UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

JEFFERSON ELIAS OLIVEIRA

CD14 e TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e mortalidade induzidas por
Achromobacter xylosoxidans

RIBEIRÃO PRETO - SP
2019

JEFFERSON ELIAS OLIVEIRA

CD14 e TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e mortalidade induzidas por
Achromobacter xylosoxidans

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena Faccioli

RIBEIRÃO PRETO - SP
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Jefferson Elias

CD14 e TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e mortalidade induzidas por *Achromobacter xylosoxidans*. Ribeirão Preto, 2019.

101 p.: il.; 40 cm.

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. *Achromobacter xylosoxidans*. 2. CD14. 3. TLR4. 4. Receptores da imunidade inata. 5. IL-6.

Nome: OLIVEIRA, Jefferson Elias

Título: CD14 e TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e mortalidade induzidas por *Achromobacter xylosoxidans*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP), Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP). Essa dissertação recebeu apoio financeiro das seguintes agências de fomento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2014/07125-6 e Equipamentos multiusuários (EMU) FAPESP – 2015/00658-1;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FAEPA-HCFMRP/USP);

Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Luiza Elias Oliveira; e a meus avós, Marieta Rosa de Oliveira Cardoso e José Elias Cardoso. Vocês são meus exemplos de vida! Cada um, à sua maneira, me ensinou o que é amor, honestidade, respeito e gratidão. Vocês muitas vezes se sacrificaram por mim, foram e são meus maiores incentivadores a estudar, desde que me entendo por gente. Tudo que sou hoje devo a vocês.

Agradecimentos

À Deus por me conceber inúmeras bênçãos durante toda minha vida e por colocar ao meu redor pessoas incríveis.

À minha mãe Luiza Elias Oliveira por todo sacrifício feito por mim. Passamos por alguns momentos pouco favoráveis, mas a senhora sempre dava um jeito de resolver tudo e me dar o melhor. Não consigo expressar em palavras o amor e gratidão que sinto pela senhora. Posso dizer com certeza que tenho a melhor mãe do mundo!

Aos meus avós, Marieta Rosa de Oliveira Cardoso e José Elias Cardoso, por toda ajuda prestada desde que nasci. Os senhores sempre estiveram muito próximos a mim, e agradeço por esse privilégio. Ver o trabalho, a dedicação e o compromisso com a família de vocês com certeza me ensinaram muitos valores. Um obrigado especial também a meus familiares que sempre estiveram dispostos a me ajudar! Serei eternamente grato!

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli, minha orientadora. Sua trajetória, sua determinação, seu comprometimento, sua ética profissional e sua forma de fazer Ciência são para mim exemplos. A senhora é uma pesquisadora que me inspira, e para mim será sempre um grande orgulho dizer que fui seu aluno. Obrigado pelos ensinamentos diários e por acreditar em mim!

À Dr^a. Morgana Kelly Borges Prado, que estive do meu lado durante meus primeiros passos durante o mestrado. Com você aprendi desde preparo de anestésico até PCR, serei sempre grato pelos ensinamentos teóricos e práticos, e por me transmitir o amor pela Achromo! Seu caráter, seu otimismo e sua ética me inspiram muito! Você foi um presente na minha vida! Obrigado por tudo!

À Camila de Oliveira Silva e Souza por todas as parcerias que fizemos! Sua ajuda foi muito importante e com você aprendi muito! Sua habilidade e postura na bancada são inspiradoras. Obrigado pela amizade, pela ajuda com as citometrias, pelas conversas e todos os bons momentos que passamos!

À Polyane Lima, Marcella Roverato e Luana Macedo pela amizade sincera e por me ajudarem nos experimentos! Minhas fiéis colaboradoras que sempre me acompanham em dias de experimento longo. Com vocês tudo fica mais leve! Serei eternamente grato!

Aos meus amigos do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses), Morgana Prado, Poly, Alyne Fávero, Camila de Oliveira, Luiz G. Gardinassi, Carol Fontanari, Mouzarlem, Ana Paula Peti, Tanize, Luana Macedo, Marcella Nicolini, Marcella Roverato, Grazielle Gaia, Amanda, Edson e Carlos. Obrigado pelos bons momentos vividos e ensinamentos compartilhados!

Aos meus amigos do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz, Ricardo Castro, Fabiana Zambuzi, Patrick Fernandes, Felipe Lima e Cícero Almeida. A convivência com vocês foi incrível, obrigado pela amizade e momentos de descontração.

À equipe técnica, Alyne Fávero, Carol Fontanari, Carlos Sorgi, Viviane Nardini e Fabiana Rosseto. Com certeza vocês foram essenciais para a execução dessa pesquisa. Obrigado por todo suporte e disponibilidade.

À Profª. Drª. Ana Lúcia da Costa Darini pela doação da cepa de *A. xylosoxidans* utilizada neste trabalho; e à técnica Joseane Cristina Ferreira por todo suporte em Microbiologia.

À Profª. Drª. Simone Gusmão Ramos e à técnica Elaine Medeiros Floriano, por toda ajuda com as histologias e imuno-histoquímica; e pelas conversas a cada encontro!

Aos funcionários do Biotério da FCFRP, Biotério Geral da USP e Biotério de camundongos especiais da FMRP pelo suporte e auxílio na manutenção dos animais.

Aos meus amigos Jéssica Sanches, Murillo Duarte e João Manoel Sanches! Se hoje estou em Ribeirão Preto devo parte disso a vocês! Meus incentivadores e meu porto seguro em Ribeirão. Nunca poderei pagar tudo que vocês fizeram por mim nas vésperas da minha seleção de Mestrado! Obrigado pela amizade sincera, pelas cervejas, pelas conversas e por todos os momentos vividos! Quero vocês para a vida toda!

Aos meus amigos de Jataí, em especial, à Gabriela Maria, que mesmo a distância sempre esteve a meu lado, a cada reencontro nossa amizade se firmava mais; e à Camila Fernandes, que me arranca risadas facilmente e hoje está do meu lado em Ribeirão Preto. Vocês são fundamentais na minha vida! Para a vida toda!

À secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine Silva Ferreira, por toda disponibilidade em ajudar durante esses dois anos. Você é parte essencial para nosso Programa!

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada por toda a formação e auxílio!

À FAPESP (Processo nº 2014/07125-6 e EMU 2015/00658-1), CNPq e a CAPES- PROEX pelo apoio financeiro fundamental.

Obrigado!

Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.

Marie Curie

RESUMO

RESUMO

OLIVEIRA, J. E. **CD14 e TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e mortalidade induzidas por *Achromobacter xylosoxidans***. 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Achromobacter xylosoxidans é um bacilo Gram-negativo, móvel, não formador de esporos, catalase positivo, não fermentador de glicose e resistente à diversos antimicrobianos. Este bacilo emergente vem sendo reportado como agente causador de pneumonias em indivíduos com fibrose cística (FC), e ceratite, osteomielite, artrite ou sepse em pacientes imunossuprimidos. A prevalência da infecção por *A. xylosoxidans* em pacientes com FC pode variar de 7,4% a 93,8%, porém, estima-se que em alguns países haja subnotificação, devido à dificuldade na identificação desse agente. A resistência à antibióticos e a capacidade de formar biofilme são os principais fatores que favorecem a permanência da bactéria no trato respiratório dos pacientes com FC, e contribuem para a exacerbação da doença. Em geral, a resposta imune ativada por bactérias Gram-negativas é dependente do reconhecimento do LPS, presente na superfície bacteriana, por receptores do tipo *Toll* (TLR), principalmente TLR2 e TLR4. Além disso, a ativação destes receptores requer frequentemente o auxílio de co-receptores, como CD14. O papel dos receptores da imunidade inata é bem conhecido para algumas bactérias Gram-negativas que também causam infecções respiratórias, porém ainda não há estudos da participação destes receptores na infecção por *A. xylosoxidans*. Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar o papel das moléculas CD14 e TLR4 durante a infecção experimental por *A. xylosoxidans*. Para tanto utilizamos camundongos C57Bl/6, deficientes de CD14 ou de TLR4 infectados com os bacilos via intratraqueal. Nestes animais, determinamos a curva de sobrevivência, e no 1º, 3º e 7º dias após infecção (d.p.i.), diferentes parâmetros foram avaliados nos pulmões, baço ou no sangue circulante. Observamos que 100% dos animais selvagens morrem em até cinco dias, enquanto 100% dos camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 sobrevivem ao final de sete dias. No entanto, quando comparadas as três linhagens de animais, observamos que apenas camundongos deficientes de TLR4 apresentam maior carga bacteriana nos pulmões. Além disso, observamos que não ocorre disseminação de bactérias para outros tecidos, e nem diferenças na expressão gênica de Lipocalina-2 (*Lcn2*) e na produção de óxido nítrico (NO), sugerindo que a resistência dos camundongos *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} à infecção não está relacionada com o controle da carga bacteriana. Interessante que, no 3º d.p.i., os pulmões de animais deficientes de CD14 ou de TLR4 apresentam menor área de lesão tecidual, menos recrutamento de neutrófilos, edema pulmonar menos intenso, e menor concentração de IL-6, TNF- α , CXCL1, CCL2, CCL3 e de LTB₄. Observamos ainda que a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta os níveis séricos de sCD14 e de IL-6, de forma dependente de CD14 ou TLR4. No entanto, 100% dos camundongos selvagens inoculados com bactérias mortas pelo calor sobreviveram e apresentam redução de IL-6 pulmonar e sérica, sugerindo que produtos liberados pelas bactéria vivas são responsáveis pela inflamação pulmonar e mortalidade. Em resumo, nossos dados mostram que a ativação de CD14 ou TLR4, possivelmente por LPS, induz inflamação pulmonar com intenso recrutamento de células, e consequente falência respiratória, resultando em morte dos animais. A citocina IL-6 parece ser o principal mediador deste processo. Assim, sugerimos que CD14 e TLR4 estão intimamente relacionadas com a patogênese da doença, constituindo importantes alvos terapêuticos.

Palavras-chave: *Achromobacter xylosoxidans*. CD14. TLR4. Receptores da imunidade inata. IL-6.

ABSTRACT

ABSTRACT

OLIVEIRA, J. E. **CD14 and TLR4 mediate *Achromobacter xylosoxidans*-induced pulmonary inflammation and mortality.** 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Achromobacter xylosoxidans is a gram-negative, mobile, non-spore-forming, positive catalase, glucose-non-fermenting bacillus resistant to various antimicrobials. This emerging bacillus is reported to cause pneumonia in patients with cystic fibrosis (CF), keratitis, osteomyelitis, arthritis, or sepsis in immunosuppressed patients. The prevalence of *A. xylosoxidans* infection in CF patients may range from 7.4% to 93.8%, however, it is estimated that in some countries underreporting due to the difficulty of identifying this agent. Antibiotic resistance and the ability to form biofilm are the main factors that favor the permanence of the bacteria in the respiratory tract of CF patients, and contribute to the exacerbation of the disease. In general, an immune response activated by Gram-negative bacteria depends on the recognition of LPS present on the bacterial surface by Toll-like receptors (TLR), mainly TLR2 and TLR4. In addition, activation of these receptors often requires the aid of co-receptors such as CD14. The role of innate immunity receptors is well known for some gram-negative bacteria that also cause respiratory infections, but there are no studies on their participation in *A. xylosoxidans* infection. In this work, our objective was to evaluate the role of CD14 and TLR4 during the experimental *A. xylosoxidans* infection. For this purpose, we used C57Bl/6 and CD14 or TLR4 deficient mice infected with bacilli via intratracheal route. In these animals, we determined the survival curve, and on days 1, 3, and 7 days post infection (d.p.i.), different parameters were evaluated in the lungs, spleen or circulating blood. We observed that 100% of wild animals die within five days, while 100% of CD14 or TLR4 deficient mice survive after seven days. However, when comparing the three animal strains, we observed that only TLR4 deficient mice show higher bacterial load in the lungs. In addition, we observed that bacteria do not spread to other tissues, nor do differences in lipocalin-2 (*Lcn2*) gene expression and nitric oxide (NO) production, suggesting that the resistance of *Cd14*^{-/-} and *Tlr4*^{-/-} mice to infection is not related to bacterial load control. Interestingly, at 3dpi, the lungs of CD14 or TLR4-deficient animals have a smaller area of tissue injury, less neutrophil recruitment, less intense pulmonary edema, and a lower concentration of IL-6, TNF- α , CXCL1, CCL2, CCL3 and LTB₄. We also observed that infection by *A. xylosoxidans* increases sCD14 and IL-6 serum levels, depending on CD14 or TLR4. However, 100% of wild mice inoculated with heat-killed bacteria survived and had reduced pulmonary and serum IL-6, suggesting that products released by living bacteria are responsible for lung inflammation and mortality. In summary, our data show that activation of CD14 or TLR4, possibly by LPS, induces pulmonary inflammation with intense cell recruitment, and consequent respiratory failure, resulting in animal death. Cytokine IL-6 seems to be the main mediator of this process. Thus, we suggest that CD14 and TLR4 are closely related to the pathogenesis of the disease, constituting important therapeutic targets.

Keywords: *Achromobacter xylosoxidans*. CD14. TLR4. Innate Immunity Receptors. IL-6.

RESUMEN

RESUMEN

OLIVEIRA, J. E. CD14 y TLR4 median la inflamación y mortalidad pulmonar inducida por *Achromobacter xylosoxidans*. 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Achromobacter xylosoxidans es un bacilo grampositivo, móvil, no formador de esporas, catalasa positiva, no fermenta glucosa y resistente a varios antibióticos. Se ha informado que este bacilo emergente causa neumonía en individuos con fibrosis quística (FQ) y queratitis, osteomielitis, artritis o sepsis en pacientes inmunodeprimidos. La prevalencia de la infección por *A. xylosoxidans* en pacientes con FQ puede variar del 7,4% al 93,8%, sin embargo, se estima que en algunos países no se informa debido a la dificultad para identificar este agente. La resistencia a los antibióticos y la capacidad de formar biopelículas son los principales factores que favorecen la permanencia de la bacteria en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ y contribuyen a la exacerbación de la enfermedad. En general, la respuesta inmune activada por bacterias Gram-negativas depende del reconocimiento de LPS presente en la superficie bacteriana por los receptores Toll-like (TLR), principalmente TLR2 y TLR4. Además, la activación de estos receptores a menudo requiere la ayuda de correceptores como el CD14. El papel de los receptores de inmunidad innata es bien conocido por algunas bacterias Gram negativas que también causan infecciones respiratorias, pero no hay estudios sobre su participación en la infección por *A. xylosoxidans*. En este trabajo, nuestro objetivo fue evaluar el papel de las moléculas CD14 y TLR4 durante la infección experimental por *A. xylosoxidans*. Para este propósito, utilizamos ratones C57Bl/6 deficientes en CD14 o TLR4 infectados con bacilos por vía intratraqueal. En estos animales, determinamos la curva de supervivencia, y en los días 1, 3 y 7 días después de la infección (d.d.i.), se evaluaron diferentes parámetros en los pulmones, el bazo o la sangre circulante. Observamos que el 100% de los animales salvajes mueren en cinco días, mientras que el 100% de los ratones con deficiencia de CD14 o TLR4 sobreviven después de siete días. Sin embargo, al comparar las tres cepas de animales, observamos que solo los ratones con deficiencia de TLR4 muestran una mayor carga bacteriana en los pulmones. Además, observamos que las bacterias no se propagan a otros tejidos, ni diferencias en la expresión génica de lipocalina-2 (Lcn2) y la producción de óxido nítrico (NO), lo que sugiere que la resistencia de los ratones *Cd14^{-/-}* y *Tlr4^{-/-}* a la infección no está relacionada con el control de la carga bacteriana. Curiosamente, en 3dpi, los pulmones de los animales con deficiencia de CD14 o TLR4 tienen un área menor de lesión tisular, menos reclutamiento de neutrófilos, edema pulmonar menos intenso y una menor concentración de IL-6, TNF- α , CXCL1, CCL2, CCL3 y LTB₄. También observamos que la infección por *A. xylosoxidans* aumenta los niveles séricos de sCD14 e IL-6, dependiendo de CD14 o TLR4. Sin embargo, el 100% de los ratones salvajes inoculados con bacterias inactivadas por el calor sobrevivieron y exhibieron IL-6 pulmonar y sérica reducida, lo que sugiere que los productos liberados por las bacterias vivas son responsables de la inflamación y mortalidad pulmonar. En resumen, nuestros datos muestran que la activación de CD14 o TLR4, posiblemente por LPS, induce inflamación pulmonar con reclutamiento celular intenso y consecuente insuficiencia respiratoria, lo que resulta en la muerte de los animales. La citocina IL-6 parece ser el mediador principal de este proceso. Por lo tanto, sugerimos que CD14 y TLR4 están estrechamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad, constituyendo objetivos terapéuticos importantes.

Palabras-clave: *Achromobacter xylosoxidans*. CD14. TLR4. Receptores de la inmunidad innata. IL-6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização dos TLRs	24
Figura 2: Entrega de LPS às moléculas de CD14 e TLR4	27
Figura 3: A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta a expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos e neutrófilos	46
Figura 4: A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta mRNA e expressão proteica de CD14 e TLR4	47
Figura 5: A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> induz aumento de sCD14 no BALF	48
Figura 6: A ativação de CD14 ou TLR4 confere susceptibilidade à infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	49
Figura 7: A ausência de TLR4, mas não de CD14, aumenta a carga bacteriana e diminui expressão de <i>Lcn2</i>	51
Figura 8: A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> se mantém restrita aos pulmões	52
Figura 9: A deficiência de CD14 ou TLR4 preserva o parênquima pulmonar na infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	54
Figura 10: Na deficiência de CD14 ou TLR4 ocorre redução no infiltrado de células para o parênquima pulmonar na infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	55
Figura 11: Animais deficientes de CD14 ou TLR4 têm menor área de lesão nos pulmões após infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	56
Figura 12: Camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentam edema pulmonar menos intenso quando comparados com os animais selvagens.....	58
Figura 13: A ausência de CD14 ou TLR4 não altera o número de células dendríticas nos pulmões após infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , quando comparado com animais selvagens	60
Figura 14: Na ausência de CD14 ou TLR4 há menor recrutamento de neutrófilos para os pulmões durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , quando comparados com animais selvagens	61
Figura 15: A ausência de CD14 aumenta o número de macrófagos intersticiais expressando MHC-II nos pulmões quando comparado ao grupo selvagem.	62
Figura 16: Na ausência de TLR4 ocorre diminuição no número de monócitos patrulheiros no sétimo dia após infecção quando comparado ao grupo selvagem	63
Figura 17: A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta o número de	

neutrófilos expressando CD14 ou TLR4 nos pulmões	65
Figura 18: Em diferentes períodos após infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , CD14 ou TLR4 são essenciais para a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β , mas não de IL-17.....	67
Figura 19: CD14 e TLR4 são essenciais para a produção CXCL1, CCL2 e CCL3 durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	69
Figura 20: Na ausência de CD14 ou TLR4 ocorre diminuição na produção de LTB ₄ , mas não de PGD ₂ e PGE ₂ durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	71
Figura 21: Na ausência de CD14 ou TLR4 ocorre diminuição de sCD14 e IL-6 séricos durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> quando comparados aos animais selvagens	73
Figura 22: A ausência de NFAT1 não modifica a mortalidade após infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	74
Figura 23: Camundongos inoculados com <i>Achromobacter xylosoxidans</i> inativadas pelo calor apresentam maior sobrevivência e redução de IL-6 nos pulmões	75
Figura 24: Na ausência de CD14, o edema e o recrutamento de neutrófilos no espaço bronco alveolar são menos intensos quando comparados com animais selvagens	100

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados na caracterização das células recuperadas dos pulmões	39
--	----

Tabela 2 - Padrões analíticos empregados para a identificação e quantificação de mediadores lipídicos	42
--	----

ACK	Cloreto de amônio e potássio
AP-1	Proteína ativadora-1
BAL	Lavado bronco alveolar (remete à técnica)
BALF	Fluido do lavado bronco alveolar
BHI	Infusão de cérebro e coração, do inglês <i>Brain heart infusion</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CFTR	Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística
DC	Célula dendrítica
D.O.	Densidade óptica
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
FC	Fibrose cística
HE	Hematoxilina e eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
Lcn2	Lipocalina 2
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LXA₄	Lipoxina A ₄
MD-2	Proteína mielóide de diferenciação 2
MPO	Mieloperoxidase
MYD88	Proteínas mielóide de diferenciação 88
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
OL	Lipídeos contendo ornitina
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês <i>Pattern-recognition receptors</i>
sCD14	CD14 solúvel
TLR2	Receptor do tipo <i>Toll 2</i> , do inglês <i>Toll-like receptor 2</i>
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll 4</i> , do inglês <i>Toll-like receptor 4</i>
TLR6	Receptor do tipo <i>Toll 6</i> , do inglês <i>Toll-like receptor 6</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ</i>
VAMP	Padrões moleculares associados a venenos
WT	Do inglês, <i>Wild-type</i> (selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> : características de interesse médico	18
1.2	Aspectos imunológicos da infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	20
1.3	Receptores do tipo <i>Toll</i>	21
1.4	Papel da molécula CD14.....	26
1.5	Papel de TLRs e CD14 em infecções por bactérias Gram-negativas	29
2	OBJETIVO	32
2.1	Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Animais	34
3.2	Obtenção e cultivo de <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	34
3.3	Inativação da bactéria pelo calor	34
3.4	Delineamento experimental.....	35
3.5	Infecção pulmonar por inoculação intratraqueal (i.t.)	35
3.6	Curva de sobrevivência	36
3.7	Eutanásia e processamento das amostras	36
3.8	Lavado broncoalveolar (BAL)	36
3.9	Processamento dos pulmões e coloração por hematoxilina e eosina (H/E) para análise histopatológica	36
3.10	Imuno-histoquímica (IHQ) para CD14 e TLR4.....	37
3.11	Determinação da carga bacteriana nos pulmões.....	37
3.12	Determinação da carga bacteriana no baço	38
3.13	Imunofenotipagem das células do parênquima pulmonar	38
3.14	Preparo dos homogenatos de pulmões e baços para quantificação de proteínas, citocinas e mediadores lipídicos.....	39
3.15	Quantificação de proteínas no parênquima pulmonar e no baço.....	40
3.16	Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	40
3.17	Quantificação de CD14 solúvel no BALF e no soro.....	40
3.18	Quantificação de nitrito.....	40
3.19	Extração e quantificação de mediadores lipídicos dos pulmões	41
3.20	Extração de RNA dos pulmões e síntese de cDNA.....	42
3.21	Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)	42
3.22	Análise estatística.....	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta a expressão TLR2 e TLR4 em neutrófilos e macrófagos, e de TLR6 em macrófagos.....	45

4.2	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> induz aumento da expressão gênica de <i>Cd14</i> e <i>Tlr4</i> no parênquima pulmonar.....	46
4.3	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta CD14 solúvel (sCD14) no BALF ...	48
4.4	A ausência de CD14 ou TLR4 confere resistência à infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	48
4.5	A deficiência de TLR4, mas não de CD14, aumenta a carga bacteriana no primeiro dia após a infecção e diminui expressão de <i>Lcn2</i> no terceiro dia após a infecção nos pulmões.	49
4.6	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> se mantém restrita aos pulmões, mesmo na ausência de CD14 ou TLR4 e não altera peso e proteínas totais no baço	51
4.7	A ausência de CD14 ou TLR4 preserva o parênquima pulmonar de animais infectados por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	52
4.8	Animais deficientes de CD14 ou TLR4 têm menos extravasamento de proteínas e edema pulmonar menos intenso durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	57
4.9	A ausência de CD14 e TLR4 altera o recrutamento de leucócitos para os pulmões após a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	58
4.10	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta o número de neutrófilos expressando CD14 ou TLR4.....	64
4.11	A ausência de CD14 ou TLR4 altera a produção de citocinas durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	66
4.12	A ausência de CD14 ou TLR4 diminui a produção de quimiocinas durante a infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	68
4.13	A deficiência de CD14 ou TLR4 impacta na produção de LTB ₄ na infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	70
4.14	A infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> aumenta a concentração sCD14 e IL-6 no sangue circulante, mas não igualmente nas três linhagens animais.	72
4.15	A ausência de NFAT1 não altera a mortalidade após infecção por <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	73
4.16	Somente <i>Achromobacter xylosoxidans</i> viável é capaz de induzir mortalidade e IL-6 nos pulmões	74
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE.....	99
	ANEXO	101

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Achromobacter xylosoxidans*: características de interesse médico

O bacilo *Achromobacter xylosoxidans* foi identificado pela primeira vez em 1971, a partir de secreções purulentas de pacientes diagnosticados com otite média [1]. Os primeiros ensaios para caracterização desta bactéria demonstraram que se trata de um bacilo Gram-negativo móvel, não formador de esporos, catalase positivo, não fermentador de glicose e resistente à vários antibióticos [2], [3]. Atualmente sabe-se que *A. xylosoxidans* é resistente a metais tóxicos, possui genoma rico em sequências C-G, tem capacidade de degradar compostos aromáticos e formar biofilme, características estas que permitem a sobrevivência do *A. xylosoxidans* em locais inóspitos e dificultam o tratamento de indivíduos infectados [4], [5]. Apesar de o seu habitat natural ser desconhecido, sugere-se que *A. xylosoxidans* tenha predileção por ambientes úmidos, e têm sido demonstrado que este micro-organismo pode ser isolado de vários tecidos e fluidos orgânicos humanos, como córnea, sangue, bile, escarro, feridas de pele, vias urinárias [6] e líquido cefalorraquidiano (LCR) [7], causando diversos tipos de infecção, como ceratite [8], [9], meningite, tromboflebite e osteomielite [10], [11], artrite [12], sepse [13], bacteremia e celulite [14].

Estudos têm sido realizados para determinar o perfil de resistência a antimicrobianos tanto em cepas catalogadas, quanto em isolados clínicos. Os resultados mostraram que algumas cepas de *A. xylosoxidans* possuem resistência intrínseca à trimetoprima/sulfametoxazol [15], aminoglicosídeos, azetreonam, ceftazidima, algumas penicilinas, cefalosporinas e tetraciclinas, devido à produção de β -lactamases, carbapenemases e proteínas ligantes de penicilina [16], [17]. Os antibióticos intravenosos mais ativos são piperacilina/tazobactam, porém pesquisas mostram que a combinação meropenem/ciprofloxacina também é bastante eficaz [18]. A resistência à outros antimicrobianos depende da expressão de genes que codificam proteínas de resistência. Dentre os mecanismos de resistência do gênero *Achromobacter* foram descritos dois sistemas de efluxo, AxyABM e AxyXY-OprZ, sendo o último a principal causa de resistência a diversos aminoglicosídeos, e à algumas fluoroquilononas, tetraciclinas e eritromicina [19], [20].

Nos últimos 25 anos, *A. xylosoxidans* tem sido frequentemente encontrado colonizando de forma crônica o trato respiratório inferior de indivíduos portadores de fibrose cística (FC) [21]–[23]. A ocorrência da infecção por este bacilo em pacientes com FC foi

determinada em várias regiões do mundo, como em Ghent, Bélgica, onde de 140 pacientes com FC, 17,9% estavam infectados por *A. xylosoxidans* [24], dado este semelhante ao encontrado em Madrid, onde a positividade foi de 19,8% [25]. Em um centro de FC da França, a prevalência anual variou de 7,4% a 10,4% de 2007 a 2014 [26]. Diferentemente, utilizando testes fenotípicos e sequenciamento de DNA em isolados de 179 pacientes com FC, pesquisadores do Rio de Janeiro, Brasil encontraram 93,8% de positividade para o bacilo [27].

A FC é uma doença genética autossômica recessiva, causada por mutações no gene que codifica o regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), que é o responsável pelo transporte de ânions através da membrana de células epiteliais, importante no movimento normal de fluidos em superfícies mucosas [28]. As mutações nesse gene não são uniformes, e são agrupadas em classes com diferentes consequências funcionais. Os casos em que há perda total da expressão ou função de CFTR são os mais graves, associados à doença pulmonar e insuficiência pancreática [29]. Alterações intestinais, como má absorção e consequente prejuízo no crescimento do paciente, também são comuns [30].

Nos pacientes com essa mutação ocorre intensa desidratação das vias respiratórias, principalmente na camada periciliar; acúmulo de muco espesso que favorece a colonização por bactérias; e ainda prejuízo no transporte de bicarbonato, reduzindo o pH pulmonar [31], [32]. Todos esses eventos geram um ambiente pró-inflamatório no trato respiratório, caracterizado por aumento na expressão de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) no epitélio, ativação contínua de genes pró-inflamatórios, estresse oxidativo, prejuízo na fagocitose, acúmulo de polimorfonucleares e baixa produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e lipoxinas [32].

Apesar de atingir todas as mucosas, a principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos fibrocísticos são as infecções bacterianas pulmonares recorrentes [21]–[23], [33]. Além de *A. xylosoxidans*, outras espécies são frequentemente encontradas colonizando o trato respiratório de pacientes com FC, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomas maltophilia*, bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* e micobactérias não tuberculosas [29], [34]. A infecção por *A. xylosoxidans* tem sido associada ao declínio acentuado da função pulmonar, constatado pela redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) [35], [36], medida que representa o volume de ar exalado em um tempo específico [37]. Entretanto, os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro envolvidos no declínio da função pulmonar observado em indivíduos infectados por *A. xylosoxidans* permanecem pouco compreendidos.

1.2 Aspectos imunológicos da infecção por *Achromobacter xylosoxidans*

A. xylosoxidans é considerado um patógeno emergente, que infecta indivíduos com algum tipo de imunossupressão, como os indivíduos fibrocísticos; portadores de neoplasias ou com insuficiência renal [5], [38]–[40]. A habilidade de *A. xylosoxidans* infectar preferencialmente indivíduos imunossuprimidos foi demonstrado pela primeira vez, em modelo animal, por Hyodo e colaboradores em 1982. Após infecção via intraperitoneal com inóculos crescentes de *A. xylosoxidans*, camundongos saudáveis ou imunodeficientes (por tratamento com ciclofosfamida) foram comparados quanto à carga bacteriana. Observou-se que o grupo tratado com ciclofosfamida apresentou maior carga bacteriana no cérebro, pulmões, fígado, baço e rins, quando comparados aos animais saudáveis, sugerindo que indivíduos imunossuprimidos possuem uma capacidade limitada em controlar essa infecção [41].

Por se tratar de uma bactéria Gram-negativa, a parede de *A. xylosoxidans* é rica em lipopolissacarídeo (LPS), que é um potente ativador das células do sistema imune. O LPS é composto pelo lipídeo A, uma região oligossacarídica, e o antígeno O [42]. Sua função primária é fornecer uma barreira contra qualquer fator de estresse, sendo essencial para a sobrevivência bacteriana [43]. No entanto, outros produtos microbianos, presentes na parede celular, ou produzidos e secretados por *A. xylosoxidans* são responsáveis pela ativação celular, e pela consequente produção de mediadores inflamatórios [44]. Foi reportado que algumas cepas de *A. xylosoxidans* podem apresentar um fator citotóxico ainda desconhecido, importante na patogenia da infecção. Neste trabalho, o sobrenadante de cultura de cepas isoladas de pacientes com FC, quando incubados com células de carcinoma mucoepidermóide pulmonar (NCI-H292) aumentou o número de vacúolos citoplasmáticos e a ativação dos mecanismos de morte celular nestas células. Além disso, esse fator citotóxico estimulou a produção de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), mesmo quando tratado com polimixina B, mostrando que não somente o LPS induz citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, quando produzidas continuamente, causam danos teciduais e declínio da função pulmonar, agravando o quadro clínico do paciente, especialmente na FC [44].

A inflamação causada por *A. xylosoxidans* é semelhante à causada por *P. aeruginosa* em pacientes com FC, sendo que em ambos os casos há aumento nos níveis séricos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) em indivíduos infectados, quando comparados ao grupo saudável ou com pacientes com FC sem infecções crônicas [45]. Outros produtos microbianos importantes produzidos por *A. xylosoxidans* são os lipídeos contento ornitina (OL) [46], [47]. Foi demonstrado que a estimulação de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 com OL, provenientes de *A.*

xylosoxidans, induz a produção TNF- α e interleucina-1 beta (IL-1 β), sendo que a produção de TNF- α é dependente da ativação de CD14. Além disso, OL também induz a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), eicosanoide produzido em diferentes condições inflamatórias[48] [48], [49]. Quanto à produção de eicosanoides em portadores da FC, foi descrito aumento de LTB₄, PGE₂ e PGD₂, e redução de LXA₄, moléculas derivadas do metabolismo do ácido araquidônico que foram detectadas em diferentes amostras biológicas como escarro, soro e urina [50]–[54].

Recentemente, nosso grupo demonstrou em um modelo de infecção pulmonar aguda pelo *A. xylosoxidans*, que PGE₂ e LTB₄ são produzidos em períodos distintos, embora somente o LTB₄ demonstrou ter um papel crucial no controle da infecção. Utilizando camundongos deficientes de 5-LO, foi observado que a ausência desta enzima e, portanto, da produção de LTB₄, prejudica a eliminação da bactéria dos pulmões; induz intenso edema; maior produção de citocinas como TNF- α e IL-1 α , e consequentemente esses camundongos sucumbem à infecção. Neste contexto, foi evidenciado que a ação protetora de LTB₄ é devido à indução de alfa-defensina, um peptídeo antimicrobiano que auxilia na eliminação de *A. xylosoxidans* pela ruptura da parede bacteriana [55]. Apesar dos avanços obtidos no estudo da infecção pelo *A. xylosoxidans* utilizando células imortalizadas, camundongos e células/soro de indivíduos infectados, os mecanismos de reconhecimento do bacilo por células do sistema imune, bem como os receptores e as vias de sinalização envolvidas na resposta antimicrobiana e/ou inflamatória permanecem pouco compreendidas.

1.3 Receptores do tipo Toll

O conceito de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês *Pattern-Recognition Receptors*) surgiu em 1989 e se baseia no reconhecimento de produtos microbianos por receptores específicos presentes em células da imunidade inata. Estas moléculas microbianas são altamente conservadas, não expressas no hospedeiro e em conjunto são denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Outras estruturas importantes que são reconhecidas pelos PRRs são os Padrões Moleculares Associados à Venenos (VAMPs) [56] e os Padrões Moleculares Associados à Dano (DAMPs) [57]. Assim como os PAMPs, os VAMPs também são moléculas altamente conservadas, não expressas no hospedeiro, mas presente em peçonhas de diferentes animais [56]. Os DAMPs, por sua vez, são moléculas do hospedeiro que possuem papel fisiológico dentro da célula, porém, podem ser liberadas após lesão tecidual e desencadear uma resposta imune [58]. Os PRRs estão presentes em diversas células da imunidade inata e adaptativa, incluindo células

dendríticas (DCs), monócitos/macrófagos e neutrófilos [59], [60]. Atualmente são conhecidas cinco classes de PRRs: receptores citoplasmáticos semelhantes a NOD (NLRs); receptores intracelulares semelhantes a RIG-1 (RLR); receptores transmembrana de lectina tipo C, receptores semelhantes a AIM-2 (ausente em melanoma 2) e receptores semelhantes a Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) [61]–[63].

Antes da descoberta dos TLRs em *Drosophila melanogaster*, a imunidade inata era vista como uma parte muito simples do sistema imunológico, e a base molecular por trás da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias era desconhecida [64]. Na tentativa de elucidar e caracterizar a função dos TLRs, em 1992 foi demonstrado que os TLRs e o receptor de IL-1 (IL-1R1) compartilhavam uma sequência de aminoácidos fundamentais para a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B), que foi chamada domínio TIR [65]. Entre 1997 e 1999 houve um grande avanço em relação aos receptores do tipo *Toll* humanos, como a descoberta do primeiro deles, TLR4 (do inglês *Toll-like Receptor 4*) e a evidência que o LPS seria seu principal ativador [66], [67], a elucidação do papel de MD2 (proteína que auxilia na entrega de LPS a TLR4) e MyD88 (proteína adaptadora essencial para sinalização intracelular) na resposta desencadeada por LPS [68], [69], e a identificação de outros receptores pertencentes à essa classe [64]. Nessa época, já se sabia que além de TLR4, as moléculas LPB (proteína ligante de LPS) e CD14 eram capazes de aumentar a sensibilização celular ao LPS [70], [71].

Hoje, sabe-se que os TLRs são proteínas integrais de membrana que possuem um domínio N-terminal rico em repetições de leucina, relacionado ao reconhecimento ao ligante; uma hélice transmembrana; e um domínio citoplasmático C-terminal- TIR, responsável pela sinalização [62], [65]. Existem 13 TLRs descritos em mamíferos, sendo estes classificados de acordo com a sua localização na célula, podendo ser receptores expressos na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 e TLR11) ou receptores localizados em vesículas celulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, TLR12 e TLR13) [64], [72].

A ativação de TLRs frequentemente resulta na sinalização de duas vias distintas, a via dependente de MAL e MYD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response protein 88*) (exceto para TLR3) que culmina na ativação do NF- κ B e AP-1, e a via dependente de TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β*) que resulta na ativação de NF- κ B e MAPK que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e interferons (IFN) do tipo 1, respectivamente [73]. Além disso, outras três proteínas adaptadoras associadas às caudas citoplasmáticas dos TLRs já foram descritas, como TIRAP, TRAMP e SARM [74].

Os componentes bacterianos, como LPS e peptidoglicano/ lipoproteínas são reconhecidos principalmente por homodímeros de TLR4 ou dímeros formados entre TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6, respectivamente. A formação destes dímeros é necessária para disparar as sinalizações subsequentes pelo recrutamento do domínio contendo a proteína adaptadora TIR [72]. Como mostrado na Figura 1, a sinalização de TLR 2 ou TLR 4, leva a ativação do domínio TIR citoplasmático e das proteínas adaptadoras associadas, como a MYD88 que recrutam a quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK-4), que fosforila IRAK-1, e este ativa o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) [75]. Essas proteínas deixam o complexo e interagem com a quinase 1 ativada por TGF- β (TAK1) e com TAB1 e TAB2, proteínas de ligação TAK1. A TAK1, após fosforilação, ativa o complexo I- κ B quinase (IKK), que compreende IKK α , IKK β e NEMO/IKK γ , levando a ativação de NF- κ B, fator de transcrição que é translocado para o núcleo e que induz a expressão de genes de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α [75], [76]. Na via dependente de TRIF, ocorre formação do complexo TRAF3 (do inglês, TNFR *associated fator 3*) / TANK- *binding kinase* (TBK)1, e a ativação de TBK1 induz a fosforilação de e ativação do fator de transcrição IRF3 (do inglês, IFN *regulatory factor*), que é translocado para o núcleo para iniciar a síntese de mRNA de IFN- β [77], [78].

Além da formação de heterodímeros ou homodímeros de TLRs na superfície celular, para que haja ativação da cascata de sinalização, proteínas acessórias de superfície desempenham importante papel no reconhecimento dos produtos bacterianos. No reconhecimento do LPS, por exemplo, as proteínas acessórias que auxiliam na ativação de TLR4 são a LBP, CD14 e MD2, constituindo importantes intermediários na interação entre

TLR4 e LPS. A LBP sérica se liga à sítios da membrana bacteriana ricos em LPS formando agregados. A molécula CD14, uma glicoproteína que pode ser solúvel ou ancorada à membrana de células mieloides, por uma cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI), forma agregados menores de LPS, que são apresentados ao complexo TLR4-MD2, fazendo com que o domínio TIR do TLR4 se ligue à MYD88 por justaposição, culminando no recrutamento das moléculas adaptadoras, e consequentemente, na ativação de NF- κ B [79], [80]. Na via de sinalização independente de MYD88, o sinal gerado pelo TLR ativa NF- κ B por meio de TRIF ou TRAM [72], sendo este o mecanismo de produção de IFN tipo 1, como já mencionado [61], [79], [81], [82].

Peptidoglicanos e lipoproteínas, constituintes de parede de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, são frequentemente reconhecidos por heterodímeros de TLR2 (TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6) [59], [83], [84]. CD14, LBP e CD36 são moléculas acessórias importantes também na ativação de TLR2. O CD14 e LBP auxiliam o reconhecimento de lipoproteínas bacterianas para ativação de TLR1/TLR2, embora o mecanismo exato desta interação ainda seja pouco compreendido [85]. O CD36 por sua vez, é um receptor “*scavenger*” capaz de se ligar a ligantes polianiónicas como lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (LDLox) e diacilglicerídeos, por interação do complexo heterotrimérico CD36-TLR2-TLR6 [86]. Já o ácido lipoteicoico (LTA) e o lipopeptídeo-2 ativador de macrófagos (MALP-2) se ligam por interação do complexo heterotrimérico CD36-TLR4-TLR6 [87]. A ativação de TLR2/TLR1 culmina no recrutamento das moléculas adaptadoras TIRAP e MyD88 para ativar a via dependente de MyD88 e MAPK, enquanto a ativação de TLR4/TLR6 dispara a via de sinalização dependente de MyD88 e TRIF. Por outro lado, a interação CD36-TLR2/TLR6 induz ativação de NF- κ B após estímulo com ácido lipoteicoico A (LTA) isolado de *Staphylococcus aureus* e amplifica a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais [86]. Além disso, a capacidade de CD36 aumentar a atividade fagocítica dos fagócitos foi também descrita para outros patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus faecalis* [88].

Além dos TLRs já mencionados, existem outros receptores que reconhecem diversos padrões de microrganismos, como TLR3, que reconhece RNA dupla-fita presente em diversos vírus; TLR5, responsável por reconhecer flagelina; TLR7 e 8, importantes no reconhecimento de fita simples de RNA viral; TLR9, que reconhece DNA com motivos CpG de bactérias e vírus; TLR10, cujas funções ainda não claras, mas sabe-se que possui sequências semelhantes às de TLR1; TLR11, cujos ligantes são componentes de bactérias uropatogênicas; TLR12,

pode reconhecer proteínas de *Toxoplasma gondii*; e por fim, TLR13, que reconhece DNA ribossomal de bactérias [64], [89].

A ativação de TLRs não ocorre exclusivamente por antígenos de microrganismos, tendo sido demonstrado por nosso grupo que TLR2 e TLR4 também são importantes na resposta imune induzida por peçonhas e assim foram denominadas VAMPs. A estimulação de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 com veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TsV) demonstrou que TsV e sua fração Ts1, resultou na produção de citocinas (IL-6 e TNF- α) e mediadores lipídicos, como PGE₂ e LTB₄, além do aumento na expressão gênica de *Tlr2*, *Cd14* e *Myd88*. Foi demonstrado que a produção de citocinas ocorre pela ativação de NF- κ B e I κ B α , dependente de MyD88 [56]. Moléculas endógenas associadas a danos, como proteínas do choque térmico (HSP70, Gp96, HSP22, HSP72), proteína HMGB1 (do inglês, *High mobility group box 1*) e moléculas da matriz extracelular, como bioglicana e sulfato de heparano, também são capazes de induzir a produção de citocinas via ativação de TLRs [90].

1.4 Papel da molécula CD14

A função de TLR4, CD14 e outras proteínas acessórias, no reconhecimento do LPS, principal componente da parede de bactérias Gram-negativas, é bem descrito [91].

A primeira etapa no reconhecimento do LPS pelas células dos mamíferos se dá pela sua ligação à proteína LBP. A LBP é sintetizada no fígado e se distribui no plasma e em fluidos teciduais, onde se liga com alta afinidade ao lipídeo A do LPS e o solubiliza formando um complexo estável [70]. Macrófagos, monócitos e neutrófilos reconhecem esse complexo por meio do CD14, tanto em sua forma transmembranar, ancorada na membrana citoplasmática destas células por um grupamento de glicosilfosfatidilinositol (GPI), quanto em sua forma solúvel, presente nos fluidos biológicos e plasma [71]. A proteína LBP transfere monômeros de lipídeo A para CD14, que é capaz de amplificar a sensibilização das células que expressam TLR4 ao estímulo por LPS [43], [71]. O LPS monomérico é então transferido para a proteína MD2, que como o CD14, pode ser solúvel ou acoplado ao TLR4 por meio de ligações de hidrogênio [92]. A ligação entre LPS e MD2 leva à dimerização de TLR4, mediada pela interação dos domínios TIR intracelulares de dois receptores TLR4. Dessa forma, MYD88 ou TRIF são recrutados para iniciar a cascata de sinalização intracelular, e indução de genes pró-inflamatórios [43], [91], como mostrado na Figura 2. Foi demonstrado em células dendríticas que CD14 induz uma via de endocitose dependente de Syk/PLC γ 2 que medeia a endocitose de TLR4, desviando a cascata de sinalização de TLR4 para produção de

IFN- β [93]. Além disso, CD14 também tem papel importante no *clearance* de células apoptóticas por macrófagos [94].

FIGURA 2: Entrega de LPS às moléculas de CD14 e TLR4. O LPS se liga ao LBP e posteriormente ao CD14, que por sua vez interage com MD2. Estas ligações induzem alterações conformacionais em TLR4, que possibilitam a formação de homodímeros de TLR4, permitindo que os domínios TIR iniciem a cascata de sinalização. Fonte: STEIMLE et al. 2016

Pereira e colaboradores (1997) observaram que a participação da molécula CD14 no reconhecimento do LPS está condicionada à quantidade de LPS ao qual a célula do hospedeiro foi exposta. Macrófagos deficientes de CD14 quando estimulados com baixa concentração de LPS não são eficientes na produção de TNF- α e IL-1 β , demonstrando que nesse caso, a participação de CD14 é essencial para produção dessas citocinas. Por outro lado, quando os macrófagos *Cd14*^{-/-} foram estimulados com alta concentração de LPS, a liberação das citocinas não foi alterada, evidenciando a ativação de uma via independente de CD14 [95].

Assim como a IL-6, o sCD14 é considerado uma proteína de fase aguda, frequentemente produzida em contextos inflamatórios [96]. Altos níveis de sCD14 em fluido do lavado bronco-alveolar (BALF) já foram reportados em casos de tuberculose, sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática, tabagismo e asma [97]–[101]. Além disso, foi demonstrado que a via CD14/NFAT/mPGES-1 medeia formação de edema de pele induzido por LPS [102]. Interessantemente, sCD14 foi considerado como um DAMP quando liberado em excesso por macrófagos de pacientes com FC, uma vez que essa molécula foi capaz de induzir citocinas

de maneira independente da presença do LPS, porém de forma dependente de TLR4/CD14 de membrana [103], [104].

Foi demonstrado também que o LPS induz aumento da expressão de CD14 no miocárdio, e que camundongos deficientes de CD14, quando infectados via i.p. com *E.coli*, produzem menos TNF- α e IL-1 β no coração, e dessa forma, são protegidos da inflamação cardíaca e disfunção ventricular [105]. A alta expressão de CD14 também já foi correlacionada com progressão da doença renal cística [106], e o uso de anti-CD14 foi eficaz em reduzir a produção de TNF- α , IL-8 e o dano renal induzido pelo LPS em coelhos [107]. Interessantemente, o uso de anti-CD14 em primatas reduz a hipotensão, a produção das citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e inibe alterações na permeabilidade do epitelial pulmonar, que ocorre nos animais tratados com LPS [108]. Corroborando estes dados, a administração de oligonucleotídeo “*anti-sense*” de CD14 (que se hibridiza, ao RNA mensageiro de CD14, bloqueando a sua tradução em proteína) reduz a mortalidade e dano hepático em camundongos submetidos a injeção de LPS, quando comparados ao grupo que não recebeu o oligonucleotídeo [109].

Camundongos deficientes de CD14 são também protegidos contra choque endotoxêmico induzido por LPS e apresentam níveis séricos reduzidos de TNF- α e IL-6, bem como redução na carga bacteriana no sangue e pulmões [110]. Por outro lado, contrariando a característica “pró-inflamatória” de sCD14 até então descrita, estudos mostraram que sCD14 plasmático humano diminui a resposta de monócitos ao LPS, pois são capazes de transferir o LPS das células para lipoproteínas, deixando-o inativado [111]; ou ainda diminui a produção de TNF- α em camundongos e assim protege da mortalidade [112]. Corroborando estes dados, pesquisadores produziram linhagens de camundongos transgênicos, com diferentes números de cópias de transgene hCD14 expressos em camundongos *Cd14*^{-/-}. Os animais com várias cópias de transgenes expressaram cerca de 10x mais sCD14 sérico que os camundongos com uma cópia de transgene. Estes animais e seus controles foram submetidos à injeção i.p. de LPS e a sobrevivência foi avaliada. De forma interessante, os camundongos *high*-CD14 eram mais resistentes, ao passo que os *low*-CD14 obtiveram um perfil intermediário, e os WT obtiveram maior taxa de mortalidade. A explicação para esse fenômeno é que altos níveis de sCD14 competem pela ligação ao LPS circulante, evitando sua interação com células imunocompetentes, e consequentemente fornecendo proteção contra o choque induzido por LPS [113].

Em modelos inflamatórios estéreis, foi demonstrado que CD14 aumenta a inflamação do tecido adiposo e resistência à insulina [114] e pode estar associado ao aparecimento da

doença de Alzheimer [115]. Além disso, em modelo de colite induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS), foi demonstrado que CD14 exerce um papel protetor, aumentando a integridade da barreira intestinal [116]. Nosso grupo demonstrou que o envenenamento por escorpião *T. serrulatus* induz expressão de CD14, que contribui suprimindo LTB₄ e aumentando IL-1 β e PGE₂, levando à edema pulmonar e aumento na mortalidade induzida pela peçonha. [117].

1.5 Papel de TLRs e CD14 em infecções por bactérias Gram-negativas

A ativação de TLRs induz diferentes vias de sinalização e culminam na transcrição de genes que codificam citocinas e enzimas relacionadas à produção de mediadores pró-inflamatórios, e a ausência desses receptores culmina em menor produção destes mediadores [118], [119]. Entretanto, tem sido demonstrado, que a geração de uma resposta imune adequada contra os patógenos é crucial para a resolução das infecções. Um exemplo da importância da via de sinalização dos TLRs no controle de infecções é o fato de que camundongos deficientes de MyD88 (proteína adaptadora na sinalização dos TLRs) desenvolvem infecções bacterianas espontâneas em vários sítios anatômicos, como placenta, sangue e peritônio [120].

Camundongos deficientes de MyD88 quando infectados com *P. aeruginosa*, apresentam maior carga bacteriana nos pulmões, devido à redução no influxo de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar [121]. Experimentos com o mesmo patógeno, inoculado no epitélio da córnea de camundongos deficientes de TLR4 e CD14, demonstraram que o LPS é um importante regulador dessa via também nas células epiteliais oculares, onde ocorre internalização do TLR4, sendo que o bloqueio de CD14 com anti-CD14, diminuiu a fosforilação de Syk e IRF3, e consequentemente a produção de CCL5/RANTES e IFN- β [122].

Foi demonstrado que CD14 é essencial para produção de TNF- α por macrófagos alveolares e peritoneais após infecção *in vitro* com *Burkholderia pseudomallei*. Além disso, foi mostrado que camundongos deficientes de CD14 e infectados com essa bactéria apresentam maior taxa de sobrevivência, menor carga bacteriana nos pulmões e fígado, e níveis reduzidos de MPO quando comparados ao grupo WT [123]. A molécula CD14 também parece regular o influxo de neutrófilos, uma vez que camundongos *Cd14*^{-/-} infectados com *Salmonella typhimurium*, apresentam atraso no recrutamento dessas células e são mais suscetíveis à infecção [124].

Camundongos deficientes de TLR4 infectados via intranasal com *Yersinia pseudotuberculosis* apresentaram maior taxa de mortalidade, quando comparados ao grupo WT, embora sem diferenças na carga bacteriana e lesão pulmonar. Interessantemente, os camundongos *Tlr4*^{-/-} apresentaram maior carga bacteriana, aumento de TNF- α e CXCL2 no fígado e baço, além de aumento de IL-6 no sangue [125]. Por outro lado, um estudo *in vitro*, mostrou que TLR2, mas não TLR4, medeia a imunidade inata na infecção por *Legionella pneumophila* [126]. A ausência de TLR2 e TLR4 também não impacta no *clearance* de *Brucella abortus* [127]. Camundongos deficientes de TLR2 e TLR4 infectados com *Klebsiella pneumoniae* apresentaram maior carga bacteriana nos pulmões e fígado, além de redução na produção de MCP-1 MIP-2, TNF- α e óxido nítrico quando comparados com camundongos selvagens, sugerindo que esses dois receptores atuam em conjunto na resposta imune protetora [128]. TLR4 também apresenta papel protetor na infecção por *Vibrio cholerae* O1, uma vez que na ausência de TLR4 ocorre aumento da carga bacteriana nos pulmões acompanhado de menor produção de IL-1 β e TNF- α [129].

Visto que os papéis de TLRs e CD14 podem variar de acordo o estímulo e local de infecção, investigar o papel desses receptores, constitui um desafio para entender como as bactérias se estabelecem no hospedeiro. Estes estudos poderão auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento das pneumonias, problema que ainda causa muitas mortes no Brasil, principalmente em crianças e idosos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO

Avaliar o papel das moléculas CD14 e TLR4 na infecção experimental por *Achromobacter xylosoxidans*.

2.1 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo

Em animais selvagens ou deficientes de CD14 ou TLR4 infectados ou não por *A. xylosoxidans*, avaliamos os seguintes parâmetros:

- Expressão dos receptores TLR2, TLR4, TLR6 e CD14, por citometria de fluxo, em células isoladas dos pulmões de camundongos selvagens (WT) infectados com *A. xylosoxidans*;
- Curva de sobrevivência, carga bacteriana nos pulmões e baço (UFC), formação de edema, lesão pulmonar, recrutamento celular para os pulmões (neutrófilos, macrófagos intersticiais, células dendríticas e monócitos patrulheiros) por citometria de fluxo, e quantificação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos em homogenato de pulmão após a infecção por *A. xylosoxidans*,
- Níveis séricos de IL-6 e sCD14 após infecção por *A. xylosoxidans*;
- Inativação da bactéria pelo calor para investigar a importância da viabilidade bacteriana na indução da inflamação pulmonar.

Em animais selvagens ou deficientes de NFAT1 infectados por *A. xylosoxidans*, avaliamos a curva de sobrevivência.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos (24-26g), das linhagens C57BL/6 (selvagem), ou deficientes de CD14 (*Cd14^{-/-}*), deficientes de TLR4 (*Tlr4^{-/-}*) ou deficientes de NFAT1 (*Nfat1^{-/-}*) provenientes do Biotério Geral da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto e do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Os animais foram mantidos em estante ventilada (Alesco, Monte Mor – SP) com livre acesso a água e alimento. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Guia Brasileiro de Produção e Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (autorização nº. 17.1.820.60.0), conforme ANEXO A.

3.2 Obtenção e cultivo de *Achromobacter xylosoxidans*

Foi utilizada a cepa LMG 1863 de *A. xylosoxidans*, gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo FCFRP – USP. A cepa de 1^a passagem foi primeiramente cultivada em caldo “Brain Heart Infusion” BHI (Laboratórios Conda S.A, KASVI – Espanha) acrescido de 20% de glicerol por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e estocada em freezer a -80°C e submetida a testes para confirmação da pureza. Anteriormente a cada experimento, a cepa foi cultivada em ágar BHI e mantida em estufa 37°C a 5% de CO₂, e após 18 horas de cultivo as bactérias foram quantificadas através de leitura da D.O. a 600 nm em espectrofotômetro, de forma que a suspensão atingisse a escala de 21x10⁸ bactérias por ml [55].

3.3 Inativação da bactéria pelo calor

Após quantificação das bactérias na suspensão por meio da leitura da D.O e ajuste do inóculo, parte do volume foi destinado à inativação dos bacilos por meio de calor. A suspensão bacteriana foi submetida a banho seco a 90°C por 30 minutos [130]. Para confirmar a ausência de bactérias não viáveis, a suspensão foi plaqueada em ágar-BHI que foram

mantidas em estufa a 37°C por 48 horas. Os camundongos foram inoculados com a bactéria inativada pela via intratraqueal (i.t.). Um grupo de animais foi inoculado com bactérias vivas obtidas da mesma suspensão bacteriana.

3.4 Delineamento experimental

Camundongos C57Bl/6 (selvagens) ou deficientes de CD14, de TLR4 ou de NFAT1 foram infectados com $2,0 \times 10^7$ bactérias para experimentos de cinética, ou com $6,3 \times 10^7$ bactérias para experimentos de sobrevivência, via i.t. [55]. Animais controles foram submetidos às mesmas condições e receberam PBS (i.t.), representados como “dia 0”. Os animais foram eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após infecção para coleta dos pulmões; do lavado bronco-alveolar; do baço e do sangue (para obtenção do soro).

3.5 Infecção pulmonar por inoculação intratraqueal (i.t.)

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com quetamina (80 a 100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), segundo recomendações sugeridas pelo CONCEA. Sob anestesia, uma pequena incisão foi realizada na região da traqueia para a inoculação i.t. de 100 µL da suspensão bacteriana de *A. xylosoxidans*. Animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam 100 µL de PBS 1x estéril [131]. Todos os animais tiveram sutura realizada no local da incisão com fio de nylon absorvível (3/8 CT19-Bioline, Anápolis (GO), Brasil).

3.6 Curva de sobrevivência

Após a infecção com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*, ou desafio com a bactéria inativada pelo calor, os camundongos C57Bl/6 (selvagem), deficientes de CD14, TLR4 ou NFAT1 foram acompanhados durante sete dias para determinação da curva de sobrevivência. A morte dos animais dos diferentes grupos foi registrada diariamente e a curva de sobrevivência determinada utilizando Log Rank test- Mantel Cox, GraphPad Prism 6 [132].

3.7 Eutanásia e processamento das amostras

Nos dias 1, 3 e 7 após a infecção, os animais foram anestesiados via i.p. com quetamina (100 mg/Kg) e xilasina (10 mg/kg) e eutanasiados por deslocamento cervical. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e centrifugado a 500 g durante 10 minutos para obtenção do soro, no qual foi quantificado IL-6 e sCD14. Os pulmões foram removidos para análise histológica, quantificação de citocinas, quantificação de eicosanoides, quantificação de proteínas totais, análise de expressão gênica, análise da carga bacteriana, imunofenotipagem das células pulmonares e avaliação do peso. Os baços foram removidos para avaliação da carga bacteriana, quantificação de citocinas e proteínas totais. Em experimento separado, o lavado broncoalveolar (BAL) foi coletado para quantificação de sCD14.

3.8 Lavado broncoalveolar (BAL)

Após 1, 3 e 7 dias de infecção, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical precedida de anestesia com quetamina (80 a 100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) e as células do fluido do lavado bronco-alveolar (BALF) foram recuperadas através da inserção de um cateter acoplado a uma seringa contendo 1 ml de PBS estéril. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. Os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados a 500g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado, e em seguida congelado a -80°C em placa de poliestireno de 48 poços para posterior quantificação de sCD14.

3.9 Processamento dos pulmões e coloração por hematoxilina e eosina (H/E) para análise histopatológica

O lobo direito médio do pulmão dos camundongos dos diferentes grupos experimentais foi removido nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Os órgãos foram fixados em

formol tamponado (10% de formaldeído), 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio por 7 dias e depois preparados em blocos de parafina no Laboratório de Patologia Pulmonar da FMRP. Cortes histológicos de 5 μ M de espessura foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e fotografados (25x, 100x e 400x) e analisados comparativamente quanto aos componentes celulares no parênquima pulmonar em microscópio óptico Leica (DM500B, Wetzlar, Germany). Sete fotomicrografias (400x) de cada pulmão foram analisadas utilizando o *software* ImageJ (U.S. NIH, Bethesda, MD, EUA) para se determinar a área de lesão tecidual [55].

3.10 Imuno-histoquímica (IHQ) para CD14 e TLR4

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a expressão de CD14 e TLR4 no tecido pulmonar dos camundongos C57Bl/6 (WT) infectados com *A. xylosoxidans*. Cortes histológicos, com 5 μ m de espessura, foram desparafinados e incubados com PBS- H_2O_2 3% por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram então lavados com PBS-T e em seguida foi adicionada glicina por 10 minutos. Uma nova lavagem foi realizada, e os cortes incubados por 60 minutos com BSA 1% para bloqueio de ligações inespecíficas seguido pela incubação com o anticorpo primário anti-CD14 (ab181470, Abcam) ou anti-TLR4 (ab13556, Abcam), que foram deixados *overnight*. No dia seguinte, foram realizadas novas lavagens e incubação por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado (GE healthcare) e com complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). A pós nova lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 5 minutos. Os cortes foram lavados e contra-corados com hematoxilina, desidratados com etanol (80%-100%), xilol e montados em bálsamo de Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). As fotomicrografias (400x) foram obtidas empregando o microscópio óptico Leica (DM500B, Wetzlar, Germany).

3.11 Determinação da carga bacteriana nos pulmões

Após a infecção, nos dias 1, 3 e 7, o lobo pulmonar superior esquerdo foi removido e acondicionado em tubo Eppendorf[®] contendo 1 mL de RPMI-I (Gibco, Itapevi, SP, Brasil) para pesagem. Em seguida, os órgãos foram cortados, dentro do tubo, em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril. Aos fragmentos foi adicionado DNase (1 mg. mL⁻¹ - Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) e liberase TM (25 μ g. mL⁻¹ - Roche, Mannheim, Alemanha) e o tecido foi mantido a temperatura de 37°C, sob agitação

constante de 150 rpm por 45 minutos. A partir de 100 μ L dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas que foram semeadas com auxílio de alça bacteriológicas estéreis, em placas de ágar-BHI. As placas de Petri foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 36 horas. Após este período, as colônias foram contadas e os dados expressos em número absoluto por grama de tecido.

3.12 Determinação da carga bacteriana no baço

Nos dias 1, 3 e 7 após a infecção, o baço foi removido, pesado e cortado em pequenos fragmentos com auxílio de uma pinça e bisturi em placa de Petri contendo 3 mL de RPMI-I. A suspensão celular obtida foi semeada, com auxílio de alça bacteriológica estéril, em placas com ágar-BHI. Em seguida, as placas foram mantidas por 36 horas a 37°C em estufa bacteriológica. As colônias foram contadas e os dados expressos em número absoluto por órgão (log10).

3.13 Imunofenotipagem das células do parênquima pulmonar

A mesma suspensão de células dos pulmões utilizada para determinação da carga bacteriana, descrita no item 3.11, foi utilizada para caracterizar as células dos pulmões. A suspensão foi submetida a separação em filcon 50 μ m (BD Bioscience- San Jose, CA, EUA) para obtenção das células em tubos cônicos de 15 mL, que em seguida foram centrifugadas a 1200 RPM a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise ACK (cloreto de amônio e potássio) durante 2 minutos para lisar as hemácias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de PBS 1x, e os tubos centrifugados novamente, e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de RPMI-C gelado. O número de células viáveis foi determinado usando solução de azul de Trypan e câmara de Neubauer, e assim, 1×10^6 células foram distribuídas em tubos de 1,5 mL para marcação. As células foram fixadas com PBS1x contendo 4% de formol por 11 minutos e após esse tempo, foi adicionado 1 mL de PBS 1x para redução da concentração de formol. Na etapa de lavagem, as células foram centrifugadas a 8000 RPM por 1 minuto a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de PBS 1x. Depois da lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado em Fc block (40 μ L por tubo) por 20 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. As células foram incubadas por 30 minutos, a 4°C, com os anticorpos acoplados à diferentes fluorocromos para marcação de cada uma das moléculas avaliadas, em tubos protegidos de luz. Após a marcação, as células foram lavadas mais uma vez com PBS 1x (centrifugação 8000 RPM por 1 minuto, 4°C) e então suspensas em tampão Cytfix Fixation Buffer

(554655, BD Bioscience- San Diego, CA, EUA) [133]. Os dados foram adquiridos no citômetro LSRFortessa (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e os dados analisados no software FlowJo (Ashland, OR, EUA). A lista de anticorpos, seus respectivos clones e fluorocromos estão listados abaixo.

Tabela 1- Lista de anticorpos utilizados na caracterização das células recuperadas dos pulmões.

Marcadores	Fluorocromos	Clones	Fabricantes
CD11b	FITC	M1/70	eBioscience
CD11b	APC	M1/70	BD
CD11c	BV421	N418	BioLegend
F4/80	PerCP-Cy5.5	BM8	eBioscience
MHC-II (I ^A /I ^E)	PE	M5/114.15.2	eBioscience
TLR2 (CD282)	Alexa Fluor 647	6C2	BD
TLR4 (CD284)	PE/Cy7	SA15-21	BioLegend
TLR6 (CD286)	BV421	C1N2	BD
CD14	BV510	rmC5-3	BD
Ly6G	BV510	1A8	BioLegend
CD45	APC Cy7	30F11	BD
CX3CR1	FITC	SA011F11	Biolegend
Ly6C	PE	HK1.4	eBioscience
Ly6G	PE/Cy7	1A8	BD

3.14 Preparo dos homogenatos de pulmões e baços para quantificação de proteínas, citocinas e mediadores lipídicos

Os lobos pulmonares superior e inferior direito foram retirados nos dias 0, 1, 3 e 7 após a infecção, colocados em tubos de 5 mL, pesados e congelados em freezer -80°C até o momento da obtenção dos homogenatos. No dia da homogeneização, foram adicionados 2 mL de RPMI-I em cada tubo, e em seguida os lobos foram triturados com auxílio do homogeneizador Turrax (IKA, Labortechnik, Staufen, Alemanha). O volume final foi separado em duas partes de 1 mL. Uma das partes foi transferida para tubos eppendorfs[®], na qual foi adicionado 1 mL de metanol gelado, e depois congeladas a -80°C para posterior extração de mediadores lipídicos. À outra parte foi adicionado inibidor de proteases a 1,6 mM (Complete, Roche, Indianápolis, IN, EUA) e em seguida homogeneizada e centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado em placas de poliestireno de 96 poços até o momento da quantificação de citocinas ou proteínas totais [134]. Para o baço, o homogenato obtido conforme item 3.12, foi centrifugado e o

sobrenadante coletado (com adição de inibidor de proteases) e acondicionado a -80°C para posterior quantificação de citocinas ou proteínas totais.

3.15 Quantificação de proteínas no parênquima pulmonar e no baço

Os sobrenadantes dos homogenatos de pulmões e baços, obtidos conforme item 3.14., foram utilizados para quantificação de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford *Coomassie Blue*, empregando kit comercial (Pierce- Rockford, IL, EUA), conforme especificações do fabricante.

3.16 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes dos homogenatos de pulmões (item 3.14) (diluídos 1:40), baço (puros) e soros (puros) dos camundongos infectados e controles foram utilizados para quantificação de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-17, IL-10, e das quimiocinas CXCL1 (KC), CCL2 (MCP-1) e CCL3 (MIP-1 α) (R&D – Minnesota, MN, USA). Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura específicos para as citocinas-alvo, e em seguida foi adicionado BSA1% para bloqueio das ligações inespecíficas. As amostras foram adicionadas para comparação com uma curva-padrão. Anticorpos ligados à biotina estrepto-avidina-peroxidase foram adicionados, e a reação foi revelada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB- BD Bioscience- San Diego, CA, EUA). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M (H_2SO_4). A leitura da densidade ótica das amostras foi realizada em filtro de 450 nm em espectrofotômetro de placa (*SpectraMax*, *Molecular Devices* – Sunnyvale, CA, EUA).

3.17 Quantificação de CD14 solúvel no BALF e no soro

Para mensurar os níveis de sCD14 utilizamos o sobrenadante do BALF (item 3.8) e o soro dos camundongos C57Bl/6 e *Tlr4*^{-/-}. Foi empregado o *Mouse CD14 Quantikine ELISA kit* (R&D Systems – Minnesota, MN, USA), segundo especificações do fabricante. O limite de detecção do teste foi de 0,66 a 6,15 pg/mL (média = 2,27 pg/mL).

3.18 Quantificação de nitrito

Para quantificação indireta de óxido nítrico, os sobrenadantes dos homogenatos de pulmões (item 3.14) também foram utilizados para quantificação de nitrito (NO_2^-) empregando o método de Griess [135]. Os sobrenadantes foram distribuídos em placa de 96 poços, bem como a curva-padrão, e em seguida foi adicionada a solução de Griess, composta

por NEED 0,1% (Sigma, St. Louis, MI, EUA) e Sulfanilamida 1% (Sigma, St. Louis, MI, EUA) na proporção 1:1 (v/v). Após 5 minutos em temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada por meio de espectrofotômetro *SpectraMax*, *Molecular Devices* – Sunnyvale, CA, EUA) a 554 nm.

3.19 Extração e quantificação de mediadores lipídicos dos pulmões

Ao 1 mL restante do sobrenadantes de homogenato pulmonar foram adicionados metanol (grau HPLC - Merck, Kenilworth, NJ, EUA) na proporção 1:1 (v/v), conforme já mencionado no item 3.14. Para quantificação dos eicosanoides, aos homogenatos foram adicionados solução contendo padrões internos deuterados (Cayman), em concentrações conhecidas (Tabela 2) e padronizadas anteriormente [136]. As amostras foram acidificadas com 50 µL de HCl 1N, centrifugadas a 2500 g por 5 minutos à 4°C, e o sobrenadante foi submetido a extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*), por meio de colunas HYPERSEP C18 (Thermo Scientific, Rockwood, TN, EUA), como já descrito [137]. A fração lipídica retida na coluna foi eluída com etanol (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e o solvente foi evaporado em *speed vacum* (Eppendorf, *concentrator plus*). Após, a massa seca de lipídios foi reconstituída em 100 µL de CH₃OH:H₂O (metanol:H₂O, 7:3 v/v). A análise dos mediadores lipídicos foi feita em HPLC-MS/MS (HPLC-MS/MS, do inglês “high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry”), empregando o equipamento HPLC-MS Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, HO, JP) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Triple - TOF 5600⁺ com fonte de ionização por ESI Turbo V (Sciex, Foster, CA, USA), situado na *facility* CEQIL (Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios) da FCFRP. Foi utilizada coluna cromatográfica de fase estacionária C18 Ascentis EXPRESS (Sulpeco – St. Louis, MO, EUA) de dimensões 100 mm x 46 mm, 2.7 µm. O volume de 10 µL de cada amostra foi introduzido ao sistema com uso de um auto-injetor e a eluição da mesma foi realizada utilizando sistema de gradiente binário, constituído de fase móvel “A” composta por H₂O:CH₃CN:CH₃COOH (água: acetonitrila: ácido acético, 70:30:0,02, v/v/v), e fase “B” composta por CH₃CN:CH₃CHOHCH₃ (acetonitrila : isopropanol, 70:30, v/v), de acordo com o seguinte gradiente: 0% de B em 0 min, 15% de B em 2 min, 20% de B em 8 min, 35% de B em 8 min, 35% de B em 11 min, 70% de B em 15 min, 100% de B em 19 min, 0% de B em 20 min, mantendo esta proporção até 25 min com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A fonte de ionização operou no modo negativo por varredura MRM^{HR} (monitoramento de reações múltiplas em alta resolução) para a identificação e quantificação dos eicosanoides. A aquisição e processamento

dos dados foram realizados pelos técnicos do CEQIL, Dr. Carlos Artério Sorgi e Dr.^a Viviani Nardini Takahashi, utilizando os softwares PeakView e MultiQuant (Sciex, Foster, CA, USA)

Tabela 2- Padrões analíticos empregados para a identificação e quantificação de mediadores lipídicos

Padrões	Tempo de retenção	Concentração (ng.mL ⁻¹)*
PGD ₂	5.56	400 – 1,85
PGE ₂	5.20	400 – 1,85
LTB ₄	10.54	400 – 1,85

*400 – 1,85: diluições nas concentrações de 400; 266; 177; 118; 59; 29; 14,80; 7,40; 3,70 e 1,85 ng.mL⁻¹

3.20 Extração de RNA dos pulmões e síntese de cDNA

O lobo inferior esquerdo dos camundongos foi retirado nos dias 0, 1, 3 e 7 após a infecção e armazenados em freezer -80°C até o momento da extração de RNA. Para a extração foi utilizada a metodologia do kit *PureLink RNA MiniKit* (Life technologies, Carlsbad, California, EUA) conforme recomendações do fabricante. A concentração e integridade do RNA extraído foram avaliadas por meio do equipamento *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Scientific, Rockwood, TN, EUA), que quantifica a ligação do RNA à sonda fluorescente do *Qubit RNA BR Assay* (Thermo Scientific, Rockwood, TN, EUA). Posteriormente, o RNA extraído foi utilizado para obtenção de 1500 ng de cDNA. Para isto, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA) e termociclador *Veriti Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA).

3.21 Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)

A expressão dos genes *Cd14* (Mm00438094_g1), *Tlr4* (Mm00445273_m1) e *Gapdh* (Mm99999915_g1) (Life Technologies- Carlsbad, CA, EUA) foi avaliada nos pulmões dos animais C57Bl/6 (WT), enquanto o gene *Lcn2* (Mm01324470_m1) (Life Technologies- Carlsbad, CA, EUA) foi avaliado nos pulmões dos camundongos WT, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-}. A expressão gênica em tempo real foi avaliada empregando o sistema *TaqMan* e o equipamento de PCR em Tempo Real *Step One Plus* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA). Todos os valores de expressão dos genes citados acima foram normalizados pelos valores da expressão do gene constitutivo (*Gapdh*). Para a construção do gráfico, a expressão gênica dos animais não infectados foram consideradas amostras de referências, sendo o 2^{-ΔΔCT} igual a 1 [138].

3.22 Análise estatística

Os resultados obtidos, analisados por meio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), sendo as diferenças estatísticas determinadas pela análise de variância (One-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas (Teste de Bonferroni), ou ainda o teste Two-way ANOVA para análises de dupla classificação (duas variáveis independentes), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para as análises de sobrevivência foi realizado o teste Log-Rank test e Mantel-Cox no pós-teste. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta a expressão TLR2 e TLR4 em neutrófilos e macrófagos, e de TLR6 em macrófagos

Nosso primeiro objetivo foi avaliar se a cepa de *A. xylosoxidans* utilizada neste trabalho induz mudanças na expressão de receptores da imunidade inata relacionados com o reconhecimento de bactérias Gram-negativas. Para isto, infectamos camundongos C57Bl/6 (WT) com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e avaliamos a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação para os receptores TLR2 (*Toll-like receptor 2*), TLR4 (*Toll-like receptor 4*), TLR6 (*Toll-like receptor 6*) e CD14 (*Cluster of differentiation 14*) em macrófagos ($CD45^+ CD11b^+ F4/80^+ MHC-II^+$) e em neutrófilos ($CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+$) isolados dos pulmões nos dias 1, 3 e 7 após a infecção (Figura 3). Nós observamos que nos macrófagos o pico de expressão de TLR4 e TLR6 ocorre no primeiro dia após a infecção, enquanto o aumento na expressão de TLR2 é observado apenas no terceiro dia. (Figura 3A). Por outro lado, nos neutrófilos, houve aumento da expressão de TLR2 no primeiro e terceiro dia após a infecção, ao passo que o pico na expressão de TLR4 ocorreu somente no primeiro dia (Figura 3B). Mudanças na expressão de CD14 não foram observadas em nenhum dos subtipos celulares nos tempos analisados.

FIGURA 3: A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta a expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos e neutrófilos. Camundongos C57Bl/6 (selvagem) foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 0, 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo pulmonar superior esquerdo foi removido, digerido com liberase e avaliado por citometria de fluxo quanto a expressão de TLR2, TLR4, TLR6 e CD14 em macrófagos ($CD45^+ CD11b^+ F4/80^+ MHC-II^+$) (A) e neutrófilos ($CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+$) (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de um experimento realizado ($n = 4-6$) e analisados pelo teste One-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0).

4.2 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* induz aumento da expressão gênica de *Cd14* e *Tlr4* no parênquima pulmonar.

Uma vez que a infecção por *A. xylosoxidans* induz aumento na expressão da proteína TLR4 e sabendo que essa molécula, juntamente com CD14, reconhece o LPS, avaliamos a expressão gênica desses dois receptores no tecido pulmonar de camundongos infectados. Por qRT-PCR, observamos que no primeiro dia após a infecção os genes *Cd14* (Figura 4A) e *Tlr4* (Figura 4B) aumentam respectivamente 40 e 10 vezes, quando comparados ao grupo inoculado com PBS (não infectado e referido como dia 0). No terceiro dia, a expressão de CD14 e de TLR4 permaneceu aumentada, se comparado com os animais não infectados, porém, menor em relação ao primeiro dia. Corroborando esses dados, podemos observar na figura 2C, que ocorre aumento na expressão de CD14 e TLR4 no parênquima pulmonar, quando estes foram avaliados por imuno-histoquímica.

FIGURA 4: A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta mRNA e expressão proteica de CD14 e TLR4. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 0, 1 e 3 após a infecção. O lobo pulmonar inferior esquerdo foi removido e o RNA extraído para análise da expressão gênica de *Cd14* (A) e *Tlr4* (B). A expressão gênica foi normalizada pelos valores da expressão de *Gapdh*. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de um experimento representativo de dois experimentos realizados ($n = 4-5$) e analisados pelo teste One-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0). Nos dias 0, 1 e 3 após a infecção o lobo direito médio foi removido, fixado em formalina e incorporado em parafina. Cortes de 5 μ m foram marcados com anticorpo primário anti-CD14 ou anti-TLR4, anticorpo secundário anti-IgG biotilado e substrato revelador. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina e analisadas por microscopia de luz, aumento de 400 x (C).

4.3 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta CD14 solúvel (sCD14) no BALF

Sabe-se que uma vez ativados, macrófagos, monócitos e outras células imunes liberam a forma solúvel da molécula CD14, que também é importante em contextos de infecções e sepse. Nesse sentido, investigamos se após a infecção por *A. xylosoxidans* ocorre a liberação dessas moléculas no espaço broncoalveolar. Para isso, infectamos animais C57Bl/6 com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e coletamos o BALF nos dias 0, 1, 3 e 7 após a infecção, para quantificação de sCD14 empregando kit comercial. Nossos dados mostram que a infecção induz a liberação dessa molécula durante todo o curso da infecção, com o pico de liberação no terceiro dia após a infecção (Figura 5).

FIGURA 5: A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* induz aumento de sCD14 no BALF. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*, eutanasiados nos dias 0, 1 e 3 após a infecção e tiveram seus pulmões lavados com PBS 1x. O BALF foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para quantificação de sCD14 por ELISA. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de um experimento realizado ($n = 4-7$) e analisados pelo teste One-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0).

4.4 A ausência de CD14 ou TLR4 confere resistência à infecção por *Achromobacter xylosoxidans*.

Nossos dados até agora demonstraram que as moléculas TLR4 e CD14 são positivamente reguladas durante a infecção por *A. xylosoxidans*, portanto, nosso próximo passo foi investigar se a ausência dessas moléculas confere susceptibilidade ou proteção aos camundongos infectados. Para isso, camundongos deficientes de CD14 (*Cd14*^{-/-}) ou TLR4 (*Tlr4*^{-/-}) e animais controles (C57Bl/6), foram infectados com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*, e a sobrevivência avaliada por até sete dias após a infecção. A figura 6 mostra que os camundongos deficientes de CD14 (Figura 6A) ou TLR4 (Figura 6B) são protegidos,

sendo que ao final de sete dias de infecção, 100% dos animais sobrevivem, ao passo que 100% dos camundongos C57Bl/6 morrem até o quinto dia após a infecção. Baseado nestes resultados, podemos deduzir que a ativação de CD14 ou de TLR4 é deletéria durante a infecção por *A. xylosoxidans*.

FIGURA 6: A ativação de CD14 ou de TLR4 confere susceptibilidade à infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} (A) ou *Tlr4*^{-/-} (B) foram infectados i.t. com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e observados diariamente para determinação da curva de sobrevivência. Os dados são representativos de três experimentos independentes (n = 8) e foram analisados pelo teste Log-rank e Mantel-Cox no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.5 A deficiência de TLR4, mas não de CD14, aumenta a carga bacteriana no primeiro dia após a infecção e diminui expressão de *Lcn2* no terceiro dia após a infecção nos pulmões.

Uma vez que a deficiência de CD14 e de TLR4 aumentou a sobrevivência dos animais infectados por *A. xylosoxidans*, nosso próximo passo foi avaliar a carga bacteriana, a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão gênica de lipocalina-2, importantes mediadores

da atividade microbicida em infecções bacterianas. Para isso, camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*, e nos dias 0, 1, 3 e 7 avaliamos a carga bacteriana nos pulmões, a produção de NO (método de Griess) e expressão do gene *Lcn2* por qRT-PCR. Quando comparados aos camundongos C57Bl/6, os camundongos *Cd14*^{-/-} não apresentam diferença na carga bacteriana, ao passo que os camundongos *Tlr4*^{-/-} possuem maior carga bacteriana no primeiro dia, mas carga semelhante à dos animais selvagens nos demais dias após a infecção (Figura 7A). Em relação a produção de NO, observamos que a infecção por *A. xylosoxidans* não induziu a produção desta molécula no parênquima pulmonar, mesmo na ausência de CD14 ou TLR4 (Figura 7B). Por outro lado, a infecção por *A. xylosoxidans* induz aumento na expressão gênica de lipocalina-2 nos pulmões, porém a deficiência de CD14 ou TLR4 não altera a expressão desse gene no primeiro dia após a infecção. No entanto, na ausência de TLR4, a expressão de *Lcn2* está diminuída no terceiro dia após a infecção, quando comparada aos animais C57Bl/6 (Figura 7C).

FIGURA 7: A ausência de TLR4, mas não de CD14, aumenta a carga bacteriana e diminui expressão de *Lcn2*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Os pulmões foram removidos e processados para análise da carga bacteriana pela obtenção das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (A); quantificação de nitrito pelo método de Griess (B) e análise da expressão gênica de *Lcn2* por qRT-PCR (C). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de um experimento representativo de dois experimentos realizados (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.6 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* se mantém restrita aos pulmões, mesmo na ausência de CD14 ou TLR4 e não altera peso e proteínas totais no baço

Com o objetivo de avaliar se *A. xylosoxidans* é capaz de se disseminar na presença ou ausência das moléculas CD14 ou TLR4, avaliamos a carga bacteriana também no baço dos animais das três linhagens. Outros parâmetros, como os níveis de IL-6, TNF- α , proteínas totais e o peso do órgão foram avaliados no baço. Para tanto, camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e foram eutanasiados nos dias 1 e 3 para remoção do baço. O baço foi pesado e em seguida homogeneizado para quantificação da carga bacteriana e para obtenção do sobrenadante, para quantificação de citocinas e proteínas totais. Observamos em camundongos C57Bl/6 que a infecção por *A. xylosoxidans* não se dissemina para o baço e não induz produção de IL-6 e TNF- α nesse órgão, mesmo na ausência de CD14 ou TLR4 (resultados não mostrados). Além disso, a

infecção não altera o peso (Figura 8A) e proteínas totais no baço (Figura 8B), e a ausência de CD14 ou TLR4 não altera esses parâmetros.

FIGURA 8: A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* se mantém restrita aos pulmões. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O baço foi removido, pesado (A) e processado para quantificação de proteínas totais (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento ($n = 3-4$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.7 A ausência de CD14 ou TLR4 preserva o parênquima pulmonar de animais infectados por *Achromobacter xylosoxidans*

Para avaliar o processo inflamatório induzido pela infecção por *A. xylosoxidans*, nós avaliamos as alterações histopatológicas pulmonares. Os pulmões foram seccionados para obtenção de cortes histológicos de 5 μ m, que foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia ótica nos aumentos de 25x (Figura 9A), 100x (Figura 10) e 400x (Figura 11A). Observamos que, somente nos animais selvagens houve aumento no infiltrado

celular no terceiro dia após a infecção, quando comparados ao grupo inoculados com PBS (dia 0). Na ausência de CD14 ou TLR4 observamos menor recrutamento de leucócitos no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (Figura 9A). O aspecto macroscópico dos pulmões está mostrado na Figura 9B, onde podemos observar menor dano pulmonar nos camundongos *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-}. A porcentagem de área infiltrada por leucócitos foi avaliada empregando o *software* ImageJ, realizada com sete imagens (400x) obtidas de cada amostra para a quantificação (Figura 11B).

FIGURA 9: A deficiência de CD14 ou TLR4 preserva o parênquima pulmonar na infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14^{-/-}* e *Tlr4^{-/-}* foram infectados i.t.com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. No terceiro dia após a infecção, os pulmões foram retirados e fotografados para análise macroscópica (B). O lobo direito médio foi removido, fixado em formalina e incorporado em parafina. Cortes de 5 μ m foram corados por HE e analisados por microscopia de luz, em aumento 25x (A).

FIGURA 10: Na deficiência de CD14 ou TLR4 ocorre redução no infiltrado de células para o parênquima pulmonar na infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14^{-/-}* e *Tlr4^{-/-}* foram infectados i.t.com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo direito médio foi removido, fixado em formalina e incorporado em parafina. Cortes de 5 μ m foram corados por HE e analisados por microscopia de luz, em aumento 100x.

FIGURA 11: Animais deficientes de CD14 ou TLR4 têm menor área de lesão nos pulmões após infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14^{-/-}* e *Tlr4^{-/-}* foram infectados i.t.com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo direito médio foi removido, fixado em formalina e incorporado em parafina. Cortes de 5 μ m foram corados por HE e analisados por microscopia de luz, em aumento 400x (A). Sete imagens de cada amostra foram quantificadas no *software* Image J quanto a porcentagem de área infiltrada (B).

4.8 Animais deficientes de CD14 ou TLR4 têm menos extravasamento de proteínas e edema pulmonar menos intenso durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*.

Visto que a ausência das moléculas CD14 ou TLR4 os animais apresentam menos lesão nos pulmões que os animais selvagens, avaliamos a seguir o impacto da ausência dessas moléculas no edema pulmonar. Para tanto, em camundongos selvagens ou deficientes de CD14 ou TLR4, avaliamos o extravasamento de proteínas para o parênquima pulmonar e o peso do órgão, nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Após serem eutanasiados, os pulmões foram removidos e pesados, e proteínas totais determinadas pelo método de Bradford. Nossos dados mostram que no terceiro dia após a infecção ocorreu aumento do peso pulmonar (Figura 12A), e do extravasamento de proteínas (Figura 12B), quando comparados aos animais inoculados com PBS (dia 0). Observamos ainda que os camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentaram menor peso e menos acúmulo de proteínas nos pulmões no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (WT). A menor concentração de proteínas totais também ocorre no BALF dos camundongos deficientes de CD14 quando comparado ao grupo C57Bl/6 (Apêndice). Não foram detectadas diferenças entre as linhagens nos dias 1 ou 7 após a infecção.

FIGURA 12: Camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentam edema pulmonar menos intenso quando comparados com os animais selvagens. Camundongos C57BL/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. (A) Os pulmões foram removidos e pesados. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento independente ($n = 4-6$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. (B) Os lobos inferior e superior direito foram processados para quantificação de proteínas totais. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de um experimento representativo de três experimentos realizados ($n = 4-6$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0); # C57BL/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.9 A ausência de CD14 e TLR4 altera o recrutamento de leucócitos para os pulmões após a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*

A composição celular é um fator determinante na produção de citocinas, quimiocinas, eicosanoides e outras moléculas efetoras no controle de diversas infecções. Nesse contexto, caracterizamos as células recrutadas para os pulmões após a infecção por *A. xylosoxidans*. As células foram obtidas do tecido pulmonar por digestão enzimática, e posteriormente marcadas com anticorpos anti as seguintes moléculas de superfície CD45, Ly6G, Ly6C, CD11c, CD11b, F4/80, MHC-II e CX₃CR1 para determinação de células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e monócitos patrulheiros. Para caracterização das células dendríticas utilizamos a

estratégia ilustrada na Figura 13A. Nossos dados mostram que no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos animais não infectados (dia 0), ocorre aumento no número de células dendríticas, caracterizadas pela expressão de $CD45^+ CD11c^+ MHC-II^+ CD11b^+$. Camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 não apresentaram diferenças no recrutamento dessas células quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado (Figura 13B). No sétimo dia após a infecção, o número destas células diminuiu para valores semelhantes aos encontrados no primeiro dia de infecção ou dos animais não infectados.

A estratégia de análise para determinar infiltrado de neutrófilos está ilustrada na Figura 14A. Observamos que a infecção por *A. xylosoxidans* induz intenso recrutamento de neutrófilos ($CD45^+ Ly6G^+$) nos dias 1 e 3 após a infecção, ao passo que no dia 7 o número destas células se encontra em níveis basais. Nossos dados também mostram que as moléculas CD14 ou TLR4 são essenciais para o recrutamento dessas células, uma vez que na ausência desses receptores os números de neutrófilos nos dias 1 e 3 após a infecção estão bastante reduzidos, quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado (Figura 14B). O menor recrutamento de neutrófilos também ocorre no BALF dos camundongos deficientes de CD14 quando comparado ao grupo C57Bl/6 (Apêndice). Não foi observada nenhuma diferença no dia 7 após a infecção, quando comparados com animais não infectados.

Avaliamos também a presença de macrófagos no parênquima pulmonar, utilizando a estratégia representadas na Figura 15A. Nossos dados mostram que nos animais C57Bl/6 e deficientes de TLR4 não ocorre diferença no número de macrófagos expressando $CD45^+ CD11b^+ F4/80^+$ em nenhum dos tempos avaliados, ao passo que no sétimo dia após a infecção, os animais deficientes de CD14 apresentam elevado número destas células quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado (Figura 15B). Ainda avaliamos macrófagos expressando MCH-II, um marcador de ativação. Não encontramos diferenças no número destas células no primeiro dia, porém, a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta essa população de células nas três linhagens de camundongos avaliadas no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos grupos não infectados. No sétimo dia, os animais C57Bl/6 apresentem maior número destas células quando comparados ao grupo não infectado, e de forma interessante, os animais *Cd14^{-/-}* apresentam elevado número destas células quando comparados aos animais C57Bl/6 infectados (Figura 15C).

Para avaliar o recrutamento de monócitos patrulheiros nos pulmões, utilizamos a estratégia representada na Figura 16A. Essas células em camundongos são caracterizadas

como CX3CR1^{high} Ly6C⁻, e observamos que o número absoluto dessas células só aumenta no sétimo dia após a infecção, nas três linhagens de camundongos avaliadas, em relação aos grupos não infectados (dia 0). Curiosamente, camundongos deficientes de TLR4 possuem esse número reduzido quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado (Figura 16B).

FIGURA 13: A ausência de CD14 ou TLR4 não altera o número de células dendríticas nos pulmões após infecção por *Achromobacter xylosoxidans*, quando comparado com animais selvagens. Camundongos C57Bl/6, Cd14^{-/-} e Tlr4^{-/-} foram infectados i.t. com 2,0 x10⁷ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo superior esquerdo foi removido, digerido e avaliado quanto a presença de células dendríticas por citometria de fluxo. Estratégia de análise está representada em A. O número absoluto de células expressando CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ está representado em B. Os dados estão expressos como média ± EPM representativos de um experimento realizado (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs Cd14^{-/-} ou Tlr4^{-/-}.

FIGURA 14: Na ausência de CD14 ou TLR4 há menor recrutamento de neutrófilos para os pulmões durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*, quando comparados com animais selvagens. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo superior esquerdo foi removido, digerido e avaliado quanto a presença de neutrófilo por citometria de fluxo. Estratégia de análise está representada em A. O número absoluto de células expressando CD45⁺Ly6G⁺ está representado em B. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento realizado (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

FIGURA 15: A ausência de CD14 aumenta o número de macrófagos intersticiais expressando MHC-II nos pulmões quando comparado ao grupo selvagem. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo superior esquerdo foi removido, digerido e avaliado quanto a presença de macrófagos por citometria de fluxo. A estratégia de análise está representada em A. O número absoluto de células expressando CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ está representado em B. O número absoluto de macrófagos expressando MHC-II está representado em C. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativo de um experimento realizado (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

FIGURA 16: Na ausência de TLR4 ocorre diminuição no número de monócitos patrulheiros no sétimo dia após infecção quando comparado ao grupo selvagem. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo superior esquerdo foi removido, digerido e avaliado quanto a presença de monócitos patrulheiros por citometria de fluxo. Estratégia de análise está representada em A. O número absoluto de células expressando CX3CR1^{high} Ly6C^{low} está representado em B. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento realizado ($n = 4-6$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.10 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta o número de neutrófilos expressando CD14 ou TLR4

Como mostrado acima, os neutrófilos são as células recrutadas em maior número para o parênquima pulmonar durante a infecção por *A. xylosoxidans*, e CD14 e TLR4 são importantes para este evento. Além disso, nossos dados sugerem que estes dois receptores são essenciais para a inflamação pulmonar e mortalidade, induzidas durante pela infecção. Assim, nosso próximo passo foi investigar a expressão das moléculas CD14 e TLR4 nos neutrófilos. Para tanto, em animais selvagens ou deficientes de CD14 ou TLR4, avaliamos o número de neutrófilos expressando CD14 ou TLR4 por citometria de fluxo.

Nossos dados mostram que a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta significativamente o número de neutrófilos expressando CD14 no primeiro dia após a infecção quando comparado aos animais não infectados (dia 0). No entanto, camundongos deficientes de TLR4 apresentam redução no número de neutrófilos expressando CD14 no primeiro dia após a infecção, quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (WT), como mostra a Figura 17A. Por outro lado, nos animais C57Bl/6, a infecção induz o aumento significativo de neutrófilos expressando TLR4 somente no terceiro dia após a infecção, quando comparado aos camundongos não infectados (dia 0). Também, a ausência de CD14 diminui o número de neutrófilos expressando TLR4, quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (Figura 17B).

A

B

FIGURA 17: A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta o número de neutrófilos expressando CD14 ou TLR4 nos pulmões. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. O lobo superior esquerdo foi removido, digerido e avaliado quanto a presença de neutrófilos (CD45⁺ Ly6G⁺) expressando CD14 (A) ou TLR4 (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento realizado (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.11 A ausência de CD14 ou TLR4 altera a produção de citocinas durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*

Estímulos infecciosos ou o dano tecidual são capazes de ativar PRRs presentes em diversas células, culminando na produção de citocinas e outros mediadores, cujas funções incluem recrutar células e promover a defesa do hospedeiro. Nesse contexto, avaliamos o impacto das moléculas CD14 e TLR4 na produção de citocinas nos pulmões após a infecção por *A. xylosoxidans*. Nossos dados demonstram que a infecção por *A. xylosoxidans* induz a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β e IL-17, principalmente no primeiro e terceiro dias após a infecção (Figura 18). Por outro lado, não há alterações na produção de IL-10 (dado não mostrado). Observamos ainda que camundongos deficientes de CD14 têm redução na produção de TNF- α no primeiro dia (Figura 18A) e de IL-6 (Figura 18B) no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos animais C57Bl/6 (WT). No entanto, a ausência de TLR4, resulta na diminuição da produção de TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β (Figura 18A-D). Além disso, nossos dados mostram que a produção de IL-17 é independente de CD14 e TLR4 (Figura 18E).

FIGURA 18: Em diferentes períodos após infecção por *Achromobacter xylosoxidans*, CD14 ou TLR4 são essenciais para a produção de TNF-α, IL-6, IL-1α e IL-1β, mas não de IL-17. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com 2,0x10⁷ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Os lobos inferior e superior direito foram removidos, homogeneizados e avaliados quanto à produção de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-1α (C), IL-1β (D) e IL-17 (E) nos sobrenadantes. Os dados estão expressos como média ± EPM representativo de um experimento de três experimentos realizados (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.12 A ausência de CD14 ou TLR4 diminui a produção de quimiocinas durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*

Visto que a ativação de CD14 e TLR4 é essencial para a produção de citocinas, nosso próximo passo foi avaliar se a ausência desses receptores influencia na produção de algumas quimiocinas, potentes em recrutar células para o local da infecção. Nossos dados mostram que a infecção por *A. xylosoxidans* induz aumento significativo na produção de CXCL1 (Figura 19A), CCL2 (Figura 19B) e CCL3 (Figura 19C) no primeiro e terceiro dia após a infecção, quando comparado ao grupo não infectado (dia 0). Camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentaram níveis reduzidos dessas quimiocinas quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (WT) no terceiro dia após a infecção.

FIGURA 19: CD14 e TLR4 são essenciais para a produção de CXCL1, CCL2 e CCL3 durante a infecção pulmonar por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Os lobos inferior e superior direito foram removidos, homogeneizados e avaliados quanto à produção de CXCL1 (A), CCL2 (B) e CCL3 (C) nos sobrenadantes. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativo de um experimento de três experimentos realizados ($n = 4-6$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não-infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.13 A deficiência de CD14 ou TLR4 impacta na produção de LTB₄ na infecção por *Achromobacter xylosoxidans*

Visto que os eicosanoides são importantes moduladores do processo inflamatório e que, como já mostrado pelo nosso grupo, leucotrieno B₄ (LTB₄) é essencial para a atividade microbicida eficientes de macrófagos contra o *A. xylosoxidans*, avaliamos se a ausência de CD14 ou TLR4 impacta na produção deste e outros mediadores lipídicos. Para isto, os pulmões dos camundongos foram homogeneizados e a fração lipídica extraída em coluna C18. A concentração de LTB₄, prostaglandina D₂ (PGD₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂) foram determinadas por HPLC-MS/MS, como mostra a figura 20. Nossos dados mostram que a infecção por *A. xylosoxidans* induz LTB₄ no primeiro dia após a infecção, quando comparado com os camundongos não infectados (dia 0). No entanto, camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentaram diminuição de LTB₄, quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado, no primeiro dia. Não foram observadas diferenças no terceiro e sétimo dia após a infecção, sendo que a produção de LTB₄ retorna aos níveis basais (Figura 20A). A Figura 20 B mostra o cromatograma representativo de LTB₄ no primeiro dia após a infecção. Por outro lado, observamos aumento de PGD₂ no sétimo dia após a infecção somente nos animais selvagens e nos deficientes de CD14 (Figura 20C). Em relação à liberação de PGE₂, observamos maior produção deste eicosanoide em pulmões dos animais selvagens ou deficientes de CD14 somente no terceiro e sétimo dia após a infecção, quando comparados aos camundongos não infectados. Camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 não apresentam diferenças na produção desse mediador quando comparados ao grupo C57Bl/6 infectado (Figura 20D).

FIGURA 20: Na ausência de CD14 ou TLR4 ocorre diminuição na produção de LTB₄, mas não de PGD₂ e PGE₂ durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com 2,0x10⁷ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção. Os lobos inferior e superior direito foram removidos, homogeneizados e a fração lipídica foi avaliada quanto à produção de LTB₄ (A, B), PGD₂ (C) e PGE₂ (D) por HPLC-MS/MS. Os dados estão expressos como média ± EPM representativos de um experimento de três experimentos realizados (n = 4-6) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.14 A infecção por *Achromobacter xylosoxidans* aumenta a concentração sCD14 e IL-6 no sangue circulante, mas não igualmente nas três linhagens animais.

Já é conhecido que em processos inflamatórios intensos, incluindo aquele induzido pelo LPS, que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células imunes no local afetado podem se difundir e atingir circulação sistêmica, podendo causar choque endotoxêmico. Além das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , concentrações elevadas sCD14 no soro são importantes marcadores de choque endotoxêmico [139], [140]. Sabendo disso, nosso próximo passo foi avaliar se a infecção pulmonar por *A. xylosoxidans* aumenta as concentrações séricas de IL-6 e sCD14 séricos nos primeiros dias após a infecção, e qual o impacto da deficiência de CD14 ou TLR4. A figura 21A mostra que no primeiro dia após a infecção ocorre aumento significativo na concentração de IL-6 no soro dos camundongos C57Bl/6 (WT) quando comparado aos camundongos não infectados (dia 0). No entanto, camundongos deficientes de CD14 apresentam níveis séricos de IL-6 reduzidos quando comparados ao grupo WT no primeiro dia após a infecção, sendo que esta citocina não foi detectada no soro dos animais deficientes de TLR4 em nenhum dos dias analisados. Em relação à presença de sCD14 no soro, assim como ocorre no BALF, a infecção induz aumento dessa molécula no primeiro e terceiro dia após a infecção, quando comparado ao grupo não infectado (dia 0). Os resultados ainda mostram que o aumento dessa molécula no soro é dependente de TLR4 (Figura 21B).

FIGURA 21: Na ausência de CD14 ou TLR4 ocorre diminuição de sCD14 e IL-6 séricos durante a infecção por *Achromobacter xylosoxidans* quando comparados aos animais selvagens. Camundongos C57Bl/6, *Cd14*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e eutanasiados nos dias 1 e 3 após a infecção. O sangue foi coletado, o soro foi obtido e utilizado para quantificação de IL-6 (A) e sCD14 (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM representativos de um experimento realizado ($n = 3-4$) e analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-} ou *Tlr4*^{-/-}.

4.15 A ausência de NFAT1 não altera a mortalidade após infecção por *Achromobacter xylosoxidans*.

A família dos Fatores Nucleares de Células T Ativadas (NFAT) compreende fatores de transcrição que regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos, e em células dendríticas. Já foi relatado que esses fatores de transcrição podem ser ativados exclusivamente via CD14 e essa via induz edema de pele após administração de LPS [102]. Nesse contexto, avaliamos se a ausência de NFAT1 poderia impactar na mortalidade dos animais infectados. Para isso, camundongos deficientes de NFAT1 (*Nfat1*^{-/-}) e seus controles, C57Bl/6, foram infectados com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*, e a sobrevivência avaliada diariamente por sete dias. A figura 22 mostra 100% de mortalidade dos animais deficientes de NFAT1 até

o quarto dia após a infecção, e 80% dos camundongos WT ao final de sete dias após a infecção. No entanto, não observamos diferenças estatisticamente significantes na mortalidade entre os dois grupos.

FIGURA 22: A ausência de NFAT1 não modifica a mortalidade após infecção por *Achromobacter xylosoxidans*. Camundongos C57Bl/6 e *Nfat1*^{-/-} foram infectados i.t. com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* e observados diariamente para determinação da curva de sobrevivência. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=6-8) e foram analisados pelo teste Log-rank e Mantel-Cox no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.16 Somente *Achromobacter xylosoxidans* viável é capaz de induzir mortalidade e IL-6 nos pulmões

Visto que a ausência de CD14 ou TLR4 não altera os mecanismos microbicidas aqui avaliados, nós hipotetizamos que a resposta inflamatória e mortalidade observadas seriam decorrentes da produção de LPS pela bactéria, independente de outros fatores de virulência e metabolismo bacteriano ativo. Para elucidar essa questão, inoculamos camundongos C57Bl/6 com suspensão de $6,3 \times 10^7$ bactérias inativadas pelo calor (90°C por 30 minutos) ou mesmo inóculo de bactérias viáveis. Nestes animais avaliamos a sobrevivência durante sete dias, e como mostrado na Figura 23A, 100% dos camundongos inoculados com a bactéria inativada sobrevivem, enquanto cerca de 80% daqueles infectados com a bactéria viável, morrem. Estes dados sugerem que algum (s) fator (es) liberado (s) pela bactéria viva, induz inflamação e morte dos animais. Para confirmar essa hipótese, quantificamos IL-6 nos pulmões e soro no primeiro dia após a infecção, em ambos os grupos experimentais. Nossos dados mostram que

há redução na produção de IL-6 nos pulmões dos camundongos inoculados com a bactéria inativada pelo calor no primeiro dia após a infecção, quando comparados aos camundongos infectados pela bactéria viável (Figura 23B). Apesar de não observarmos diferenças estatísticas, os dados sugerem que a produção de IL-6 é dependente de algum fator liberado por bactérias vivas. Futuros experimentos serão realizados para melhor elucidar este fenômeno.

FIGURA 23: Camundongos inoculados com *Achromobacter xylosoxidans* inativadas pelo calor apresentam maior sobrevivência e redução de IL-6 nos pulmões. Camundongos C57Bl/6 foram infectados ou desafiados i.t. com $6,3 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans* viáveis ou inativadas pelo calor (90°C por 30 minutos) e observados diariamente para determinação da curva de sobrevivência (A). Em experimento independente, os lobos pulmonares inferior e superior direito foram removidos, homogeneizados e avaliados quanto à produção de IL-6 no primeiro e terceiro dia após a infecção. (B). O sangue foi coletado para obtenção do soro e posterior avaliação de IL-6 sérica (C). O dado de sobrevivência é representativo de um experimento independente ($n = 8$) e foi analisado pelo teste Log-rank e Mantel-Cox no pós-teste. Os dados de quantificação de IL-6 são representativos de um experimento realizado ($n = 4$) e foram analisados pelo teste One-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, *infectados vs não infectados (PBS); #A.x. viável vs A.x. inativada.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O reconhecimento de PAMPs pelas células imunes é a primeira etapa para início da resposta imune, cujo objetivo é eliminar o agente agressor [89], [141]. Os receptores da imunidade inata (PRRs), principalmente os TLRs, são sensores que detectam moléculas expressas por patógenos, mas não pelo hospedeiro, como o LPS. Essa molécula é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, e é classicamente reconhecida por TLR4 e CD14 [66], [67]. Além de LPS, peptidoglicano, lipoproteínas e glicoproteínas também estão presentes na estrutura do envelope dessa classe de bactérias, e são comumente reconhecidos por dímeros TLR1:TLR2 ou TLR2:TLR6 [142]. Algumas bactérias ainda possuem flagelina, principal componente do flagelo bacteriano, potente ativador de TLR5 [142], [143]. Motivos CpG não metilados, comuns em DNA procariótico, são reconhecidos por TLR9 [142]. Todos esses receptores, quando funcionais, são eficientes ativadores da resposta imune [62]. No entanto, até o presente, nada se sabia sobre os receptores da imunidade inata importantes para o reconhecimento de *A. xylosoxidans*. Assim, tivemos como objetivo inicial, investigar na infecção por *A. xylosoxidans* quais PRRs estão aumentados nos pulmões. Observamos em animais selvagens que no primeiro e terceiro dia após a infecção ocorre aumento expressivo de TLR2, TLR4 e TLR6 em macrófagos (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ MHC-II⁺) isolados dos pulmões. Além disso, a infecção induz aumento de TLR2 e TLR4 em neutrófilos (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺). Observamos também que durante a infecção há aumento da expressão de mRNA de CD14 e TLR4 no parênquima pulmonar. Nossos dados são semelhantes à outros da literatura reportando que bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*; *K. pneumoniae*; *L. pneumophila* e *B. pseudomallei*, também aumentam expressão de TLR2, TLR4 e/ou TLR6 nos pulmões [144]–[149]. Baseado nestes resultados, nosso próximo passo foi investigar o papel de CD14 e do TLR4 nesta infecção. Futuramente iremos investigar o papel de TLR2, uma vez que sua expressão também foi aumentada após a infecção.

Embora tenham vários trabalhos descrevendo o papel de CD14, principalmente em modelos utilizando LPS, ainda existem diversas lacunas e resultados controversos, principalmente em relação à contribuição dessa molécula na patogênese de infecções. Neste estudo, mostramos que a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta a expressão gênica e proteica de CD14, além de sCD14 no BALF e no soro, quando comparados aos camundongos não

infectados. Nossos dados estão de acordo com outros, demonstrando que ocorre aumento na produção de CD14 de membrana ou solúvel, em diversas condições, como asma [101], [150]; tabagismo [98]; ceratite [151]; doença renal [106]; sepse [139], [152], [153]; colestase (bloqueio ou diminuição do fluxo de bile do fígado) [154]; miocardite [105]; colite [116] e pneumonias [155], [156]. Interessante, que entre os estudos publicados, alguns sugerem que CD14 tem um papel protetor no intestino pois aumenta a função de barreira intestinal em modelo de colite [116], mas deletério em casos de infecções sistêmicas ou pulmonares por potencializar a inflamação [157].

Até o presente, sabe-se que CD14 tem papel crucial no controle da infecção por *E. coli* em coelhos. Constatou-se que coelhos pré-tratados com anti-CD14 e infectados com *E. coli* tiveram melhora na pressão arterial média, mas apresentaram níveis de nitrato/nitrito reduzidos no sangue e maior carga bacteriana no BALF, quando comparados aos coelhos tratados com anticorpo isótipo controle. Curiosamente, o bloqueio de CD14 não alterou os níveis de TNF- α , IL-8, MCP-1 nem a contagem de polimorfonucleares no sangue e no BALF. Os autores sugeriram que CD14 tem um papel duplo nesse modelo de infecção, pois a inibição sistêmica de CD14 reduz a hipotensão induzida pela bactéria, mas prejudica a eliminação da bactéria nos pulmões, local primário da infecção [158]. Por outro lado, em estudo realizado por Haziot e colaboradores em 1996, foi mostrado que camundongos deficientes de CD14 são resistentes ao choque séptico induzido por LPS ou por *E. coli* (inoculados via i.p.), quando comparados aos camundongos selvagens. Essa proteção foi justificada pelo fato de camundongos deficientes de CD14 apresentarem menor carga bacteriana no sangue e nos pulmões, além de níveis séricos de TNF- α e IL-6 reduzidos quando comparados ao grupo selvagem [110]. Resultados semelhantes foram encontrados por Wiersinga e colaboradores, que mostraram que camundongos deficientes de CD14, ao serem infectados (via i.n.) com *B. pseudomallei*, apresentaram menor mortalidade e redução da carga bacteriana nos pulmões, no entanto, não foi observada diferença na capacidade fagocítica de macrófagos ou neutrófilos *Cd14*^{-/-} infectados, quando comparados às células de camundongos selvagens [123]. Nossos dados corroboram parcialmente os dados acima, uma vez que também observamos maior sobrevivência dos camundongos deficientes de CD14 após a infecção (bem como os deficientes de TLR4) (Figura 6) quando comparados ao grupo selvagem (C57Bl/6), porém sem diferenças na carga bacteriana nos pulmões (Figura 7A). Interessante que animais deficientes de TLR4 também sobrevivem mais, embora apresentem maior carga bacteriana nos pulmões no primeiro dia após a infecção (Figura 7A). Assim, podemos sugerir que a sinalização via TLR4 seja essencial para a indução de mecanismos

microbicidas essenciais somente nas primeiras horas após a infecção. Embora não tenhamos identificados claramente quais os mecanismos microbicidas responsáveis pelas diferenças entre as linhagens de camundongos, observamos que (Figura 7C), nos animais selvagens infectados por *A. xylosoxidans* ocorre aumento na expressão gênica de lipocalina-2, um peptídeo antimicrobiano produzido principalmente por neutrófilos, e que é conhecido por reduzir o crescimento bacteriano por meio do sequestro de ferro [159]. No entanto, a ausência de CD14 não alterou a expressão de Lcn-2, ao passo que a ausência de TLR4 diminui a expressão desse peptídeo antimicrobiano no terceiro dia após a infecção, sugerindo a contribuição desta molécula para o controle da infecção. Assim, podemos propor que outros mecanismos, além da expressão de Lcn-2, estão envolvidos no controle desta infecção, e que estes podem ser diferentes dependendo da presença ou não de CD14 e/ou TLR4. Estudos futuros deverão ser realizados para elucidar estes mecanismos. No entanto, nossos resultados indicam que a maior sobrevivência dos animais deficientes de CD14 ou TLR4 não está relacionada com a carga bacteriana nos pulmões.

Nosso próximo passo foi avaliar o impacto da deficiência de CD14 e de TLR4 no processo inflamatório pulmonar desencadeado por *A. xylosoxidans*. Observamos em animais selvagens que a infecção induz intenso recrutamento de células para os pulmões, principalmente no terceiro dia, quando comparados com camundongos não infectados (Figuras 13-15). No entanto, na ausência de CD14 ou TLR4 o edema (Figura 12), o recrutamento de neutrófilos (Figura 14) e a área de lesão nos pulmões (Figura 11) foram significativamente menores, fatos que se correlacionam com a menor produção de citocinas e quimiocinas, como IL-6, TNF- α (Figura 18) CXCL1, CCL2 e CCL3 (Figura 19), que são descritas na literatura como potentes quimioatraentes para neutrófilos [160]–[164] e indutores de edema [165]–[168]. Estes resultados indicam que o processo inflamatório nos pulmões é responsável pela morte dos animais. Nossos dados são semelhante à outros da literatura, que demonstram que na infecção por *M. tuberculosis* o processo inflamatório pulmonar também é menor na ausência de CD14 [169]. No entanto, em animais deficientes de TLR4 infectados por *P. aeruginosa* o menor edema só foi observado nas primeiras 4 horas [170]. Por outro lado, dados contrários aos nossos também foram publicados, demonstrando que a ausência de TLR4 leva ao aumento do edema nos pulmões de camundongos infectados com *B. pertussis*, pois diminui a produção de IL-10 pelas células T reguladoras [171].

Em nosso trabalho, observamos pela análise histológica dos pulmões, que ocorre intenso recrutamento destes granulócitos para os pulmões dos animais selvagens, mas com

menor intensidade naqueles deficientes de CD14 ou de TLR4. Assim, para confirmar as diferenças no recrutamento de neutrófilos para os pulmões após a infecção por *A. xylosoxidans* empregamos citometria de fluxo e anticorpos para os marcadores CD45⁺ e Ly6G⁺ [172]. Como esperado, observamos nos animais selvagens que a infecção induz intenso recrutamento de neutrófilos para os pulmões no primeiro e terceiro dia após a infecção (Figura 14), evento clássico após infecção por bactérias [173]. Corroborando com dados da literatura, observamos que camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 possuem menor recrutamento de neutrófilos para os pulmões, quando comparados aos camundongos selvagens. O número absoluto de neutrófilos também foi menor no BALF de camundongos deficientes de CD14 em relação ao dos camundongos selvagens (Apêndice). Em modelo de instilação de LPS por aerossóis, foi demonstrado também que camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentam redução no número de neutrófilos bem como nos níveis de MPO no BALF, quando comparados aos camundongos selvagens [174], dados estes que se assemelham aos nossos. Resultados similares foram encontrados em estudo no qual camundongos selvagens, deficientes de CD14 ou TLR4 foram infectados com *A. baumannii*, pois mostraram que a deficiência de TLR4 resultou em níveis reduzidos de TNF- α , IL-6, MIP-2 e CXCL1, além de maior recrutamento de macrófagos alveolares e menor de neutrófilos no BALF. Contudo, a ausência de CD14 não alterou o número de nenhum dos tipos celulares avaliados no BALF [175], dado este divergente do encontrado em nosso modelo de infecção. Por outro lado, a deficiência de CD14 resultou em menor migração de neutrófilos para o espaço bronchoalveolar após infecção com *S. pneumoniae*, quando comparado com camundongos selvagens [156]. Neutrófilos são células essenciais para os mecanismos de defesa nas infecções bacteriana, pois após serem ativados expressam mais PRRs, como TLR4, TLR2 e CD14, produzem citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, eicosanoides, como LTB₄ e peptídeos antimicrobianos, essenciais para resposta imune protetora [176]. No entanto, quando excessiva, a inflamação mediada por neutrófilos pode levar à destruição tecidual, e uma condição clínica chamada lesão pulmonar aguda (LPA) [173], [177]. Nesse contexto, o processo inflamatório, especialmente na LPA, deve ser finamente regulado, objetivando a diminuição do recrutamento de neutrófilos e o edema, sem, contudo, prejudicar os mecanismos de defesa antibacterianos [177], [178]. Novamente, nossos dados sugerem que o processo inflamatório mediado por CD14 e TLR4 contribuem significativamente para a inflamação pulmonar e morte dos animais infectados com *A. xylosoxidans*.

Apesar de classicamente ser considerado marcador de macrófagos e monócitos, foi descrito que CD14 também é expresso na superfície e nos grânulos azurófilos de neutrófilos, que inclusive podem liberar uma forma solúvel do CD14, semelhante à liberada pelos monócitos. Os neutrófilos respondem ao LPS via CD14 produzindo TNF- α , e participam diretamente da resposta inflamatória aguda [179], [180]. Nesse contexto, foi demonstrado que crianças asmáticas com mutações na expressão de CD14 em neutrófilos circulantes respondem menos à componentes bacterianos, quando comparadas com crianças que possuem expressão normal de CD14 [181]. Visto que a infecção por *A. xylosoxidans* não induz expressão de CD14 na população de macrófagos avaliada (Figura 3), investigamos se ocorreria aumento da expressão dessa molécula nos neutrófilos. Observamos que no primeiro dia após a infecção, ocorre acentuado recrutamento de neutrófilos expressando CD14, o que se correlaciona com maior expressão gênica desse co-receptor no parênquima pulmonar no primeiro dia após a infecção (Figura 4). Observamos ainda que na ausência de TLR4, há menor número de neutrófilos expressando CD14, quando comparados aos animais selvagens. De forma semelhante, na ausência de CD14 observamos menor número absoluto de neutrófilos expressando TLR4, quando comparados aos selvagens (Figura 17). Nossos dados corroboram dados encontrados em estudo que utilizou modelo de dano agudo induzido por LPS inoculado em glândulas mamárias de bovinos. Neste estudo foi observado que os animais apresentaram maior número de neutrófilos expressando CD14 no lavado mamário 24 horas após o LPS, e que após 96 horas o número de neutrófilos CD14⁺ retorna a níveis basais, quando comparado ao grupo inoculado com PBS [182]. Baseado nestes dados, sugerimos que a inflamação pulmonar induzida por *A. xylosoxidans* é desencadeada, em parte pela ativação de neutrófilos, via interação da bactéria e/ou LPS com CD14.

As células dendríticas também são essenciais na resposta imune às infecções, pois após ativação de PRRs, constituem importante fonte de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-12, e ainda direcionam linfócitos T *naïve* para expansão clonal para se tornarem linfócitos T antígeno-específicos [183]. Além disso, foi demonstrado que a depleção de células dendríticas plasmocitoides (pDC) culmina no aumento de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de monócitos para os pulmões, mostrando papel regulador dessas células na inflamação pulmonar em modelo de sepse [184]. Foi demonstrado que 48 horas após infecção de camundongos C57Bl/6 com *K. pneumoniae* ocorre aumento de diferentes populações de células dendríticas nos pulmões, caracterizadas por CD11c⁺ Siglec-F⁻ NK1.1⁻ e subdivididas em CD103⁺ (CD103⁺ CD11b⁻), as pDC (120 g8⁺ CD11b⁻) e as CD11b⁺ (CD11b⁺ CD103⁻) [185]. De forma semelhante, observamos que a infecção por *A. xylosoxidans* induz intenso

recrutamento de células dendríticas ($CD45^+ CD11c^+ MHC-II^+ CD11b^+$) no terceiro dia após a infecção quando comparado aos camundongos não infectados (Figura 13), de forma independente de CD14 ou TLR4. Futuramente avaliaremos o impacto da ausência de CD14 e TLR4 no recrutamento de pDC.

Observamos também que a infecção por *A. xylosoxidans* não aumenta o número absoluto de macrófagos residentes do parênquima pulmonar ($CD45^+ CD11b^+ F4/80^+$, também chamados de intersticiais), mas aumenta a expressão de MHC-II neste subtipo celular, no terceiro e sétimo dia após a infecção, quando comparado com os camundongos não infectados (Figura 15). A expressão de MHC-II é importante para fagocitose e necessária para apresentação de antígenos às células T, e sua regulação é um ponto crítico no controle da resposta imune [186]. De forma curiosa, observamos que o número de macrófagos intersticiais ativados expressando MHC-II é maior nos camundongos deficientes de CD14 quando comparados aos camundongos selvagens no sétimo dia após a infecção, período no qual a produção das citocinas classicamente produzidas por esses macrófagos, IL-1, IL-6 e TNF- α [187], está a níveis basais. Investigaremos esse evento futuramente. Utilizamos a estratégia $CD45^+ CD11c^- Ly6G^- CD11b^+ Ly6C^{low} CX3CR1^{hi}$ para marcação de monócitos patrulheiros [188], que são células que migram pelo lúmen dos vasos para remover células mortas e detritos, além de contribuírem para o reparo tecidual após um processo inflamatório [189], [190]. Observamos aumento de monócitos patrulheiros no sétimo dia após a infecção por *A. xylosoxidans* (Figura 16), momento no qual provavelmente mecanismos resolutivos e de *clearance* de células apoptóticas, como neutrófilos, estejam ocorrendo. A ausência de TLR4 diminuiu o número de monócitos patrulheiros quando comparado ao grupo selvagem, provavelmente devido à menor intensidade da inflamação pulmonar na ausência de TLR4, e assim sendo necessário menor número de monócitos com função reparadora, quando comparado ao grupo selvagem.

Visto que a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta o recrutamento de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos MHC-II⁺ principalmente no terceiro dia após a infecção, e que camundongos deficientes de CD14 ou TLR4 apresentam redução no número de neutrófilos, avaliamos o impacto da ausência desses receptores na produção de mediadores pró-inflamatórias nos pulmões. Encontramos que na ausência de CD14 ocorre menor produção de TNF- α e IL-6 no primeiro e terceiro dias após a infecção, respectivamente, quando comparado com os camundongos selvagens. Por outro lado, a ausência de TLR4 reduz a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β quando comparado com os camundongos

selvagens, demonstrando que a ativação desse receptor é essencial para a liberação dessas citocinas (Figura 18). Avaliamos também as quimiocinas CXCL1, potente quimioatraente para neutrófilos, CCL2, quimioatraente para monócitos, DCs e linfócitos T, e CCL3, que recruta monócitos e linfócitos [167]. Observamos que a produção das três quimiocinas avaliadas é prejudicada na ausência de CD14 ou TLR4, quando comparadas com a produção pelos camundongos selvagens (Figura 19). Dados na literatura mostram que durante a infecção intranasal por *K. pneumoniae*, camundongos deficientes de TLR4 apresentam níveis reduzidos de CXCL1 e IL-1 β [191]. Semelhantemente, na infecção pulmonar por *A. baumannii*, a ausência de TLR4 levou níveis reduzidos de TNF- α , IL-6, MIP-2 e CXCL1, quando comparado ao grupo selvagem. Por outro lado, na infecção intranasal por *Y. pseudotuberculosis* a ausência de TLR4 aumenta os níveis de IL-6, TNF- α , CXCL2 e CCL2 nos pulmões e fígado, sem, no entanto, alterar CXCL1 e IL-1 β [125]. Camundongos deficientes de CD14 infectados com *M. tuberculosis* apresentam maior produção de IFN- γ , IL-10 e MIP-2 na segunda semana após a infecção, porém após cinco semanas, na deficiência de CD14 ocorre diminuição de IL-1 β e CXCL1 [169]. Nosso dados estão de acordo com outros da literatura que mostram que macrófagos peritoneais deficientes de CD14, quando estimulados com LPS, produzem menos TNF- α e IL-6, quando comparado com macrófagos de camundongos selvagens [192]. Foi demonstrado ainda, que macrófagos alveolares deficientes de CD14, infectados com *B. pseudomallei*, também produzem menos TNF- α quando comparados com macrófagos de camundongos selvagens, e que no plasma de animais *Cd14*^{-/-} infectados com o mesmo patógeno, as concentrações de IL-6, IL-12 e IFN- γ são menores 48 h após a infecção, quando comparados aos animais selvagens [123]. Esses dados demonstram que a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas requerem a ativação de CD14 e/ou TLR4. Esses receptores, quando ativados, comumente iniciam uma cascata de sinalização intracelular para ativação de fatores de transcrição como NF- κ B, um dos principais responsáveis pela indução de genes da IL-6, TNF- α , IL-1 e de quimiocinas [193].

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a infecção por *A. xylosoxidans* induz produção PGE₂ no sétimo dia após a infecção, e LTB₄ no primeiro dia após a infecção nos pulmões. LTB₄ é essencial para a síntese de alfa-defensina, peptídeo antimicrobiano que auxilia no *clearance* do bacilo nos pulmões [55]. Em nosso trabalho, observamos que animais deficientes de CD14 ou TLR4 produzem menos LTB₄ nos pulmões, quando comparados com camundongos selvagens. No entanto, nos animais *Cd14*^{-/-}, apesar da diminuição de LTB₄, não observamos alteração da carga bacteriana, sugerindo que outros mecanismos microbicidas estão presentes nestes animais. No entanto, nos animais deficientes de TLR4, observamos

aumento da carga bacteriana concomitante com a diminuição de LTB₄, sugerindo que nestes animais, a deficiência deste mediador lipídico pode estar contribuindo para o aumento do número de bactérias. LTB₄ é potente indutor dos mecanismos microbicidas de macrófagos e neutrófilos [194]. Para melhor entendermos as diferenças observadas, iremos quantificar alfa-defensina nos camundongos selvagens e nos deficientes de CD14 ou TLR4. Contrário aos nossos resultados, nosso grupo demonstrou anteriormente que camundongos deficientes de CD14 envenenados com a peçonha de *T. serrulatus*, apresentam níveis maiores de LTB₄ nos pulmões e menores de IL-1 β , e também são protegidos da mortalidade, quando comparados ao grupo selvagem envenenado [117]. Uma possível explicação para essas diferenças está no fato de que as moléculas presentes na peçonha do escorpião são totalmente distintas das moléculas presentes nos bacilos de *A. xylosoxidans*, sugerindo que na ausência de CD14 pode ocorrer indução ou inibição de LTB₄ de forma estímulo-dependente. No caso de infecções bacterianas, é descrito LTB₄ é produzido principalmente por neutrófilos e um potente quimioatraente para estas células [195], [196]. Nesse contexto, é coerente sugerir que, em parte, o menor recrutamento de neutrófilos nos camundongos deficientes de CD14 é devido a menor produção de LTB₄. Observamos também que a infecção por *A. xylosoxidans* aumentou a produção de PGD₂ nos pulmões de camundongos selvagens e nos deficientes de CD14 na fase final da infecção, quando comparado com camundongos não infectados. Uma explicação para esse aumento na fase final da infecção seria pelo fato de a PGD₂ possuir atividade anti-inflamatória e estar relacionada com imunidade protetora em modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) [197] e também, como já mostrado pelo nosso grupo, na infecção pelo *H. capsulatum* [137]. Assim, o aumento de PGD₂ teria a função de diminuir o processo inflamatório.

Observamos ainda que a IL-6 é uma das citocinas produzidas em maior abundância após infecção por *A. xylosoxidans*, sendo que na ausência de CD14 ou TLR4 sua produção é bastante reduzida. A IL-6 é principalmente produzida em processos inflamatórios agudos e tem como uma das funções o recrutamento de neutrófilos para o local infectado pois é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão [198]. As citocinas, no geral, quando produzidas em excesso em órgão primário em resposta ao LPS, por exemplo, podem se difundir e atingir a circulação sistêmica, podendo configurar um quadro semelhante ao choque endotoxêmico ou choque séptico [199]. Já é sabido que as pneumonias são consideradas fatores de risco para desenvolvimento de choque, e os principais marcadores séricos dessa condição clínica são IL-6, CCL2 e sCD14 [140], [200]. Além disso, existem relatos de sepse causada por *A. xylosoxidans* em crianças com FC e doença pulmonar grave [13]. Nesse

contexto, observamos que a infecção por *A. xylosoxidans* aumenta os níveis séricos de IL-6 no primeiro dia após a infecção, quando comparados com os animais selvagens não infectados, e que essa produção é dependente de CD14 ou TLR4. Observamos também que a infecção aumenta sCD14 no soro dos animais no primeiro e terceiro dia após a infecção, quando comparado ao grupo selvagem não infectado, o que não acontece na ausência de TLR4, sugerindo que a ativação deste receptor é importante para que ocorra a liberação de CD14 (*shedding*) no BALF. Nesse sentido, hipotetizamos que o aumento de IL-6 e sCD14 séricos podem estar relacionados com a presença de LPS oriundo de *A. xylosoxidans* na circulação, contribuindo para a mortalidade induzida pela infecção. Assim, iremos quantificar LPS sistemicamente nos animais selvagens ou deficientes de CD14 ou TLR4 e infectados,

Os fatores de transcrição da família NFAT são regulados por cálcio, calcineurina e quinases, e estão associados com o desenvolvimento e diferenciação de células T, apesar de serem expressos em diversos leucócitos [201]. Já foi demonstrado que CD14 é capaz de sinalizar de maneira independente de TLR4 via NFAT, e mediar edema de pele induzido por LPS [102], [202]. Nós hipotetizamos que CD14 na infecção por *A. xylosoxidans* ativaria NFAT1 que auxiliaria no desenvolvimento de edema pulmonar. Investigamos se NFAT1 é importante em nosso modelo de infecção, e observamos que a ausência de NFAT1 não alterou a sobrevivência dos camundongos, sugerindo que a mortalidade dos animais não é desencadeada via NFAT1. Por outro lado, foi demonstrado que a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* ativou NFAT de forma rápida, e que esse fator de transcrição contribui para a resposta inflamatória do hospedeiro [203].

Para avaliar se a inflamação pulmonar induzida por *A. xylosoxidans* é dependente da viabilidade bacteriana e consequente liberação de produtos microbianos, como LPS, inoculamos camundongos C57Bl/6 com *A. xylosoxidans* morta pelo calor para avaliar a curva de sobrevivência e a produção de IL-6 pulmonar e sérica. Observamos que o bacilo inativado pelo calor não é capaz de induzir a morte dos animais, e que a produção de IL-6 sérica e pulmonar no primeiro dia após a infecção foi menor, quando comparada ao grupo que foi inoculado com *A. xylosoxidans* viável. Apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas significantes na concentração de IL-6 no terceiro dia após a infecção, provavelmente devido ao número reduzido de animais, e a grande variabilidade nas respostas, fica evidente que a produção de IL-6 depende da viabilidade bacteriana. Nossos dados sugerem que a bactéria morta não induz inflamação pulmonar e mortalidade pois não há produção e liberação de

fatores de virulência, possivelmente o LPS, como na bactéria viável. Como mencionado acima, iremos quantificar LPS em ambas as situações.

Em conjunto, nossos dados mostram que a ativação de CD14 ou TLR4, induz recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, e a produção de mediadores inflamatórios que medeiam o edema pulmonar induzido por *A. xylosoxidans*, provável causa de mortalidade dos animais infectados. Mostramos ainda que animais deficientes de CD14 ou TLR4 produzem menos IL-6, e que a produção dessa citocina, bem como mortalidade, são dependentes da viabilidade bacteriana.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Na infecção por *A. xylosoxidans*, a ativação de CD14 e de TLR4 medeiam a inflamação pulmonar e a mortalidade induzidas, provavelmente pelo LPS. A inflamação pulmonar é dependente da viabilidade da bactéria.

REFERÊNCIAS

- [1] E. Yabuuchi and A. Oyama, "Achromobacter xylosoxidans n. sp. from human ear discharge.," *Jpn. J. Microbiol.*, vol. 15, no. 5, pp. 477–481, Sep. 1971.
- [2] E. Yabuuchi, I. Yano, S. Goto, E. Tanjmura, I. Tomiyoshi, and A. Ohyama, "Ohyama 1971," vol. 24, no. 4, 1974.
- [3] B. Chester and L. H. Cooper, "Achromobacter species (CDC group Vd): morphological and biochemical characterization.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 425–436, Mar. 1979.
- [4] T. H. Jakobsen *et al.*, "Complete genome sequence of the cystic fibrosis pathogen Achromobacter xylosoxidans NH44784-1996 complies with important pathogenic phenotypes.," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e68484, 2013.
- [5] C. E. Swenson and R. T. Sadikot, "Achromobacter respiratory infections.," *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 12, no. 2, pp. 252–258, Feb. 2015.
- [6] B. Holmes, J. J. S. Snell, and S. P. Lapage, "Strains of Achromobacter xylosoxidans from clinical material," *J. Clin. Pathol.*, vol. 30, no. 7, pp. 595–601, 1977.
- [7] S. Shigeta, Y. Yasunaga, K. Honzumi, H. Okamura, R. Kumata, and S. Endo, "Cerebral ventriculitis associated with Achromobacter xylosoxidans.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 31, no. 2, pp. 156–161, Feb. 1978.
- [8] A. K. Reddy, P. Garg, V. Shah, and U. Gopinathan, "Clinical, microbiological profile and treatment outcome of ocular infections caused by Achromobacter xylosoxidans.," *Cornea*, vol. 28, no. 10, pp. 1100–1103, Dec. 2009.
- [9] O. Spierer, P. F. Monsalve, T. P. O'Brien, E. C. Alfonso, D. Gologorsky, and D. Miller, "Clinical Features, Antibiotic Susceptibility Profiles, and Outcomes of Infectious Keratitis Caused by Achromobacter xylosoxidans.," *Cornea*, vol. 35, no. 5, pp. 626–630, May 2016.
- [10] G. Pamuk, D. Aygun, K. Barut, and O. Kasapcopur, "Achromobacter causing a thrombophlebitis and osteomyelitis combination: a rare cause.," *BMJ Case Rep.*, vol. 2015, Sep. 2015.
- [11] T. Shinha and I. C. Oguagha, "IDCases Osteomyelitis caused by Achromobacter xylosoxidans," *IDCases*, vol. 2, no. 1, pp. 11–12, 2015.
- [12] K. T. Suryavanshi and S. K. Lalwani, "Uncommon pathogen: Serious manifestation: A rare case of Achromobacter xylosoxidans septic arthritis in immunocompetent patient.," *Indian J. Pathol. Microbiol.*, vol. 58, no. 3, pp. 395–397, 2015.
- [13] K. Stobbelaar *et al.*, "Sepsis Caused by Achromobacter Xylosoxidans in a Child with Cystic Fibrosis and Severe Lung Disease.," *Am. J. Case Rep.*, vol. 17, pp. 562–566, Aug. 2016.
- [14] J. Dai, A. O. Huen, L. A. Kestenbaum, M. D. Sarezky, C. C. Coughlin, and A. C. Yan, "Achromobacter xylosoxidans Bacteremia and Cellulitis: A Report of a Case.," *Pediatr. Dermatol.*, vol. 32, no. 4, pp. e186–7, 2015.
- [15] R. H. V. Pereira and R. S. Leão, "Patterns of virulence factor expression and antimicrobial resistance in Achromobacter xylosoxidans and Achromobacter ruhlandii isolates from patients with cystic fibrosis," no. 2017, pp. 600–606, 2019.
- [16] S. Nakamoto, M. Sakamoto, K. Sugimura, Y. Honmura, Y. Yamamoto, and N. Goda, "Environmental Distribution and Drug Susceptibility of Achromobacter Xylosoxidans Isolated from Outdoor and Indoor Environments," pp. 67–70, 2017.
- [17] S. M. Nielsen, R. L. Meyer, and N. Norskov-Lauritsen, "Differences in Gene Expression Profiles between Early and Late Isolates in Monospecies Achromobacter Biofilm.," *Pathog. (Basel, Switzerland)*, vol. 6, no. 2, May 2017.
- [18] H. Green and A. M. Jones, "Emerging Gram-negative bacteria : pathogenic or innocent bystanders," 2018.
- [19] J. Bador *et al.*, "First Description of an RND-Type Multidrug Efflux Pump in," vol. 55, no. 10, pp. 4912–4914, 2011.

- [20] J. Bador, L. Amoureux, E. Blanc, and C. Neuwirth, "Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 603–605, Jan. 2013.
- [21] S. Rajan and L. Saiman, "Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis.," *Semin. Respir. Infect.*, vol. 17, no. 1, pp. 47–56, Mar. 2002.
- [22] A. Lambiase *et al.*, "Achromobacter xylosoxidans respiratory tract infection in cystic fibrosis patients.," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 8, pp. 973–980, Aug. 2011.
- [23] O. Ciofu, C. R. Hansen, and N. Hoiby, "Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis.," *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 251–258, May 2013.
- [24] F. De Baets, P. Schelstraete, S. Van Daele, F. Haerynck, and M. Vaneechoutte, "Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance.," *J. Cyst. Fibros.*, vol. 6, no. 1, pp. 75–78, Jan. 2007.
- [25] L. Llorca Otero, R. Giron Moreno, B. Buendia Moreno, C. Valenzuela, A. Guiu Martinez, and T. Alarcon Caverio, "Achromobacter xylosoxidans infection in an adult cystic fibrosis unit in Madrid.," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 34, no. 3, pp. 184–187, Mar. 2016.
- [26] L. Amoureux, J. Bador, F. Bounoua Zouak, A. Chapuis, C. de Curraize, and C. Neuwirth, "Distribution of the species of *Achromobacter* in a French Cystic Fibrosis Centre and multilocus sequence typing analysis reveal the predominance of *A. xylosoxidans* and clonal relationships between some clinical and environmental isolates.," *J. Cyst. Fibros.*, vol. 15, no. 4, pp. 486–494, Jul. 2016.
- [27] R. H. V. Pereira *et al.*, "Achromobacter xylosoxidans: Characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 10, pp. 3649–3651, 2011.
- [28] J. Xu, Y. Yin, L. Zhang, J. Zhang, S. Yuan, and H. Zhang, "Four case reports of Chinese cystic fibrosis patients and literature review.," *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 52, no. 8, pp. 1020–1028, Aug. 2017.
- [29] F. Ratjen, S. C. Bell, S. M. Rowe, and C. H. Goss, "Cystic fibrosis," *Nat. Publ. Gr.*, no. May, pp. 1–19, 2015.
- [30] S. Sabharwal, "Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis," vol. 12, no. 1, pp. 43–47, 2016.
- [31] R. C. Boucher, "New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.," *Eur. Respir. J.*, vol. 23, no. 1, pp. 146–158, Jan. 2004.
- [32] T. S. Cohen and A. Prince, "review Cystic fibrosis : a mucosal immunodeficiency syndrome," *Nat. Med.*, vol. 18, no. 4, p. nm.2715-11, 2012.
- [33] M. G. Surette, "The cystic fibrosis lung microbiome.," *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 11 Suppl 1, pp. S61-5, Jan. 2014.
- [34] C. Gangell *et al.*, "Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 53, no. 5, pp. 425–432, Sep. 2011.
- [35] C. Ronne Hansen, T. Pressler, N. Hoiby, and M. Gormsen, "Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study.," *J. Cyst. Fibros.*, vol. 5, no. 4, pp. 245–251, Dec. 2006.
- [36] M. C. Firmida, R. H. V. Pereira, E. A. S. R. Silva, E. A. Marques, and A. J. Lopes, "Clinical impact of *Achromobacter xylosoxidans* colonization/infection in patients with cystic fibrosis," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 49, no. 4, pp. 11–15, 2016.
- [37] C. A. D. C. PEREIRA, "Espirometria," pp. 45–51, 1996.
- [38] Y. Igra-siegman, H. Chmel, and C. Cobbs, "Clinical and Laboratory Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* Infection," vol. 11, no. 2, pp. 141–145, 1980.
- [39] G. Aisenberg, K. V. Rolston, and A. Safdar, "Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003).," *Cancer*, vol. 101, no. 9, pp. 2134–2140, Nov. 2004.
- [40] M. D. Parkins and R. A. Floto, "Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis.," *J. Cyst. Fibros.*, vol. 14, no. 3, pp. 293–304, May 2015.
- [41] S. Hyodo, S. Katahira, and S. Shigeta, "Experimental infection of immunocompromised mice with *Achromobacter xylosoxidans*.," *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 136, no. 3, pp. 251–261, Mar. 1982.
- [42] S. Okuda, D. J. Sherman, T. J. Silhavy, N. Ruiz, and D. Kahne, "Lipopolysaccharide transport and

- assembly at the outer membrane: the PEZ model,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 6, pp. 337–345, Jun. 2016.
- [43] A. Steimle, I. B. Autenrieth, and J. S. Frick, “Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 306, no. 5, pp. 290–301, 2016.
 - [44] R. P. Mantovani, C. E. Levy, and T. Yano, “A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with in vitro increased proinflammatory cytokines,” *J. Cyst. Fibros.*, vol. 11, no. 4, pp. 305–311, 2012.
 - [45] C. R. Hansen, T. Pressler, K. G. Nielsen, P. Jensen, T. Bjarnsholt, and N. Høiby, “Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients,” *J. Cyst. Fibros.*, vol. 9, no. 1, pp. 51–58, 2010.
 - [46] O. W. THIELE, J. OULEVEY, and D. H. HUNNEMAN, “Ornithine- containing lipids in *Thiobacillus A2* and *Achromobacter* sp.,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 139, no. 1, pp. 131–135, 1984.
 - [47] K. Okemoto, K. Hanada, M. Nishijima, and K. Kawasaki, “The preparation of a lipidic endotoxin affects its biological activities,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 31, no. 10, pp. 1952–1954, 2008.
 - [48] Y. Kawai, N. Takasuka, K. Inoue, K. Akagawa, and M. Nishijima, “Ornithine-containing lipids stimulate CD14-dependent TNF- α production from murine macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 cells,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 197–203, 2000.
 - [49] Y. Kawai *et al.*, “A typical bacterial ornithine-containing lipid N(α)-(D)-[3-(hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 23, no. 1, pp. 67–73, 1999.
 - [50] G. E. Carpagnano, P. J. Barnes, D. M. Geddes, M. E. Hodson, and S. A. Kharitonov, “Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 167, no. 8, pp. 1109–1112, Apr. 2003.
 - [51] R. Chiron, Y. Y. Grumbach, N. V. T. Quynh, V. Verriere, and V. Urbach, “Lipoxin A(4) and interleukin-8 levels in cystic fibrosis sputum after antibiotherapy,” *J. Cyst. Fibros.*, vol. 7, no. 6, pp. 463–468, Nov. 2008.
 - [52] J. T. Zakrzewski, N. C. Barnes, J. F. Costello, and P. J. Piper, “Lipid mediators in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease,” *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 136, no. 3, pp. 779–782, Sep. 1987.
 - [53] J. Yang, J. P. Eiserich, C. E. Cross, B. M. Morrissey, and B. D. Hammock, “Metabolomic profiling of regulatory lipid mediators in sputum from adult cystic fibrosis patients,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 1, pp. 160–171, Jul. 2012.
 - [54] S. Jabr *et al.*, “Quantification of major urinary metabolites of PGE₂ and PGD₂ in cystic fibrosis: Correlation with disease severity,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 89, no. 2, pp. 121–126, Aug. 2013.
 - [55] M. K. B. Prado *et al.*, “Leukotriene B4 is essential for lung host defence and alpha-defensin-1 production during *Achromobacter xylosoxidans* infection,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17658, Dec. 2017.
 - [56] K. F. Zoccal *et al.*, “TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e88174, 2014.
 - [57] C. A. J. Janeway, “Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology,” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 54 Pt 1, pp. 1–13, 1989.
 - [58] E. Venereau, C. Ceriotti, and M. E. Bianchi, “DAMPs from Cell Death to New Life,” *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 422, 2015.
 - [59] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, “Pathogen recognition and innate immunity,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, Feb. 2006.
 - [60] M. Lalancette-Hebert, J. Faustino, S. S. Thammisetty, S. Chip, Z. S. Vexler, and J. Kriz, “Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 65, pp. 312–327, Oct. 2017.
 - [61] K. J. Ishii, S. Koyama, A. Nakagawa, C. Coban, and S. Akira, “Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections,” *Cell Host Microbe*, vol. 3, no. 6, pp. 352–363, Jun. 2008.

- [62] I. Botos, D. M. Segal, and D. R. Davies, "The structural biology of Toll-like receptors.," *Structure*, vol. 19, no. 4, pp. 447–459, Apr. 2011.
- [63] L. Schaefer, "Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 51, pp. 35237–35245, Dec. 2014.
- [64] L. A. J. O. Neill, D. Golenbock, and A. G. Bowie, "redefining innate immunity," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, no. 6, pp. 453–460, 2013.
- [65] A. Heguy, C. T. Baldari, G. Macchia, J. L. Telford, and M. Melli, "Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 4, pp. 2605–2609, Feb. 1992.
- [66] A. Poltorak *et al.*, "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.," *Science*, vol. 282, no. 5396, pp. 2085–2088, Dec. 1998.
- [67] S. T. Qureshi *et al.*, "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 4, pp. 615–625, Feb. 1999.
- [68] H. Wesche, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, and Z. Cao, "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex.," *Immunity*, vol. 7, no. 6, pp. 837–847, Dec. 1997.
- [69] A. B. Schromm *et al.*, "Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling.," *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 1, pp. 79–88, Jul. 2001.
- [70] R. R. Schumann *et al.*, "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein.," *Science*, vol. 249, no. 4975, pp. 1429–1431, Sep. 1990.
- [71] S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison, "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.," *Science*, vol. 249, no. 4975, pp. 1431–1433, Sep. 1990.
- [72] T. Kawai and S. Akira, "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.," *Int. Immunol.*, vol. 21, no. 4, pp. 317–337, Apr. 2009.
- [73] E. M. Creagh and L. A. J. O'Neill, "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity.," *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 8, pp. 352–357, Aug. 2006.
- [74] M. Nemati, T. Larussa, H. Khorramdelazad, M. Mahmoodi, and A. Jafarzadeh, "Toll-like receptor 2: An important immunomodulatory molecule during Helicobacter pylori infection.," *Life Sci.*, vol. 178, pp. 17–29, Jun. 2017.
- [75] A. Oeckinghaus, M. S. Hayden, and S. Ghosh, "Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways.," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 695–708, Jul. 2011.
- [76] S. Mukherjee, S. Karmakar, and S. P. S. Babu, "TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review.," *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 2, pp. 193–204, 2016.
- [77] E. Vercammen, J. Staal, and R. Beyaert, "Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2008.
- [78] S. S.-Y. Kim *et al.*, "DOK3 is required for IFN-beta production by enabling TRAF3/TBK1 complex formation and IRF3 activation.," *J. Immunol.*, vol. 193, no. 2, pp. 840–848, Jul. 2014.
- [79] B. S. Park and J.-O. Lee, "Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 45, p. e66, Dec. 2013.
- [80] A. Plociennikowska, A. Hromada-Judycka, K. Borzecka, and K. Kwiatkowska, "Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 3, pp. 557–581, Feb. 2015.
- [81] J. C. Kagan, T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov, "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 4, pp. 361–368, Apr. 2008.
- [82] C. Vilades *et al.*, "Involvement of the LPS-LPB-CD14-MD2-TLR4 inflammation pathway in HIV-1/HAART-associated lipodystrophy syndrome (HALS).," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, no. 6, pp. 1653–1659, Jun. 2014.
- [83] O. Takeuchi *et al.*, "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.," *Int. Immunol.*, vol.

- 13, no. 7, pp. 933–940, Jul. 2001.
- [84] L. Alexopoulou *et al.*, “Hypo-responsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 878–884, Aug. 2002.
 - [85] D. R. E. Ranoa, S. L. Kelley, and R. I. Tapping, “Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 14, pp. 9729–9741, Apr. 2013.
 - [86] L. M. Stuart *et al.*, “THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY,” vol. 170, no. 3, pp. 477–485, 2005.
 - [87] C. R. Stewart *et al.*, “CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 155–161, Feb. 2010.
 - [88] I. N. Baranova *et al.*, “Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 10, pp. 7147–7156, Nov. 2008.
 - [89] N. J. Gay, M. F. Symmons, M. Gangloff, and C. E. Bryant, “Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 14, no. 8, pp. 546–558, 2014.
 - [90] A. M. Piccinini and K. S. Midwood, “DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling,” vol. 2010, 2010.
 - [91] A. Molinaro *et al.*, “Chemistry of lipid A: At the heart of innate immunity,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 21, no. 2, pp. 500–519, 2015.
 - [92] H. M. Kim *et al.*, “Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran,” *Cell*, vol. 130, no. 5, pp. 906–917, Sep. 2007.
 - [93] I. Zanoni *et al.*, “CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4,” *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 868–880, 2011.
 - [94] C. D. Gregory, A. Devitt, and O. Moffatt, “Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 26, no. 4, pp. 644–649, 1998.
 - [95] P. Y. Perera, S. N. Vogel, G. R. Detore, A. Haziot, and S. M. Goyert, “CD14-Dependent and CD14-Independent Signaling Pathways in Murine Macrophages from Normal and CD14 Knockout Mice Stimulated with Lipopolysaccharide or Taxol,” *J. Immunol.*, vol. 158, no. 9, pp. 4422–4429, 1997.
 - [96] S. Bas, B. R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, and C. Gabay, “CD14 Is an Acute-Phase Protein,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 7, pp. 4470–4479, 2004.
 - [97] I. Striz, L. Zheng, Y. M. Wang, H. Pokorna, P. C. Bauer, and U. Costabel, “Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlates with alveolar macrophage membrane-bound CD14,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 151, no. 2 Pt 1, pp. 544–547, Feb. 1995.
 - [98] V. Regueiro *et al.*, “Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers,” *Eur. Respir. J.*, vol. 33, no. 2, pp. 273–281, 2009.
 - [99] G. Hoheisel, L. Zheng, H. Teschler, I. Striz, and U. Costabel, “Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis,” *Chest*, vol. 108, no. 6, pp. 1614–1616, Dec. 1995.
 - [100] A. Pforte *et al.*, “Expression of CD14 correlates with lung function impairment in pulmonary sarcoidosis,” *Chest*, vol. 105, no. 2, pp. 349–354, Feb. 1994.
 - [101] J. C. Virchow, P. Julius, H. Matthys, C. Kroegel, and W. Luttmann, “CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma,” *Eur. Respir. J.*, vol. 11, no. 2, pp. 317–323, 1998.
 - [102] I. Zanoni *et al.*, “CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 5, pp. 1747–1757, 2012.
 - [103] R. Landmann, S. Link, S. Sansano, Z. Rajacic, and W. Zimmerli, “Soluble CD14 activates monocytic cells independently of lipopolysaccharide,” *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 5, pp. 2264–2271, 1998.
 - [104] M. Lévêque *et al.*, “Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: Origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production,” *FASEB J.*, vol. 31, no. 5, pp. 1891–1902, 2017.
 - [105] P. Knuefermann *et al.*, “CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction,” *Circulation*, vol. 106, no. 20, pp. 2608–2615, 2002.

- [106] J. Zhou *et al.*, “Renal CD14 expression correlates with the progression of cystic kidney disease,” *Kidney Int.*, vol. 78, no. 6, pp. 550–560, 2010.
- [107] J. Schimke, J. Mathison, J. Morgiewicz, and R. J. Ulevitch, “Anti-CD14 mAb treatment provides therapeutic benefit after in vivo exposure to endotoxin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 23, pp. 13875–13880, 1998.
- [108] D. J. Leturcq, A. M. Moriarty, G. Talbott, R. K. Winn, T. R. Martin, and R. J. Ulevitch, “Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock,” *J. Clin. Invest.*, vol. 98, no. 7, pp. 1533–1538, 1996.
- [109] S. FURUSAKO *et al.*, “CD14 ODN vs sepsis.pdf,” *Acta. Med. Okayama*, p. 10, 2011.
- [110] A. Haziot *et al.*, “Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice,” *Immunity*, vol. 4, no. 4, pp. 407–414, 1996.
- [111] R. L. Kitchens, P. A. Thompson, S. Viriyakosol, G. E. O’Keefe, and R. S. Munford, “Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins,” *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 3, pp. 485–493, 2001.
- [112] A. Haziot, X. Y. Lin, J. Silver, and S. M. Goyert, “Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide),” *J. Immunol.*, vol. 154, no. 12, pp. 6529–6532, 1995.
- [113] B. Jacque, K. Stephan, I. Smirnova, B. Kim, D. Gilling, and A. Poltorak, “Mice expressing high levels of soluble CD14 retain LPS in the circulation and are resistant to LPS-induced lethality,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, no. 11, pp. 3007–3016, 2006.
- [114] J. M. Fernández-Real *et al.*, “CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance,” *Diabetes*, vol. 60, no. 8, pp. 2179–2186, 2011.
- [115] P. Andre *et al.*, “Lipopolysaccharide-Binding Protein, Soluble CD14, and the Long-Term Risk of Alzheimer’s Disease: A Nested Case-Control Pilot Study of Older Community Dwellers from the Three-City Cohort,” *J. Alzheimers. Dis.*, Aug. 2019.
- [116] S. Buchheister *et al.*, “CD14 Plays a Protective Role in Experimental Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Intestinal Barrier Function,” *Am. J. Pathol.*, vol. 187, no. 5, pp. 1106–1120, 2017.
- [117] K. F. Zoccal *et al.*, “CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1beta Release and Inflammation,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 890, 2018.
- [118] R. J. Ulevitch and P. S. Tobias, “Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 13, pp. 437–457, 1995.
- [119] C. R. Marion *et al.*, “crosssm Derived from *Acinetobacter baumannii*,” vol. 87, no. 9, pp. 1–14, 2019.
- [120] J. S. Villano, F. Rong, and T. K. Cooper, “Bacterial infections in Myd88-deficient mice,” *Comp. Med.*, vol. 64, no. 2, pp. 110–114, Apr. 2014.
- [121] A. A. Anas *et al.*, “Lung epithelial MyD88 drives early pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a flagellin dependent mechanism,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 311, no. 2, pp. L219–28, Aug. 2016.
- [122] S. Roy, M. Karmakar, and E. Pearlman, “CD14 mediates Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and spleen tyrosine kinase (Syk) and interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) activation in epithelial cells and impairs neutrophil infiltration and *Pseudomonas aeruginosa* killing in vivo,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 2, pp. 1174–1182, Jan. 2014.
- [123] W. J. Wiersinga, A. F. De Vos, C. W. Wieland, M. Leendertse, J. J. T. H. Roelofs, and T. Van Der Poll, “CD14 Impairs Host Defense against Gram-Negative Sepsis Caused by *Burkholderia pseudomallei* in Mice,” vol. 198, 2008.
- [124] K. K. Yang *et al.*, “Neutrophil Influx in Response to a Peritoneal Infection with *Salmonella* Is Delayed in Lipopolysaccharide-Binding Protein or CD14-Deficient Mice,” 2018.
- [125] J. Choi *et al.*, “Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases A role for Toll-like receptor 4 in the host response to the lung infection of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice,” *Comparative Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 44, pp. 54–60, 2016.
- [126] M. Akamine *et al.*, “Differential Roles of Toll-Like Receptors 2 and 4 in In Vitro Responses of Macrophages to *Legionella pneumophila*,” vol. 73, no. 1, pp. 352–361, 2005.

- [127] D. S. Weiss *et al.*, “MyD88 , but Not Toll-Like Receptors 4 and 2 , Is Required for Efficient Clearance of *Brucella abortus*,” vol. 73, no. 8, pp. 5137–5143, 2005.
- [128] H.-Y. Jeon *et al.*, “Cooperative Interactions between Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 in Murine *Klebsiella pneumoniae* Infections,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1529–1538, Aug. 2017.
- [129] G. K. H. Iii, B. A. Sayed, M. S. Rohrer, V. Olivier, and K. J. F. Satchell, “Role of Toll-Like Receptor 4 in the Proinflammatory Response to *Vibrio cholerae* O1 El Tor Strains Deficient in Production of Cholera Toxin and Accessory Toxins,” vol. 73, no. 9, pp. 6157–6164, 2005.
- [130] R. F. J. Noel, T. T. Sato, C. Mendez, M. C. Johnson, and T. H. Pohlman, “Activation of human endothelial cells by viable or heat-killed gram-negative bacteria requires soluble CD14,” *Infect. Immun.*, vol. 63, no. 10, pp. 4046–4053, Oct. 1995.
- [131] A. I. Medeiros, A. Sa-Nunes, E. G. Soares, C. M. Peres, C. L. Silva, and L. H. Faccioli, “Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis,” *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 3, pp. 1637–1644, Mar. 2004.
- [132] A. Secatto *et al.*, “5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e31701, 2012.
- [133] F. S. M. Tristao *et al.*, “Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 949, 2017.
- [134] P. A. T. Pereira *et al.*, “Celecoxib improves host defense through prostaglandin inhibition during *Histoplasma capsulatum* infection,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 950981, 2013.
- [135] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, “Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids,” *Anal. Biochem.*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, Oct. 1982.
- [136] C. A. Sorgi *et al.*, “Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays,” *Sci. data*, vol. 5, p. 180167, Aug. 2018.
- [137] P. A. T. Pereira *et al.*, “Prostaglandins D2 and E2 have opposite effects on alveolar macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*,” *J. Lipid Res.*, vol. 59, no. 2, pp. 195–206, Feb. 2018.
- [138] F. W. G. Paula-Silva, I. B. F. Petean, L. A. B. da Silva, and L. H. Faccioli, “Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis,” *J. Endod.*, vol. 42, no. 3, pp. 447–454, Mar. 2016.
- [139] Q. Zou, “Presepsin as a novel sepsis biomarker,” *World J. Emerg. Med.*, vol. 5, no. 1, p. 16, 2014.
- [140] R. S. Hotchkiss, L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull, and J.-L. Vincent, “Sepsis and septic shock HHS Public Access,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, no. 16045, pp. 1–47, 2017.
- [141] C. A. Janeway and R. Medzhitov, “ Innate Immune Recognition ,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 197–216, 2002.
- [142] P. Baral, S. Batra, R. L. Zemans, G. P. Downey, and S. Jeyaseelan, “Divergent functions of toll-like receptors during bacterial lung infections,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 190, no. 7, pp. 722–732, 2014.
- [143] S. Rakoff-nahoum and R. Medzhitov, “Nrc2541.Pdf,” vol. 9, no. JANuARy, pp. 57–63, 2009.
- [144] Y. Nakao *et al.*, “Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 3, pp. 1566–1573, Feb. 2005.
- [145] T. E. West, R. K. Ernst, M. J. Jansson-Hutson, and S. J. Skerrett, “Activation of Toll-like receptors by *Burkholderia pseudomallei*,” *BMC Immunol.*, vol. 9, p. 46, Aug. 2008.
- [146] X. Huang, W. Du, S. A. McClellan, R. P. Barrett, and L. D. Hazlett, “TLR4 is required for host resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 47, no. 11, pp. 4910–4916, Nov. 2006.
- [147] H. K. Shim *et al.*, “*Legionella* lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 41, no. 10, pp. 687–694, Oct. 2009.
- [148] H.-S. Shin, J.-H. Lee, S.-H. Paek, Y. W. Jung, and U.-H. Ha, “*Pseudomonas aeruginosa*-dependent

- upregulation of TLR2 influences host responses to a secondary *Staphylococcus aureus* infection.,” *Pathog. Dis.*, vol. 69, no. 2, pp. 149–156, Nov. 2013.
- [149] V. Regueiro, D. Moranta, M. A. Campos, J. Margareto, J. Garmendia, and J. A. Bengoechea, “*Klebsiella pneumoniae* increases the levels of toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells,” *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 2, pp. 714–724, 2009.
- [150] W. Dubin *et al.*, “Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14 in bronchoalveolar compartment protein,” *Am J Physiol.*, no. 270, 1996.
- [151] P. I. Song *et al.*, “The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 12, pp. 2867–2877, 2001.
- [152] B. B. de Aguiar *et al.*, “CD14 expression in the first 24h of sepsis: effect of -260C>T CD14 SNP.,” *Immunol. Invest.*, vol. 37, no. 8, pp. 752–769, 2008.
- [153] K. Klouche *et al.*, “Diagnostic and prognostic value of soluble CD14 subtype (Presepsin) for sepsis and community-acquired pneumonia in ICU patients,” *Ann. Intensive Care*, vol. 6, no. 1, 2016.
- [154] M.-H. Chou *et al.*, “Effects of hepatocyte CD14 upregulation during cholestasis on endotoxin sensitivity,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34903, 2012.
- [155] V. Marcos *et al.*, “Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases,” *Respir. Res.*, vol. 11, p. 32, Mar. 2010.
- [156] M. C. Dessing, S. Knapp, S. Florquin, A. F. De Vos, and T. Van Der Poll, “CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae*,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 175, no. 6, pp. 604–611, 2007.
- [157] I. Zanoni and F. Granucci, “Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. JUL, pp. 1–6, 2013.
- [158] C. W. Frevert *et al.*, “Effect of CD14 Blockade in Rabbits with *Escherichia coli* Pneumonia and Sepsis,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 10, pp. 5439–5445, 2000.
- [159] T. H. Flo *et al.*, “Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron,” *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 917–921, 2004.
- [160] N. W. Lukacs, R. M. Strieter, S. W. Chensue, M. Widmer, and S. L. Kunkel, “TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation,” *J. Immunol.*, vol. 154, no. 10, pp. 5411–5417, May 1995.
- [161] C. D. Sadik, N. D. Kim, and A. D. Luster, “Neutrophils cascading their way to inflammation,” *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 10, pp. 452–460, Oct. 2011.
- [162] K. V Sawant *et al.*, “Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation,” *J. Innate Immun.*, vol. 7, no. 6, pp. 647–658, 2015.
- [163] C. A. Fielding *et al.*, “IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 2189–2195, Aug. 2008.
- [164] U. A. Maus *et al.*, “Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 6, pp. 3273–3278, Mar. 2003.
- [165] D. C. Hocking, P. G. Phillips, T. J. Ferro, and A. Johnson, “Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor-alpha,” *Circ. Res.*, vol. 67, no. 1, pp. 68–77, Jul. 1990.
- [166] M. A. Olman *et al.*, “Pulmonary edema fluid from patients with early lung injury stimulates fibroblast proliferation through IL-1 beta-induced IL-6 expression,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 4, pp. 2668–2677, Feb. 2004.
- [167] M. Bhatia, R. L. Zemans, and S. Jeyaseelan, “Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 46, no. 5, pp. 566–572, 2012.
- [168] Z. Yang *et al.*, “Knockdown of TNFalpha alleviates acute lung injury in rats with intestinal ischemia and reperfusion injury by upregulating IL10 expression,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 42, no. 2, pp. 926–934, Aug. 2018.
- [169] C. W. Wieland, G. J. W. Van Der Windt, W. J. Wiersinga, S. Florquin, and T. Van Der Poll, “CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis,” *Immunology*, vol. 125, no. 2, pp. 272–279, 2008.

- [170] S. J. Skerrett, C. B. Wilson, H. D. Liggitt, and A. M. Hajjar, "Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 292, no. 1, 2007.
- [171] S. C. Higgins *et al.*, "Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 6, pp. 3119–3127, Sep. 2003.
- [172] B. G. Yipp *et al.*, "The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection," *Sci. Immunol.*, vol. 2, no. 10, pp. 1–14, 2017.
- [173] A. Craig, J. Mai, S. Cai, and S. Jeyaseelan, "Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia," *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 2, pp. 568–575, 2009.
- [174] S. Jeyaseelan, H. W. Chu, S. K. Young, M. W. Freeman, and G. S. Worthen, "Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury," *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 3, pp. 1754–1763, 2005.
- [175] S. Knapp *et al.*, "Differential roles of CD14 and Toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, no. 1, pp. 122–129, 2006.
- [176] T.-S. Teng, A.-L. Ji, X.-Y. Ji, and Y.-Z. Li, "Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered," *J. Immunol. Res.*, vol. 2017, p. 9671604, 2017.
- [177] G. Balamayooran, S. Batra, M. B. Fessler, K. I. Happel, and S. Jeyaseelan, "Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 43, no. 1, pp. 5–16, 2010.
- [178] J. L. M. Dunn *et al.*, "Blocking CXCL1-dependent neutrophil recruitment prevents immune damage and reduces pulmonary bacterial infection after inhalation injury," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 314, no. 5, pp. L822–L834, 2018.
- [179] D. A. Rodeberg, R. E. Morris, and G. F. Babcock, "Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 11, pp. 4747–4753, Nov. 1997.
- [180] A. Haziot, B. Z. Tsuberi, and S. M. Goyert, "Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 12, pp. 5556–5565, Jun. 1993.
- [181] E. R. Svendsen *et al.*, "Circulating neutrophil CD14 expression and the inverse association of ambient particulate matter on lung function in asthmatic children," *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 99, no. 3, pp. 244–253, 2007.
- [182] Z. Sladek, D. Rysanek, and M. Faldyna, "Activation of phagocytes during initiation and resolution of mammary gland injury induced by lipopolysaccharide in heifers," *Vet. Res.*, vol. 33, no. 2, pp. 191–204, 2002.
- [183] P. C. Cook and A. S. MacDonald, "Dendritic cells in lung immunopathology," *Semin. Immunopathol.*, vol. 38, no. 4, pp. 449–460, 2016.
- [184] F. Venet, X. Huang, C.-S. Chung, Y. Chen, and A. Ayala, "Plasmacytoid dendritic cells control lung inflammation and monocyte recruitment in indirect acute lung injury in mice," *Am. J. Pathol.*, vol. 176, no. 2, pp. 764–773, Feb. 2010.
- [185] H. Hackstein *et al.*, "Modulation of respiratory dendritic cells during *Klebsiella pneumonia* infection," pp. 1–11, 2013.
- [186] J. Xaus *et al.*, "The expression of MHC class II genes in macrophages is cell cycle dependent," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 11, pp. 6364–6371, Dec. 2000.
- [187] M. Liegeois, C. Legrand, C. J. Desmet, T. Marichal, and F. Bureau, "The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity," *Cell. Immunol.*, vol. 330, no. February, pp. 91–96, 2018.
- [188] C. O. S. Souza *et al.*, "CD18 Regulates Monocyte Hematopoiesis and Promotes Resistance to Experimental Schistosomiasis," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. August, p. 1970, 2018.
- [189] R. M. Kratofil, P. Kubes, and J. F. Deniset, "Monocyte conversion during inflammation and injury," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 37, no. 1, pp. 35–42, 2017.
- [190] G. THOMAS, R. TACKE, C. HEDRICK, and R. HANNA, "Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 35, no. 6, pp. 1306–1316, 2015.

- [191] C. W. Wieland, M. H. P. Van Lieshout, A. J. Hoogendijk, and T. Van Der Poll, "Host defence during *Klebsiella pneumoniae* relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2," *Eur. Respir. J.*, vol. 37, no. 4, pp. 848–857, 2011.
- [192] K. J. Moore *et al.*, "Divergent Response to LPS and Bacteria in CD14-Deficient Murine Macrophages," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 8, pp. 4272–4280, 2000.
- [193] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S. C. Sun, "NF- κ B signaling in inflammation," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 2, no. March, 2017.
- [194] S. L. Brandt and C. H. Serezani, "Too much of a good thing: How modulating LTB4 actions restore host defense in homeostasis or disease.," *Semin. Immunol.*, vol. 33, pp. 37–43, Oct. 2017.
- [195] S. Batra, S. Cai, G. Balamayooran, and S. Jeyaseelan, "Intrapulmonary administration of leukotriene B(4) augments neutrophil accumulation and responses in the lung to *Klebsiella* infection in CXCL1 knockout mice.," *J. Immunol.*, vol. 188, no. 7, pp. 3458–3468, Apr. 2012.
- [196] A. M. Tager and A. D. Luster, "BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors.," *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol. 69, no. 2–3, pp. 123–134, 2003.
- [197] T. Murata *et al.*, "Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 13, pp. 5205–5210, Mar. 2013.
- [198] T. C. Barnes, M. E. Anderson, and R. J. Moots, "The Many Faces of Interleukin-6 : The Role of IL-6 in Inflammation , Vasculopathy , and Fibrosis in Systemic Sclerosis," vol. 2011, 2011.
- [199] B. Beutler and A. Poltorak, "Sepsis and evolution of the innate immune response," vol. 29, no. 7, pp. 2–7, 2001.
- [200] E. Rokita and E. J. Menzel, "Characteristics of CD14 shedding from human monocytes. Evidence for the competition of soluble CD14 (sCD14) with CD14 receptors for lipopolysaccharide (LPS) binding.," *APMIS*, vol. 105, no. 7, pp. 510–518, Jul. 1997.
- [201] F. Macian, "NFAT PROTEINS: KEY REGULATORS OF T $\square$ CELL DEVELOPMENT AND FUNCTION," vol. 5, no. June, pp. 472–484, 2005.
- [202] I. Zanoni *et al.*, "CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation.," *Nature*, vol. 460, no. 7252, pp. 264–268, Jul. 2009.
- [203] Z. Pang *et al.*, "The calcineurin-NFAT axis contributes to host defense during *Pseudomonas aeruginosa* lung infection," vol. 102, no. December, pp. 1–10, 2017.

APÊNDICE

Além de avaliarmos edema e recrutamento de células no parênquima pulmonar, também avaliamos esses parâmetros no BALF. Para isso, camundongos C57Bl/6 e *Cd14^{-/-}* foram infectados ou não via i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*. Nos dias 1, 3 e 7 após a infecção, os camundongos foram eutanasiados para coleta do BALF. O número total de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer e neutrófilos e células mononucleares foram diferencialmente contadas em lâminas coradas com Panótico rápido. O sobrenadante do BALF foi utilizado para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Nossos dados mostram que na ausência de CD14, a concentração de proteínas totais no BALF é menor no terceiro e sétimo dia após a infecção, quando comparado aos camundongos C57Bl/6 (Figura 24A). Além disso, a infecção aumenta o recrutamento de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar no primeiro e terceiro dia após a infecção, quando comparado ao grupo não infectado (dia 0), e camundongos *Cd14^{-/-}* apresentaram redução no recrutamento destas células no terceiro dia após a infecção, quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (Figura 24B). Observamos também que a infecção aumenta o número absoluto de mononucleares no terceiro e sétimo dia após a infecção, sem diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (Figura 24C). Experimentos futuros serão realizados para determinar estes parâmetros nos animais deficientes de TLR4.

FIGURA 24: Na ausência de CD14, o edema e o recrutamento de neutrófilos no espaço bronco alveolar são menos intensos quando comparados com animais selvagens. Camundongos C57Bl/6 e *Cd14*^{-/-} foram infectados i.t. com $2,0 \times 10^7$ bacilos de *A. xylosoxidans*. Após 1, 3 e 7 dias após a infecção os animais foram eutanasiados e BALF recuperado. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) foram contados diferencialmente por Panótico rápido. Os dados são representativos de um experimento independente (n=4-7) e foram analisados pelo teste Two-Way ANOVA e Bonferroni no pós-teste. Dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, * infectados vs não infectados (dia 0); # C57Bl/6 vs *Cd14*^{-/-}.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Investigação do papel dos receptores da imunidade inata na infecção por *Achromobacter xylosoxidans*", registrada sob nº 17.1.820.60.0, sob a responsabilidade de Jefferson Elias Oliveira e Lúcia Helena Faccioli, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião do dia 25/04/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Alyne Fávero Galvão Meirelles, Ana Lucia da Costa Darini, Carlos Artério Sorgi, Caroline Fontanari e Morgana Kelly Borges Prado.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica							
Vigência da Autorização	dezembro/17 a agosto/2020							
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. isogênico C57BL/6	Cam. isogênico NFAT 1	Cam. Knock tlr2 -/-	Cam. Knock tlr4 -/-	Cam. Knock cd14 -/-	Cam. Knock myd88 -/-	Cam. Knock itgb2 low	Cam. Knock cd36 -/-
Nº de animais	196	64	60	60	120	60	60	60
Peso/Idade	24-28 g / 10-12 semanas							
Sexo	Macho							
Origem	Biotério CampusU SP-RP	Biotério de Animais Especiais da FMRP-USP				Biotério I FCFRP-USP	Biotério da UNIFESP	

Ribeirão Preto, 03 de maio de 2019.

Ana Patricia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP