

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do efeito protetor da Frutose-1,6-bisfosfato na sepse
induzida por *Candida albicans* em camundongos

Tese apresentada ao
programa de Pós-
Graduação em Biologia
Celular e Molecular como
requisito para obtenção do
grau de Doutor

Autor

Roberto Christ Vianna Santos

Orientador

Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, RS

Dezembro, 2010

Agradecimentos

Ao PPGBCM, pela estrutura e oportunidade;

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES, pelo suporte financeiro;

Ao Professor Jarbas Rodrigues de Oliveira, na qualidade de amigo, mestre e orientador, os tantos e inesquecíveis diálogos, científicos ou não que desde o ano de 2000 tivemos. Serei por toda a vida inteiramente grato por esta orientação que ultrapassa a tese. Agradeço, sobretudo, o privilégio de ter trabalhado e aprendido muito contigo;

À memória de meu pai e a força, amor e carinho de minha mãe;

À minha mulher Camila Monego Moreira que me deu seu incentivo desde o início do doutorado, de forma incondicional, contribuindo significativamente para a concretização dessa tese;

À minha família: meus irmãos, Simone, Maria Alice e Lauro, meus sobrinhos Luisa e Bruno e minha sobrinha-neta Valentina;

Ao meu sogros Ivan e Carmem Lúcia pelos excelentes momentos de convívio;

Aos professores José Luis Rosa e Ramon Bartrons da Universitat de Barcelona pelas importantes colaborações no trabalho, dosando as críticas com comentários de incentivo, mas principalmente pelo carinho e amizade;

Ao Dr. Rafael Silvio Remus Pulcinelli, amigo de todas as horas, pelos excelentes momentos de questionamentos existenciais e teóricos (microbiológicos ou não) em nossas impagáveis quintas-feiras.

Ao Professor Dr. Rafael Noal Moresco, meus agradecimentos pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições ao longo de todo o trabalho e principalmente pela amizade;

Ao Centro Universitário Franciscano-UNIFRA, por acreditar em meu profissionalismo;

Agradeço afetosamente aos amigos Matheus Valente e Mateus Biazús por tornaram as noites de quinta feira mais divertidas. Agradeço a amizade e companheirismo compartilhado todo esse tempo.

À Dr^a. Luiza Braga pelo auxílio no desenho experimental envolvendo o uso dos animais;

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves pelo fornecimento das cepas de pela disponibilidade para discussões acerca de virulência de *Candida* sp.;

Não poderia deixar de mencionar meus estagiários Henrique Dias e Luiz Buais que souberam tornar meu cotidiano mais leve graças ao entusiasmo e à boa vontade.

À colônia sul americana de Barcelona: Miguel Angel Peña Rico, Fabíola Josefina Amair Piñedo, Mónica Patricia Cubillos Rojas, Shanna Catalina Bittencourt

À empresa Planalto por transportar-me com carinho nestes 75.000 Km entre Santa Maria e Porto Alegre.

Aos amigos do laboratório de Pesquisa em Biofísica, Robson Heinrich, Vinícius Lorini, Fernanda Mesquita, Débora Attolini, Gabriela Viegas, Patrícia Scherer Denizar Mello, Márcio Donadio, Melissa Pires, Fernanda Bordignon, Adroaldo Lunardelli;

Aos amigos Eduardo Caberlon e Ricardo Obalski pelos momentos de discussão científica e acerca do universo feminino;

Aos amigos de todas as épocas, impossível de listar todos, mas inesquecíveis e vitais;

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, auxiliaram de uma maneira direta ou indireta, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

Índice

Capítulo 1	1
1.1 Introdução	2
1.2 Objetivos.....	17
Capítulo 2	19
Artigo submetido para publicação no periódico <i>Critical Care Medicine</i>	20
Capítulo 3	52
Artigo aceito para publicação no periódico <i>Inflammation</i>	53
Capítulo 4	71
4.1 Considerações Finais	72

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o papel da Frutose-1,6-bisfosfato na modulação do processo inflamatório na sepse induzida por *C. albicans*, na expressão de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B e na produção de NO e expressão de iNOS em macrófagos. Um modelo de sepse intratraqueal foi realizado em camundongos CF-1 utilizando cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol. FBP(500mg/kg) foi administrada aos animais no momento da indução no grupo Sepse+FBP. Cinco a seis animais de cada grupo foram mortos 24h, 5dias e 10 dias após a indução de sepse. O sangue foi coletado para a realização do perfil hematológico completo e para o ensaio das citocinas (IL-6 e MCP-1). O restante dos animais foram utilizados para dados de mortalidade. A fim de determinar o possível efeito anti-inflamatório da FBP, uma série de transfecções utilizando promotores dos genes COX-2, IL-6 e NF-Kappa B foram realizados em células RAW. A produção de NO em macrófagos e a expressão de iNOS em RAW também foi realizada. Investigamos ainda as regiões do promotor do gene da COX-2 que realizam a mediação dos efeitos do zymosan. Transfecções transientes com uma série de construções com mutações na região promotora da COX-2 foram realizadas para elucidar os efeitos do zymosan na transcrição da COX-2. A mortalidade diminuiu significativamente nos animais que receberam FBP após indução no grupo *C. albicans* sensível ao fluconazol. As citocinas e os índices hematológicos foram similares ao grupo sepse, com exceção da contagem de plaquetas. A FBP previne significativamente o decréscimo do número de plaquetas. A FBP parece não atuar na transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B. A FBP reduziu os níveis de NO no lavado bronco-alveolar através da inibição da expressão de iNOS. A exposição ao zymosan (50µg/ml por 24h) marcadamente aumenta a atividade relativa de luciferase em macrófagos RAW transfectados com o promotor da COX-2. Deleções nos sítios de ligação C/EBP e NF-Kappa B resultam em um importante decréscimo na atividade do gene repórter e uma deleção no sítio NF-Kappa B e C/EBP com mutações nos sítios CRE e/ou AP-1 anula a atividade da COX-2 induzida por zymosan.

Palavras-chave: Zymosan; COX-2; Luciferase; Óxido Nítrico; Óxido Nítrico Sintase; Candidemia; Sepse

Abstract

The aim of this research was to determine the role in the modulation of inflammation of Fructose-1,6-bisphosphate, in experimental *C. albicans*-induced sepsis, and in COX-2, IL-6 and NF-Kappa B gene expression, NOx production and expression of iNOS in macrophages. Intratracheal sepsis model was performed in CF-1 mice, using fluconazole-resistant and -susceptible strains of *C. albicans*. FBP (500mg/Kg) was administered to mice at the time of operation in Sepsis + FBP Group. Five to six animals from each group were killed 24h, 5 days, and 10 days after the sepsis induction. Blood was taken for assessment of complete hematological profile and cytokine assay (IL-6 and MCP-1). The rest of the mice were observed for mortality. In order to determine the possible anti-inflammatory mechanism of FBP, a series of transfections in RAW macrophages using COX-2, IL-6 and NF-Kappa B promoters has been conducted. The NO production by macrophages and iNOS expression in RAW has been determined. We also investigate the regions of COX-2 promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan. Transient transfections with a series of COX-2 promoter–mutation constructs were performed to further elucidate the effects of zymosan on COX-2 transcription. Mortality decreased significantly in groups that received FBP in *C. albicans* susceptible to fluconazole group. All cytokine and hematological indexes of FBP group were similar to sepsis group, with exception of platelets count. FBP significantly prevented the decrease in platelets count. FBP does not seem to act in the transcription of COX-2, IL-6, and NF-Kappa B. FBP reduced amounts of NOx levels in BAL fluid through the inhibition of expression of iNOS. Exposure to zymosan (50 µg/mL for 24 h) markedly enhanced the relative luciferase activity in RAW 264.7 macrophages transfected with COX-2 luciferase promoter constructs. Deletion on the CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) binding site resulted in an important decrease in reporter gene activity and a deletion of NF-kappa B and C/EBP with mutation of the cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) and/or activator protein-1(AP-1) totally abolished the COX-2 activity induced by zymosan.

Key-words: Zymosan; COX-2; Luciferase; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Candidemia; Sepsis.

Capítulo I
Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

Candida sp.

O gênero *Candida* pode fazer parte da microbiota normal da pele, mucosas, trato digestivo e geniturinário do ser humano, podendo ser encontrado também em plantas, objetos e no meio ambiente. São descritas várias espécies como sendo clinicamente importantes, incluindo *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e mais recentemente *C. dubliniensis*, embora *C. albicans* continue sendo a mais freqüente e a principal causa das infecções fúngicas invasivas [1].

Candida sp. corresponde a 70-90% de todas as micoses invasivas, representando a causa mais comum de infecções fúngicas deste tipo. Nos Estados Unidos, a incidência de sepse de origem fúngica aumentou em três vezes no período de 1979 a 2000 [2]. Um estudo realizado em 50 hospitais norte americanos, entre os anos de 1995 a 2002, confirmou que *Candida* sp. é a quarta causa mais comum de infecções sangüíneas, representando 9,5% de todos os episódios [3]. Na Europa, ela aparece também como uma causa comum de infecções sangüíneas, representando 3% deste tipo de infecção, sendo comumente isolado em pacientes de unidades médicas, cirúrgicas e de tratamento intensivo [1]. Em Taiwan, a *Candida* sp. representa a causa mais comum de infecções sangüíneas, normalmente associadas a elevados perfis de resistência [4].

Estudos realizados no Brasil mostram que a *C. albicans* continua sendo o principal agente envolvido em candidemias e sepse, mas estirpes não-*albicans* têm sido frequentemente isoladas [5] [6]. Em um estudo mais recente, Camargo e colaboradores

em 2010 verificaram que a duração média da estada do paciente no hospital, após o diagnóstico de candidemia foi de 40,8 dias. Nesse mesmo estudo a *C. albicans* foi a espécie mais prevalente, com 44% dos casos, seguida de *C. parapsilosis* com 22%, *C. tropicalis* com 15%, *C. glabrata* com 9% e *C. krusei* com 6%. A mortalidade registrada também foi elevada, com índices próximos de 43% [7].

Fatores de risco associados à sepse fúngica incluem: pré-maturidade, nascimento com baixo peso, ruptura de barreiras cutânea ou mucosa (como intervenções cirúrgicas e queimaduras de ampla extensão), utilização de cateteres (intravasculares ou urinários), defeitos na imunidade celular, utilização de antimicrobianos de amplo espectro, nutrição parenteral, multicolonização por *Candida* sp., procedimentos cirúrgicos (especialmente do trato gastrointestinal) e hemodiálise [8].

Sinais e sintomas clínicos de candidíase sistêmica são inespecíficos e incluem itens como instabilidade na temperatura corpórea, angústia respiratória, distensão abdominal, apnéia e bradicardia, letargia e diminuição de perfusão tecidual [9]. Atualmente, seu diagnóstico é baseado no isolamento de *Candida* sp. no sangue do paciente, associado a alguns destes sinais e sintomas.

A ampla utilização de terapia antifúngica profilática e empírica, especialmente com derivados azólicos, como o Fluconazol, seleciona cepas de *Candida* sp. com elevados perfis de resistência, influenciando diretamente na mortalidade de pacientes com candidemia [10]. A mortalidade secundária a uma infecção fúngica sistêmica varia bastante, sendo influenciada pela região e também pelo tipo de pacientes estudados [1]. Em um estudo da Confederação Européia de Micologia Médica (ECMM), foi detectada uma mortalidade média de 37,9% após 30 dias de infecção, tendo seus níveis mais elevados em idosos (49,0%), pacientes com doenças oncológicas (49,0%),

com doenças hematológicas (45,0%) e pacientes em Unidades de Tratamento Intensivos (UTI) (42,4%) [11]. Segundo Rocco e Simms, 2000 a mortalidade associada à candidemia é de 48%, e se houver um atraso de mais de 48h para o início da terapêutica antifúngica, a mortalidade sobe para 78%. Idade avançada, ingressar em UTI com candidemia, insuficiência renal, entre outros, são fatores que se relacionam à morbidade e elevam a mortalidade [12].

O custo econômico de uma infecção por *Candida* sp. também é um fator importante, pois uma candidemia prolonga a estada hospitalar e reforça a necessidade de ventilação mecânica [13]. Em um estudo realizado em 2000, os pacientes colonizados por *Candida* sp. apresentaram um aumento de 6,2 dias no tempo de internação hospitalar, se comparado com pacientes não colonizados. Se comparados com pacientes infectados por *Candida* sp., este aumento de tempo sobe para 12,7 dias. O excesso de custo associado à infecção por *Candida* sp., foi de 8.000 € para pacientes colonizados e 16.000 € para pacientes infectados por *Candida* sp. [12]. Em um estudo realizado na Bélgica em 2010, Vandijck e colaboradores verificaram que o custo médio diário associado ao tratamento antifúngico de candidemias foi de 197,00 €. O tratamento antifúngico de uma candidemia por *C. albicans* sensível ao fluconazol foi de 144,65 € e o custo de uma infecção causada por *C. albicans* resistente ao fluconazol foi de 478,15 € [8].

Sepse

O termo sepsé é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), decorrente de infecção por microrganismos ou pela presença de suas toxinas.

Define-se um quadro de SRIS, quando o paciente manifesta duas ou mais das seguintes condições: hipertermia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos/min); taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações/min ou Pressão parcial de CO₂ menor que 32 mmHg) e contagem de leucócitos totais sanguíneos maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³ ou com mais de 10% de formas imaturas [14].

A sepse é uma condição clínica grave, que afeta aproximadamente 18 milhões de pessoas ao ano em todo o mundo, representando a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes cirúrgicos e vítimas de traumas [15]. Atualmente atinge cerca de 700.000 pacientes, correspondendo a cerca de 210.000 mortes todo o ano nos Estados Unidos, contribuindo para um gasto aproximado de 16,7 bilhões de dólares [16]. Na Alemanha, a cada ano, 75.000 pacientes desenvolvem sepse, implicando um custo econômico associado ao manejo destes pacientes entre 3,6 a 7,7 bilhões de euros [17].

A resposta do hospedeiro na sepse é tão importante quanto o sítio de infecção e o agente etiológico da sepse. O pulmão é o sítio de infecção mais frequentemente acometido, seguido por abdômen e trato urinário, mas em 20% dos pacientes, o sítio primário não é determinado e mesmo nos pacientes em cujo sítio é altamente suspeito, uma grande proporção tem culturas estéreis ou significado clínico questionável. Pacientes com infecções presumidas ou condições inflamatórias graves não causadas por infecções (ex. pancreatite), apresentam alterações bioquímicas, fisiológicas, taxas de disfunção orgânica e mortalidade similares, fornecendo suporte para o argumento de

que a resposta do hospedeiro é o maior determinante da evolução clínica do quadro séptico [18].

A ocorrência de falência orgânica segue um padrão comum: a disfunção pulmonar ocorre quase sempre e de maneira precoce. Ela persiste durante o choque e se resolve ou torna-se fatal. Sérias anormalidades hepáticas, neurológicas e de coagulação tendem a ocorrer horas a dias após o início da sepse e persistem por tempo indeterminado. O número de falências orgânicas, além da gravidade dessas, afeta o prognóstico do paciente, pois cada órgão adicional em falência acrescenta 15 a 20% na taxa de mortalidade. Essas taxas de mortalidade e suas complicações vêm apresentando uma discreta redução nas últimas décadas, provavelmente devido a melhor definição da síndrome, a incrementos nas medidas de suporte a órgãos-alvo e a prevenção de complicações, mesmo na ausência de uma terapêutica específica com impacto considerável na mortalidade. Portanto, o tratamento da falência orgânica é essencial, mas por enquanto se baseia em medidas de suporte, como ventilação mecânica, reposição volêmica, fármacos vasopressores, suporte nutricional, sedação, diálise entre outras [19].

Mediadores inflamatórios na sepse

O fator nuclear Kappa B (NF-Kappa B) é um fator de transcrição de eucariotos que existe no citoplasma como um complexo inativo. Sua forma predominante é um heterodímero composto por subunidades p50 e p65. Fisiologicamente o NF-Kappa B se liga às proteínas inibitórias da família I-Kappa B (Kappa B Inibitório) e é ativado em resposta a estímulos patogênicos primários (vírus, bactérias e fungos) ou secundários

(citocinas inflamatórias). Após o estímulo, a proteína I-Kappa B é fosforilada e posteriormente degradada através do proteossoma. As subunidades p50 e p65 livres do I-Kappa B migram para o núcleo para ativar a expressão de genes inflamatórios [20].

Dentre vários fatores de transcrição envolvidos na patogênese da sepse, o NF-Kappa B é caracterizado como crítico, pois regula a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), quimiocinas, moléculas de adesão e outras enzimas induzíveis como Ciclooxigenase-2 (COX-2) e Óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Patógenos e seus produtos ativam o NF-Kappa B, aumentando a expressão de iNOS, levando a uma produção excessiva de NO. Essa liberação de NO causa subsequentemente vasodilatação, hiporeatividade vascular e hipotensão. A ativação de NF-Kappa B faz a mediação da expressão de um grande número de citocinas, que levam à ativação de NF-Kappa B, amplificando e perpetuando assim a resposta inflamatória [21].

O acúmulo de leucócitos e sua ativação pelos mediadores descritos acima levam à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como ânion superóxido e NO, respectivamente. Além dos seus efeitos próprios, esses radicais também podem reagir entre si, produzindo o peroxinitrito, um potente agente oxidante [22] [23]. O NO e a iNOS estão implicados na patofisiologia da falência micro circulatória e na disfunção de órgãos na sepse. As fases iniciais da sepse são caracterizadas pelo comprometimento hemodinâmico e a falência de órgãos pode ocorrer mesmo com o restabelecimento da pressão arterial e do débito cardíaco. O fornecimento de oxigênio, portanto, não parece ser um fator limitante na falência de múltiplos órgãos, sugerindo que existe nestes casos um defeito na utilização do oxigênio celular, possivelmente associado à disfunção mitocondrial. O NO é um conhecido modulador da função mitocondrial, geralmente atua

diminuindo a produção energética da mitocôndria pela inibição da Citocromo C Oxidase [26]. Vários trabalhos tem mostrado que graus crescentes de disfunção mitocondrial correlacionam-se com a severidade da sepse e evolução a óbito [24] [25].

Uma das sequelas importantes da SRIS ou da sepse, que pode surgir, é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que acomete cerca de 30% dos pacientes com sepse, enquanto praticamente todos os pacientes desenvolvem disfunção de um órgão [27]. O choque séptico é um agravamento do quadro de sepse, caracterizado por acentuadas alterações hemodinâmicas como hipotensão definida por uma pressão arterial média (PAM) menor que 90 mmHg ou uma redução de 40 mmHg da PAM basal, não responsiva à reposição de líquido e resistente a agentes vasoconstritores; perfusão anormal de órgãos e tecidos, procedente da vasodilatação e vasoconstrição em pequenos vasos; diminuição da resistência vascular sistêmica e aumento da frequência cardíaca (100 batimentos/min ou mais). O aparecimento dos sinais e sintomas clínicos é decorrente da ativação de sistemas séricos, de células residentes, do endotélio e dos leucócitos. Conseqüentemente ocorre síntese e/ou liberação de mediadores endógenos (citocinas, radicais reativos do oxigênio e do nitrogênio e mediadores lipídicos), sendo a ativação das células inflamatórias um fator decisivo para o desenvolvimento da sepse [28].

O TNF- α é tido como um mediador importante na sepse, pois é uma das primeiras citocinas que surgem na circulação, tanto na sepse experimental quanto em humanos [29] [30]. Além disto, a administração endovenosa de TNF- α em animais induz uma síndrome com as características típicas de sepse. Nos estudos de sepse em humanos, o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α foi correlacionado com o grau de severidade da doença [31], detectando-se níveis mais elevados nos casos fatais.

A IL-6 participa, principalmente, na indução da febre e na produção, pelo fígado, de proteínas de fase aguda [32]. Apesar de não estar totalmente definida a relevância de seus efeitos na sepse, essa citocina é a que apresenta melhor correlação com a mortalidade, em modelos experimentais e em pacientes com sepse, isto é, quanto mais elevados os níveis plasmáticos de IL-6, maior a probabilidade de o paciente evoluir a óbito [33]. A liberação de IL-6 é dependente da produção de TNF- α , pois a neutralização desta citocina com anticorpos específicos diminui os níveis plasmáticos da IL-6. O TNF- α estimula a liberação sistêmica de IL-6, amplificando, desse modo, a resposta inflamatória [34].

As quimiocinas como a Proteína-1 Quimiotática dos Monócitos (MCP-1) também são fatores importantes na resposta inflamatória, pois são agentes envolvidos na quimiotaxia e ativação de leucócitos, capazes de aumentar a resposta inflamatória pela indução da liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas. A exacerbação da liberação de citocinas pró- ou antiinflamatórias está fortemente relacionada com a severidade e mortalidade na sepse, sendo primordial o equilíbrio desses mediadores para a resolução da doença [33] [35].

Durante a sepse, a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro inicia uma cascata de eventos, resultando em hipotensão e dano tecidual. Induzidos por TNF- α , os receptores solúveis de TNF- α e a IL-6 modificam a resposta na sepse, estimulando as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão que auxiliam no extravasamento de neutrófilos e células mononucleares para o sítio da infecção. Além disso essas células sintetizam outros fatores imunomodulatórios, como por exemplo a citocina MCP-1 [36]. Essa citocina contribui para o acúmulo de células mononucleares no local da infecção e apesar dos neutrófilos serem considerados os mais importantes

fagócitos na defesa contra sepse de origem fúngica, as células mononucleares também podem contribuir de maneira significativa para a defesa contra este tipo de infecção, especialmente quando houver neutropenia [38]. Em contraste com a sepse/choque séptico de origem bacteriana, a dinâmica de citocinas e moléculas de adesão durante a sepse por *Candida* sp. não está bem esclarecida experimentalmente [36]. O TNF- α aumenta a atividade fungicida, através da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e da liberação de enzimas lisossomais. Em camundongos a produção de TNF- α e IL-6 aumenta de forma dose-dependente, diretamente relacionada com o tamanho do inóculo de blastoconídeos de *Candida* sp., tanto em animais neutropênicos quanto em animais não-neutropênicos [37].

Infecções causadas por diferentes microrganismos apresentam diferentes padrões de resposta inflamatória. Abscessos causados por *Candida* sp. são caracterizados por granulomas compostos de células multinucleadas, macrófagos e neutrófilos. Já infiltrados inflamatórios causados por *S. aureus* são compostos predominantemente por neutrófilos [34].

Os eicosanóides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico que apresentam um importante papel na resposta ao processo infeccioso. As enzimas ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) convertem o ácido araquidônico em prostanóides. Na maioria dos tecidos, a COX-1 é expressa de maneira constitutiva, ao passo que a COX-2 é induzida por mediadores inflamatórios, patógenos e suas toxinas. A importância dos prostanóides na sepse foi originalmente sugerida há vários anos por Northover e Subramanian em 1962. Nestes estudos, cães tratados com aspirina foram resistentes à hipotensão induzida por Lipopolissacarídeo (LPS). Após este estudo

inicial, vários autores começaram a utilizar anti-inflamatórios não esteroidais para a inibição da COX, resultando em efeitos benéficos em diferentes modelos animais [52].

Utilizando animais *Knock-out* para COX-2 (COX-2^{-/-}), Ejima e colaboradores em 2003 verificaram a importância da COX-2 nas consequências patofisiológicas da endotoxemia induzida por LPS. Nos animais COX-2^{-/-}, após a administração intraperitoneal de LPS, ocorreu a produção de um menor infiltrado inflamatório, uma menor ativação e translocação de NF-Kappa B ao núcleo e um menor grau de lesão renal e pulmonar quando comparados com animais *wild-type* também tratados com LPS. Os animais *Knock-out* também apresentaram um aumento na produção de Interleucina 10 (IL-10), uma importante citocina anti-inflamatória, onde altos índices correlacionaram-se com melhor prognóstico na sepse [53].

O zymosan é uma substância oriunda da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Composta por cadeias de polissacarídeos de vários pesos moleculares contém aproximadamente 73% de polissacarídeos, 15% de lipídeos, 7% de lipídeos e compostos inorgânicos, dentre outros. As partículas de zymosan vêm sendo amplamente utilizadas como um modelo de estudo de padrões de resposta imune à infecções fúngicas [54]. A administração intraperitoneal em camundongos induz um quadro de peritonite aguda e inflamação generalizada, podendo evoluir a um quadro de falência de múltiplos órgãos. Este processo é caracterizado pela da ativação de vários mediadores inflamatórios, incluindo o sistema do complemento, prostaglandinas, leucotrienos, fatores de agregação plaquetária, espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossomais.

O zymosan também atua como um potente ativador de macrófagos. Após a fagocitose de zymosan, os macrófagos liberam enzimas lisossomais, ácido

araquidônico, TNF- α e COX-2. Como o zymosan não é degradado pelas células, ele acaba ocasionando uma prolongada resposta inflamatória [55]. Os macrófagos desempenham um papel importante na imunidade inata, atuando na defesa contra a invasão de microrganismos. Macrófagos residentes são amplamente distribuídos e são os primeiros tipos celulares a reconhecer agentes invasores. Os macrófagos reconhecem e fagocitam microrganismos opsonizados através de receptores envolvidos na fagocitose como receptores de manose, lectina e dectina-1. A fagocitose também é acompanhada pela ativação de receptores não fagocíticos, como os receptores *Toll Like* (TLR) [56].

Tratamento da Sepses

Em um quadro de sepsis, devem ser avaliados processos distintos, porém interligados, que ocorrem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local e generalizada. Até pouco tempo, o tratamento de pacientes com sepsis ou choque séptico era realizado por meio de antimicrobianos e fármacos que interferem nas alterações cardiovasculares [39] e pouca ênfase era dada na resposta inflamatória, podendo ser esse um dos motivos da alta mortalidade de pacientes com choque séptico por *Candida* sp. Ademais, não se demonstrou, inequivocamente, a relativa contribuição de cada mediador inflamatório na letalidade resultante do choque séptico induzido por fungos. Os fármacos antimicrobianos são necessários, mas não são suficientes para o tratamento da sepsis e paradoxalmente podem precipitar alterações sépticas pela liberação de produtos microbianos. Pacientes que não recebem prontamente a antibioticoterapia adequada

têm uma mortalidade aumentada em 10 a 15%. Três componentes são fundamentais na sepse: o processo inflamatório, a coagulação e a fibrinólise. O microrganismo através da invasão tecidual ou liberação de toxinas inicia a resposta inflamatória sistêmica. A cascata da inflamação e a ativação do sistema de coagulação estão associados à diminuição da fibrinólise, o que leva a uma alteração da circulação microvascular [40].

Atualmente um dos fármacos mais prescritos para o tratamento da sepse e choque séptico, atua na preservação da função endotelial e da perfusão microvascular. A Drotrecogina Alfa Ativada (DAA) é uma proteína C ativada recombinante que tem sido amplamente utilizada em casos de sepse, apresentando efeitos benéficos na microcirculação, ligando-se diretamente a receptores específicos no endotélio e em células inflamatórias, apresentando um efeito imunomodulatório negativo. A proteína C ativada é uma proteína endógena que promove a fibrinólise, inibe a trombólise e apresenta atividade anti-inflamatória. Em 2001 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a DAA para o tratamento da sepse. Este fármaco é o primeiro de uma nova classe de inibidores da coagulação, atuando na inibição dos fatores Va e VIIIa, além de inibir a formação da trombina pelo aumento da fibrinólise [41]. A terapia adjuvante com DAA tem mostrado uma redução significativa na mortalidade de pacientes adultos com sepse [40].

Frutose-1,6-bisfosfato

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um metabólito intermediário da rota glicolítica, que demonstra vários efeitos terapêuticos benéficos, como na lesão isquêmica do rim,

coração, fígado, intestino, cérebro e pulmão [42]; além de apresentar-se protetora em várias patologias, como em lesões tóxicas. Nosso grupo verificou um efeito protetor da FBP na intoxicação hepática por galactosamina. Foi observado uma redução nos índices de necrose e um aumento nos índices de apoptose em fígados de ratos [43]. A FBP também se mostrou útil na reversão de processos inflamatórios induzidos pela administração de carragenina [44] [45] e apresentou um importante efeito imunomodulatório em linfócitos T [46]. Os efeitos protetores observados pela utilização da FBP são provavelmente devidos à sua habilidade em manter os níveis intracelulares de ATP e Ca^{++} , evitando a morte celular por déficit de energia [47]. Em situações de estresse, a FBP ainda inibe a formação de radicais livres e protege contra o dano celular [48]. Alguns estudos demonstram que por ser bifosforilado, a FBP tem grande dificuldade em atravessar a membrana celular e, como é uma substância oriunda da degradação fisiológica da glicose, tem baixa toxicidade [49] [44].

Nosso grupo de pesquisa também verificou que a FBP tem a capacidade de reduzir o índice de mortalidade na sepse induzida experimentalmente por *Escherichia coli* em ratos, onde a administração de 500mg/kg de FBP reduziu em 50% a mortalidade de animais sépticos contra o grupo controle que apresentou 100% de mortalidade após 24 horas. Houve uma redução significativa nos níveis de leucócitos totais, monócitos e células imaturas quando comparados os grupos séptico tratado com FBP e o controle séptico sem tratamento. As lesões histológicas no coração, pulmões, fígado e rins foram menores e algumas vezes ausentes no grupo séptico tratado com FBP, quando comparados com o grupo controle séptico sem tratamento [50]. Recentemente, nosso grupo reportou que a FBP atua como um inibidor da agregação

plaquetária, prevenindo a trombocitopenia, prolongando os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada em ratos sépticos [51].

Os efeitos da FBP têm sido atribuídos principalmente a: (a) sua capacidade de aumentar o metabolismo dos carboidratos por intervenção na rota glicolítica, não somente como um regulador metabólico mas também como um substrato; (b) redução da demanda energética e um conseqüente aumento da eficiência metabólica; (c) estabilização das membranas celulares [49].

Atualmente é notório o gradual e crescente número de casos de sepse causada por fungos, principalmente do gênero *Candida* em diversos países. Este aumento é acompanhado por altas taxas de mortalidade, aumento do tempo de internação e conseqüentemente aumento dos custos associados ao manejo desses pacientes. Considerando que já obtivemos resultados promissores no tratamento da sepse bacteriana, o nosso estudo propôs a avaliação do papel protetor da FBP na sepse induzida por *C. albicans*. Os modelos experimentais utilizados para o estudo da sepse, contribuem para um melhor entendimento da evolução da doença, tentando compreender os mecanismos pelos quais os mediadores inflamatórios, envolvidos no processo, desempenham seus papéis. Os modelos experimentais de sepse por fungos descritos na literatura utilizam normalmente a inoculação de células fúngicas na corrente circulatória de animais, conferindo inexistência de um foco infeccioso. Em modelos experimentais no qual inexistesse esse foco, a falência da migração de neutrófilos não acarreta grandes conseqüências, já que o acúmulo de neutrófilos, em tecidos não infectados, é extremamente lesivo devido à ativação dessas células e à liberação de enzimas proteolíticas e de radicais livres que são altamente reativos. Já em modelos,

nos quais há presença de um foco infeccioso, a falência da migração de neutrófilos para o sítio é extremamente prejudicial para a resolução do processo, uma vez que essas células são fundamentais para a eliminação dos microrganismos. Dessa forma, ocorrem proliferação e disseminação do agente infeccioso no organismo, evoluindo o quadro de sepse para o choque séptico e a provável morte do indivíduo. Nesse trabalho foi estabelecido um modelo experimental de sepse a partir de um foco infeccioso, onde foi analisado as etapas da síndrome séptica, o papel desempenhado pela FBP nesta situação clínica, através da mensuração dos níveis de mediadores inflamatórios, os perfis hematológicos na sepse induzida por *C. albicans* em camundongos, além da ação da FBP na transcrição de genes inflamatórios.

1.2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliar *in vivo* o efeito protetor da Frutose-1,6-bisfosfato na sepse induzida por *C. albicans* e *in vitro* sua ação sobre a transcrição de genes inflamatórios

Objetivos específicos

1. Estabelecer um modelo experimental de sepse induzida por *C. albicans* observando o tempo de morte utilizando cepas sensíveis e resistentes ao Fluconazol.
2. Determinar a concentração sérica de citocinas marcadoras de processo inflamatório (IL-6 e MCP-1).
3. Avaliar alterações hematológicas nos animais, através do hemograma completo (contagem total de eritrócitos, contagem de plaquetas, contagem total e diferencial de leucócitos, dosagem de hemoglobina e hematócrito).
4. Realizar a hemocultura dos animais.
5. Determinar o efeito da FBP na produção de NO em lavado bronco-alveolar de animais estimulados com zymosan.
6. Determinar o efeito do zymosan na ativação da transcrição de COX-2 em macrófagos, investigando os sítios da região promotora responsáveis por esta ativação.
7. Verificar o efeito da FBP na ativação transcricional de COX-2 induzida por zymosan.
8. Analisar a ação da FBP na ativação transcricional de IL-6 e NF-Kappa B induzidas por zymosan.

9. Determinar o efeito da FBP na expressão de iNOS em macrófagos estimulados com zymosan.

Capítulo II

Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in *Candida* experimental sepsis and prevents the septic-induced platelet decrease

Artigo submetido ao periódico *Critical Care medicine*

Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in *Candida* experimental sepsis and prevents the septic-induced platelet decrease

Roberto Christ Vianna Santos ^{1,2,3}, MSc; Rafael Noal Moresco ⁴, PhD; Miguel Angel Peña Rico ³, PhD; Jose Luis Rosa ³, PhD; Ramon Bartrons ³, PhD; Francesc Ventura Pujol ³, PhD; Débora Nunes Mário ⁵, BSc; Sydney Hartz Alves ⁵, PhD; Etiane Tatsch ⁴, BSc; Helena Kober ⁴, BSc; Ricardo Obalski de Mello ¹, MSc and Jarbas Rodrigues de Oliveira ^{2,3}, PhD.

1 Laboratório de Microbiologia Clínica, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Unitat Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

4 Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, USFM, Santa Maria-RS, Brazil.

5 Laboratorio de Pesquisas Micológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil.

Financial Support

This study was supported by grants from CAPES/DGU (BEX 4422/09-0) - Brazil, IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge) and Secretaría de Estado de Universidades, Ministerio de Ciencia e Innovación (PHB2008-0080-PC) – Spain.

Key-words: Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase, MCP-1, IL-6, Candidemia, NF-Kappa B

Corresponding author: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

E-mail: jarbas@pucrs.br

Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, CEP 90.619-900

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Objective: To determine the role in the modulation of inflammation of Fructose-1,6-bisphosphate, in experimental *Candida albicans*-induced sepsis, and in COX-2, IL-6 and NF-Kappa B gene expression, NOx production and expression of iNOS in macrophages.

Design: Randomized and controlled experimental study.

Setting: Research laboratory of an academic institution.

Subjects: Male CF1 strain mice, RAW 264.7 macrophages and alveolar macrophages.

Interventions: Intratracheal sepsis model was performed in mice, using fluconazole-resistant and -susceptible strains of *C. albicans*. FBP (500mg/Kg) was administered to mice at the time of operation in Sepsis + FBP Group. Five to six animals from each group were killed 24h, 5 days, and 10 days after the sepsis induction. Blood was taken for assessment of complete hematological profile and cytokine assay (IL-6 and MCP-1). The rest of the mice were observed for mortality. In order to determine the possible anti-inflammatory mechanism of FBP, a series of transfections in RAW macrophages using COX-2, IL-6 and NF-Kappa B promoters has been conducted. The NOx production by macrophages and iNOS expression in RAW has been determined.

Measurements and main results: Mortality decreased significantly in groups that received FBP in *C. albicans* susceptible to fluconazole group. All cytokine and hematological indexes of FBP group were similar to sepsis group, with exception of platelets count. FBP significantly prevented the decrease in platelets. FBP does not

seem to act in the transcription of COX-2, IL-6, and NF-Kappa B. FBP reduced amounts of NOx levels in BAL fluid through the inhibition of expression of iNOS.

Conclusions: FBP reduced mortality in *C. albicans* susceptible to fluconazole group, preventing the fall in the number of platelets and decreases the NOx levels by inhibiting iNOS.

Introduction

Candida sp. is the most common cause of invasive fungal infection, accounting for 70–90% of all invasive mycoses (1). In the USA, *Candida* sp. is the fourth most common cause of bloodstream infections, and in European studies, *Candida* sp. is the fifth to tenth most common causative pathogen (2, 3, 4, 5, 6, and 7). One study of the epidemiology of sepsis found that the annual number of cases of sepsis caused by fungal organisms in the United States increased by 207% between 1979 and 2000 (8).

Invasive candidiasis is associated with substantial morbidity and high mortality (40–60%), prolonged hospital stay and increased health care costs (9). This increase can also be attributed to antimicrobial resistance, since their intensive clinical use for both therapy and prophylaxis has favored the emergence of resistance strains (10). Another reason for the importance of *Candida* species is the many different types of patient affected. One of the main factors traditionally associated with candidemia is the loss of normal host defense mechanisms. As soon as the diagnosis is made, such mechanisms must be restored in order to combat candidemia. Nevertheless, some studies have observed that certain species, e.g. *C. albicans* and *C. tropicalis*, can cause infections even in immunocompetent patients. Although infrequent, this finding modifies the approach to infections caused by such organisms (11, 12)

Fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high-energy intermediate of glycolysis has been studied for its ability to protect ischemic or hypoxic tissue and facilitate the recovery of tissues (13). FBP is capable of entering cells, serving as a glycolytic intermediate (14) and diffuses across a membrane bilayer in a concentration-dependent fashion (15). Recently, it has been shown that exogenous administration of FBP can

reduce the duration and severity of seizures in laboratory animals (16, 17). In some studies of our group (18-22), we reported that FBP reduced the exudate volume, protein concentration, total neutrophils, and suppressed T-cell proliferation in the pleural cavity in mice inflammation model (18). FBP also inhibits cellular proliferation and thereby reduces the soluble tumor necrosis factor receptor II levels through the blockage of the potassium channels, acting as a powerful immunomodulatory agent (19). In another inflammation model, FBP (500mg/kg) attenuated the exudate volume, total leukocytes and the number of polymorphonuclear leukocytes (20). In a bacterial sepsis model FBP reduced the mortality rate caused by *Escherichia coli* and improved hematologic and histological alterations (21, 22).

Due to the fact that an increased number of patients have experienced sepsis caused by fungal organisms, especially by *Candida* sp., and the high mortality of this infection, there is therefore a need for a strategy to reduce the mortality caused by *Candida* sp. sepsis. Thus, considering that FBP reduced the mortality rate of sepsis caused by *Escherichia coli* (22), the purpose of this study was to assess the role of FBP in *C. albicans*-induced sepsis. We also investigated the effect of FBP on hematological parameters, nitric oxide synthase (iNOS) protein expression, and nitrite/nitrate (NOx) levels, as well as the effect on the transcription of inflammatory genes COX-2, IL-6, NF-Kappa B.

Materials and Methods

Animals

Male CF-1 mice, weighing between 18±20 g were allowed free access to water (tap water) and food (Nuvilab CR1, Nuvital Brasil). The photo period was automatically

controlled, providing 12 h of light and 12 h of dark with a temperature range of 20 to 21°C and relative humidity of 55% to 65%.

Candida albicans growth and characterization

Well characterized clinical isolates of *C. albicans* susceptible to fluconazole, named Sc1, and a *C. albicans* resistant to fluconazole, named R-36 were used throughout this study. These strains are germ-tube positive and chlamyospore-positive and yield the chlamyospore presentation profile typical of *C. albicans*. It yields typical colonies on CHROMagar Candida Medium (Beckton Dickinson), growing well at 30, 37, and 42 °C and its carbohydrate assimilation profile is characteristic of *C. albicans*. The Sc1 MIC's were 4 µg/ml to fluconazole and 0.25 to amphotericin B. The R-36 MIC's were 64 µg/ml to fluconazole and 0.25 to amphotericin B. The MIC's were performed by Macrodilution.

Antimicrobial activity of FBP

The antimicrobial activity of FBP against *C. albicans* susceptible and resistant to fluconazole was determined by an agar dilution method. The FBP was dissolved in water, being then prepared to the solutions at concentrations of 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, and 0.06 mg/dL. All the experiments were performed in duplicate. The plates were incubated at 35 °C for 48 h.

Intratracheal model

A large loopful of organisms was suspended in fresh Sabouraud dextrose broth and incubated for 24 h at 37°C. Blastoconidia were harvested and washed twice with sterile buffered saline (pH 7.4) by centrifugation at 800g for 15 min. Yeast cells were resuspended and counted in a hemocytometer and adjusted to a concentration of 4×10^8 C.F.U./mL. The viable count was confirmed by serially diluting the yeast suspension and plating the inoculum on Sabouraud Dextrose Agar plates. Colonies were counted 24 to 48 h later.

The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine 100mg/kg and Xylazine 10mg/kg and then tracheostomized. 50 µl of saline solution (NaCl 0.9%) or 4×10^8 C.F.U./ml was administered directly in the lungs by intratracheal instillation. The surviving mice were killed by carbon dioxide asphyxiation 24 h after the end of challenge (15 days). After 24h, 5 and 10 days the animals were euthanized by cervical dislocation and the inferior vena cava was incised. Whole blood was aspirated and approximately 1-1.5 ml was collected. A complete hematological profile was performed using the ABX Pentra 120 (Horiba-Brazil). After these analyses the samples were centrifuged and the plasma was aliquoted and stored at -80°C for a maximum of two weeks. Cytokines assays (IL-6 and MCP-1) were determined using Multiplex Luminex[®] immunoassay (Invitrogen).

Blood Culture

A blood sample of 0.5 to 1 mL from each animal was collected to perform the blood culture. The blood collection was performed using a tube filled with a nutrient medium (Becton Dickinson). The tubes were then placed in an oven at 37°C for a period

of 48 h. Later, the positive blood cultures were identified as seen in material and methods - *Candida albicans* growth and characterization.

Cell culture

Macrophages RAW 264.7 were obtained from the *American Type Culture Collection* (Bethesda, MD) and were maintained sub-confluent in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM l-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Cells were harvested by gentle scraping and were used when confluence had reached 70%.

Transfection, Luciferase, and β-galactosidase assays

The Mouse COX-2 promoter-luciferase construct pCOX -511, IL-6 promoter-luciferase construct p1168hull6P-luc+, NF-Kappa B promoter-luciferase construct pNFkB-luc+ (Stratagene), and pSV40-β galactosidase control vector (Promega) were generous gifts from Dr. Antonio R. García Susperregui (Unidad de Bioquímica - Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona). Transfections were performed using Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Optimem (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the supplier's protocols. The different promoter-reporters fusion plasmids (1 µg) and 60 ng of the pSV40-β galactosidase control vector (Promega) were co-transfected into the RAW cells using 0.75 µL and 0.25 µL of Lipofectamine LTX and Plus Reagent respectively. Luciferase activity was measured in supernatant extracts. Co-transfection

with pSV- β galactosidase plasmide DNA was carried out to normalize transfection efficiencies in different transfectants and expressed in relation to the activity of the control group. The luciferase and β -galactosidase activities assays were performed in a luminometer (TD 20/20 – Turner Biosystems).

Cellular extracts

The cellular extracts, using RAW or mice CF1 alveolar macrophages were performed using a 50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10% glycerol, and 2% SDS lysis buffer [23].

Western Blot

Western blot was performed with 50 μ g of total cellular protein extracts from RAW cells. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Membranes were probed with anti-iNOS primary antibody – specific polyclonal antibodies against the C-terminus of iNOS from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Bound antibody was visualized with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody, and developed by enhanced chemiluminescence using ECL (Amersham Bioscience Corp.).

Bronchoalveolar lavage (BAL)

The lungs of the anesthetized mice were subjected to BAL at 24h following Zymosan (500 μ g/Kg) intratracheal injection. BAL fluid was obtained by instilling saline into the lungs through a tracheal cannula using a volume equal to 80% of lung vital capacity (3 \times with 0.5 ml of 0.9% NaCl) for a total of 1.5 ml. Total BAL fluid recovery was

approximately 90% of the instilled volume and did not differ significantly between the experimental groups and controls.

Nitrite/nitrate (NO_x)

NO_x levels were measured in BAL by the Griess method using the Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer.

Statistical analysis

In vivo analyses

Differences in survival after 15 days of observation were assessed by Kaplan-Meier analysis followed by the Logrank test. Different parameters have been compared among different animal treatment groups by the Kolmogorov-Smirnov test followed by Mann-Whitney test.

In vitro analyses

All experiments were repeated at least three times and One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the significant differences between treatment groups and Newman–Keuls test was used for multi-group comparisons.

A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. Results are presented as mean ± standard error (SEM). All statistical analyses were performed with the software package GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego-CA, USA).

Ethics aspects

All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, protocol number 08/00032.

Results

Antimicrobial activity

Using an agar dilution method, the FBP showed no antimicrobial activity against *C. albicans* susceptible to fluconazole and *C. albicans* resistant to fluconazole strains.

Blood culture

Twenty-four hours after intratracheal administration of the *C. albicans* (Sc-1 or R-36) blastoconidea all animals developed candidemia, which was detected by positive blood cultures. There was a recovery of the same organism in animals inoculated in Sabouraud agar plates.

Comparision of C. albicans virulence of susceptible and resistant to fluconazole in immunocompetent CF-1 mice.

Initial experiments were conducted to compare the pathogenesis of *C. albicans* susceptible and resistant sepsis in immunocompetent CF-1 mice. Mice were inoculated with *C. albicans* susceptible (Figure 1A) or *C. albicans* resistant (Figure 1B) via trachea and observed twice daily for 15 days for mortality. In all experiments, necropsies of all infected mice demonstrated deep organ invasion by the fungus, with extensive mycelial growth in target organs (kidney, heart, and lung; data not shown). Mortality was significantly decreased in groups that received FBP in *C. albicans* susceptible to fluconazole group. FBP does not seem to act in *C. albicans* resistant to fluconazole-induced sepsis.

Hematological parameters

We performed blood profile analyses throughout the study to closely document changes that occurred during sepsis. Within 24h of sepsis, significant leucopenia was observed. In the figure 2A and 2B, the values for the time zero are the hematological values obtained prior to the sepsis surgery. There were significant differences in the hematological profiles between the sham and sepsis group. In the sepsis group, there was an initial leucopenia (in day 1), followed by and increase in the white blood cells, which increases after day 1 until the end of the study. When analyzing the number of platelets, we observed a decrease in number on day 1 after induction (Figure 2C and 2D). In the sepsis group by *C. albicans* susceptible to fluconazole, the FBP significantly prevented the decrease in platelets (Figure 2C), but when we analyzed the sepsis group by *C. albicans* fluconazole-resistant, this beneficial effect was not present (Figure 2D).

Cytokine production in plasma of infected mice

IL-6 levels was significantly enhanced within day 1 to day 5 after sepsis surgery (Figure 3A) in *C. albicans* susceptible to fluconazole, and day 1 to day 10 after sepsis surgery (Figure 3B) in *C. albicans* resistant fluconazole. In both cases the maximal induction point is at day 1. MCP-1 levels was significantly enhanced within day 1 to day 5 (Figure 3C), and the maximal induction point is at day 1 after surgery in both cases. The FBP showed no inhibitory activity on IL-6 and MCP-1 release in *C. albicans*-induced sepsis.

Effect of FBP on NO production in BAL and iNOS expression in macrophages

FBP reduced NO accumulation induced by zymosan in BAL of CF-1 mice (Figure 4A). Expression of iNOS mRNA was induced by zymosan and LPS. FBP in 10, 5, and 2 mM inhibited expression of iNOS protein expression in RAW macrophages (Figure 4B).

FBP on transcription of IL-6, NF-Kappa B and COX-2

30 minutes before induction with zymosan, we used 10, 5, 2, and 1 mM FBP. The FBP concentrations tested showed no inhibitory potential of the transcription genes of COX-2, IL-6 and NF-kappa B, as seen on figure 5.

Discussion

C. albicans susceptible and resistant to fluconazole virulence

Initial experiments were conducted to compare the role of FBP on pathogenesis of *C. albicans* susceptible and resistant to fluconazole in a sepsis model. Mice were inoculated with *C. albicans* susceptible (Sc-1) or with resistant (R-36) (4×10^8 UFC/mL intratracheally) and observed twice daily for 15 days for morbidity and mortality as shown in figure 1. Figure 1A shows that sepsis group presented 33.3% survival after 15 days in *C. albicans* susceptible group and 20% survival in *C. albicans* resistant group. In both cases sepsis was associated with clinical signs of disease (including decrease of body temperature, lethargy, and ruffled appearance). The sham group presented 100% of survival and FBP appears to be protective in sepsis by *C. albicans* susceptible to fluconazole, with 72.7% of survival rate. The FBP does not seem to protect animals subjected to sepsis with *C. albicans* resistant to fluconazole. This can be explained by several strains with increased resistance to drugs also presented and expression of

large number of virulence factors. Fluconazole is the most commonly prescribed antifungal agent for the prophylaxis and therapy of candidiasis, having becoming more common for disseminated candidiasis (24).

Angiolella et al, 2008 (25) demonstrated that a complex relationship exists between fluconazole resistance and *C. albicans* virulence. This group found that among isolates, the higher MICs of fluconazole, more virulent were the strains; represented by a marked decreased in survivor rates in a murine model of disseminated candidiasis. Fekete-Forgács et al, 2000 (26), showed that a fluconazole-resistant strain proved to be superior in all virulence traits examined including germination, adherence ability, secreted proteinase and phospholipase production. The virulence of this resistance strain in a mouse model was also higher than fluconazole susceptible strain.

With the development of azole resistance, not only a particular but several putative virulence traits can change simultaneously, resulting in an increased *in vivo* virulence. Several references demonstrate that fluconazole resistant emerging strains accompanying changes of virulence factors. Lyman et al, 1999 (27), related an increased adherence of *C. albicans* fluconazole-resistant strain in esophageal mucosa. Wu et al, 2000 (28) showed an increase of extracellular production of Aspartyl Proteinase (Sap)-dependent manner for the most fluconazole-susceptible isolate (MIC, 1.0 mg/ml) and significantly increased in a dose-dependent way for the most fluconazole-resistant isolate (MIC, >64 mg/ml).

Hematologic parameters

The most important hematological finding is that FBP prevents the septic-induced platelet decrease. The role of FBP on platelets has been recently reported, being an

important platelet aggregation inhibitor (21, 22 and 29). The inhibition of the platelet aggregation can be very important, since this can improve the tissue perfusion that is harmed in the septic shock for the formation of clots. Platelets play a complex role in sepsis. They modulate not only their own function but also that of cells around them. Platelets activation happens characteristically at endothelial surfaces in response to vascular injury and leads to the secretion of an array of platelet substances (29).

In systemic inflammatory syndromes, such as the response to sepsis, disseminated intravascular platelet activation may happen, which will contribute to microvascular failure and thereby contribute to the development of organ dysfunction. In addition, in this situation, platelets may be directly involved in the inflammatory response by releasing inflammatory mediators and growth factors (30)

Almost every patient with sepsis presents abnormalities in the coagulation system (clinically relevant coagulation abnormalities may occur in 50% to 70% of patients) ranging from a small decrease in platelet count and subclinical prolongation of clotting times to full-blown disseminated intravascular coagulation (DIC). There is evidence that DIC is involved in the pathogenesis of microvascular dysfunction and contributes to organ failure. Also, activation of the coagulation system may cause bleeding, through the depletion of platelets and consumption of coagulation factors (31).

It has been suggested that platelet count is a very important criterion to assess hematological failure in the septic process. Mavrommatis et al, 2000 (32) have reported that platelet count has not changed in uncomplicated sepsis, but in severe sepsis and septic shock, platelet count was markedly reduced. In critically ill patients with a platelet count of less than $50 \times 10^9/L$ have a four – to fivefold greater risk for bleeding as compared with patients with a higher platelet count (33). The risk of intracerebral

bleeding in patients with sepsis during ICU admission is relative low (0.3 to 0.5%), but in 88% of patients with this complication the platelet count is less than $100 \times 10^9/l$ (34).

Cytokine analysis

Disseminated *C. albicans* infections are often difficult to diagnose and are associated with a high mortality. At first, the fungi engage with a succession of innate-immunity leukocytes then later lymphocytes, all involved in a complex chemical cross-talk based at the earliest stages on production of a mixture of chemokines and cytokines by host leukocytes, and of surface polysaccharides and secreted proteins by the fungus (35).

Proinflammatory cytokines and chemokines including IL-6 and MCP-1 have previously been shown to play key roles in host defense against *C. albicans* infection, due to their ability enhance phagocytosis of blastoconidea and increase oxygen-dependent and independent candidicidal activity (36). IL-6 is a multifunctional cytokine that plays an important role in several physiologic processes, including hematopoiesis, B-cell proliferation and plasma cell differentiation and it is a critical factor for triggering the acute phase response. This cytokine has also been found useful as a prognostic factor for outcome in septic patients, correlated with mortality in septic patients (36).

MCP-1 belongs to CC family of chemotactic cytokines or chemokines, which stimulate the migration of monocytic cells. The coordinated synthesis and release of MCP-1 is important in both acute and chronic inflammatory process by controlling the influx of phagocytic cells and also their state of activation in concert with primary inflammatory cytokines (37). Our findings concerning the IL-6 and MCP-1 produced during experimental *C. albicans* sepsis agree well with those of others studies (36, 37),

where plasma levels of this cytokine/chemokine were higher for mice infected with the most virulent strain, and presented a peak on day one after sepsis induction. However, FBP does not seem to act in the plasma levels of IL-6 and MCP-1.

NO production and iNOS expression

Analyzing the production of NO, we have shown that zymosan stimulates the production of NO and this production is inhibited by FBP. Similar results were found by Edde et al, 1998 (39), when using cultured rat alveolar macrophages, the production of NO by LPS-stimulated macrophages was inhibited in a concentration-dependent manner by FBP. Correspondingly, increasing concentrations of FBP were associated with a proportional reduction of mRNA for iNOS after macrophages were exposed to LPS.

FBP effect on Transcription of COX-2, IL-6 and NF-Kappa B in RAW macrophages

The mechanisms of septic shock and septic vascular dysfunction are complex and multiple. One well-established mechanism is the activation of NF-Kappa B pathway. Pathogens and their products, such as LPS and zymosan activate NF-Kappa B, which cause iNOS expression, leading to an excessive production of NO. NO released subsequently causes vasodilatation, vascular hyporeactivity and hypotension. NF-Kappa B activation mediates the expression of numerous cytokines, which lead to further activation of NF-kappa B, amplifying and perpetuating the inflammatory response (38). Systemic COX-2 is increasingly recognized as an important player in sepsis-induced

inflammation. In fact, COX-2-deficient mice are protected from sepsis-induced inflammation and death (39).

Macrophage activation is followed by a significant increase in COX-2 expression, playing an important role in local and systemic inflammatory responses. In sepsis, IL-6 represents a marker of inflammation, an inducer of altered physiology, or a mediator of organ injury. Circulating levels of IL-6 may serve as a predictive variable for survival sepsis. In the model of macrophage culture that we used, FBP does not inhibit the transcription of COX-2, IL-6 and NF-kappa B, showing that its possible mechanisms of action do not happen by inhibiting the transcription of these inflammatory genes. The results of the effect of FBP on the transcription of IL-6 confirm our results, where the FBP did not decrease plasma levels of IL-6 in *C. albicans* induced sepsis.

Conclusion

The results suggest that the intratracheal administration of *C. albicans* in mice leads to sepsis. The use of FBP seemed to be beneficial in sepsis due to fluconazole susceptible *C. albicans*, but not in *C. albicans* fluconazole resistant sepsis. FBP prevents the drastic fall in the number of platelets and reduces the NO levels in BAL, by inhibiting iNOS. Grouping such results showed that the FBP can be a therapeutic alternative for the future treatment of sepsis.

References

1. Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990–9). *Epidemiol Infect* 2001; 126:397–414.
2. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et al. Nosocomial infections in combined medical–surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21:510–5.
3. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 1999; 29:253–8.
4. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309–17.
5. Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C, et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med* 1997; 23:23–30.
6. Bouza E, Perez-Molina J, Muñoz P. Report of ESGNI01 and ESGNI02 studies. Bloodstream infections in Europe. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5 (Suppl 2):2S1–12.
7. Eloy O, Blanc V, Pina P, et al. Epidemiology of candidemia: results of a one month French hospitals-based surveillance study in 2004. *Pathol Biol* 2006; 54:523–30.
8. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546–54.

9. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1172-7.
10. Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 2: S83-S85.
11. Picazo JJ, Candel FJ, González-Romo F. Update on fungal infections- Introduction. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 2: S79-S81.
12. Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards Jr, JE, et al. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *JID* 2005; 192: 336-43.
13. Marangos PJ, Fox AW, Riedel BJ, et al. Potential therapeutic applications of fructose-1,6-diphosphate. *Expert Opin Investig Drugs* 1998; 7: 615-23.
14. Hardin CD, Roberts TM. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am j Physiol* 2004; 267: H2325-32.
15. Ehringer WD, Niu W, Chiang B, et al. Membrane permeability of fructose-1,6-bisphosphate in lipid vesicles and endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2000; 210:35-45.
16. Xu, K, Stringer JL. Pharmacokinetics of fructose-1,6-diphosphate after intraperitoneal and oral administration to adult rats. *Pharmacol Res* 2008; 57(3):234-8.

17. Yin H, Jin XB, Gong Q, et al. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Int Immunopharmacol.* 2008; 20:1842-7.
18. Lopes RP, Lunardelli A, Preissler T, et al. The effects of fructose-1,6-bisphosphate and dexamethasone on acute inflammation and T-cell proliferation. *Inflamm Res* 2006; 55:354-8.
19. Nunes FB, Alves-Filho JC, Alves Bastos CM, et al. Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. *Pharmacol Res.* 2004; 49:449-53.
20. Alves Filho JC, Santos RC, Castaman TA, et al. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res* 2004; 49: 245-8.
21. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; 47:35-4.
22. Nunes FB, Simões Pires MG, Alves Filho JC, et al. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30:2069-74.
23. Duran J, Obach M, Navarro-Sabate A, et al. Pfkfb3 is transcriptionally up regulated in diabetic mouse liver through proliferative signals. *FEBS J* 2009; 276: 4555-4568.
24. White, TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev* 1998; 11:382–402.

25. Angiolella L, Stringaro AR, De Bernardis F, et al. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 3: 927-936.
26. Fekete-Forgács, K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 2000; 43: 273-279.
27. Lyman CA, Garret KF, Peter J et al. Increased adherence of fluconazole-resistant isolates of *Candida* species to explanted esophageal mucosa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 213-216.
28. Wu T, Wright K, Hurst SF et al. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase, a Virulence Factor, by *Candida albicans* Isolates following Growth in Subinhibitory Concentrations of Fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1200-1208.
29. Oliveira LM, Pires MGS, Magrisso AB, Munhoz TP, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats. *J Thromb Thrombol* 2010; 29: 387–394.
30. Levi M. The coagulant response in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 627-642.
31. Levi M, Jonge E, Van Der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombol* 2003; 16(1-2): 43-47.
32. Maurommatis AC, Theodoridis T; Orfanidou A. et al. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 451-457.

33. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000; 28(6): 1871-1876.
34. Oppenheim-Eden A, Giantz L, Eidelman LA, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage in critically ill patients: incidence over six years and associated factors. *Intens Care Med* 1999; 25(1): 63-67.
35. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 244-251.
36. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, et al. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun* 2005; 5: 2751-2757.
37. Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, et al. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* 1998; 91(1): 258-265.
38. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Ann Rev Immunol* 2009; 27: 693-733.
39. Edde L, Zhou X, Eaton JW et al. Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by Fructose-1,6-diphosphate. *BBRC* 1998; 243: 683-687.

Figures

Figure 1.

Experimental pathogenicity of *C. albicans* susceptible and resistant in a sepsis model. (A, B) Male CF-1 mice were infected via intratracheal with the indicated *C. albicans* strain ($n=10$ mice/group). Survival was determined over the time indicated. For further details, see materials and methods.

Figure 2.

Effect of FBP on hematological findings in experimental Candida sepsis. The results were evaluated by an automated cell counter, expressed in mean \pm SEM ($n=5$ mice/group). * $P<0.05$ indicates significant difference compared to the sepsis group. The left column represents *C. albicans* susceptible to fluconazole-induced sepsis and the right column represents *C. albicans* resistant to fluconazole-induced sepsis.

Figure 3.

Effect of FBP on immunological findings in experimental Candida sepsis. The results were evaluated by Luminex and are expressed in mean \pm SEM ($n=5$ mice/group). * $P<0.05$ indicates significant difference compared to the sepsis group. A (IL-6 levels of *C. albicans* susceptible to fluconazole-induced sepsis); B (IL-6 levels of *C. albicans* resistant to fluconazole-induced sepsis); C (MCP-1 levels of *C. albicans* susceptible to fluconazole-induced sepsis); D (MCP-1 levels of *C. albicans* resistant to fluconazole-induced sepsis).

Figure 4.

A. Effect of FBP on zymosan-induced NO accumulation in BAL through the Griess method using Cobas Mira analyzer. Columns and bars represent mean \pm SEM ($n=5$ mice/group). The sham group received saline solution via trachea. The zymosan group received $500\mu\text{g/Kg}$ of zymosan via intratracheal. The Zymosan + FBP group received FBP (500mg/Kg) 30 minutes before administration of Zymosan ($500\mu\text{g/Kg}$).

B. Effect of FBP on zymosan-stimulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression in RAW 264.7 macrophages. RAW were incubated for 24h with zymosan or LPS in the presence of various concentrations of FBP as indicated. The position of the molecular mass markers is indicated on the right. Data shown are representative of three independent experiments that provided nearly identical results. For further information see material and methods. Ran was used as normalizing protein.

Figure 5.

Effect of FBP on Transcription of inflammatory genes (A) COX-2, (B) IL-6, and (C) NF-Kappa B. RAW macrophages were transfected with plasmids described in materials and methods and stimulated with LPS or Zymosan at indicated concentrations ($\mu\text{g/mL}$) for 24h. The induction fold was determined and the luciferase activity was normalized to the β -galactosidase activity. Values are expressed as means \pm ED of three independent experiments. * $p < 0.05$ indicated significant difference compared to the zymosan group.

Figure 1

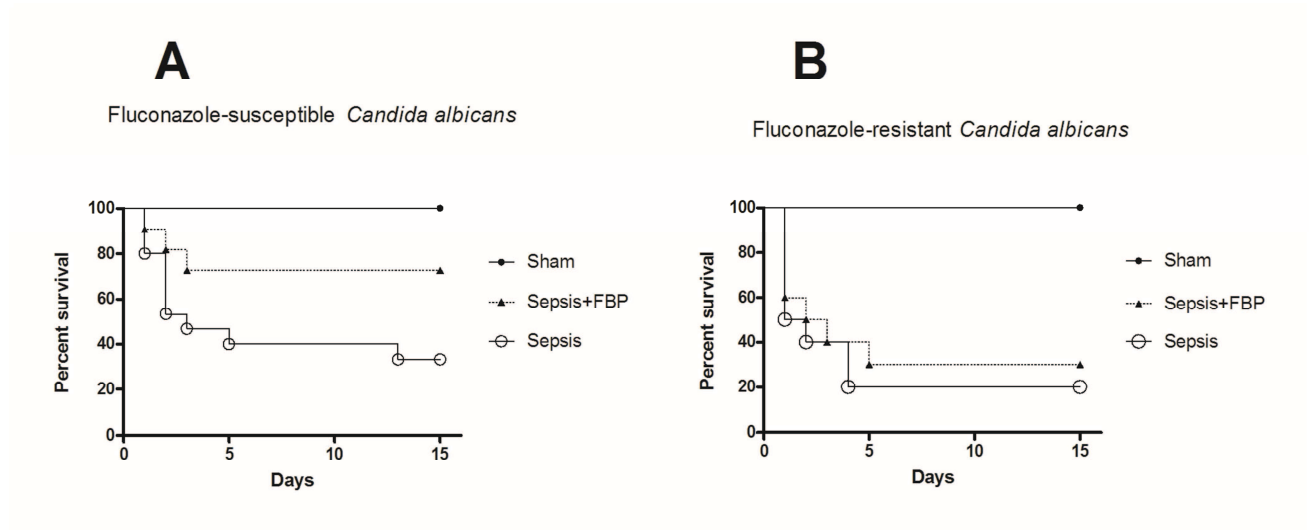
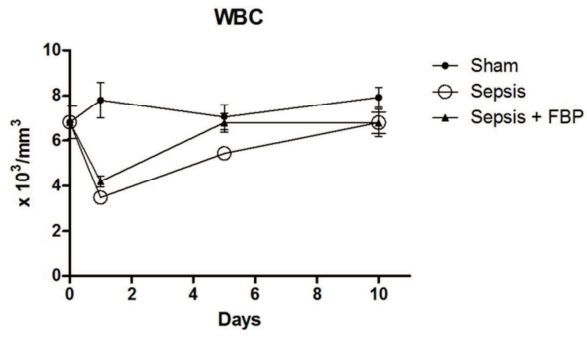
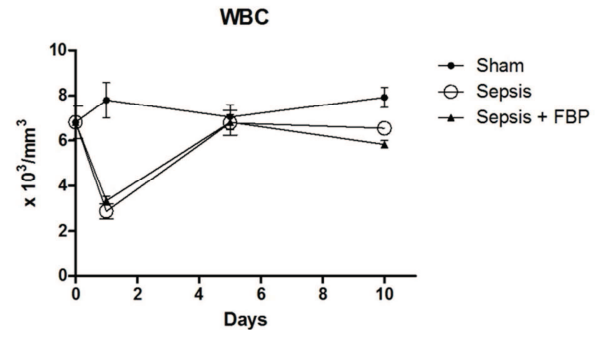


Figure 2

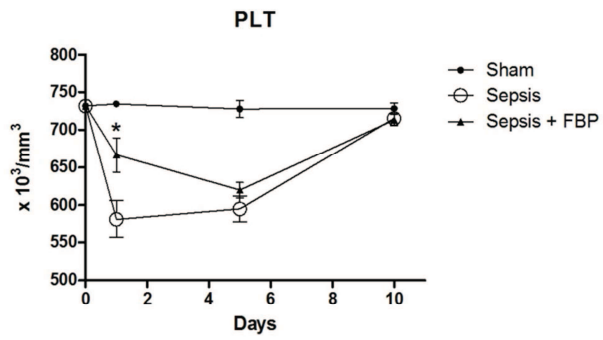
A



B



C



D

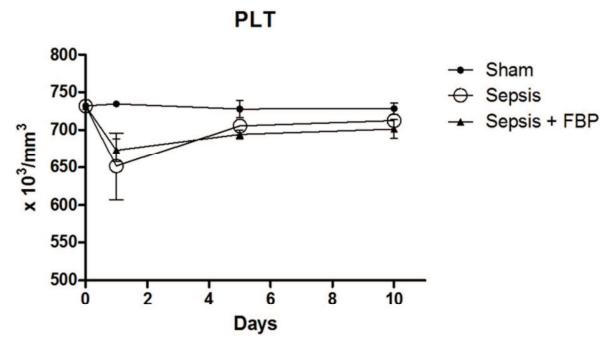


Figure 3

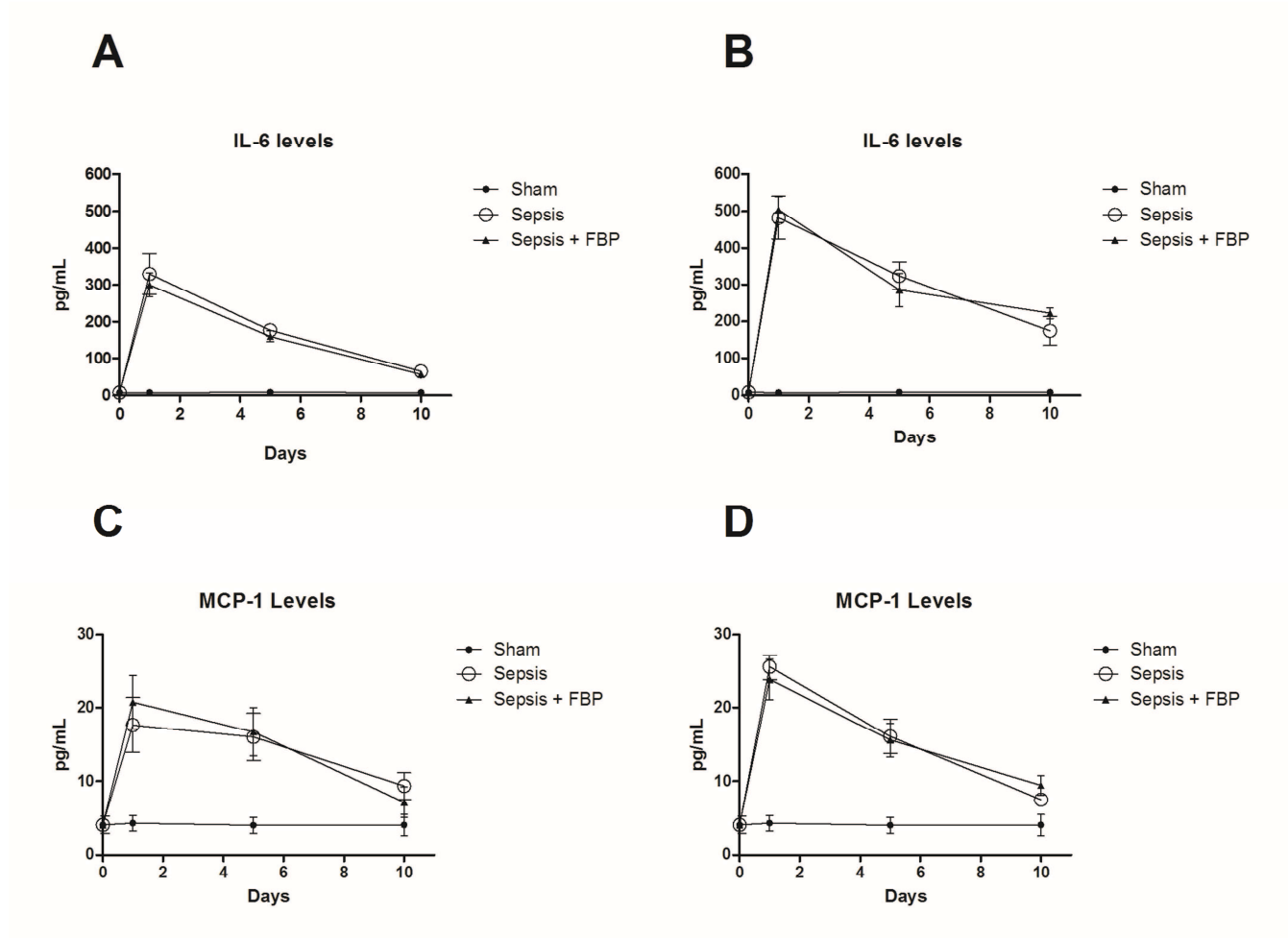


Figure 4

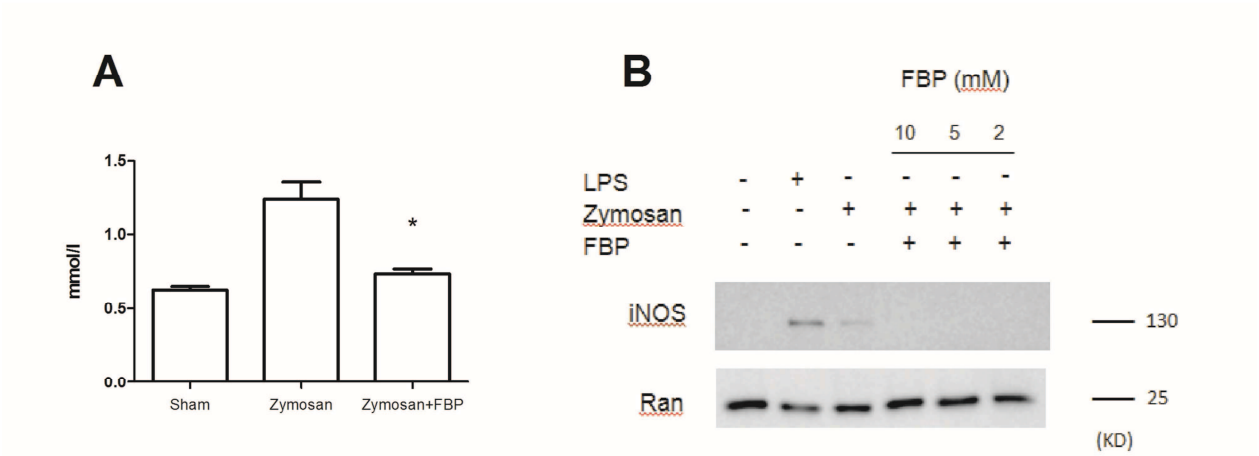
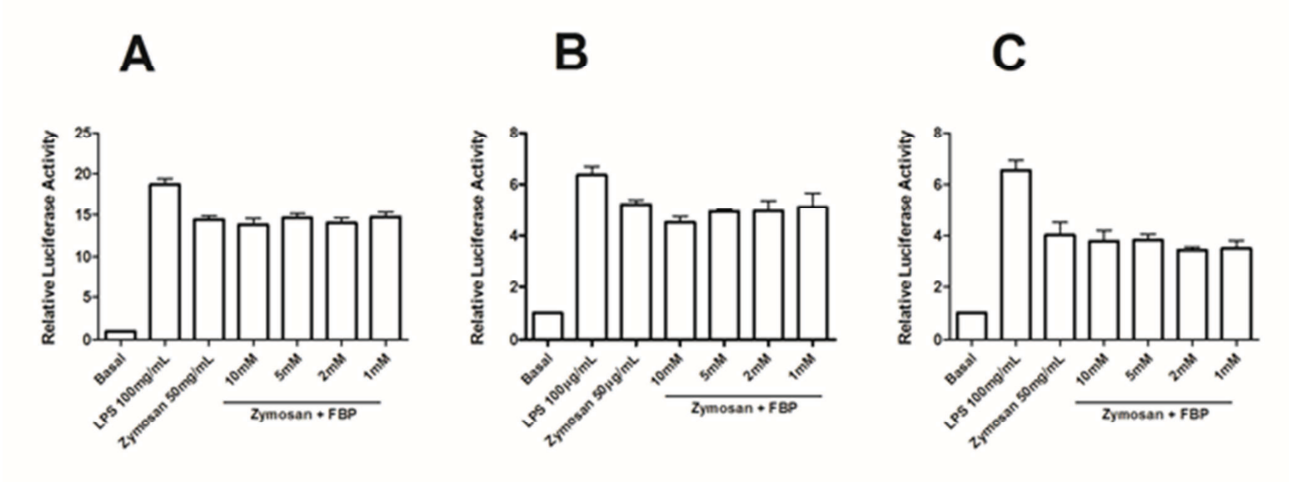


Figure 5



Capítulo III

The transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in zymosan activated Macrophages is dependent on NF-Kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE sites.

Inflammation (2010) *in press*. DOI 10.1007/s10753-010-9275-3

The transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in zymosan activated Macrophages is dependent on NF-Kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE sites.

Roberto Christ Vianna Santos ^{1,2,3}, Miguel Angel Peña Rico ³, Ramon Bartrons ³, Francesc Ventura Pujol ³, Jose Luis Rosa ³ and Jarbas Rodrigues de Oliveira ^{2,3}

1 Laboratório de Microbiologia Clínica, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

E-mail: jarbas@pucrs.br

Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, CEP 90.619-900

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Zymosan is a yeast cell wall particle that activates several cell lines, especially macrophages, resulting in the stimulated secretion of inflammatory products including Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and arachidonic acid. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an immediate early gene induced by several stimuli in macrophages. The following research aimed to investigate the regions of COX-2 promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan. Transient transfections with a series of COX-2 promoter-mutation constructs were performed to further elucidate the effects of zymosan on COX-2 transcription. Exposure to zymosan (50 μ g/mL for 24h) markedly enhanced the relative luciferase activity in RAW 264.7 macrophages (Mouse Leukaemic Monocyte Macrophage Cell Line) transfected with COX-2 luciferase promoter constructs. Deletion on the CCAAT-Enhancer Binding Protein (C/EBP) and Nuclear Factor Kappa B (NF-Kappa B) binding site resulted in an important decrease in reporter gene activity and a deletion of NF-Kappa B and C/EBP with mutation of the Cyclic Adenosine Monophosphate-Response Element (CRE) and/or Activator protein-1 (AP-1) totally abolished the reporter gene activity induced by zymosan. These findings provide further insight into the signal transduction pathways involved in COX-2 gene activated by zymosan in macrophages.

Key Words: Zymosan, COX-2, Luciferase, Macrophages

Introduction

Macrophage activation is followed by a significant increase in COX-2 expression, although Cyclooxygenase-1 (COX-1) level remain relatively unchanged [1]. Therefore, COX-2 is thought to play an important role in local and systemic inflammatory responses. The differential responses in the expression of the genes encoding COX-1 and COX-2 reflect, at least in parts, differences in the regulatory elements in the 5'-flanking regions of these two genes. In the COX-2 gene promoter, the elements for NF-Kappa B (- 223/- 214), nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6, - 132/- 124), and AP-1/CRE (-59/- 53) are important in regulating transcription [2] [3] [4] [5] [6].

The transcription of the COX-2 gene is regulated through NF-Kappa B, a multisubunit transcription factor that rapidly activates the transcription of many inflammatory cytokines, adhesion molecules, and chemokines. It is a central mediator of the immune and inflammatory response. Besides NF-Kappa B, many other transcription factors are involved in the regulation of the inflammatory response [7].

Zymosan is a substance derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is composed by polysaccharide chains of various molecular weights, containing approximately 73% polysaccharides, 15% proteins, and 7% lipids and inorganic components. When injected into animals, it induces inflammation by inducing a wide range of inflammatory mediators. It includes activated components of the complement system, prostaglandins and leukotrienes, platelet aggregation factor, oxygen radicals, and lysosomal enzymes. Also, zymosan directly activates macrophages. Toll-like receptor (TLR) -2 has been shown to be involved in zymosan-induced signaling [8]. After zymosan is phagocytosed, macrophages release lysosomal enzymes, reactive oxygen metabolites, arachidonic acid, and TNF- α [9]. Zymosan is a strong inducer of COX-2 expression in macrophages [10] and since it is not degradable, phagocytosis by macrophages results in a prolonged inflammatory response [11].

This study aimed to investigate the effects of zymosan on COX-2 expression in mouse macrophages. In previous studies, zymosan acted in a way which is similar to lipopolysaccharide (LPS), inducing pro inflammatory cytokines, nitric oxide, and prostaglandins in macrophages [12]. This research showed, for the first time, the regions of COX-2 core promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan.

Materials and methods

Cell culture

Macrophages RAW 264.7 were obtained from the *American Type Culture Collection* (Bethesda, MD) and were maintained sub-confluent in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM l-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. The cells were subcultured twice a week and grown on 6-well plates. Cells were harvested by gentle scraping and were used when confluence reached 70%.

Transfection and Luciferase and β-galactosidase assays

The Mouse COX-2 promoter-luciferase deletion constructs (-511/-474, -474/-255, constructs pCox 474, and pCox 255 respectively; -255/-165 construct pCox165mut and mutant constructs pCox165CREmut and pCox165AP-1CREmut, represent the -150/-143 Cox-2 promoter construct in which the CREB site and AP-1 were mutagenized. Those were generous gifts from Dr. Antonio R. García Susperregui (Unidad de Bioquímica - Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona). Transfections were performed using Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The different promoter-reporters fusion plasmids (1 µg) and 60 ng of the pSV40-β galactosidase control vector (Promega) were co-transfected into the RAW cells using 0.75 µL and 0.25 µL of Lipofectamine LTX and Plus Reagent respectively. Transfected cells were challenged with zymosan or LPS, washed twice with PBS, and scraped into luciferase lysis buffer (Promega). Co-transfection with pSV-β galactosidase plasmid DNA was carried out to normalize transfection efficiencies in different transfectants and expressed relative to the activity of the control group. The luciferase and β-galactosidase activity assay were performed in a luminometer (TD 20/20 – Turner Biosystems).

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the differences between treatment groups. The Newman–Keuls test was used for multi-group comparisons. Statistical significance was accepted for P values <0.05 .

Results

The effects of zymosan on COX-2 activity were assessed in RAW 264.7 macrophages. LPS and zymosan concentration-dependently increased the COX-2 luciferase promoter activity (Figure 1). We determined the optimal concentration (which increases the relative luciferase activity) of LPS. Exposure to 100 μ g/mL of LPS increase 24.6 folds (\pm 1.9) and the exposure to 50 μ g/mL of Zymosan increase 15.1 folds (\pm 2.2). The optimal exposure time was determined in 24h (Figure 1). LPS (100 μ g/mL) was used as a positive control since it also activates COX-2 promoter activity in RAW 264.7 [13]. When macrophages were exposed to LPS for 24h, the transcription of COX-2 was markedly enhanced. When the cells were exposed to zymosan, similar results were observed (Figure 1).

A series of experiments have been conducted in order to identify the regions of COX-2 promoter that mediate the inductive effects of zymosan. Transient transfections with a series of COX-2 promoter-mutation constructs (Figure 2) were performed to further elucidate the effects of Zymosan on COX-2 transcription. Figure 2 shows that mutagenizing the AP-1 and CRE sites abrogated the zymosan-mediated stimulation of COX-2 promoter activity. Zymosan increased the COX-2 promoter (COX 511) and some COX-2 promoter-mutation constructs (COX 474, COX 255, and COX 165) expression in transfected cells in 24hours. In contrast, mutation-constructs (COX 165 AP-1mut, COX 165 CREmut, and COX 165 AP-1/CREmut) decrease the COX-2 transcription.

Discussion

Several signal transduction pathways were simultaneously stimulated by zymosan [14], which suggested crosstalk between receptor systems; these signals appeared to converge at the common Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) pathway. The COX-2 gene promoter contains several sequences that act as positive regulatory elements for COX-2 gene transcription in various cell types [15] and also contains multiple potential *cis-acting* elements. NF-Kappa B, AP-1, NF-IL6, CRE have been reported to be involved in COX-2 expression up to the present time. NF-Kappa B has been shown to be a positive regulator of COX-2 expression in murine macrophages

exposed to LPS [16]. Zymosan is recognized by immune cells through TLR-2 and TLR-6 that trigger the Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88)- mediated NF-Kappa B activation and cytokine production [8].

In our studies, zymosan in a concentration-dependent action increased the COX-2 promoter-luciferase activity in transfected cells (Figure 1A). A stepwise decrease in the basal COX-2 promoter activity was observed when shorter constructs were used (Figure 2). Mutagenizing the AP-1 and CRE sites abrogated the zymosan stimulation of the COX-2 promoter activity. Therefore, the AP-1/CRE binding site in the COX-2 promoter might be critical for zymosan induced COX-2 expression. Similar results were found by Chun and Surh, 2004 [16] when the mutation of the CRE site located in the COX-2 promoter significantly repressed COX-2 reporter induction in murine fibroblast. The CRE site is important during many immunological events, including cytokine signaling as well as thymocyte maturation and T cell activation. CRE also have been shown to regulate the transcription of Major Histocompatibility Complex (MHC) class I and II [17].

The transcriptional factors AP-1 and CRE act as environmental sensors, detecting changes in the extracellular milieu through multiple signaling cascades [14]. Multiple signaling pathways regulate the activities of AP-1 and CRE. The AP-1 is of particular interest due to its wide distribution among the matrix metalloproteinase and cytokine genes. AP-1 is a transcription factor and has been shown to play an important role in promoting carcinogenesis, which is activated in response to a number of stimulants including TNF- α and Interleukin-1 (IL-1) [18] [19]. AP-1 is composed of a heterogeneous set of dimeric proteins, including members from the proto-oncogenes Jun and Fos family (Jun/Fos). While Jun is constitutively expressed but activated by phosphorylation, Fos is activated by regulation of its protein expression [20]. Still, the relative contribution of the various promoter elements to COX-2 transcription in macrophages has not been completely understood.

Expression of AP-1 is under the regulation of the crucial upstream regulatory pathway of MAPKs and several inflammatory stimuli that induce COX-2 gene expression also activate MAPKs and Phosphatidylinositol-3 Kinase/Serine/Threonine Protein Kinase (PI3K/AKT) [21]. MAPKs, including Extracellular-Regulated Kinases (ERK), p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38), and c-JUN N-Terminal Kinase (JNK), are the

primary protein kinases that mediate the post-translational modification of the AP-1 and CRE protein [22].

The AP-1 and CRE elements seem to be required for COX-2 promoter activation in herpes virus-infected monocytes [23], phorbol myristate acetate (PMA)-treated murine calvarial osteoblasts cell line (MC3T3 cells) [24], and fluid shear stress-treated osteoblasts [25]. However, the AP-1 and CRE sites in zymosan-induced COX-2 transcription in RAW 264.7 cells had not previously been studied. Our results concluded that mutation of the AP-1 site causes a decrease in promoter activity similar in magnitude to the one caused by mutation of CRE. Zymosan-induced COX-2 transcription in RAW macrophages is regulated through multiple redundant mechanisms involving several response elements present in the COX-2 promoter.

The transcriptional regulation of COX-2 gene is complex and varies according to the cell type and the stimulus applied. It is well known that COX-2 promoter region contains several *cis-acting* elements that are activated by LPS [6] [13] [24]. Woo and Kwon, 2007 [26] showed that one mutation in NF-Kappa B, CRE or C/EBP significantly reduced LPS-induced promoter activities. C/EBP has been identified in many studies as playing a critical role in COX-2 expression in the transcriptional activation of the COX-2 promoter. C/EBP binds to C/EBP enhancer elements and is important in inducing the expression of COX-2 by TNF- α and endotoxin [13]. Gorgoni et al, 2001 [27] reported that COX-2 induction by LPS was profoundly defective in C/EBP^{-/-} macrophages, essentially due to impaired transcriptional induction via C/EBP promoter element. All these results support our data, where the major transcriptional factors (NF-Kappa B, C/EBP, CRE, and AP-1) are essential in COX-2 gene regulation by LPS.

There were no data on the transcriptional activation of the COX-2 gene in zymosan activated RAW 264.7 macrophages. This study shows at first time the major transcriptional factors involved in the regulation of COX-2 gene. Based on these data, it is possible to affirm that the Zymosan induction of COX-2 gene acts similarly to LPS induction of COX-2 gene. It was demonstrated that the deletion in the NF-Kappa B binding site significantly reduced the reporter gene activity compared with the response using wild type plasmid. Deletion on the C/EBP and NF-Kappa B binding site results in an important decrease in reporter gene activity. Finally, a deletion of NF-Kappa B and C/EBP with mutation of the CRE and/or AP-1 totally abolished the reporter gene activity

induced by zymosan. In summary, the results indicate that Zymosan induction of COX-2 gene is complex and involves multiple transcription factors binding to NF-Kappa B, C/EBP, CRE, and AP-1 element. However further studies are required to elucidate all *cis-acting* elements in cyclooxygenase-2 gene in zymosan activated macrophages.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CAPES/DGU (BEX 4422/09-0) - Brazil, IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge) and Secretaría de Estado de Universidades, Ministerio de Ciencia e Innovación (PHB2008-0080-PC) – Spain.

References

- [1] Radi, Z.A., D.K. Meyerholz, M.R. Ackermann. 2010. Pulmonary cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 cellular expression and distribution after respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infection. *Viral Immunol* 23 (1): 43-8.
- [2] Inoue, H., T. Nanayama, S. Hara, C. Yokoyama, T. Tanabe. 1994. The cyclic AMP response element plays an essential role in the expression of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene in differentiated U937 monocytic cells. *FEBS Lett* 350: 51–54.
- [3] Inoue, H., C. Yokoyama, S. Hara, Y. Tone, T. Tanabe. 1995. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 270: 24965–24971.
- [4] Mestre, J.R., K. Subbaramaiah, P.G. Sacks, S.P. Schantz, T. Tanabe, H. Inoue and A.J. Dannenberg. 1997. Retinoids suppress phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 57 : 1081–1085.
- [5] Subbaramaiah, K., P.A. Cole, A.J. Dannenberg. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and - independent mechanisms. 2002. *Cancer Res* 62: 2522–2530.
- [6] Spooren, A., R. Kooijman, B. Lintermans, K. Van Craenenbroeck, L. Vermeulen, G. Haegeman, S. Gerlo. 2010. Cooperation of NF-kappaB and CREB to induce synergistic IL-6 expression in astrocytes. *Cell Signal* 22(5): 871-81.
- [7] Vallabhapurapu S., M. Karin. 2009. Regulation and Function of NF-kB Transcription Factors in the Immune System. *Ann Rev Immunol* 27: 693-733.

- [8] Dimitrova, P., V. Gyurkovska, I. Shalova, L. Saso, N. Ivanovska. 2009. Inhibition of zymosan-induced kidney dysfunction by tyrphostin AG-490. *J Inflamm* 6: 13.
- [9] Underhill, D.M. 2003. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 9 (3): 176-180.
- [10] Goodridge, H.S., R. M. Simmons, D.M. Underhill. 2007. Dectin-1 Stimulation by *Candida albicans* Yeast or Zymosan Triggers NFAT Activation in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immun* 178: 3107–3115.
- [11] Volman, T.J.H., T. Hendriks, R.J.A. Goris. 2005. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* 23 (4): 291–297.
- [12] Ikeda, Y., Y. Adachi, K. Ishibashi, N. Miura, N. Ohno. 2005. Activation of Toll-Like Receptor-Mediated NF-kappa B by Zymosan-Derived Water-Soluble Fraction: Possible Contribution of Endotoxin-Like Substances. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27(2): 285-298.
- [13] Wadleigh, D.J., S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, H.R. Herschman. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages, *J Biol Chem* 275: 6259–6266.
- [14] Han, E.H., J.H. Park, K.W. Kang, T.C. Jeong, H.S. Kim, H.G. Jeong. 2009. Risk assessment of tetrabromobisphenol A on cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *J Toxicol Environ Health* 72 (21-22):1431-8.
- [15] Smith, W.L., D.L DeWitt, R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-82.

- [16] Chun, K.S., Y.S. Surh. 2004. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68(6):1089-100.
- [17] Gobin, S. J., P. Biesta, J. E. de Steenwinkel, G. Datema, and P. J. van den Elsen. 2002. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J. Biol. Chem.* 277: 39525–39531.
- [18] Hsu, T.C., M.R. Young, J. Cmarik, N.H. Colburn. 2000. Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 28: 1338–1348.
- [19] Angel, P., M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129–157.
- [20] Karin, M., Z. Liu, E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240–246.
- [21] Pommery, N., J.P. Hénichart. 2005. Involvement of PI3K/Akt pathway in prostate cancer-potential strategies for developing targeted therapies. *Mini Rev Med Chem* 5(12):1125-32.
- [22] Glinghammar, B., H. Inoue, J.J. Rafter. 2002. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis* 23(5):839-45.
- [23] Janelle, M. E., A. Gravel, J. Gosselin, M. J. Tremblay, and L. Flamand. 2002. Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene expression by human herpesvirus 6: role for cyclic AMP-responsive element-binding protein and activator protein- 1. *J Biol Chem.* 277: 30665–30674.

- [24] Okada, Y., O. Voznesensky, H. Herschman, J. Harrison, and C. Pilbeam. 2000. Identification of multiple cis-acting elements mediating the induction of prostaglandin G/H synthase-2 by phorbol ester in murine osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.* 78: 197–209.
- [25] Ajubi, N. E., J. Klein-Nulend, M. J. Alblas, E. H. Burger, and P. J. Nijweide. 1999. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 276: E171–E178.
- [26] Woo, K.J., Kwon T.K. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter. 2007. *Int Immunopharmacol.* 7(13): 1776-83.
- [27] Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C., Poli, V. The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the COX-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. 2001. *J Biol Chem.* 276(44): 40769-77

Figures

Figure 1. Effects of LPS or Zymosan in COX-2 promoter Luciferase transfection in RAW macrophages. (A) and (C) Cells were treated with LPS (A) or Zymosan (C) at indicated concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h. The induction fold was determined. (B) and (D) Cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS (B) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Zymosan at indicated times (h). the luciferase activity was normalized to the β -galactosidase activity. Values are expressed as means \pm ED of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the basal group (first column).

Figure 2. LPS and Zymosan increased the activity of the COX-2 promoter through AP-1/CRE box. Macrophages were transfected with plasmids containing distinct mutations. At 12h post-transfections, cells were incubated with LPS (100µg/mL) or LPS (50µg/mL) for 24h and luciferase activity was measured. The luciferase activity was normalized to the the β -galactosidase activity. Values are expressed as means \pm ED of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the basal group (first column).

Figure 1

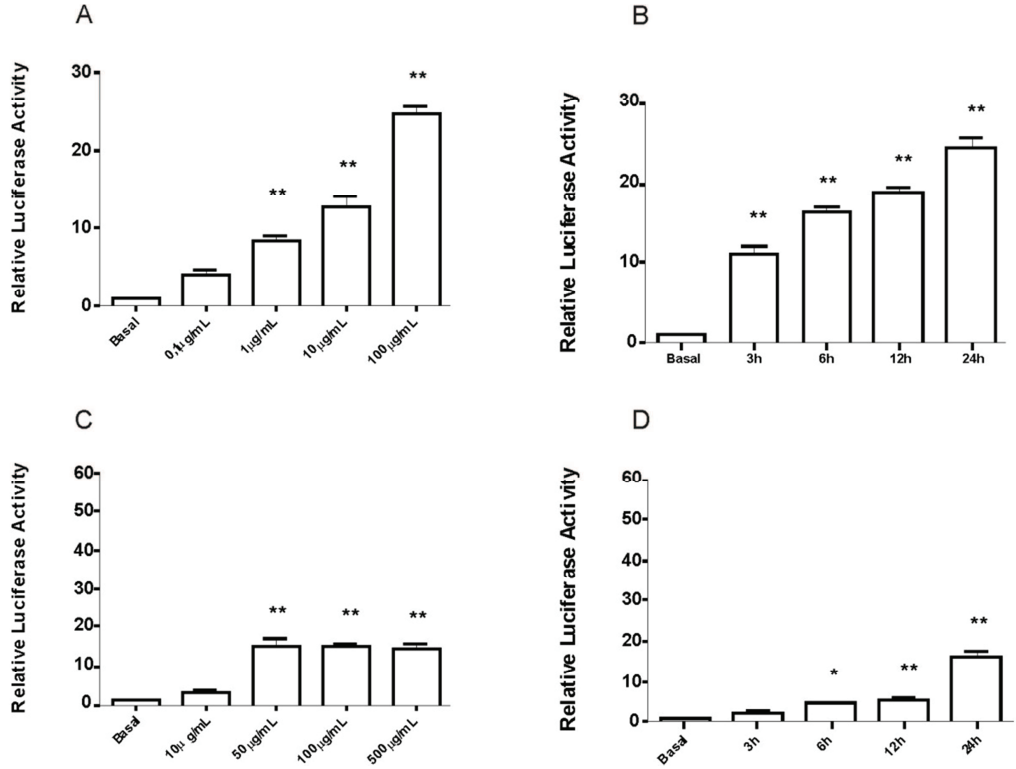
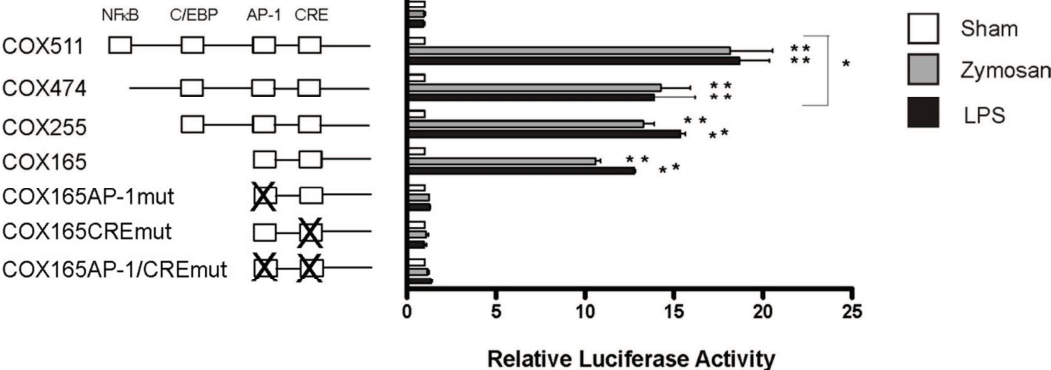


Figure 2



Capítulo IV
Considerações Finais

4.1 Considerações finais

No primeiro estudo (Capítulo I) os experimentos iniciais foram realizados com a finalidade de comparar o papel da FBP na patogênese da sepse induzida por *C. albicans* sensível (Sc-1) e resistente ao fluconazol (R-36). Foram inoculados nos animais através da traqueia 4×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa Sc-1 ou R-36. Os animais foram observados por 15 dias para verificação da morbidade e mortalidade. O grupo séptico apresentou 33,3% de sobrevivência após 15 dias no grupo sensível ao fluconazol e 20% de sobrevivência no grupo resistente ao fluconazol. Em ambos os casos, a sepse foi associada a sinais clínicos da doença como diminuição da temperatura corpórea e letargia. O grupo *sham* apresentou 100% de sobrevivência e a FBP demonstrou um efeito protetor na sepse induzida por *C. albicans* sensível ao Fluconazol, com 72,7% de taxa de sobrevivência. A FBP não foi capaz de proteger os animais quando induzida a sepse por *C. albicans* resistente ao fluconazol.

O fluconazol é o agente antifúngico mais prescrito para a profilaxia e tratamento de candidíase e também para candidemias [57]. Várias estirpes que apresentam um aumento da resistência a esse fármaco também desenvolvem um aumento da expressão de um grande número de fatores de virulência.

Angiolella e colaboradores, 2008 [58] demonstraram que existem relações complexas entre a resistência e virulência. Esse grupo relatou que isolados clínicos que apresentam concentrações inibitórias mínimas (CIM) de fluconazol mais altas, apresentavam também a expressão de uma quantidade maior de fatores de virulência. Quando administradas em animais, essas cepas diminuía a taxa de sobrevivência de animais em modelo de candidemia, quando comparadas com cepas sensíveis. Fekete-Forgács e colaboradores em 2000 [59] mostraram que cepas resistentes ao fluconazol

apresentaram um número maior de fatores de virulência, como habilidade de aderência, produção e secreção de proteinases, e fosfolipases. A taxa de morte induzidas por essas cepas resistentes em modelos animais também foi superior quando comparadas com a indução por cepas sensíveis.

Com o desenvolvimento da resistência ao Azóis não apenas um, mas vários fatores de virulência podem ser expressos simultaneamente, resultando em um aumento da virulência *in vivo*. Vários autores demonstram que a emergência da resistência ao fluconazol traz consigo modificações nos fatores de virulência. Lyman et al, 1999 [60], relatam um aumento na capacidade de aderência de *C. albicans* resistente ao fluconazol na mucosa esofágica. Wu et al, 2000 [61] mostraram um aumento da produção extracelular de Aspartil Proteinase (Sap) de maneira dependente à resistência, onde cepas sensíveis ao fluconazol (MIC, 1,0 mg/ml) produziam uma pequena quantidade de Sap e com o aumento gradual de resistência as estirpes produziam uma quantidade cada vez maior dessa proteinase, aumentando assim a virulência dessas cepas.

Parâmetros hematológicos

O achado hematológico mais significativo desse primeiro estudo foi que a FBP previne o decréscimo do número de plaquetas induzida pela sepse fúngica. Nosso grupo recentemente verificou o papel da FBP nas plaquetas, onde esse açúcar bifosforilado atuou como um importante inibidor da agregação plaquetária [42] [50] [51]. A inibição dessa agregação pode ser muito importante do ponto de vista clínico, pois aumenta a perfusão tecidual, que pode estar significativamente alterada em um quadro

de sepse e choque séptico. As plaquetas desempenham um papel complexo na sepse. Elas modulam a sua própria função e também as funções de células próximas a elas. A ativação plaquetária ocorre na superfície do endotélio em resposta à lesão vascular e acarreta secreção de um grande número de substâncias plaquetárias [51]. Em síndromes inflamatórias sistêmicas, como na resposta à sepse, a ativação plaquetária disseminada pode ocorrer, contribuindo para a falência microvascular favorecendo significativamente a disfunção de órgãos. Nessa situação, as plaquetas podem estar envolvidas diretamente na resposta inflamatória pela liberação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento [62].

A ativação do sistema da coagulação pode levar a quadros hemorrágicos através da diminuição do número de plaquetas e consumo dos fatores de coagulação. Um grande número de pacientes com sepse (50 a 70%) apresentam anormalidades nesse sistema, que vão desde a uma diminuição discreta da contagem de plaquetas e prolongamento subclínico dos tempos de coagulação a processos hemorrágicos intensos em função da coagulação intravascular disseminada (CIVD). Existem evidências importantes de que a CIVD está envolvida na patogênese da disfunção microvascular e conseqüentemente contribui de forma decisiva para a falência de múltiplos órgãos [63].

Alguns estudos sugerem que a contagem das plaquetas é um critério decisivo para avaliação da falência do estado coagulatório no processo séptico. Mavrommatis et al, 2000 [64] relataram que a contagem de plaquetas não se modifica na sepse não complicada, mas na sepse severa e no choque séptico o seu número é significativamente reduzido. Pacientes críticos com contagens menores que $50 \times 10^9/L$ apresentam riscos quatro a cinco vezes mais elevados de hemorragias quando

comparados a pacientes com contagem normal de plaquetas [65]. O risco de sangramento intracerebral em pacientes com sepse durante a admissão na UTI é relativamente baixo (0,3 a 0,5%), mas em 88% dos pacientes com contagens inferiores a $100 \times 10^9/L$ de plaquetas este quadro hemorrágico é visualizado [66].

Parâmetros imunológicos

A candidemia é de difícil diagnóstico e está associada a altos índices de mortalidade. Citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas incluindo IL-6 e MCP-1 apresentam-se como elementos fundamentais na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*, por favorecerem a atividade fagocítica frente aos blastoconídeos e aumentar a atividade anti-*Candida*. A IL-6 é uma citocina multifuncional que atua de maneira decisiva em vários processos fisiológicos incluindo a hematopoiese, proliferação de células B e diferenciação celular, sendo um fator crítico nas respostas de fase aguda à infecções. Essa citocina também apresenta grande valor no prognóstico de pacientes sépticos, onde índices elevados correlacionam-se com altas taxas de mortalidade [67].

O MCP-1 pertence a uma família de citocinas quiotáticas ou quimiocinas, que apresentam como função primária o estímulo à migração de células monocíticas ao foco infeccioso. A síntese e liberação coordenada dessa quimiocina faz com que ela desempenhe um papel fundamental nos processos inflamatórios crônicos e agudos através do controle do influxo e ativação de células fagocíticas [68]. Nossos resultados envolvendo os níveis de IL-6 e MCP-1 na sepse experimental induzida por *C. albicans* corroboram com outros estudos, onde os níveis plasmáticos dessas citocinas foram

maiores nos animais infectados com a estirpe mais virulenta e apresentaram um pico plasmático no primeiro dia após a indução de sepse [67] [68]. Entretanto, a FBP não atua na diminuição dos níveis plasmáticos de IL-6 e MCP-1, mostrando que o seu mecanismo de ação não é através da diminuição dessas citocinas.

Efeito da FBP na transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B em macrófagos

Os mecanismos envolvidos na patofisiologia da sepse, choque séptico e disfunção microvascular são múltiplos e complexos. Um mecanismo bem estabelecido é a ativação da rota do NF-Kappa B. Patógenos e seus produtos como LPS e zymosan ativam o NF-Kappa B que induz a expressão de COX-2, IL-6 e iNOS, levando a uma produção excessiva de NO. O NO liberado subsequentemente causa vasodilatação, hiporreatividade vascular e hipotensão. A ativação de NF-Kappa B media a expressão de várias citocinas, que levam a ativação de NF-kappa B, amplificando e perpetuando assim a resposta inflamatória [69]. A COX-2 sistêmica é reconhecida como um importante agente na inflamação induzida pelo processo séptico. Alguns trabalhos vêm mostrando que a COX-2 pode ser um alvo terapêutico importante na sepse, pois animais deficientes em COX-2 apresentam menor mortalidade após indução do processo séptico [70].

A ativação de macrófagos é seguida por um aumento significativo na expressão de COX-2, atuando de maneira fundamental na resposta inflamatória local e sistêmica. Na sepse, a IL-6 representa um marcador chave do processo inflamatório, um indutor de alterações patofisiológicas e um mediador da falência de órgãos. Índices circulantes de IL-6 podem ser utilizados como uma variável preditiva para a sobrevivência na

sepsis, onde altos índices correlacionam-se com altas taxas de mortalidade. No modelo de cultura de macrófagos que foi utilizada nesse trabalho, a FBP não foi capaz de inibir a transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B, mostrando que seu mecanismo de ação não é inibir a transcrição desses genes pró-inflamatórios. Os resultados da ação da FBP na transcrição de IL-6 confirmam nossos próprios resultados, onde a FBP mostrou não ser capaz de diminuir os níveis plasmáticos de IL-6 na sepsis induzida por *C. albicans*.

Produção de NO e expressão de iNOS

Quando analisada a produção de NO, verificamos que o zymosan estimula esta produção e quando tratamos previamente os animais com FBP, esta produção é inibida significativamente. Verificamos também, através da técnica de Western Blott, que a FBP é capaz de reduzir a expressão de iNOS em macrófagos RAW estimulados com zymosan. Estes dados correlacionam-se com Edde et al, 1998 [70]. Neste estudo, os autores utilizaram culturas de macrófagos alveolares, estimulados com LPS. A FBP de maneira dose-dependente inibiu a produção de NO, através da redução da transcrição de iNOS.

No segundo estudo (Capítulo II) verificou-se que a região promotora do gene da COX-2 contém várias sequências que atuam como elementos regulatórios positivos para a transcrição do gene da COX-2. NF-Kappa B, AP-1 (Proteína 1 ativadora), NF-IL-6 (Fator Nuclear Interleucina-6) e CRE (Elemento de resposta à adenosina monofosfato cíclica) vêm sendo descritos como sítios envolvidos na expressão da COX-2. O NF-Kappa B é um regulador positivo da expressão de COX-2 em macrófagos murinos expostos ao LPS [71] [72] e o zymosan é um agente reconhecido pelas células do sistema imune através do TLR 2 e TLR 6 que subsequentemente ativam o Gene 88 de diferenciação mielóide de resposta primária (MyD88) que induz sinal positivo para a ativação e translocação de NF-Kappa B ao núcleo, culminando na transcrição de genes pró-inflamatórios e a consequente produção de citocinas e quimiocinas [73].

Nesse segundo estudo, o zymosan de uma maneira dose dependente aumentou a taxa de transcrição do gene da COX-2 em macrófagos transfectados. Um decréscimo gradual na atividade da região promotora da COX-2 foi observada quando utilizamos construções plasmidiais de menor tamanho. Mutações nos sítios AP-1 e CRE diminuem a intensidade do estímulo produzido por zymosan, mostrando que esses sítios são críticos para a expressão da COX-2 induzidas por zymosan. Chun e Surth [72] encontraram resultados similares ao analisar fibroblastos murinos estimulados por LPS. O sítio CRE é importante em vários eventos imunológicos, incluindo sinalização de citocinas, maturação e ativação de células T, bem como na transcrição do complexo principal de histocompatibilidade classe I e II (MHC classe I e II) [74].

Os fatores de transcrição AP-1 e CRE atuam como sensores ambientais, detectando mudanças no meio extracelular através de múltiplas sinalizações [71]. AP-1 é um importante fator envolvido na promoção da carcinogênese, sendo ativado em

resposta a um grande número de estímulos como TNF- α e IL-1 (Interleucina-1), sendo composto por proteínas diméricas, que incluem os proto-oncogenes Jun e Fos [75] [76]. AP-1 e CRE são necessários para a ativação de COX-2 em modelo de infecção herpética de monócitos [77], e em osteoblastos tratados com PMA (Éster de Forbol) [78]. Entretanto o papel destes fatores de transcrição não havia sido estudado na transcrição de COX-2 induzida por zymosan. Os resultados desse segundo estudo concluem que a mutação do sítio AP-1 causa um decréscimo significativo na atividade do promotor, de magnitude similar à mutação do sítio CRE.


A regulação transcricional do gene da COX-2 é complexa e varia de acordo com o tipo celular e estímulo aplicado. Atualmente é bem estabelecido que a região promotora da COX-2 contém um grande número de elementos que são ativados por LPS [78] [79]. Woo e Kwon mostraram que uma mutação em NF-Kappa B, CRE ou C/EBP (Proteínas que se ligam a Ccaat) reduz significativamente a atividade do promotor induzida por LPS [80]. C/EBP vem sendo identificado em vários estudos como um fator crítico na expressão de COX-2. Gorgoni e colaboradores em 2001 relataram que a indução da expressão de COX-2 em macrófagos C/EBP^{-/-} é drasticamente diminuída [81]. Todos estes dados, corroboram com nossos resultados, onde os principais fatores de transcrição (NF-Kappa B, C/EBP, CRE e AP-1) são essenciais na regulação da expressão da COX-2 induzida por LPS.

Não existe dados sobre a ativação transcricional da COX-2 induzida por zymosan em macrófagos. Nosso estudo mostrou pela primeira vez os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da COX-2. Baseado nestes dados é possível afirmar que a indução da COX-2 por zymosan atua de maneira similar a indução por LPS. Foi demonstrado que uma deleção do sítio NF-Kappa B, reduz de maneira

significativa a atividade do gene repórter quando comparada à resposta utilizando o plasmídeo *wild-type*. Deleções nos sítios C/EBP e NF-Kappa B resultam em um importante decréscimo na atividade da COX-2. Finalmente a deleção de NF-kappa B e C/EBP com mutações nos sítios CRE e/ou AP-1 praticamente anula a atividade do gene repórter induzida por zymosan. Em resumo, estes resultados indicam que a indução da COX-2 via zymosan é complexa e envolve um grande número de fatores de transcrição. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar todos os elementos transcricionais envolvidos na ativação do gene da COX-2 em macrófagos estimulados por zymosan.

Anexos

Anexo 1. Comprovante de submissão para periódico Critical Care Medicine

Critical Care Medicine  Editorial Manager®

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: [Author](#) Username: rchrist

Submissions Being Processed for Author Roberto Christ Vianna Santos, MSc

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in Candida experimental sepsis and prevents the septic-induced platelet decrease.	Nov 25, 2010	Nov 25, 2010	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Anexo 2. Artigo Publicado no periódico Inflammation (2010).

In press DOI 10.1007/s10753-010-9275-3

Dear Author

Here are the proofs of your article.

- You can submit your corrections **online**, via **e-mail** or by **fax**.
- For **online** submission please insert your corrections in the online correction form. Always indicate the line number to which the correction refers.
- You can also insert your corrections in the proof PDF and **email** the annotated PDF.
- For **fax** submission, please ensure that your corrections are clearly legible. Use a fine black pen and write the correction in the margin, not too close to the edge of the page.
- Remember to note the **journal title**, **article number**, and **your name** when sending your response via e-mail or fax.
- **Check** the metadata sheet to make sure that the header information, especially author names and the corresponding affiliations are correctly shown.
- **Check** the questions that may have arisen during copy editing and insert your answers/corrections.
- **Check** that the text is complete and that all figures, tables and their legends are included. Also check the accuracy of special characters, equations, and electronic supplementary material if applicable. If necessary refer to the *Edited manuscript*.
- The publication of inaccurate data such as dosages and units can have serious consequences. Please take particular care that all such details are correct.
- Please **do not** make changes that involve only matters of style. We have generally introduced forms that follow the journal's style.
- Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case, please contact the Editorial Office and return his/her consent together with the proof.
- If we do not receive your corrections **within 48 hours**, we will send you a reminder.
- Your article will be published **Online First** approximately one week after receipt of your corrected proofs. This is the **official first publication** citable with the DOI. **Further changes are, therefore, not possible.**
- The **printed version** will follow in a forthcoming issue.

Please note

After online publication, subscribers (personal/institutional) to this journal will have access to the complete article via the DOI using the URL:

<http://dx.doi.org/10.1007/s10753-010-9275-3>

If you would like to know when your article has been published online, take advantage of our free alert service. For registration and further information, go to:

<http://www.springerlink.com>.

Due to the electronic nature of the procedure, the manuscript and the original figures will only be returned to you on special request. When you return your corrections, please inform us, if you would like to have these documents returned.

Metadata of the article that will be visualized in OnlineFirst

1	Article Title	The Transcriptional Activation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Zymosan-Activated Macrophages is Dependent on NF-Kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE Sites	
2	Article Sub- Title		
3	Article Copyright - Year	Springer Science+Business Media, LLC 2010 (This will be the copyright line in the final PDF)	
4	Journal Name	Inflammation	
5		Family Name	Oliveira
6		Particle	de
7		Given Name	Jarbas Rodrigues
8		Suffix	
9		Organization	Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
10		Division	
11	Corresponding Author	Address	Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, Porto Alegre 90.619-900, Rio Grande do Sul, Brazil
12		Organization	Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS
13		Division	
14		Address	Santa Maria , Rio Grande do Sul, Brazil
15		Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
16		Division	
17		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
18		e-mail	jarbas@puhrs.br
19		Family Name	Santos
20		Particle	
21		Given Name	Roberto Christ Vianna
22		Suffix	
23		Organization	Laboratório de Microbiologia Clínica, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA
24	Author	Division	
25		Address	Santa Maria , Rio Grande do Sul, Brazil
26		Organization	Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS
27		Division	
28		Address	Santa Maria , Rio Grande do Sul, Brazil

29		Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
30		Division	
31		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
32		e-mail	
33		Family Name	Rico
34		Particle	
35		Given Name	Miguel Angel Peña
36		Suffix	
37	Author	Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
38		Division	
39		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
40		e-mail	
41		Family Name	Bartrons
42		Particle	
43		Given Name	Ramon
44		Suffix	
45	Author	Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
46		Division	
47		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
48		e-mail	
49		Family Name	Pujol
50		Particle	
51		Given Name	Francesc Ventura
52		Suffix	
53	Author	Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
54		Division	
55		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
56		e-mail	
57		Family Name	Rosa
58		Particle	
59		Given Name	Jose Luis
60		Suffix	
61	Author	Organization	Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona
62		Division	
63		Address	Campus de Bellvitge, Barcelona , Spain
64		e-mail	
65		Received	

66		Revised
67	Schedule	Accepted
68	Abstract	<p>Zymosan is a yeast cell wall particle that activates several cell lines, especially macrophages, resulting in the stimulated secretion of inflammatory products including tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and arachidonic acid. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an immediate early gene induced by several stimuli in macrophages. The following research aimed to investigate the regions of COX-2 promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan. Transient transfections with a series of COX-2 promoter-mutation constructs were performed to further elucidate the effects of zymosan on COX-2 transcription. Exposure to zymosan (50 μg/mL for 24 h) markedly enhanced the relative luciferase activity in RAW 264.7 macrophages (mouse leukemic monocyte macrophage cell line) transfected with COX-2 luciferase promoter constructs. Deletion on the CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) binding site resulted in an important decrease in reporter gene activity and a deletion of NF-kappa B and C/EBP with mutation of the cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) and/or activator protein-1 totally abolished the reporter gene activity induced by zymosan. These findings provide further insight into the signal transduction pathways involved in COX-2 gene activated by zymosan in macrophages.</p>
69	Keywords separated by ' - '	zymosan - COX-2 - luciferase - macrophages
70	Foot note information	

Inflammation (© 2010)
DOI: 10.1007/s10753-010-9275-3

The Transcriptional Activation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Zymosan-Activated Macrophages is Dependent on NF-Kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE Sites

Roberto Christ Vianna Santos,^{1,2,3} Miguel Angel Peña Rico,³ Ramon Bartrons,³
Francesc Ventura Pujol,³ Jose Luis Rosa,³ and Jarbas Rodrigues de Oliveira^{2,3,4,5}

Abstract—Zymosan is a yeast cell wall particle that activates several cell lines, especially macrophages, resulting in the stimulated secretion of inflammatory products including tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and arachidonic acid. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an immediate early gene induced by several stimuli in macrophages. The following research aimed to investigate the regions of COX-2 promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan. Transient transfections with a series of COX-2 promoter-mutation constructs were performed to further elucidate the effects of zymosan on COX-2 transcription. Exposure to zymosan (50 μ g/mL for 24 h) markedly enhanced the relative luciferase activity in RAW 264.7 macrophages (mouse leukemic monocyte macrophage cell line) transfected with COX-2 luciferase promoter constructs. Deletion on the CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) binding site resulted in an important decrease in reporter gene activity and a deletion of NF-kappa B and C/EBP with mutation of the cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) and/or activator protein-1 totally abolished the reporter gene activity induced by zymosan. These findings provide further insight into the signal transduction pathways involved in COX-2 gene activated by zymosan in macrophages.

KEY WORDS: zymosan; COX-2; luciferase; macrophages.

INTRODUCTION

Macrophage activation is followed by a significant increase in COX-2 expression, although cyclo-

oxygenase-1 (COX-1) level remains relatively unchanged [1]. Therefore, COX-2 is thought to play an important role in local and systemic inflammatory responses. The differential responses in the expression of the genes encoding COX-1 and COX-2 reflect, at least in parts, differences in the regulatory elements in the 5'-flanking regions of these two genes. In the COX-2 gene promoter, the elements for NF-kappa B (-223/-214), nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6, -132/-124), and AP-1/CRE (-59/-53) are important in regulating transcription [2-6].

The transcription of the COX-2 gene is regulated through NF-kappa B, a multisubunit transcription factor that rapidly activates the transcription of many inflammatory cytokines, adhesion molecules, and chemokines. It is a central mediator of the immune and inflammatory response. Besides NF-kappa B, many other transcription factors are involved in the regulation of the inflammatory response [7].

¹Laboratório de Microbiologia Clínica, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain

⁴Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, 90.619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, 90.619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: jarbas@pucrs.br

Zymosan is a substance derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is composed of polysaccharide chains of various molecular weights, containing approximately 73% polysaccharides, 15% proteins, and 7% lipids and inorganic components. When injected into animals, it induces inflammation by inducing a wide range of inflammatory mediators. It includes activated components of the complement system, prostaglandins and leukotrienes, platelet aggregation factor, oxygen radicals, and lysosomal enzymes. Also, zymosan directly activates macrophages. Toll-like receptor (TLR)-2 has been shown to be involved in zymosan-induced signaling [8]. After zymosan is phagocytosed, macrophages release lysosomal enzymes, reactive oxygen metabolites, arachidonic acid, and TNF- α [9]. Zymosan is a strong inducer of COX-2 expression in macrophages [10] and since it is not degradable, phagocytosis by macrophages results in a prolonged inflammatory response [11].

This study aimed to investigate the effects of zymosan on COX-2 expression in mouse macrophages. In previous studies, zymosan acted in a way which is similar to lipopolysaccharide (LPS), inducing proinflammatory cytokines, nitric oxide, and prostaglandins in macrophages [12]. This research showed, for the first time, the regions of COX-2 core promoter gene that mediate the inductive effects of zymosan.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Macrophages RAW 264.7 were obtained from the *American Type Culture Collection* (Bethesda, MD) and were maintained sub-confluent in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. The cells were subcultured twice a week and grown on 6-well plates. Cells were harvested by gentle scraping and were used when confluence reached 70%.

Transfection and Luciferase and β -Galactosidase Assays

The mouse COX-2 promoter-luciferase deletion constructs (-511/-474, -474/-255, constructs pCox 474, and pCox 255, respectively; -255/-165 construct pCox165mut and mutant constructs pCox165CREmut

and pCox165AP-1CREmut, represent the -150/-143 Cox-2 promoter construct in which the CREB site and AP-1 were mutagenized. Those were generous gifts from Dr. Antonio R. García Susperregui (Unidad de Bioquímica—Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona). Transfections were performed using Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The different promoter-reporters fusion plasmids (1 μ g) and 60 ng of the pSV40- β galactosidase control vector (Promega) were co-transfected into the RAW cells using 0.75 and 0.25 μ L of Lipofectamine LTX and Plus Reagent, respectively. Transfected cells were challenged with zymosan or LPS, washed twice with PBS, and scraped into luciferase lysis buffer (Promega). Co-transfection with pSV- β galactosidase plasmid DNA was carried out to normalize transfection efficiencies in different transfectants and expressed relative to the activity of the control group. The luciferase and β -galactosidase activity assay were performed in a luminometer (TD 20/20—Turner Biosystems).

Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the differences between treatment groups. The Newman-Keuls test was used for multi-group comparisons. Statistical significance was accepted for *P* values < 0.05.

RESULTS

The effects of zymosan on COX-2 activity were assessed in RAW 264.7 macrophages. LPS and zymosan concentration-dependently increased the COX-2 luciferase promoter activity (Fig. 1). We determined the optimal concentration (which increases the relative luciferase activity) of LPS. Exposure to 100 μ g/mL of LPS increase 24.6-fold (\pm 1.9) and the exposure to 50 μ g/mL of zymosan increase 15.1-fold (\pm 2.2). The optimal exposure time was determined in 24 h (Fig. 1). LPS (100 μ g/mL) was used as a positive control since it also activates COX-2 promoter activity in RAW 264.7 [13]. When macrophages were exposed to LPS for 24 h, the transcription of COX-2 was markedly enhanced.

Activation of the COX-2 Gene in Zymosan-Activated Macrophages

Q1

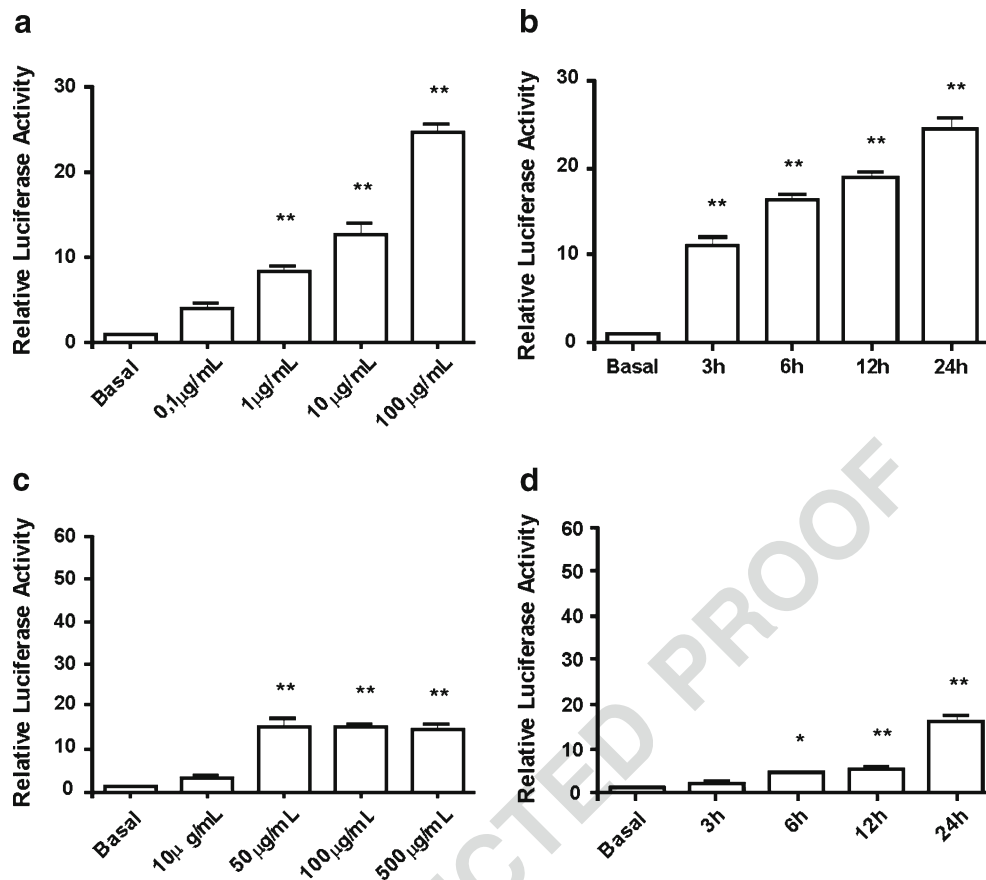


Fig. 1. Effects of LPS or zymosan in COX-2 promoter–luciferase transfection in RAW macrophages. Cells were treated with LPS (a) or zymosan (c) at indicated concentrations (micrograms per milliliter) for 24 h. The induction fold was determined. Cells were treated with 100 μg/mL of LPS (b) or 50 μg/mL of zymosan (d) at indicated times (hours). The luciferase activity was normalized to the β-galactosidase activity. Values are expressed as means±ED of three independent experiments. * p <0.05 and ** p <0.01 compared with the basal group (first column).

Q2

136 When the cells were exposed to zymosan, similar results
137 were observed (Fig. 1).

138 A series of experiments have been conducted in
139 order to identify the regions of COX-2 promoter that
140 mediate the inductive effects of zymosan. Transient
141 transfections with a series of COX-2 promoter–mutation
142 constructs (Fig. 2) were performed to further elucidate
143 the effects of zymosan on COX-2 transcription. Figure 2
144 shows that mutagenizing the AP-1 and CRE sites
145 abrogated the zymosan-mediated stimulation of COX-2
146 promoter activity. Zymosan increased the COX-2 promoter
147 (COX 511) and some COX-2 promoter–mutation
148 constructs (COX 474, COX 255, and COX 165)
149 expression in transfected cells in 24 h. In contrast,
150 mutation constructs (COX 165 AP-1mut, COX 165
151 CREmut, and COX 165 AP-1/CREmut) decrease the
152 COX-2 transcription.

DISCUSSION

153

154 Several signal transduction pathways were simulta-
155 neously stimulated by zymosan [14], which suggested
156 crosstalk between receptor systems; these signals
157 appeared to converge at the common mitogen-activated
158 protein kinases (MAPK) pathway. The COX-2 gene
159 promoter contains several sequences that act as positive
160 regulatory elements for COX-2 gene transcription in
161 various cell types [15] and also contains multiple
162 potential *cis*-acting elements. NF-kappa B, AP-1, NF-
163 IL6, and CRE have been reported to be involved in
164 COX-2 expression up to the present time. NF-kappa B
165 has been shown to be a positive regulator of COX-2
166 expression in murine macrophages exposed to LPS [16].
167 Zymosan is recognized by immune cells through TLR-2
168 and TLR-6 that trigger the myeloid differentiation

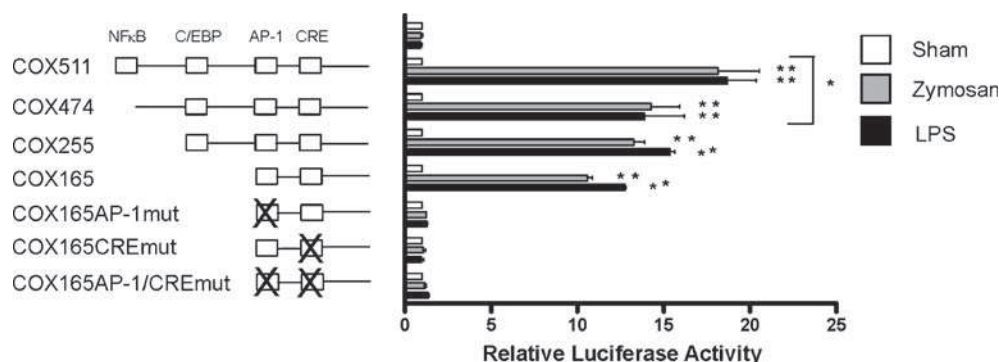


Fig. 2. LPS and zymosan increased the activity of the COX-2 promoter through AP-1/CRE box. Macrophages were transfected with plasmids containing distinct mutations. At 12 h post-transfections, cells were incubated with LPS (100 μ g/mL) or zymosan (50 μ g/mL) for 24 h and luciferase activity was measured. The luciferase activity was normalized to the β -galactosidase activity. Values are expressed as means \pm ED of three independent experiments. * p <0.05 and ** p <0.01 compared with the basal group (first column).

169 primary response gene 88 (MyD88)-mediated NF-kappa
 170 B activation and cytokine production [8].

171 In our studies, zymosan in a concentration-depend-
 172 ent action increased the COX-2 promoter-luciferase
 173 activity in transfected cells (Fig. 1a). A stepwise
 174 decrease in the basal COX-2 promoter activity was
 175 observed when shorter constructs were used (Fig. 2).
 176 Mutagenizing the AP-1 and CRE sites abrogated the
 177 zymosan stimulation of the COX-2 promoter activity.
 178 Therefore, the AP-1/CRE binding site in the COX-2
 179 promoter might be critical for zymosan-induced COX-2
 180 expression. Similar results were found by Chun and
 181 Surh [16] when the mutation of the CRE site located in
 182 the COX-2 promoter significantly repressed COX-2
 183 reporter induction in murine fibroblast. The CRE site is
 184 important during many immunological events, including
 185 cytokine signaling as well as thymocyte maturation and
 186 T cell activation. CRE also have been shown to regulate
 187 the transcription of major histocompatibility complex
 188 (MHC) class I and II [17].

189 The transcriptional factors AP-1 and CRE act as
 190 environmental sensors, detecting changes in the extrac-
 191 ellular milieu through multiple signaling cascades [14].
 192 Multiple signaling pathways regulate the activities of
 193 AP-1 and CRE. The AP-1 is of particular interest due to
 194 its wide distribution among the matrix metalloproteinase
 195 and cytokine genes. AP-1 is a transcription factor and
 196 has been shown to play an important role in promoting
 197 carcinogenesis, which is activated in response to a
 198 number of stimulants including TNF- α and interleukin-
 199 1 [18, 19]. AP-1 is composed of a heterogeneous set of
 200 dimeric proteins, including members from the proto-
 201 oncogenes Jun and Fos family (Jun/Fos). While Jun is
 202 constitutively expressed but activated by phosphoryla-

203 tion, Fos is activated by regulation of its protein
 204 expression [20]. Still, the relative contribution of the
 205 various promoter elements to COX-2 transcription in
 206 macrophages has not been completely understood.

207 Expression of AP-1 is under the regulation of the
 208 crucial upstream regulatory pathway of MAPKs, and
 209 several inflammatory stimuli that induce COX-2 gene
 210 expression also activate MAPKs and phosphatidylinosi-
 211 tol-3 kinase/serine/threonine protein kinase (PI3K/AKT)
 212 [21]. MAPKs, including extracellular-regulated kinases,
 213 p38 mitogen-activated protein kinase (p38), and c-JUN
 214 N-terminal kinase, are the primary protein kinases that
 215 mediate the post-translational modification of the AP-1
 216 and CRE protein [22].

217 The AP-1 and CRE elements seem to be required
 218 for COX-2 promoter activation in herpes virus-infected
 219 monocytes [23], phorbol myristate acetate (PMA)-
 220 treated murine calvarial osteoblasts cell line (MC3T3
 221 cells) [24], and fluid shear stress-treated osteoblasts [25].
 222 However, the AP-1 and CRE sites in zymosan-induced
 223 COX-2 transcription in RAW 264.7 cells had not
 224 previously been studied. Our results concluded that
 225 mutation of the AP-1 site causes a decrease in promoter
 226 activity similar in magnitude to the one caused by
 227 mutation of CRE. Zymosan-induced COX-2 transcrip-
 228 tion in RAW macrophages is regulated through multiple
 229 redundant mechanisms involving several response ele-
 230 ments present in the COX-2 promoter.

231 The transcriptional regulation of COX-2 gene is
 232 complex and varies according to the cell type and the
 233 stimulus applied. It is well known that COX-2 promoter
 234 region contains several *cis*-acting elements that are
 235 activated by LPS [6, 13, 24]. Woo and Kwon [26]
 236 showed that one mutation in NF-kappa B, CRE, or C/

Activation of the COX-2 Gene in Zymosan-Activated Macrophages

237 EBP significantly reduced LPS-induced promoter activ-
 238 ities. C/EBP has been identified in many studies as
 239 playing a critical role in COX-2 expression in the
 240 transcriptional activation of the COX-2 promoter. C/
 241 EBP binds to C/EBP enhancer elements and is important
 242 in inducing the expression of COX-2 by TNF- α and
 243 endotoxin [13]. Gorgoni *et al.* [27] reported that COX-2
 244 induction by LPS was profoundly defective in C/EBP^{-/-}
 245 macrophages, essentially due to impaired transcriptional
 246 induction via C/EBP promoter element. All these results
 247 support our data, where the major transcriptional factors
 248 (NF-kappa B, C/EBP, CRE, and AP-1) are essential in
 249 COX-2 gene regulation by LPS.

250 There were no data on the transcriptional activation
 251 of the COX-2 gene in zymosan-activated RAW 264.7
 252 macrophages. This study shows at first time the major
 253 transcriptional factors involved in the regulation of
 254 COX-2 gene. Based on these data, it is possible to
 255 affirm that the zymosan induction of COX-2 gene acts
 256 similarly to LPS induction of COX-2 gene. It was
 257 demonstrated that the deletion in the NF-kappa B
 258 binding site significantly reduced the reporter gene
 259 activity compared with the response using wild-type
 260 plasmid. Deletion on the C/EBP and NF-kappa B
 261 binding site results in an important decrease in reporter
 262 gene activity. Finally, a deletion of NF-kappa B and C/
 263 EBP with mutation of the CRE and/or AP-1 totally
 264 abolished the reporter gene activity induced by
 265 zymosan. In summary, the results indicate that
 266 zymosan induction of COX-2 gene is complex and
 267 involves multiple transcription factors binding to NF-
 268 kappa B, C/EBP, CRE, and AP-1 element. However,
 269 further studies are required to elucidate all *cis*-acting
 270 elements in cyclooxygenase-2 gene in zymosan-activated
 271 macrophages.

272 **ACKNOWLEDGMENTS**

273 This study was supported by grants from CAPES/
 274 DGU (BEX 4422/09-0)—Brazil, IDIBELL (Institut
 275 d'Investigació Biomèdica de Bellvitge) and Secretaría
 276 de Estado de Universidades, Ministerio de Ciencia e
 277 Innovación (PHB2008-0080-PC)—Spain.

278 **REFERENCES**

279 1. Radi, Z.A., D.K. Meyerholz, and M.R. Ackermann. 2010.
 280 Pulmonary cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 cellular

expression and distribution after respiratory syncytial virus and
 281 parainfluenza virus infection. *Viral Immunol* 23(1): 43–48. 282
 2. Inoue, H., T. Nanayama, S. Hara, C. Yokoyama, and T. Tanabe. 283
 1994. The cyclic AMP response element plays an essential role in
 284 the expression of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2
 285 gene in differentiated U937 monocytic cells. *FEBS Lett* 350: 51–54. 286
 3. Inoue, H., C. Yokoyama, S. Hara, Y. Tone, and T. Tanabe. 1995. 287
 Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide
 288 synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in
 289 vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for
 290 interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol*
 291 *Chem* 270: 24965–24971. 292
 4. Mestre, J.R., K. Subbaramaiah, P.G. Sacks, S.P. Schantz, T. 293
 Tanabe, H. Inoue, and A.J. Dannenberg. 1997. Retinoids suppress
 294 phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Cancer Res*
 295 57: 1081–1085. 296
 5. Subbaramaiah, K., P.A. Cole, and A.J. Dannenberg. 2002. 297
 Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription
 298 by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mech-
 299 anisms. *Cancer Res* 62: 2522–2530. 300
 6. Spooren, A., R. Kooijman, B. Lintermans, K. Van Craenenbroeck, 301
 L. Vermeulen, G. Haegeman, and S. Gerlo. 2010. Cooperation of
 302 NF-kappaB and CREB to induce synergistic IL-6 expression in
 303 astrocytes. *Cell Signal* 22(5): 871–881. 304
 7. Vallabhapurapu, S., and M. Karin. 2009. Regulation and function 305
 of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Ann Rev*
 306 *Immunol* 27: 693–733. 307
 8. Dimitrova, P., V. Gyurkovska, I. Shalova, L. Saso, and N. 308
 Ivanovska. 2009. Inhibition of zymosan-induced kidney dysfunc-
 309 tion by tyrphostin AG-490. *J Inflamm* 6: 13. 310
 9. Underhill, D.M. 2003. Macrophage recognition of zymosan 311
 particles. *J Endotoxin Res* 9(3): 176–180. 312
 10. Goodridge, H.S., R.M. Simmons, and D.M. Underhill. 2007. 313
 Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan
 314 triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J*
 315 *Immunol* 178: 3107–3115. 316
 11. Volman, T.J.H., T. Hendriks, and R.J.A. Goris. 2005. Zymosan- 317
 induced generalized inflammation: experimental studies into
 318 mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome.
 319 *Shock* 23(4): 291–297. 320
 12. Ikeda, Y., Y. Adachi, K. Ishibashi, N. Miura, and N. Ohno. 2005. 321
 Activation of toll-like receptor-mediated NF-kappa B by zymosan-
 322 derived water-soluble fraction: possible contribution of endotoxin-
 323 like substances. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27(2): 285–
 324 298. 325
 13. Wadleigh, D.J., S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, and H.R. 326
 Herschman. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxyge-
 327 nase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol*
 328 *Chem* 275: 6259–6266. 329
 14. Han, E.H., J.H. Park, K.W. Kang, T.C. Jeong, H.S. Kim, and H.G. 330
 Jeong. 2009. Risk assessment of tetrabromobisphenol A on
 331 cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1
 332 signaling pathways in murine macrophages. *J Toxicol Environ*
 333 *Health* 72(21–22): 1431–1438. 334
 15. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. 2000. Cyclo- 335
 oxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev*
 336 *Biochem* 69: 145–182. 337
 16. Chun, K.S., and Y.S. Surh. 2004. Signal transduction pathways 338
 regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular
 339 targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68(6): 1089–
 340 1100. 341
 17. Gobin, S.J., P. Biesta, J.E. de Steenwinkel, G. Datema, and P.J. van 342
 den Elsen. 2002. HLA-G transactivation by cAMP-response
 343 element-binding protein (CREB). An alternative transactivation
 344 pathway to the conserved major histocompatibility complex
 345 (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem* 277: 39525–39531. 346

347 18. Hsu, T.C., M.R. Young, J. Cmarik, and N.H. Colburn. 2000. 366
348 Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa 367
349 B)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic 368*
350 *Biol Med* 28: 1338–1348. 369
351 19. Angel, P., and M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 370
352 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys 371*
353 *Acta* 1072: 129–157. 372
354 20. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and 373
355 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240–246. 374
356 21. Pommery, N., and J.P. Hénichart. 2005. Involvement of PI3K/Akt 375
357 pathway in prostate cancer-potential strategies for developing 376
358 targeted therapies. *Mini Rev Med Chem* 5(12): 1125–1132. 377
359 22. Glinghammar, B., H. Inoue, and J.J. Rafta. 2002. Deoxycholic 378
360 acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent 379
361 induction of caspases, COX-2 promoter activity and the trans- 380
362 cription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis* 23(5): 839–845. 381
363 23. Janelle, M.E., A. Gravel, J. Gosselin, M.J. Tremblay, and L. 382
364 Flamand. 2002. Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene 383
365 expression by human herpes virus 6: role for cyclic AMP- 384
385 responsive element-binding protein and activator protein-1. *J Biol Chem* 277: 30665–30674.

24. Okada, Y., O. Voznesensky, H. Herschman, J. Harrison, and C. Pilbeam. 2000. Identification of multiple *cis*-acting elements mediating the induction of prostaglandin G/H synthase-2 by phorbol ester in murine osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 78: 197–209.

25. Ajubi, N.E., J. Klein-Nulend, M.J. Alblas, E.H. Burger, and P.J. Nijweide. 1999. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E171–E178.

26. Woo, K.J., and T.K. Kwon. 2007. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter. *Int Immunopharmacol* 7(13): 1776–1783.

27. Gorgoni, B., M. Caivano, C. Arizmendi, and V. Poli. 2001. The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the COX-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* 276(44): 40769–40777.

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES.

Q1. Please check the suggested running head.

Q2. Please check if the edits/changes made to the captions of Figs. 1 and 2 are appropriate.

UNCORRECTED PROOF

4.1 Considerações finais

No primeiro estudo (Capítulo I) os experimentos iniciais foram realizados com a finalidade de comparar o papel da FBP na patogênese da sepse induzida por *C. albicans* sensível (Sc-1) e resistente ao fluconazol (R-36). Foram inoculados nos animais através da traqueia 4×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa Sc-1 ou R-36. Os animais foram observados por 15 dias para verificação da morbidade e mortalidade. O grupo séptico apresentou 33,3% de sobrevivência após 15 dias no grupo sensível ao fluconazol e 20% de sobrevivência no grupo resistente ao fluconazol. Em ambos os casos, a sepse foi associada a sinais clínicos da doença como diminuição da temperatura corpórea e letargia. O grupo *sham* apresentou 100% de sobrevivência e a FBP demonstrou um efeito protetor na sepse induzida por *C. albicans* sensível ao Fluconazol, com 72,7% de taxa de sobrevivência. A FBP não foi capaz de proteger os animais quando induzida a sepse por *C. albicans* resistente ao fluconazol.

O fluconazol é o agente antifúngico mais prescrito para a profilaxia e tratamento de candidíase e também para candidemias [57]. Várias estirpes que apresentam um aumento da resistência a esse fármaco também desenvolvem um aumento da expressão de um grande número de fatores de virulência.

Angiolella e colaboradores, 2008 [58] demonstraram que existem relações complexas entre a resistência e virulência. Esse grupo relatou que isolados clínicos que apresentam concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol mais altas, apresentavam também a expressão de uma quantidade maior de fatores de virulência. Quando administradas em animais, essas cepas

diminuíam a taxa de sobrevivência de animais em modelo de candidemia, quando comparadas com cepas sensíveis. Fekete-Forgács e colaboradores em 2000 [59] mostraram que cepas resistentes ao fluconazol apresentaram um número maior de fatores de virulência, como habilidade de aderência, produção e secreção de proteinases, e fosfolipases. A taxa de morte induzidas por essas cepas resistentes em modelos animais também foi superior quando comparadas com a indução por cepas sensíveis.

Com o desenvolvimento da resistência ao Azóis não apenas um, mas vários fatores de virulência podem ser expressos simultaneamente, resultando em um aumento da virulência *in vivo*. Vários autores demonstram que a emergência da resistência ao fluconazol traz consigo modificações nos fatores de virulência. Lyman et al, 1999 [60], relatam um aumento na capacidade de aderência de *C. albicans* resistente ao fluconazol na mucosa esofágica. Wu et al, 2000 [61] mostraram um aumento da produção extracelular de Aspartil Proteinase (Sap) de maneira dependente à resistência, onde cepas sensíveis ao fluconazol (MIC, 1,0 mg/ml) produziam uma pequena quantidade de Sap e com o aumento gradual de resistência as estirpes produziam uma quantidade cada vez maior dessa proteinase, aumentando assim a virulência dessas cepas.

Parâmetros hematológicos

O achado hematológico mais significativo desse primeiro estudo foi que a FBP previne o decréscimo do número de plaquetas induzida pela sepse fúngica. Nosso grupo recentemente verificou o papel da FBP nas plaquetas,

onde esse açúcar bifosforilado atuou como um importante inibidor da agregação plaquetária [42] [50] [51]. A inibição dessa agregação pode ser muito importante do ponto de vista clínico, pois aumenta a perfusão tecidual, que pode estar significativamente alterada em um quadro de sepse e choque séptico. As plaquetas desempenham um papel complexo na sepse. Elas modulam a sua própria função e também as funções de células próximas a elas. A ativação plaquetária ocorre na superfície do endotélio em resposta à lesão vascular e acarreta secreção de um grande número de substâncias plaquetárias [51]. Em síndromes inflamatórias sistêmicas, como na resposta à sepse, a ativação plaquetária disseminada pode ocorrer, contribuindo para a falência microvascular favorecendo significativamente a disfunção de órgãos. Nessa situação, as plaquetas podem estar envolvidas diretamente na resposta inflamatória pela liberação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento [62].

A ativação do sistema da coagulação pode levar a quadros hemorrágicos através da diminuição do número de plaquetas e consumo dos fatores de coagulação. Um grande número de pacientes com sepse (50 a 70%) apresentam anormalidades nesse sistema, que vão desde a uma diminuição discreta da contagem de plaquetas e prolongamento subclínico dos tempos de coagulação a processos hemorrágicos intensos em função da coagulação intravascular disseminada (CIVD). Existem evidências importantes de que a CIVD está envolvida na patogênese da disfunção microvascular e conseqüentemente contribui de forma decisiva para a falência de múltiplos órgãos [63].

Alguns estudos sugerem que a contagem das plaquetas é um critério decisivo para avaliação da falência do estado coagulatório no processo séptico. Mavrommatis et al, 2000 [64] relataram que a contagem de plaquetas não se modifica na sepse não complicada, mas na sepse severa e no choque séptico o seu número é significativamente reduzido. Pacientes críticos com contagens menores que $50 \times 10^9/L$ apresentam riscos quatro a cinco vezes mais elevados de hemorragias quando comparados a pacientes com contagem normal de plaquetas [65]. O risco de sangramento intracerebral em pacientes com sepse durante a admissão na UTI é relativamente baixo (0,3 a 0,5%), mas em 88% dos pacientes com contagens inferiores a $100 \times 10^9/L$ de plaquetas este quadro hemorrágico é visualizado [66].

Parâmetros imunológicos

A candidemia é de difícil diagnóstico e está associada a altos índices de mortalidade. Citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas incluindo IL-6 e MCP-1 apresentam-se como elementos fundamentais na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*, por favorecerem a atividade fagocítica frente aos blastoconídeos e aumentar a atividade anti-*Candida*. A IL-6 é uma citocina multifuncional que atua de maneira decisiva em vários processos fisiológicos incluindo a hematopoiese, proliferação de células B e diferenciação celular, sendo um fator crítico nas respostas de fase aguda à infecções. Essa citocina também apresenta grande valor no prognóstico de pacientes sépticos, onde índices elevados correlacionam-se com altas taxas de mortalidade [67].

O MCP-1 pertence a uma família de citocinas quiotáticas ou quimiocinas, que apresentam como função primária o estímulo à migração de células monocíticas ao foco infeccioso. A síntese e liberação coordenada dessa quimiocina faz com que ela desempenhe um papel fundamental nos processos inflamatórios crônicos e agudos através do controle do influxo e ativação de células fagocíticas [68]. Nossos resultados envolvendo os níveis de IL-6 e MCP-1 na sepse experimental induzida por *C. albicans* corroboram com outros estudos, onde os níveis plasmáticos dessas citocinas foram maiores nos animais infectados com a estirpe mais virulenta e apresentaram um pico plasmático no primeiro dia após a indução de sepse [67] [68]. Entretanto, a FBP não atua na diminuição dos níveis plasmáticos de IL-6 e MCP-1, mostrando que o seu mecanismo de ação não é através da diminuição dessas citocinas.

Efeito da FBP na transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B em macrófagos

Os mecanismos envolvidos na patofisiologia da sepse, choque séptico e disfunção microvascular são múltiplos e complexos. Um mecanismo bem estabelecido é a ativação da rota do NF-Kappa B. Patógenos e seus produtos como LPS e zymosan ativam o NF-Kappa B que induz a expressão de COX-2, IL-6 e iNOS, levando a uma produção excessiva de NO. O NO liberado subsequentemente causa vasodilatação, hiporreatividade vascular e hipotensão. A ativação de NF-Kappa B media a expressão de várias citocinas, que levam a ativação de NF-kappa B, amplificando e perpetuando assim a resposta inflamatória [69]. A COX-2 sistêmica é reconhecida como um

importante agente na inflamação induzida pelo processo séptico. Alguns trabalhos vêm mostrando que a COX-2 pode ser um alvo terapêutico importante na sepse, pois animais deficientes em COX-2 apresentam menor mortalidade após indução do processo séptico [70].

A ativação de macrófagos é seguida por um aumento significativo na expressão de COX-2, atuando de maneira fundamental na resposta inflamatória local e sistêmica. Na sepse, a IL-6 representa um marcador chave do processo inflamatório, um indutor de alterações patofisiológicas e um mediador da falência de órgãos. Índices circulantes de IL-6 podem ser utilizados como uma variável preditiva para a sobrevivência na sepse, onde altos índices correlacionam-se com altas taxas de mortalidade. No modelo de cultura de macrófagos que foi utilizada nesse trabalho, a FBP não foi capaz de inibir a transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B, mostrando que seu mecanismo de ação não é inibir a transcrição desses genes pró-inflamatórios. Os resultados da ação da FBP na transcrição de IL-6 confirmam nossos próprios resultados, onde a FBP mostrou não ser capaz de diminuir os níveis plasmáticos de IL-6 na sepse induzida por *C. albicans*.

Produção de NOx e expressão de iNOS

Quando analisada a produção de NOx, verificamos que o zymosan estimula esta produção e quando tratamos previamente os animais com FBP, esta produção é inibida significativamente. Verificamos também, através da técnica de Western Blott, que a FBP é capaz de reduzir a expressão de iNOS em macrófagos RAW estimulados com zymosan. Estes dados correlacionam-

se com Edde et al, 1998 [70]. Neste estudo, os autores utilizaram culturas de macrófagos alveolares, estimulados com LPS. A FBP de maneira dose-dependente inibiu a a produção de NO, através da redução da transcrição de iNOS.

No segundo estudo (Capítulo II) verificou-se que várias rotas de transdução de sinais são simultaneamente estimuladas por zymosan, sugerindo um *crosstalk* entre os sistemas receptores, onde esses sinais acabam convergindo para a rota das MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) [71]. A região promotora do gene da COX-2 contém várias sequências que atuam como elementos regulatórios positivos para a transcrição do gene da COX-2 em vários tipos celulares. NF-Kappa B, AP-1 (Proteína 1 ativadora), NF-IL-6 (Fator Nuclear Interleucina-6) e CRE (Elemento de resposta à adenosina monofosfato cíclica) vêm sendo descritos como sítios envolvidos na expressão da COX-2. O NF-Kappa B é um regulador positivo da expressão de COX-2 em macrófagos murinos expostos ao LPS [72] e o zymosan é um agente reconhecido pelas células do sistema imune através do TLR 2 e TLR 6 que subsequentemente ativam o Gene 88 de diferenciação mielóide de resposta primária (MyD88) que induz sinal positivo para a ativação e translocação de NF-Kappa B ao núcleo, culminando na transcrição de genes pró-inflamatórios e a consequente produção de citocinas e quimiocinas [73].

Nesse segundo estudo, o zymosan de uma maneira dose dependente aumentou a taxa de transcrição do gene da COX-2 em macrófagos transfectados. Um decréscimo gradual na atividade da região promotora da COX-2 foi observada quando utilizamos construções plasmidiais de menor tamanho. Mutações nos sítios AP-1 e CRE diminuem a intensidade do estímulo produzido por zymosan, mostrando que esses sítios são críticos para a expressão da COX-2 induzidas por zymosan. Chun e Surth [72] encontraram resultados similares ao analisar fibroblastos murinos estimulados por LPS. O sítio CRE é importante em vários eventos imunológicos, incluindo sinalização

de citocinas, maturação e ativação de células T, bem como na transcrição do complexo principal de histocompatibilidade classe I e II (MHC classe I e II) [74].

Os fatores de transcrição AP-1 e CRE atuam como sensores ambientais, detectando mudanças no meio extracelular através de múltiplas sinalizações [71]. AP-1 é um importante fator envolvido na promoção da carcinogênese, sendo ativado em resposta a um grande número de estímulos como TNF- α e IL-1 (Interleucina-1), sendo composto por proteínas diméricas, que incluem os proto-oncogenes Jun e Fos [75] [76]. AP-1 e CRE são necessários para a ativação de COX-2 em modelo de infecção herpética de monócitos [77], e em osteoblastos tratados com PMA (Éster de Forbol) [78]. Entretanto o papel destes fatores de transcrição não havia sido estudado na transcrição de COX-2 induzida por zymosan. Os resultados desse segundo estudo concluem que a mutação do sítio AP-1 causa um decréscimo significativo na atividade do promotor, de magnitude similar à mutação do sítio CRE.

A regulação transcricional do gene da COX-2 é complexa e varia de acordo com o tipo celular e estímulo aplicado. Atualmente é bem estabelecido que a região promotora da COX-2 contém um grande número de elementos que são ativados por LPS [78] [79]. Woo e Kwon mostraram que uma mutação em NF-Kappa B, CRE ou C/EBP (Proteínas que se ligam a Ccaat) reduz significativamente a atividade do promotor induzida por LPS [80]. C/EBP vem sendo identificado em vários estudos como um fator crítico na expressão de COX-2. Gorgoni e colaboradores em 2001 relataram que a indução da expressão de COX-2 em macrófagos C/EBP^{-/-} é drasticamente diminuída [81]. Todos estes dados, corroboram com nossos resultados, onde os principais

fatores de transcrição (NF-Kappa B, C/EBP, CRE e AP-1) são essenciais na regulação da expressão da COX-2 induzida por LPS.

Não existe dados sobre a ativação transcricional da COX-2 induzida por zymosan em macrófagos. Nosso estudo mostrou pela primeira vez os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da COX-2. Baseado nestes dados é possível afirmar que a indução da COX-2 por zymosan atua de maneira similar a indução por LPS. Foi demonstrado que uma deleção do sítio NF-Kappa B, reduz de maneira significativa a atividade do gene repórter quando comparada à resposta utilizando o plasmídeo *wild-type*. Deleções nos sítios C/EBP e NF-Kappa B resultam em um importante decréscimo na atividade da COX-2. Finalmente a deleção de NF-kappa B e C/EBP com mutações nos sítios CRE e/ou AP-1 praticamente anula a atividade do gene repórter induzida por zymosan. Em resumo, estes resultados indicam que a indução da COX-2 via zymosan é complexa e envolve um grande número de fatores de transcrição. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar todos os elementos transcricionais envolvidos na ativação do gene da COX-2 em macrófagos estimulados por zymosan.

Referências:

1. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e954-e966.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss RF. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-54.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39(3):309-17.
4. Cheng YR, Lin LC, Young TG, Liu CE, Chen CH, Tsay RW. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical center in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(2):155-61.
5. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006;44:2816-23.
6. Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, Monfardini LPA, Cunha AK, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:570-6.
7. Camargo TZS, Marra AR, Silva CV, Cardoso MFS, Martino MDV, Camargo LFA, et al. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 2010; 38:546-51.

8. Vandijck D, Blot S, Labeau S, Buyle F, Depaemelaere M, Vandewoude K, et al. Candidemia in critically ill patient: An analysis of daily antifungal therapy related costs. *J Mycol Méd* 2008; 18: 96-99.
9. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Inflammatory response and clinical course of adult patients with nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(2):170-7.
10. Carmen Flórez C, Martín-Mazuelos E, Ruiz M, Cisneros JM, Herrero M, García MV, et al. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* spp.: results from a multicenter active surveillance program in Andalusia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27(9):518-22.
11. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(4):317-22.
12. Rocco TR, Simms HH. Inadequate proof of adverse outcome due to the use of fluconazole in critically ill patients. *Arch Surg* 2000;135(9):1114.
13. Gómez J, Elisa García-Vázquez E, Espinosa C, Ruiz J, Canteras M, Hernández-Torres A, et al. Nosocomial candidemia at a general hospital: prognostic factors and impact of early empiric treatment on outcome(2002–2005). *Med Clin (Barc)* 2010;134(1):1–5.
14. Fairchild KD, O'Shea M. Heart Rate Characteristics: Physiomarkers for Detection of Late-Onset Neonatal Sepsis. *Clin Perinat* 2010; 37(3): 581-598.
15. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2)-

- dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15(1):42-9.
16. Gurnani PK, Patel GP, Crank CW, Vais D, Lateef O, Akimov S, et al. Impact of the implementation of a sepsis protocol for the management of fluid-refractory septic shock: A single-center, before-and-after study. *Clin Ther* 2010; 32(7):1285-1293.
 17. Moerer O, Burchardi H. The costs of sepsis. *Anaesthesist* 2006; 55, suppl 1: 36-42.
 18. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348: 138-150.
 19. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998; 26: 2078-2086.
 20. Endo K, Kinouchi Y, Kakuta Y, Ueki N, Takahashi S, Shimosegawa T. Involvement of NF-kappa B pathway in TL1A gene expression induced by lipopolysaccharide. *Cytokine* 2010; 49(2): 215-220.
 21. Díaz-Muñoz MD, Osma-García IC, Cacheiro-Llaguno C, Fresno M, Íñiguez MA. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell Sign* 2010; 22(10):1427-1436.
 22. Boveris A, Alvares S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1186-1193.
 23. Ritter C, Andrade ME, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Superoxide production during sepsis development. *Am J Resp Crit Care Med* 2003;167:474-475.

24. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R491-R497.
25. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35 (9 suppl): S441-S448.
26. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2524-2531.
27. Kubiak BD, Albert SP, Gatto LA, Snyder KP, Maier KG, Vieau CJ, et al. Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. *Shock* 2010; 34(5):525-34.
28. Vincent JL, Martinez EO, Silva E. Evolving concepts in sepsis definition. *Crit Care Clin* 2009; 25(4):665-675.
29. Riedmann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003;112:460-67.
30. Santana C, Guindeo MC, Gonzales G, Muñoz G, Saavedra P, Domenhech E. Cord Blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2001; 90:1176-81.
31. Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage. *Mediators Inflamm* 2010; 642462.
32. Pino-Yanes M, Corrales A, Casula M, Blanco J, Muriela A, Espinosa E, et al. Common variants of TLR1 associate with organ dysfunction and sustained pro-inflammatory response during sepsis. *PLoS One* 2010; 5(10): 13759.

33. Krakauer T, Buckley MJ, Fisher D. Pro-inflammatory mediators of toxic shock and their correlation to lethality. *Mediators of Inflamm* 2010; 517594.
34. Gullo A, Foti A, Murabito P, Livolti G, Astuto M, Stissi C, et al. Spectrum of sepsis, mediators, source control and management of bundles. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2:906-11.
35. Labbe K, Danialou G, Guozdic D, Demoule A, Divangahi M, Boyd JH, et al. Inhibition of monocyte chemo attractant protein-1 prevents diaphragmatic inflammation and maintains contractile function during endotoxemia. *Crit Care* 2010; 14(5): R187.
36. Sampaio P, Santos M, Correia A, Amaral FE, Chavéz-Galarza J, Costa-de-Oliveira, et al. Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with a recurrent bloodstream infection, *PLoS One* 2010; 5(4): e10155.
37. Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Ozturk E, Yavuv O. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther* 2007; 24(1):91-100.
38. MacCallum DM, Castillo L, Brown AJP, Gown AR, Odds FC. Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infection. *PLoS One* 2010; 4(7):e6420.
39. Bone RC, Grodzin CJ, Balk A. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112: 235-243.
40. Schlichting D, McCollam JS. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat. *South Med J* 2007; 100(6):594-600.
41. Matthay MA. Severe sepsis: A new treatment with both anticoagulant and anti-inflammatory properties. *N Engl J Med* 2001; 344(10):759-762.

42. Nunes FB., Graziottin CM., Alves-Filho JCF, Lunardelli A, Pires MGS, Wächter PH, et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; 47(1):35-41.
43. Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, Alves-Filho JCF, Nunes FB, Oliveira JR. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2003; 25(1):83-91.
44. Planas ME, Sanchez S, Gonzalez P, Rodrigues de Oliveira J, Bartrons R. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. *Eur J Pharmacol* 1993; 237(2-3):251-55.
45. Alves Filho JC, Santos RC, Castaman TA, de Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res* 2004; 49(3):245-8.
46. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int Immunopharmacology* 2003; 3: 267-272.
47. Nunes FB, Gaspareto PB, Santos RCV, Assis M, Graziottin CM, Biolchi V, et al. Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicol Lett* 2003; 143(1):73-81.
48. De Mello RO, Lunardelli A, Caberlon E, de Moraes CB, Santos RCV, da Costa VL, et al. Effect of N-Acetylcysteine and Fructose-1,6-Bisphosphate in the treatment of experimental sepsis. *Inflamm* 2010.

49. Roig T, Oliveira JR, Bartrons R, Bermúdez AJ. Fructose-1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; 266(35):C1722-C1728.
50. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCF, Wächter PH, Rodrigues de Oliveira J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30: 2069-74.
51. Oliveira LM, Pires MGS, Magrisso AB, Munhoz TP, Roesler R, de Oliveira JR. Fructose-1,6-bisphosphate inhibits in vitro and x vivo platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 29:387-394.
52. Funk CD. Prostaglandin and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-1875.
53. Ejima K, Layne MD, Carvajal IM, Kritek PA, Baron RM, Chen Y, et al. Cyclooxygenase-2 deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J*;17(10):1325-27.
54. Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 2003;9(3):176-80.
55. Radi, ZA, Meyerholz DK, Ackermann MR. Pulmonary cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 cellular expression and distribution after respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infection. *Viral Immunol* 2010; 23(1): 43–48.
56. Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, et al. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem* 2006; 281(9):5506-14.

57. White, TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev* 1998; 11:382–402.
58. Angiolella L, Stringaro AR, De Bernardis F, Posteraro B, Bonito M, Toccaceli L, et al. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 3: 927-936.
59. Fekete-Forgács, K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 2000; 43: 273-279.
60. Lyman CA, Garret KF, Peter J, Gonzalez C, Walsh TJ. Increased adherence of fluconazole-resistant isolates of *Candida* species to explanted esophageal mucosa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 213-216.
61. Wu T, Wright K, Hurst SF, Morrison CJ. Enhanced extracellular production of Aspartyl Proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1200-1208.
62. Levi M. The coagulant response in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 627-642.
63. Levi M, Jonge E, Van Der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombol* 2003; 16(1-2): 43-47.
64. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakyntinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28(2): 451-457.

65. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000; 28(6): 1871-1876.
66. Oppenheim-Eden A, Giantz L, Eidelman LA, Sprung CL. Spontaneous intracerebral hemorrhage in critically ill patients: incidence over six years and associated factors. *Intens Care Med* 1999; 25(1): 63-67.
67. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun* 2005; 5: 2751-2757.
68. Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota A, Polentarutti N. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* 1998; 91(1): 258-265.
69. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Ann Rev Immunol* 2009; 27: 693-733.
70. Edde L, Zhou X, Eaton JW, Sherman MP. Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by Fructose-1,6-diphosphate. *BBRC* 1998; 243: 683-687.
71. Han EH, Park JH, Kang KW, Jeong TC, Kim HS, and Jeong HG. Risk assessment of tetrabromobisphenol A on cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *J Toxicol Environ Health* 2009; 72(21-22): 1431-1438.
72. Chun, KS, Surh YS. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1089-340.

73. Dimitrova, P, Gyurkovska V, Shalova I, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of zymosan-induced kidney dysfunction by tyrphostin AG-490. *J Inflamm* 2009; 6: 13.
74. Gobin, SJ, Biesta P, de Steenwinkel JE, Datema G, van den Elsen PJ. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem* 2002; 277:39525–39531.
75. Hsu, TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) -dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1338–1348.
76. Angel, P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1072: 129–157.
77. Janelle, ME, Gravel A, Gosselin J, Tremblay MJ, Flamand L. Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene expression by human herpes virus 6: role for cyclic AMP responsive element-binding protein and activator protein-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 30665–30674.
78. Okada, Y, Voznesensky O, Herschman H, Harrison J, Pilbeam C. Identification of multiple cis-acting elements mediating the induction of prostaglandin G/H synthase-2 by phorbol ester in murine osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2000; 78: 197–209.
79. Wadleigh, DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR.. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 6259–6266.

80. Woo, KJ, Kwon TK. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(13): 1776–1783.
81. Gorgoni, B, Caivano M, Arizmendi C, Poli V. The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the COX-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276(44): 40769–40777.