal of Endodontics, 2017.

GHIZZONI, M. et al. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- $\kappa$ B mediated inflammation. Drug Discovery Today, 2011.

- GUSTEMS, M. et al. C-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 2014.
- HAMON, M. A.; COSSART, P. Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections. *Cell Host and Microbe*, 2008.
- HAMMOUDA, M. B. et al. Disorders and Cancer. *Cells*, 2020.
- HAN, S. H.; BISHOP, B. M.; VAN HOEK, M. L. Antimicrobial activity of human beta-defensins and induction by Francisella. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008.
- HARDER, J. et al. Human-  $\beta$ -Defensin-2 in Respiratory Epithelia, 2001.
- HERS, I.; VINCENT, E. E.; TAVARÉ, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 2011.
- HERTZ, C. J. et al. Activation of Toll-Like Receptor 2 on Human Tracheobronchial Epithelial Cells Induces the Antimicrobial Peptide Human  $\beta$  Defensin-2. *The Journal of Immunology*, 2003.
- HIELPOS, M. S. et al. CCL20 and beta-defensin 2 production by human lung epithelial cells and macrophages in response to Brucella abortus infection. *PLoS ONE*, 2015.
- HOLLY, M. K.; DIAZ, K.; SMITH, J. G. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 2017.
- HUANG, F. C. Differential regulation of interleukin-8 and human beta-defensin 2 in Pseudomonas aeruginosa-infected intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 2014.
- HUSZCZYNSKI, S. M.; LAM, J. S.; KHURSIGARA, C. M. The role of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology *Pathogens*, 2019.
- HWANG, H. S. et al. TLR5 activation induces expression of the pro-inflammatory mediator Urokinase Plasminogen Activator via NF- $\kappa$ B and MAPK signalling pathways in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 2019.
- JANG, B. C. et al. Up-regulation of human  $\beta$ -defensin 2 by interleukin-1 $\beta$  in A549 cells: Involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF- $\kappa$ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004.
- JO, M.; JUNG, S. T. Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors. *Experimental & molecular medicine*, 2016.
- JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, v. 298, n. 5600, p. 1911–1912, 2002.

KANG, H. K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*, 2017.

KARIN, M. Mitogen activated protein kinases as targets for development of novel anti-inflammatory drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004.

KIM, Y. S. et al. Effect of Proinflammatory Cytokines on the Expression and Regulation of Human Beta-Defensin 2 in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 2010.

KIM, Y. J. et al. Pneumolysin-mediated expression of  $\beta$ -defensin 2 is coordinated by p38 MAP kinase-MKP1 in human airway cells. *Journal of Microbiology*, 2013.

KOBATAKE, E.; KABUKI, T. S-Layer Protein of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 Promotes Human  $\beta$ -Defensin 2 Expression via TLR2–JNK Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 2019.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 2007.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; KIMBALL, J. R.; DALE, B. A. Regulation of Human  $\beta$ -Defensin-2 in Gingival Epithelial Cells: The Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways, But Not the NF- $\kappa$ B Transcription Factor Family. *The Journal of Immunology*, 2002.

KUDRYASHOVA, E.; SEVEAU, S. M.; KUDRYASHOV, D. S. Targeting and inactivation of bacterial toxins by human defensins. *Biological Chemistry Walter de Gruyter GmbH*, 2017.

LAI, Y., GALLO, RICHARD. L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *National Institutes Of Health*, 2009.

LAUBE, D. M. et al. *Antimicrobial Peptides in the Airway*. Springer-Verlag, 2006.

LAVOIE, E. G.; WANGDI, T.; KAZMIERCZAK, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and Infection*, 2011.

LEE, J.; LEE, D. G. Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: Membrane disruption and apoptosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014.

LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006.

LIU, S. et al. Computational resources and tools for antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*. John Wiley and Sons Ltd, 2017.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2011.

MACREDMOND, R. E. et al. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human  $\beta$ -defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respiratory Research*, 2005.

MADI, A. et al. *Pseudomonas fluorescens* can induce and divert the human  $\beta$ -defensin-2 secretion in intestinal epithelial cells to enhance its virulence. *Archives of Microbiology*, 2013.

MALHOTRA, S.; HAYES, D.; WOZNIAK, D. J. *Cystic Fibrosis and Pseudomonas aeruginosa: the Host-Microbe Interface*. American Society For Microbiology, 2019.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P.; MIRANDA, E.; TREJO, A. Regulation of human  $\beta$ -defensin-2 by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG): Involvement of PKC, JNK, and PI3K in human lung epithelial cell line (A549). *Peptides*, 2008.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. *Signaling via the NF- $\kappa$ B system*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine Wiley-Blackwell, 2016.

MORANTA, D. et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of  $\beta$ -defensins by airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2010.

NIYONSABA, F. et al. Epithelial cell-derived human  $\beta$ -defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International Immunology*, 2002.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nature Immunology*, 2011.

OGUSHI, K. I. et al. *Salmonella enteritidis* FliC (Flagella Filament Protein) Induces Human  $\beta$ -Defensin-2 mRNA Production by Caco-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2001.

PATEL, A. L.; SHVARTSMAN, S. Y. Outstanding questions in developmental ERK signaling. *Development (Cambridge)*, 2018.

RAOUST, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS ONE*, 2009.

REVATHIDEVI, S.; MUNIRAJAN, A. K. *Akt in cancer: Mediator and more* Seminars in Cancer Biology Academic Press, 2019.

ROUTSIAS, J. G. et al. In vitro bactericidal activity of human  $\beta$ -defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*, 2010.

SALIBA, A. M. et al. Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cellular Microbiology*, 2005.

SATO, H.; FRANK, D. W. Intoxication of host cells by the T3SS phospholipase ExoU: PI (4,5) P 2-associated, cytoskeletal collapse and late phase membrane blebbing. PLoS ONE, 2014.

SAWA, T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: From bacterial pathogenesis to host response. Journal of Intensive Care, 2014.

SCHARF, S. et al. Induction of human  $\beta$ -defensin-2 in pulmonary epithelial cells by *Legionella pneumophila*: Involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B, and AP-1. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2010.

SCHARF, S. et al. *Streptococcus pneumoniae* induces human  $\beta$ -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. Experimental Lung Research, 2012.

SCHMECK, B. et al. Histone Acetylation and Flagellin Are Essential for *Legionella pneumophila* -Induced Cytokine Expression. The Journal of Immunology, 2008.

SELSTED, M. E.; OUELLETTE, A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nature Immunology, 2005.

SHAO, Z. J. et al. Andrographolide exerted its antimicrobial effects by upregulation of human  $\beta$ -defensin-2 induced through p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathway in human lung epithelial cells. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2012.

SHIH, V. F. S. et al. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. Cell Research, 2011.

SITKIEWICZ, I.; STOCKBAUER, K. E.; MUSSER, J. M. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. Trends in Microbiology, 2007.

STEUBESAND, N. et al. The expression of the  $\beta$ -defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- $\kappa$ B and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida esophagitis*. BMC Immunology, 2009.

SUBEDI, D. et al. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE, 2018.

SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2015.

SUN, J.; NAN, G. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway as a Discovery Target in Stroke. Journal of Molecular Neuroscience, 2016.

SUTTERWALA, F. S. et al. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. Journal of Experimental Medicine, 2007.

TECLE, T.; TRIPATHI, S.; HARTSHORN, K. L. Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immunity*, 2010.

TSUTSUMI-ISHII, Y.; NAGAOKA, I. NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional regulation of human-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002.

TSUTSUMI-ISHII, Y.; NAGAOKA, I. Modulation of Human  $\beta$ -Defensin-2 Transcription in Pulmonary Epithelial Cells by Lipopolysaccharide-Stimulated Mononuclear Phagocytes Via Proinflammatory Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 2003.

URBANOWSKI, M. L.; LYKKEN, G. L.; YAHR, T. L. A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *PNAS*, 2005.

VAN AVONDT, K.; VAN SORGE, N. M.; MEYAARD, L. Bacterial Immune Evasion through Manipulation of Host Inhibitory Immune Signaling. *PLoS Pathogens*, 2015.

WEHKAMP, J. et al. NF- $\kappa$ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by. *Society*, 2004.

WEHKAMP, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1 $\beta$ -mediated induction of human  $\beta$ -defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF- $\kappa$ B and AP-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 2006.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*, 2010.

WONNENBERG, B. et al. The role of IL-1 $\beta$  in *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection. *Cell and Tissue Research Springer Verlag*, 2016.

YAEGER, R.; CORCORAN, R. B. Targeting alterations in the RAF–MEK pathway *Cancer Discovery American Association for Cancer Research*, 2019.

YEDERY, R. D.; JERSE, A. E. Augmentation of cationic antimicrobial peptide production with histone deacetylase inhibitors as a novel epigenetic therapy for bacterial infections. *Antibiotics*, 2015.

YANG, S. H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation *Gene*, 2013.

YIN, L.; CHUNG, W. O. Epigenetic regulation of human B-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunology*, 2011.

YUAN, F. et al. Wedelolactone inhibits LPS-induced pro-inflammation via NF- $\kappa$ B Pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Biomedical Science*, 2013.

ZENG, Z. et al. Roles of G protein-coupled receptors in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2020.

ZHANG, G.; PRADHAN, S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*, 2014.