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

GRAZIELE ZENARO MANIN

**Identificação dos componentes do Sistema Imune que participam
na resistência de camundongos em modelo de infecção letal por
*Legionella longbeachae***

Ribeirão Preto
2014

GRAZIELE ZENARO MANIN

**Identificação dos componentes do Sistema Imune que participam
na resistência de camundongos em modelo de infecção letal por
*Legionella longbeachae***

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Ribeirão Preto

2014

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.

Catálogo da Publicação

Manin, Grazielle Zenaro

Identificação dos componentes do Sistema Imune que participam na resistência de camundongos em modelo de infecção letal por *Legionella longbeachae*, 2014.

76 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Zamboni, Dario Simões.

1. *Legionella longbeachae*. 2. Doença dos legionários. 3. CCR2. 4. CCR5. 5. IL-17.

Nome: MANIN, Graziele Zenaro

Título: Identificação dos componentes do Sistema Imune que participam na resistência de camundongos em modelo de infecção letal por *Legionella longbeachae*

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

Julgamento: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

Julgamento: _____

Assinatura _____

Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Instituto de Biociências - Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG)

Julgamento: _____

Assinatura _____

**À minha família e ao meu noivo
pelo apoio e pela compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Dario Zamboni, pela dedicação e por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório.

Às agências de fomento, que forneceram apoio financeiro para a realização do trabalho, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos professores Dr. Fernando Cunha, Dr. José Carlos Farias Alves Filho e Dra. Maria Cristina Barreira pela infraestrutura cedida para a realização dos experimentos.

Aos veteranos do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata (Liliana, Juliana Issa, Marcelo, Larissa, Djalma e Catarina), por todos os ensinamentos e toda ajuda que foi extremamente necessária para o início, o desenrolar e a conclusão deste projeto.

À Danielle, à Daiane e à Karoline, que se tornaram minhas amigas, compartilharam comigo toda a ansiedade do mestrado e tornaram meus dias mais agradáveis em Ribeirão Preto. Em especial à Dani, por estar ao meu lado quando mais precisei.

À Mariana, por me ajudar a defender nossa linha de pesquisa com *L. longbeachae* e entrar de cabeça nessa causa.

Aos demais colegas do laboratório, Alexandre, Tiago, Juliana Ribeiro, Natália e Talita, que também são parte deste projeto e foram muito importantes para a conclusão do mesmo.

À Maira, pelo suporte técnico e por toda a paciência despendida com nossas manias e nossas vontades.

À Dona Lúcia, por cuidar, carinhosamente, do nosso local de trabalho, o que favoreceu nossos experimentos e garantiu nosso bem-estar, além de ser um grande exemplo de humildade e simplicidade.

À Ana, secretária da pós-graduação, pela atenção, pela dedicação e por toda sua simpatia.

Aos bioteristas, Domingos, Rubilan, Edir, Devanir, Adriana, Júlio e Denner, pelo cuidado com nossos animais e com nossos experimentos.

Aos meus amigos do SolCris, por continuarem fornecendo lembranças maravilhosas do tempo em que vivíamos juntos. Em especial, à Nathalie, à Melina, à Nathália e ao Carlos, por estarem sempre presentes, mesmo longe.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio, pelo incentivo e pelo orgulho que vejo em seus olhos todas as vezes que alcanço mais um dos meus objetivos. Esse orgulho me motiva e me ajuda a seguir, tentando chegar cada vez mais longe.

Ao meu noivo, Leonardo, por estar sempre ao meu lado, apoiando e incentivando, e por me mostrar que a felicidade está nas coisas simples da vida.

RESUMO

MANIN, G. Z. Identificação dos componentes do Sistema Imune que participam na resistência de camundongos em modelo de infecção letal por *Legionella longbeachae*. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença dos legionários consiste em uma broncopneumonia severa e atípica, que acomete de 2 a 7% das pessoas infectadas com *Legionella* spp e que apresenta taxa de mortalidade que varia de 5 a 30%, sendo considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade mundial. A patologia causada pela espécie *L. pneumophila* tem sido amplamente estudada em modelos experimentais e suas características clínicas foram extensivamente descritas. No entanto, este modelo não representa adequadamente a doença que acomete seres humanos, pois *L. pneumophila* não é letal aos camundongos como é para humanos. Recentemente, uma nova espécie de bactéria do gênero *Legionella*, denominada *Legionella longbeachae*, foi descrita como importante agente de doença dos legionários em países do hemisfério sul. A pneumonia induzida por *L. longbeachae* em humanos não difere da induzida por *L. pneumophila*. No entanto, *L. longbeachae* é letal para camundongos em doses baixas, o que torna esse modelo murino de doença dos legionários mais fidedigno ao que ocorre com humanos.

Com a acentuada mudança dos hábitos de nossa sociedade, há o aumento do número de pessoas com fatores que predispõe a doença, como idade elevada ou tratamento imunossupressor. Assim, entender melhor a relação patógeno-hospedeiro no curso da doença dos legionários por meio da utilização de um modelo experimental adequado é importante para a descoberta de novos meios de combater este patógeno.

Neste trabalho, geramos uma cepa de *L. longbeachae* mutante para *rpsL*, que se torna resistente à estreptomicina. Essa cepa pode ser utilizada para infecções *in vivo* nas quais a quantificação da CFU foi estimada em placas contendo antibiótico, o que culmina em maior eficiência experimental e menor quantidade de contaminações. Essa cepa foi utilizada em experimentos *in vivo* para avaliar os componentes do sistema imune que operam na resistência diante de uma dose letal bacteriana administrada pela via intranasal. Demonstramos que camundongos

deficientes para as citocinas IFN γ ou TNF α e para o receptor de quimiocinas CCR2 são mais susceptíveis à infecção do que os camundongos selvagens. No entanto, camundongos deficientes para o receptor de quimiocinas CCR5, para o receptor de IL-17, para a citocina IL-6 ou para o receptor citoplasmático NOD2 são mais resistentes à infecção quando comparados com animais selvagens. A descoberta destas moléculas em um modelo de infecção letal *in vivo* ressalta a importância de alguns componentes da imunidade para a resistência durante a doença dos legionários experimental e possíveis alvos terapêuticos para essa doença.

ABSTRACT

MANIN, G. Z. **Identification of Immune System components involved in mice resistance to *Legionella longbeachae* lethal infection.** 2014. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Legionnaires' disease is a severe and atypical bronchopneumonia, which affects 2-7% people infected with *Legionella* spp and has a mortality rate of 5 to 30%, therefore it is considered an important cause of mortality and morbidity worldwide. Disease caused by *Legionella pneumophila* has been largely studied in experimental models and its clinical characteristics was extensively described. However this model does not adequately represent the disease that affects humans, because *L. pneumophila* is not lethal to mice, as it is to humans. Recently, a new species of bacterium from *Legionella* genus, called *Legionella longbeachae*, was described as an important agent of Legionnaires' disease in the southern hemisphere.

The pneumonia induced by *L. longbeachae* in humans is not different from pneumonia induced by *L. pneumophila*. However, a low dose of *L. longbeachae* is lethal to mice, which makes this murine infection model of Legionnaires' disease more reliable than that which occurs in humans.

Because our society is changing, there is an increase in the number of persons with predisposing factors, like higher age or immunosuppressive treatment. So, a better understanding of host-pathogen relationship by using a suitable experimental model is important to find new ways to fight this pathogen.

Here, we generated a strain of *rpsL* mutant *L. longbeachae*, which becomes resistant to streptomycin. This strain could be used in *in vivo* infections, when CFU quantification was estimated in plates with antibiotic, culminating in greater experimental efficiency and lower contamination. This strain was used in *in vivo* experiments to evaluate components of the immune system that participates in resistance against lethal dose of bacteria administered intranasally.

We showed that *Tnfa*^{-/-}, *Ifny*^{-/-} or *Ccr2*^{-/-} mice are more susceptible to infection than wild type mice. However *Ccr5*^{-/-}, *Il17r*^{-/-}, *Il6*^{-/-} or *Nod2*^{-/-} mice are more resistant to infection than wild type animals. The discovery of these molecules in a lethal infection model *in vivo* highlights the importance of some components of immunity to

resistance during experimental Legionnaires' disease and potential therapeutic targets to disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de <i>L. longbeachae</i> DZ420 em placa com meio CYE semissólido suplementado com estreptomicina.....	35
Figura 2 - <i>L. longbeachae</i> DZ420 possui mutação no aminoácido 43 da proteína ribossômica S12 (K43R).....	35
Figura 3 - <i>L. longbeachae</i> DZ420 é capaz de replicar em macrófagos C57BL/6, mas não em macrófagos mortos	37
Figura 4 - <i>L. longbeachae</i> DZ420 causa hipotermia em camundongos infectados e é letal em doses iguais ou superiores a 10^5 bactérias.....	39
Figura 5 - <i>L. longbeachae</i> DZ420 recruta neutrófilos para os pulmões de camundongos infectados.....	41
Figura 6 - <i>L. pneumophila</i> deficiente em flagelina, mas não <i>L. longbeachae</i> DZ420 é controlada de maneira precoce nos pulmões dos camundongos infectados	45
Figura 7 - A citocina IFN γ é importante para a resistência frente à infecção por <i>L. longbeachae</i>	49
Figura 8 - Os efeitos do TNF α são importantes para a resistência frente à infecção por <i>L. longbeachae</i>	50
Figura 9 - CCR2 é parcialmente importante na resistência de camundongos frente à infecção por <i>L. longbeachae</i>	54
Figura 10 - CCR5 é importante para a patogênese da infecção por <i>L. longbeachae</i>	55
Figura 11 - IL-17R está envolvido na patogênese de <i>L. longbeachae</i>	58

ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

BAL: Lavado broncoalveolar

BMDMs: *Bone marrow-derived macrophages*

CCL: *C-C Chemokine ligand*

CCR: *C-C chemokine receptor*

CFU: Unidades Formadoras de Colônia

CXCL: *C-X-C Chemokine ligand*

CXCR: *C-X-C chemokine receptor*

CYE: *Charcoal yeast extract*

DAMP: *Damage-associated molecular pattern*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

Dot: *Defective organelle trafficking*

EDTA: *Ethylene diamine tetracetic acid*

EEA1: *Early Endosomal Antigen 1*

***flaA*⁻:** *Legionella pneumophila* deficiente para flagelina

g: grama

h: horas

Icm: *Intracellular multiplication*

IFN: *Interferon*

IL: Interleucina

Kg: quilograma

LCCM: Meio Condicionado de células L929

LCV: *Legionella containing vacuole*

LPS: Lipopolissacarídeo

mg: miligrama

MOPS: 3 -(*N-Morpholino*) *propanesulfonic acid*

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*

ml: mililitros

mM: milimolar

MPO: Enzima Mieloperoxidase

MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*

NI: Camundongos não infectados

NLR: *Nod Like Receptors*

NLRC4: *NLR family CARD domain containing-4*

NLRP3: *NLR family PYRIN domain containing 3*

nm: nanômetro

NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*

PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*

PBS: Salina Tamponada com Fosfato

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

PRRs: *Pattern recognition receptors*

RNA: Ácido Ribonucleico

SBF: Soro Bovino Fetal

TLR: *Toll Like Receptors*

TMB: tetramethylbenzidina

TNF: *Tumor necrosis factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Bactérias	27
3.3 Infecções <i>in vivo</i>	28
3.4 Ensaio de sobrevivência, perda de peso e aferição da temperatura de camundongos infectados.....	28
3.5 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (CFUs)	28
3.6 Recrutamento de neutrófilos	29
3.7 Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para dosagem de IL-1 β	30
3.8 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)	30
3.9 Curva de crescimento de <i>L. longbeachae</i> em BMDMs	31
3.10 Sequenciamento de <i>L. longbeachae</i>	31
3.11 Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Geração de cepa de <i>L. longbeachae</i> NSW150 resistente à estreptomicina	33
4.2 Caracterização do crescimento <i>in vitro</i> da cepa de <i>L. longbeachae</i> DZ420.....	36
4.3 Caracterização do crescimento <i>in vivo</i> da cepa de <i>L. longbeachae</i> DZ420	38
4.4 Análise do recrutamento de neutrófilos durante a infecção por <i>L. longbeachae</i> DZ420	40
4.5 Comparação entre os modelos experimentais de infecção por <i>L. longbeachae</i> DZ420 e por <i>L. pneumophila</i> deficiente em flagelina	42
4.6 Avaliação do papel das citocinas TNF α e IFN γ na resistência à infecção letal por <i>L. longbeachae</i> DZ420.....	46
4.7 Avaliação do papel dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 na resistência à infecção letal por <i>L. longbeachae</i> DZ420.....	51
4.8 Avaliação do papel da citocina IL-17 na resistência à infecção letal por <i>L. longbeachae</i>	56
4.9 Avaliação da participação de outros componentes da imunidade inata na resistência à infecção por <i>L. longbeachae</i> DZ420	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O termo legionelose refere-se, coletivamente, às síndromes clínicas resultantes da infecção por *Legionella* spp. As legioneloses são um importante problema de saúde pública, visto sua capacidade de dar origem a casos esporádicos, surtos epidêmicos e infecções hospitalares (nestas últimas, com taxa de mortalidade de quase 50%) (Leggieri et al., 2012),

As legioneloses englobam a doença dos legionários e a febre de Pontíac, sendo que uma das características que difere clinicamente as duas formas de manifestação da infecção por *Legionella* spp é a intensidade dos sintomas. Na doença dos legionários, os sintomas são mais relevantes e incluem pneumonia, tosse e febre, enquanto na febre de Pontíac os sintomas são mais amenos e se assemelham aos sintomas de uma gripe comum (Doebbeling and Wenzel, 1987).

A doença dos legionários consiste em uma broncopneumonia com um período de incubação de 2 a 10 dias que acomete de 2 a 7% das pessoas infectadas com *Legionella* spp., apresentando taxa de mortalidade que varia de 5 a 30%, enquanto que a febre de Pontíac consiste em uma infecção mais branda, auto-limitada, com um período de incubação de 36 horas, que acomete de 95 a 100% das pessoas infectadas com a bactéria e que apresenta taxa de mortalidade praticamente nula (Doebbeling and Wenzel, 1987). Como a hospitalização de pacientes com a doença dos legionários é comum, nestes casos o isolamento do micro-organismo é possível. No entanto, na febre de Pontíac o isolamento do micro-organismo é incomum devido ao fato de que pacientes acometidos por esta patologia normalmente não são hospitalizados.

As bactérias do gênero *Legionella* foram, primeiramente, identificadas como organismos importantes para a saúde pública em 1976. A espécie responsável pelo primeiro surto identificado da doença foi *L. pneumophila*, a qual permanece como a espécie que mais causa legioneloses (Fields et al., 2002; McDade et al., 1977). Pouco tempo depois, em 1980, foi isolada de um paciente com pneumonia em Long Beach, Califórnia, uma nova espécie de *Legionella* que foi denominada *Legionella longbeachae* (McKinney et al., 1981). Um segundo sorogrupo de *L. longbeachae* foi descoberto durante o mesmo ano (Bibb et al., 1981). Nenhum destes casos relatados de *L. longbeachae* sugeriu uma fonte conhecida de infecção.

Clinicamente, a doença dos legionários causada por *L. pneumophila* não difere da doença dos legionários causada por *L. longbeachae*, ou seja, tanto os sintomas quanto os achados laboratoriais em ambas as infecções são os mesmos (Amodeo et al., 2010).

Programas de vigilância da Europa (Joseph et al., 2010) e dos Estados Unidos (Neil and Berkelman, 2008) têm mostrado que o número de casos provocados por *L. longbeachae* ocupam o segundo ou o terceiro lugar no ranking de casos provocados por bactérias do gênero *Legionella*, representando cerca de 5% dos casos totais. Ao contrário, os dados de programas de vigilância de países do hemisfério sul, como Austrália e Nova Zelândia (Li et al., 2002), têm apontado, consistentemente, *L. longbeachae* como a principal causadora da doença dos legionários ou a segunda maior causadora, com números bem próximos dos casos originados por *L. pneumophila*. Em 2010, foi relatado um significativo aumento de mais de 40% no número de casos anuais da doença comparados com os 3 anos anteriores. Uma pesquisa recente na área rural da Tailândia também revelou que *L. longbeachae* é a principal causa da doença dos legionários naquele local (Phares et al., 2007). Além disso, relatórios recentes mostram que a incidência da doença dos legionários derivada de *L. longbeachae* tem aumentado mundialmente.

A credibilidade dos relatórios epidemiológicos depende da qualidade do diagnóstico da doença. A forma mais segura de se diagnosticar a doença dos legionários é através da cultura do escarro do paciente, porém as bactérias do gênero *Legionella* são fastidiosas e de crescimento lento, fazendo com que esse tipo de teste se torne inviável por despender muito tempo e meio de cultura diferenciado. Previamente, foi relatado que o atraso no estabelecimento da terapia adequada contra *Legionella* spp. pode aumentar significativamente a taxa de mortalidade da doença (Heath et al., 1996).

Desta maneira, foram desenvolvidos testes alternativos para o diagnóstico da doença. Entre eles, o teste do antígeno urinário é amplamente utilizado por ser rápido e adequado para a investigação de surtos da doença dos legionários (Wever et al., 2000). Em contrapartida, esse tipo de teste tem a desvantagem de reconhecer apenas antígenos de *Legionella pneumophila* do sorotipo 1, o que possibilita o diagnóstico adequado para a doença causada por esta espécie, mas não por outras (Murdoch, 2003). Testes que envolvem técnicas de biologia molecular, como a

investigação do DNA da bactéria, são rápidos e muito eficientes em distinguir as espécies de *Legionella*, porém eles estão disponíveis em poucos laboratórios e não são realizados como rotina nos laboratórios de análises clínicas (Murdoch, 2003).

Sabendo que ainda existe um problema mundial relacionado à dificuldade em diagnosticar corretamente a doença dos legionários e determinar qual espécie de *Legionella* é responsável pela doença em cada situação, os dados epidemiológicos tornam-se imprecisos, visto que o número de casos de doença dos legionários causados por outras espécies que não *L. pneumophila* podem estar subestimados. Esta constatação, aliada aos dados que comprovam a importância de *L. longbeachae* em alguns países, indica que o estudo desta espécie de *Legionella* pode trazer contribuições relevantes para a compreensão da doença dos legionários. Embora muitos estudos já tenham sido desenvolvidos com o objetivo de identificar os fatores importantes para a patogenicidade de *L. pneumophila*, muito pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro durante a infecção por *L. longbeachae*.

L. pneumophila é uma bactéria Gram-negativa intracelular facultativa que possui a capacidade de infectar protozoários ambientais de vida livre, principalmente amebas aquáticas (Swanson and Hammer, 2000). Estes protozoários que são susceptíveis à infecção por *L. pneumophila*, frequentemente, contaminam reservatórios de água humanos e é através da inalação de gotículas de água contaminadas com *L. pneumophila* que os seres humanos adquirem a doença dos legionários (Muder et al., 1986).

O ciclo de vida de *L. pneumophila* é muito semelhante em amebas e em macrófagos alveolares. Inicialmente, a bactéria é fagocitada e assim ela pode adentrar a célula permanecendo em um vacúolo endocítico. A fim de garantir sua multiplicação no interior deste vacúolo, a bactéria, que possui um sistema de secreção do tipo IV especializado, denominado Dot/Icm, injeta proteínas efetoras no citoplasma celular. Estas proteínas são capazes de subverter as respostas imunes do hospedeiro e garantir a formação de um nicho ideal para o crescimento da bactéria, denominado Vacúolo Contendo *Legionella* (LCV, do inglês, *Legionella-containing Vacuole*) (Derre and Isberg, 2004).

Para que o LCV seja formado, é necessário que a *L. pneumophila* evite a acidificação do vacúolo fagocítico, assim como sua fusão com lisossomos (Horwitz,

1983; Horwitz and Maxfield, 1984). É necessário também que sejam recrutadas vesículas derivadas do retículo endoplasmático e mitocôndrias para as proximidades do LCV (Derre and Isberg, 2004; Hubber and Roy, 2010; Newton et al., 2010; Swanson and Isberg, 1995). Com a formação do nicho adequado para multiplicação de *L. pneumophila*, a bactéria atinge grandes quantidades no interior dos LCVs e acaba por lisar o vacúolo e, posteriormente, as células nas quais se encontram, ficando livre para infectar novas células e dar continuidade à infecção (Isberg et al., 2009).

Enquanto macrófagos humanos são permissivos à replicação de *L. pneumophila*, macrófagos derivados da maioria das linhagens de camundongos utilizadas como modelos experimentais são restritivos ao crescimento desta bactéria, com exceção dos macrófagos da linhagem A/J, os quais são permissivos por possuírem mutações no gene *Naip5/Birc1*, gene este que codifica uma proteína importante no reconhecimento e no controle de *L. pneumophila* (Diez et al., 2003; Zamboni et al., 2006). Deste modo, muitos estudos sobre *L. pneumophila* que utilizam modelos experimentais demonstram a importância de diferentes moléculas para o controle da infecção. Estes estudos contribuíram para a identificação e associação de várias vias do sistema imune com a restrição da multiplicação de *L. pneumophila*.

Atualmente, é sabido que *L. pneumophila* pode ser reconhecida por diversos receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês, *Pattern recognition receptors*). Tais receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*) ou padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs, do inglês, *Damage-associated molecular pattern*) e podem estar localizados tanto na superfície quanto no interior da célula (Massis and Zamboni, 2011).

Os receptores do tipo toll (TLRs, do inglês, *Toll-Like Receptors*) são PRRs transmembrana encontrados na superfície celular ou em compartimentos endocíticos. Já foi demonstrado que vários TLRs possuem a capacidade de reconhecer *L. pneumophila*. Por exemplo, TLR2 pode reconhecer lipopolissacarídeos (LPS), lipopeptídeos e lipoproteínas de *L. pneumophila*; TLR9 pode reconhecer sequências CpG não metiladas de DNA e TLR5, a flagelina bacteriana (Janeway and Medzhitov, 2002).

Camundongos deficientes para a proteína MyD88, que consiste em uma molécula adaptadora comum a vias ativadas por diferentes TLRs e também por alguns receptores de citocinas, como o receptor de interleucina 1 (IL-1R, do inglês, *Interleukin-1 Receptor*) e o receptor da interleucina 18 (IL-18R, do inglês, *Interleukin-18 Receptor*), mostraram-se altamente susceptíveis à infecção por *L. pneumophila* (Archer et al., 2009). Acredita-se que isto aconteça devido à ativação dos TLRs e de MyD88 que culmina com ativação de fatores de transcrição, os quais acabam por induzir a transcrição de genes inflamatórios necessários para o controle da infecção.

Os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês, *Nod-Like Receptors*) também são PRRs, porém localizam-se no interior das células. NLRs como NOD1 e NOD2, após reconhecerem suas moléculas-alvo, levam à ativação de fatores de transcrição, através da molécula adaptadora RIP2, culminando na transcrição de genes inflamatórios, assim como ocorre com os TLRs. NLRs como NLRP3 e NLRC4, quando ativados, induzem a formação de plataformas moleculares denominadas inflamassomas, que culminam com a ativação de Caspase-1, levando a maturação e a secreção de interleucina 1 β (IL-1 β , do inglês, *Interleukin-1 β*) e interleucina 18 (IL-18, do inglês, *Interleukin-18*) (Massis and Zamboni, 2011). É descrito ainda que os receptores NOD1, NOD2 e sua molécula adaptadora RIP2 são importantes na geração de respostas imunes que acarretam o recrutamento de neutrófilos para os pulmões dos camundongos infectados, evento que contribui para a superação da infecção por *L. pneumophila* (Frutuoso et al., 2010).

Mesmo reconhecida a importância do recrutamento de neutrófilos e de outras células para o sítio da infecção por *L. pneumophila*, pouco se sabe sobre a relevância de receptores de quimiocinas no direcionamento destas células, embora tenha sido descrita a participação de ligantes destas moléculas na infecção. Como exemplo, foi visto o aumento da produção de CCL2, uma quimiocina ligante de CCR2, por macrófagos infectados *in vitro* (Matsunaga et al., 2001). Camundongos deficientes para CXCL2 apresentaram redução no número de neutrófilos recrutados para os pulmões, o que aumentou a letalidade da infecção por *L. pneumophila* em camundongos A/J, porém outros ligantes ou receptores de quimiocinas não foram avaliados (Tateda et al., 2001). Além dos receptores CXCR1 e CXCR2 que estão classicamente relacionados com o recrutamento de neutrófilos, outros receptores de quimiocinas também podem estar relacionados com a quimiotaxia destas células,

pois já foi descrito que, em determinadas condições inflamatórias, neutrófilos humanos presentes no sítio da infecção podem apresentar receptores de quimiocinas que são pouco expressos ou ausentes em neutrófilos circulantes (Hartl et al., 2008).

A indução da expressão de receptores de quimiocinas em neutrófilos pode ocorrer após determinados estímulos. Em experimentos *in vitro*, por exemplo, neutrófilos estimulados com ligantes de NOD2 aumentaram a expressão de CCR5 (Hartl et al., 2008). O receptor CCR5 também foi descrito como uma molécula importante para o recrutamento de neutrófilos para os pulmões de camundongos expostos a um aerossol de LPS (Grommes et al., 2014).

Da mesma forma, citocinas como IL-17 também vem sendo relacionadas com o recrutamento de neutrófilos e trabalhos anteriores mostraram que camundongos deficientes para esta citocina têm capacidade diminuída de recrutar neutrófilos (Korn et al., 2009). Durante a infecção por *L. pneumophila*, camundongos *Il-17^{-/-}* apresentaram redução da quantidade de neutrófilos e de quimiocinas nos pulmões, mostrando-se susceptíveis à infecção (Kimizuka et al., 2012).

Estes dados mostram que ainda existem muitos mecanismos relacionados ao recrutamento de neutrófilos que precisam ser desvendados. Há indícios de que os receptores CCR2 e CCR5 e também a citocina IL-17 possam estar envolvidos nestas vias de quimiotaxia (Grommes et al., 2014; Wang et al., 2012; Ye et al., 2001).

Outra molécula descrita como importante no controle da infecção por *L. pneumophila* é o interferon gama (IFN γ). O IFN γ é uma citocina que desempenha um importante papel na resposta imune inata contra microrganismos intracelulares (Schindler and Plumlee, 2008). Esta citocina é capaz de ativar macrófagos com perfil inflamatório, os quais possuem atividade microbicida potencializada (Decker et al., 2005). Camundongos deficientes em *Ifn γ* apresentam susceptibilidade intermediária à infecção por *L. pneumophila*, quando comparados com camundongos selvagens e camundongos deficientes para *Myd88*, sugerindo que existe uma via dependente de MyD88 e independente de IFN γ que é suficiente para ativar a resposta imune inata e promover a proteção do camundongo contra a infecção pela bactéria. (Archer et al., 2009). Uma resposta dependente de MyD88 e independente de IFN γ que pode ser relevante na defesa contra *L. pneumophila* é a produção do fator de necrose tumoral

alfa (TNF α , do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*), visto que a depleção de TNF α reduz significativamente a capacidade do camundongo controlar a replicação bacteriana (Skerrett et al., 1997).

Ressaltada a importância de diferentes espécies de *Legionella* para a doença dos legionários e, sabendo que apenas a patogênese por *L. pneumophila* tem sido extensivamente estudada, é necessário adquirir conhecimentos também a cerca de outras espécies de *Legionella*. Existe, por exemplo, poucas informações a respeito da doença causada pela espécie *L. longbeachae*, apesar de sua importância já descrita em alguns países. Além disso, já foi demonstrado que o modelo experimental murino de infecção por *L. longbeachae* é um modelo letal (Asare et al., 2007; Gobin et al., 2009; Pereira et al., 2011a). Isso torna *L. longbeachae* um modelo mais apropriado para o estudo da doença dos legionários do que *L. pneumophila*, pois representa de maneira mais fidedigna o desenvolvimento da doença em humanos.

A infecção por *L. longbeachae* não foi relacionada com a inalação de gotículas de água contaminada, mas sim com a inalação de material proveniente de compostos para plantio, terra e solos contaminados, visto que análises dos reservatórios de água de pessoas infectadas por esta espécie de *Legionella* foram negativas para a bactéria. Em contrapartida, diversos substratos comerciais para plantio foram positivos para a bactéria e alguns estudos de caso indicaram que a cepa de *L. longbeachae* encontrada no substrato comercial foi idêntica à encontrada no escarro do paciente (Steele et al., 1990).

Assim, embora a doença dos legionários causada por *L. longbeachae* apresente fatores de risco comuns a outras infecções por *Legionella*; como o uso de cigarros, apresentação de condições médicas preexistentes, idade avançada e o uso de terapia imunossupressora; ela também apresenta fatores de risco que, até o momento, são exclusivos: a prática de atividades de jardinagem e a utilização de substratos comerciais para plantio (O'Connor et al., 2007).

Com relação ao ciclo de vida em macrófagos, sabe-se que, após a fagocitose, o LCV que contém *L. pneumophila* exclui marcadores endossomais como o antígeno endossomal precoce 1 (EEA1, do inglês, early endosomal antigen 1), Rab5, LAMP-1, LAMP-2 e o receptor de manose 6-fosfato (M6PR, do inglês, Mannose 6-Phosphate Receptor), enquanto o vacúolo contendo *L. longbeachae* adquire o

marcador endossomal precoce EEA1 e o marcador endossomal tardio LAMP2 (Asare and Abu Kwaik, 2007). Este mesmo trabalho demonstrou utilizando macrófagos de linhagem (U937) que há o recrutamento de estruturas semelhantes ao retículo endoplasmático para os arredores do vacúolo contendo *L. longbeachae*, assim como faz a *L. pneumophila*. Esses dados sugerem que *L. longbeachae* difere de outras espécies de *Legionella* no que diz respeito a habitat, especificidade do hospedeiro e tráfego intracelular, embora ocasionem a mesma doença. Entretanto os mecanismos envolvidos em cada um desses pontos ainda precisam ser desvendados.

Recentemente, o grupo de Carmen Buchrieser sequenciou e analisou o genoma de quatro cepas de *L. longbeachae* (Cazalet et al., 2010). Uma dessas cepas, a NSW150, teve o genoma completamente sequenciado (Cazalet et al., 2010). A análise e comparação da cepa NSW150 de *L. longbeachae* com *L. pneumophila* revelou que a interação daquela bactéria com as células hospedeiras possui características diferentes da interação de *L. pneumophila*, visto que *L. longbeachae* possui um repertório único de substratos do sistema de secreção tipo IV Dot/Icm, domínios proteicos eucarióticos e semelhantes a eucarióticos, além de codificar um sistema de secreção adicional.

Em contraste com *L. pneumophila*, *L. longbeachae* não codifica flagelo (Cazalet et al., 2010). Visto que o reconhecimento de flagelina pelo inflamassoma de NLRC4 resulta em resistência a infecção em camundongos, o fato de *L. longbeachae* não apresentar flagelo pode explicar as diferenças na susceptibilidade de camundongos à infecção por esses dois patógenos. Além disso, a análise do transcriptoma revelou que *L. longbeachae* tem um ciclo de vida bifásico menos pronunciado que o ciclo de vida da *L. pneumophila*, e a análise do genoma e por microscopia eletrônica sugere que *L. longbeachae* é encapsulada (Cazalet et al., 2010). Essas diferenças espécie-específicas podem explicar os diferentes nichos ambientais e a epidemiologia da doença causada por estas duas espécies de *Legionella*.

Uma vez que o estudo da interação patógeno-hospedeiro pode favorecer a descoberta de novos meios de intervenção no quadro patogênico da doença dos legionários, faz-se necessária a escolha de um modelo experimental que represente adequadamente a doença que acomete os seres humanos. Como evidenciado

anteriormente, as características clínicas e as manifestações em humanos da doença dos legionários causada por *L. pneumophila* e *L. longbeachae* são iguais, porém em modelos experimentais murinos não existe esta similaridade. Enquanto a doença causada por *L. longbeachae* é letal para o modelo murino, representando o que acontece com seres humanos, a doença causada por *L. pneumophila* é rapidamente controlada pelos macrófagos alveolares dos camundongos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar o modelo experimental de infecção causada por *L. longbeachae*, por se tratar de um modelo mais fiel a doença que acomete seres humanos e identificar os componentes do sistema imune que participam na resistência e na susceptibilidade de camundongos em modelo de infecção letal por *L. longbeachae*

2. OBJETIVO

Gerar uma cepa de *Legionella longbeachae* que seja resistente a estreptomicina e que possa ser utilizada em experimentos *in vivo*.

Utilizar a cepa de *L. longbeachae* gerada para identificar componentes do sistema imune que participam da resistência em um modelo murino letal de doença dos legionários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 (selvagem), *Asc*^{-/-}, *Caspase-1*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Ccr4*^{-/-}, *Ccr5*^{-/-}, *Icam*^{-/-}, *Ifn γ* ^{-/-}, *Il-10*^{-/-}, *Il-17r*^{-/-}, *Il-1r*^{-/-}, *Il-22*^{-/-}, *Il-23*^{-/-}, *Il-6*^{-/-}, *Inos*^{-/-}, *Mip-1 α* ^{-/-}, *Myd88*^{-/-}, *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-}, *Nod1/Nod2*^{-/-}, *Rip2*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr9*^{-/-} e *Tnfa*^{-/-}, com idade entre 8 e 12 semanas. Durante os experimentos, estes camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, em microisoladores; com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo claro/escuro controlados, dispondo de livre acesso a ração e água.

3.2 Bactérias

As bactérias *L. longbeachae* utilizadas neste trabalho são bactérias clonais resistentes ao antibiótico estreptomicina, denominadas DZ420, geradas em nosso laboratório a partir de bactérias obtidas de isolados clínicos da cepa NSW150 de *L. longbeachae*. Os isolados clínicos da cepa NSW150 foram gentilmente cedidos pela Dra. Carmen Buchrieser do Instituto Pasteur, Paris, França (Cazalet et al., 2010). Também foram utilizadas bactérias *L. pneumophila* deficientes em flagelina (*L. pneumophila flaA*⁻) em experimentos que visavam a comparação entre as espécies *L. pneumophila* e *L. longbeachae*.

Todas as bactérias foram cultivadas em meio semissólido contendo extrato de levedura e carvão vegetal (meio CYE semissólido, do inglês, *Charcoal Yeast-Extract*) (1% de extrato de levedura (Acumedia), 1% de MOPS (Sigma), pH 6,9; 3,3 mM de L-cisteína (Sigma); 0,33 mM Fe(NO₃)₃ (Sigma), 1,5% de Ágar bacteriológico (Oxoid) e 0,2% de carvão ativado (Sigma)) suplementado ou não com estreptomicina (0,1 g/L) em estufa a 37°C.

Para infecções *in vivo* ou *in vitro*, as bactérias, crescidas por 48h a 37°C, foram diluídas em meio RPMI incompleto (Sigma) e a densidade óptica a 600nm (OD₆₀₀) foi obtida em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf, Alemanha) para

a determinação da quantidade de bactérias na solução. A concentração foi ajustada especificamente para cada tipo de infecção.

3.3 Infecções *in vivo*

Camundongos selvagens ou deficientes de 8 a 12 semanas foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (90mg/kg) (Agener União) e xilasina (5mg/kg) (Dopaser) por via intraperitoneal. Em seguida, os camundongos foram infectados por via intranasal com 40µL de meio RPMI incompleto contendo 10^6 bactérias. A verificação da eficácia da infecção foi feita através do crescimento de diluições da solução de infecção em placas contendo meio CYE semissólido e incubação destas placas a 37°C, o que permitiu avaliar se a concentração da solução estava adequada, ou pela realização de um ensaio de CFU (Unidade Formadora de Colônia, do inglês, Colony-Forming Unit) nos pulmões de um grupo de camundongos infectados 4 horas após a infecção, o que possibilitou determinar a quantidade de bactérias que realmente chegou ao órgão de interesse após a infecção.

3.4 Ensaio de sobrevida, perda de peso e aferição da temperatura de camundongos infectados.

Após a infecção, realizada como descrito no tópico 3.3, os camundongos selvagens ou deficientes foram acompanhados por um período de 10 a 15 dias. Diariamente, cada camundongo foi pesado em balança analítica (Mettler Toledo) e teve sua temperatura retal aferida com auxílio de um termômetro (Miller & Weber, USA). Os camundongos que vieram a óbito durante o período foram anotados para construção da curva de sobrevida dos respectivos animais.

3.5 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (CFUs)

Em determinados tempos após a infecção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus pulmões e baço explantados e

homogeneizados em 5 mL de meio RPMI incompleto estéril por 30 segundos a 3500g, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen, Fischer Scientific). O homogenato foi diluído em RPMI incompleto e plaqueado em meio CYE semissólido. As placas foram acondicionadas em estufa a 37°C por 96 horas e, no final deste período, as CFUs foram contadas e multiplicadas pelo fator de diluição.

3.6 Recrutamento de neutrófilos

O recrutamento de neutrófilos foi determinado pela avaliação da quantidade de células totais no Lavado Broncoalveolar (BAL, do inglês, *Bronchoalveolar lavage*) com posterior contagem diferencial destas células e também por ensaio da atividade de enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar. Para os dois experimentos, os camundongos foram infectados como descrito no item 3.3 e após 24, 48, 72, 96 ou 120h foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (cetamina e xilasina), administrado por via intravenosa.

Em seguida, a traqueia dos camundongos foi exposta e foi realizado o BAL com 1 mL de PBS-EDTA (5mM). O número de células no fluído obtido do BAL foi calculado por contador automático de células (Beckman Coulter) e foram preparadas lâminas em citocentrífuga (Shandon CytoSpin, Thermo Scientific), que ao serem coradas com corante panótico (Laborclin) possibilitaram a determinação da quantidade diferencial de células na amostra. O fluído obtido no BAL foi ainda centrifugado por 5 minutos a 1000g e o sobrenadante foi congelado a -80°C para posterior análise de citocinas.

Para o ensaio de MPO ativa, a cavidade torácica dos camundongos foi aberta e os pulmões foram perfundidos pela injeção de 10mL de PBS no ventrículo direito do coração. O lóbulo superior esquerdo do pulmão foi explantado e homogeneizado em 200µL de tampão (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; NaEDTA 0,015 M) pH 4,7 a 1000g por 30 segundos. Logo após, o homogenato foi centrifugado a 1000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1mL de tampão de lise (NaCl 0,2%) por tubo e os tubos foram agitados por 30 segundos e foram novamente centrifugados por 15 minutos a 1000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 500 µL de tampão H-TAB por tubo (1g de H-TAB,

200 mL de NaPO_4 0,05M, pH 5,4) e a amostra foi homogeneizada a 1000g por 30 segundos.

Para dosagem de MPO, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10000g, 4°C, e diluídas. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 μL de cada amostra diluída, 25 μL de tetrametilbenzidina 1,6 mM (TMB) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (3,845 mg/mL) e 100 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,5 mM por poço. Após incubação de 5 minutos no escuro, foram adicionados 75 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4M a cada poço para parar a reação e a leitura da placa foi feita em leitor de microplaca (Epoch, BioTek, USA) no comprimento de onda de 450 nm. O resultado obtido da comparação entre a amostra e a curva padrão, feita a partir da extração de neutrófilos da medula óssea de camundongos selvagens, foi o número de neutrófilos por miligrama de tecido pulmonar.

3.7 Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para dosagem de IL-1 β

Para dosagem dos níveis de IL-1 β no BAL dos camundongos infectados e não infectados, as amostras, preparadas como descrito no item 3.6, foram descongeladas, homogeneizadas e submetidas ao ensaio, segundo instruções do fabricante do kit utilizado (BD OptEIA Set Mouse, BD Biosciences).

3.8 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Células progenitoras extraídas da medula óssea de fêmures de camundongos selvagens (C57/BL6) foram colocadas em cultura para diferenciação em BMDMs. Estas células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 por 7 dias em meio RPMI 1640 com L-glutamina (Sigma), suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), 30% de meio condicionado por células L929 (LCCM), rico em M-CSF (citocina fundamental para a diferenciação dos BMDMs), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 U/mL de estreptomicina (Sigma). Posteriormente, os macrófagos foram retirados das placas pela lavagem das monocamadas com PBS gelado e foram distribuídos em placas de 24 poços (Corning) (2×10^5 células por poço). Estas células foram então cultivadas em estufa 37°C e 5% CO_2 em meio RPMI 1640 com

L-glutamina (Sigma) suplementado com 10% de LCCM e 5% de SBF por 24h para total aderência nas placas, como descrito (Marim et al., 2010).

3.9 Curva de crescimento de *L. longbeachae* em BMDMs

Para realização da curva de crescimento de *L. longbeachae*, as bactérias preparadas como descrito no item 3.2 foram adicionadas a cada poço de uma placa de 24 poços (Corning), contendo 2×10^5 BMDMs de camundongos C57BL/6, com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,015. Após 24, 48 ou 72 horas, o sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados foi retirado e as células aderidas foram lisadas com água estéril. O lisado celular foi adicionado ao sobrenadante de cultura das células separado anteriormente, garantindo que todas as bactérias de cada poço fossem contadas. Foram plaqueadas diluições seriadas de cada poço em placas contendo meio CYE semissólido e a quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU) foi obtida a partir da contagem de colônias bacterianas visualizadas após 96 horas de incubação em estufa 37°C.

Nos experimentos com opsonização, foi adicionado anticorpo anti-*L. longbeachae* produzido no laboratório a uma concentração de 1:250 por poço uma hora antes da infecção dos BMDMs com a bactéria.

3.10 Sequenciamento de *L. longbeachae*

Inicialmente, o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, deoxyribonucleic acid) da bactéria *L. longbeachae* DZ420 foi extraído através da fervura de 20 µL de uma solução de bactérias em água estéril por 8 minutos e foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, Polymerase Chain Reaction) com primers para o gene *rpsL* (Tabela 1) e 1 µL de DNA. Os fragmentos de DNA obtidos na reação de PCR foram purificados com kit comercial (QIAquick PCR Purification, Qiagen), segundo instruções do fabricante. Em seguida, o DNA purificado foi clonado em vetor pGEM®-T (Promega) e este vetor foi utilizado para transformar *Escherichia Coli* DH5α competentes. As bactérias *E. coli* DH5α que foram transformadas, ou seja, que receberam o plasmídeo pGEM®-T contendo o gene *rpsL* de *L. longbeachae* DZ420 foram crescidas em 5 mL de meio Luria-Bertani líquido

(LB líquido) (1% de triptona (Oxoid), 0,5% de extrato de levedura (Acumedia) e 1% de cloreto de sódio (J.T.Baker), pH 7,00) com ampicilina (50 µg/mL) por 16 horas sob agitação constante a 37°C. Em seguida, os plasmídeos foram extraídos das bactérias com kit comercial QIAprep Spin, Miniprep (QIAGEN). Foi realizado um PCR com o DNA plasmidial, primers universais para o plasmídeo pGEM-T e o reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e o DNA obtido foi precipitado com isopropanol 65%. O DNA precipitado foi ressuspensionado em formamida e sequenciado em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). A comparação entre o gene *rpsL* da *L. longbeachae* DZ420 e da NSW150 foi feita pela ferramenta básica de busca de local de alinhamento (BLAST, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI, do inglês, *National Center for Biotechnology Information*).

Tabela 1 - Sequência dos primers para amplificação do gene *rpsL*.

Primer	Sequência
RPSL_ORF (Forward)	ATGGCTACTATTAATCAGTTAGTAAG
RPSL_ORF (Reverse)	TTATTTTTTATCTTTTGGCTTCTTAGTACC

3.11 Análise Estatística

Os testes de análise estatística foram realizados no programa GraphPad Prism 5.0. Foi utilizado o teste t de Student para comparar dois grupos na análise da quantidade de CFU, do recrutamento de células e da secreção de citocinas, o teste Log-rank para a comparação entre curvas de sobrevivência *in vivo* e o *two way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para comparação entre curvas de perda de massa corporal e de crescimento de bactérias *in vitro*. Foram considerados significativos os resultados estatísticos em que $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Geração de cepa de *L. longbeachae* NSW150 resistente à estreptomicina

Os experimentos *in vivo* realizados para avaliar o número de bactérias presentes nos pulmões dos camundongos infectados utilizando bactérias *L. longbeachae* selvagens eram pouco aproveitáveis devido ao elevado número de contaminantes bacterianos que cresciam juntamente com as bactérias de interesse. Desta forma, nosso primeiro objetivo foi gerar uma cepa de *L. longbeachae* que pudesse crescer em placas contendo antibióticos. Para isso, optamos por utilizar como bactéria parental a cepa NSW150, cujo genoma foi totalmente sequenciado (Cazalet et al., 2010).

Para isso, a cepa NSW150 de *L. longbeachae* foi descongelada em placa contendo meio CYE semissólido e, 96 horas depois, uma colônia de bactérias isolada foi novamente plaqueada em placa contendo CYE semissólido. Após 48h, todas as bactérias que haviam crescido na placa foram retiradas e espalhadas em outra placa contendo meio CYE semissólido e estreptomicina (0,1 g/L). Após 96 horas, apenas as bactérias resistentes à estreptomicina cresceram na placa. As colônias de bactérias obtidas foram plaqueadas novamente e congeladas em meio de congelamento (2% peptona (Acumedia) e 5% glicerol (Invitrogen)). Para termos uma amostra clonal, escolhemos uma destas colônias para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Esta colônia foi denominada DZ420. Verificamos que a DZ420 cresce normalmente em placa contendo meio CYE semissólido e estreptomicina (Fig. 1A) e as colônias características se desenvolvem após 3 ou 4 dias de cultura a 37°C.

Com a utilização da bactéria DZ420, pudemos reduzir a porcentagem de placas contaminadas nos experimentos de infecção *in vivo* de cerca de 42% para 1,21%. Isso possibilitou maior eficiência nos nossos experimentos de quantificação de CFU em pulmões de animais infectados.

A estreptomicina é um aminoglicosídeo que tem como mecanismo de ação sua ligação à subunidade ribossômica 30S da bactéria, acarretando erros na tradução do RNA por aumentar a afinidade dos ribossomos a RNAs transportadores

não cognatos (Ozaki et al., 1969). Desta forma, há a produção e o acúmulo de proteínas defeituosas, que podem, muitas vezes, se tornarem tóxicas para a bactéria (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Assim, nosso próximo objetivo foi identificar qual mutação estava presente na *L. longbeachae* DZ420 que a permitia a pressão seletiva da estreptomicina.

Na maioria dos casos, a resistência a estreptomicina é adquirida por mutações espontâneas no gene *rpsL*, que é o gene responsável por codificar a proteína ribossomal S12, a qual é importante para a manutenção da precisão da tradução (Bottger and Springer, 2008). Isso já foi descrito para bactérias como *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae* (Mieskes et al., 2000; Pelchovich et al., 2013a; Salles et al., 1992). A fim de observar se a bactéria *L. longbeachae* DZ420 também possuía uma mutação no gene *rpsL* e descobrir qual seria essa mutação, sequenciamos o gene *rpsL* da DZ420 e comparamos com o gene *rpsL* da NSW150, cuja sequência já era conhecida e publicada (Cazalet et al., 2010). A sequência de nucleotídeos de ambos os genes obteve similaridade de 99%, diferindo apenas por um nucleotídeo localizado na posição 128 (Fig. 2A). A substituição de uma adenina por uma guanina na posição 128 do gene *rpsL* acarreta a troca do aminoácido 43 da proteína ribossômica S12 (Fig. 2B). Portanto, a mutação encontrada é denominada K43R, visto que o aminoácido codificado anteriormente pelo códon AAA na posição 43, que era uma lisina (K), foi substituído por uma arginina (R), codificada pelo códon AGA.

Figura 1 - Crescimento de *L. longbeachae* DZ420 em placa com meio CYE semissólido suplementado com estreptomicina. *L. longbeachae* DZ420 foi plaqueada em placa contendo meio CYE semissólido e mantida em estufa à 37°C por 96 horas.

A							
NSW150	61	GTGCCTGCACTGGAATCATGTCCACAACGACGTGGAGTATGTACGCGTGT	120	120			
DZ420	356	GTGCCTGCACTGGAATCATGTCCACAACGACGTGGAGTATGTACGCGTGT	297	297			
NSW150	121	ACACCTA AAAA ACCTAACTCAGCTATGCGTAAGGTTGCTCGTGTGCGTTTAACCAATGGG	180	180			
DZ420	296	ACACCTA G AAAAACCTAACTCAGCTATGCGTAAGGTTGCTCGTGTGCGTTTAACCAATGGG	237	237			

B							
NSW150	1	MATINQLVRKPRVDVKKKSNVPALESCQRRGVCTRVYTTTP K KPNSAMRKVARVRLTNG	60	60			
		<u>MATINQLVRKPRVDVKKKSNVPALESCQRRGVCTRVYTTTP+KPNSAMRKVARVRLTNG</u>					
DZ420	1	MATINQLVRKPRVDVKKKSNVPALESCQRRGVCTRVYTTTP R KPNSAMRKVARVRLTNG	60	60			
NSW150	61	FEVTSYIGGEGHNLQEHSVVLIRGGRVKDLPGVRYHTVRGSLDTSGVNDRKQGRSKYGTK	120	120			
		<u>FEVTSYIGGEGHNLQEHSVVLIRGGRVKDLPGVRYHTVRGSLDTSGVNDRKQGRSKYGTK</u>					
DZ420	61	FEVTSYIGGEGHNLQEHSVVLIRGGRVKDLPGVRYHTVRGSLDTSGVNDRKQGRSKYGTK	120	120			
NSW150	121	KPKDKK 126					
		<u>KPKDKK</u>					
DZ420	121	KPKDKK 126					

Figura 2 - *L. longbeachae* DZ420 possui mutação no aminoácido 43 da proteína ribossômica S12 (K43R). O DNA de *L. longbeachae* DZ420 foi extraído e o gene *rpsL* foi amplificado e sequenciado. (A) Alinhamento das sequências de DNA do gene da DZ420 com o gene da NSW150 selvagem. (B) Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína codificada por *rpsL* da DZ420 e da NSW150. Em vermelho, o nucleotídeo ou o aminoácido divergente entre as duas sequências.

4.2 Caracterização do crescimento *in vitro* da cepa de *L. longbeachae* DZ420

Por se tratar de uma bactéria muito virulenta, até o momento não havia sido possível o crescimento da *L. longbeachae* NSW150 em macrófagos murinos. Dessa forma, nosso grupo, não havia conseguido estudar a sobrevivência e a multiplicação destas bactérias em macrófagos, visto que nas primeiras horas de infecção, a bactéria é capaz de causar danos irreversíveis a maioria destas células em cultura.

Já é descrito para *E. coli* que a mutação no gene *rpsL* que torna a bactéria resistente à estreptomicina é capaz de aumentar a sobrevivência destas bactérias em macrófagos murinos, possivelmente por aumentar a precisão da tradução pelos ribossomos (Miskinyte and Gordo, 2013). Com base nisso, testamos se a *L. longbeachae* DZ420 era capaz de crescer em macrófagos murinos derivados de medula óssea.

Nosso resultado mostrou que a DZ420 é capaz de se multiplicar em macrófagos murinos derivados de medula óssea, atingindo até mil vezes a quantidade inicial de bactérias em 72 horas. Quando houve opsonização da bactéria, o crescimento aconteceu de forma mais rápida (Fig 3A), provavelmente devido a uma maior internalização bacteriana mediada por receptores FcR.

A fim de responder se a *L. longbeachae* DZ420 é capaz de se replicar no meio em ausência de células vivas, realizamos experimentos nos quais essas bactérias foram colocadas em contato com macrófagos vivos ou com macrófagos lisados por choque térmico. As bactérias que infectaram os macrófagos vivos cresceram e atingiram uma quantidade de quase mil vezes a quantidade inicial de bactérias como visto anteriormente. Porém as que foram colocadas em contato com os macrófagos lisados não foram capazes de se multiplicar (Fig. 3B).

Figura 3 - *L. longbeachae* DZ420 é capaz de replicar em macrófagos C57BL/6, mas não em macrófagos mortos. (A) Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDMs) foram infectados com *L. longbeachae* DZ420 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,15. Bactérias foram mantidas sem opsonização (círculos fechados) ou com opsonização (quadrados fechados) utilizando anticorpos anti-*L. longbeachae* feitos em coelhos. (B) BMDMs vivos (círculos fechados) ou lisados por choque térmico (quadrados fechados) foram infectados com *L. longbeachae* DZ420 a uma MOI de 0,15. Após 24, 48 ou 72 horas, o sobrenadante das células infectadas, juntamente com o lisado celular, foi plaqueado em meio CYE semissólido e incubado em estufa a 37°C por 96 horas para a determinação da quantidade de CFU. Barras verticais representam o erro padrão (SE). ** indica $P < 0,01$ e *** indica $P < 0,001$, two way ANOVA.

4.3 Caracterização do crescimento *in vivo* da cepa de *L. longbeachae* DZ420

A fim de observar se *L. longbeachae* DZ420 pode ser utilizada para análise da sobrevida de modelo letal de doença dos legionários murina, camundongos selvagens foram infectados pela via intranasal com três diferentes doses de DZ420 (10^4 , 10^5 e 10^6) e a sobrevida desses animais foi acompanhada. Mais de 50% dos camundongos infectados com 10^5 e 10^6 bactérias sucumbiram à infecção, enquanto que nenhum animal do grupo infectado com 10^4 bactérias foi a óbito (Fig. 4A). A partir deste experimento, determinamos a utilização da dose 10^6 para experimentos de análise de sobrevida e 10^5 para experimentos de quantificação de CFU *in vivo*. Em um experimento individual, camundongos selvagens infectados com 10^6 bactérias tiveram sua temperatura retal acompanhada por um período de 8 dias. Este ensaio revelou que há diminuição da temperatura retal dos camundongos infectados com DZ420 ao longo dos dias de infecção, sendo que a redução da temperatura torna-se mais acentuada após o quinto dia de infecção (Fig. 4B).

Figura 4 - *L. longbeachae* DZ420 causa hipotermia em camundongos infectados e é letal em doses iguais ou superiores a 10^5 bactérias. (A) Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^4 (círculos fechados), 10^5 (quadrados fechados) ou 10^6 (triângulos fechados) *L. longbeachae* DZ420 e a sobrevida desses camundongos foi acompanhada por 15 dias. (B) Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 bactérias *L. longbeachae* DZ420 e a temperatura retal foi mensurada diariamente até a morte dos animais.* indica $P < 0,5$, teste Log-rank.

4.4 Análise do recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *L. longbeachae* DZ420

Sabendo que grande parte dos camundongos infectados por *L. longbeachae* sucumbem precocemente à infecção, analisamos o recrutamento de células da imunidade inata para os pulmões dos camundongos infectados. Para isso, camundongos selvagens foram infectados com DZ420 e, após 9, 24, 48 ou 72 horas, foi realizado o Lavado Broncoalveolar desses camundongos. A contagem das células totais presentes no BAL revelou que o recrutamento de células para os pulmões dos animais infectados é intenso e ocorre de maneira dependente da dose e do tempo de infecção (Fig. 5A). A contagem diferencial mostrou que o aumento na quantidade de células presentes nos pulmões correspondia ao aumento de neutrófilos no sítio da infecção (Fig. 5B). Para confirmar o aumento na quantidade de neutrófilos nos pulmões após a infecção, foi realizado o ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que permite inferir a quantidade de neutrófilos presentes no tecido pulmonar a partir da dosagem da enzima MPO de neutrófilos. O resultado do ensaio de MPO ativa foi condizente com o padrão observado no BAL, ou seja, houve aumento da quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar dos camundongos de maneira dependente do tempo de infecção e da dose de bactérias recebida (Fig. 5C).

Figura 5 - *L. longbeachae* DZ420 recruta neutrófilos para os pulmões de camundongos infectados. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10⁵ (círculos fechados), 10⁶ (triângulos fechados) ou 10⁷ (quadrados fechados) *L. longbeachae* DZ420. Após 9, 24, 48 ou 72 horas, os animais foram sacrificados para realização do BAL, perfusão e retirada dos pulmões para ensaio de atividade de MPO. O número de células totais (A) e neutrófilos (B) foi estimado por contagem diferencial de células. A quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar foi inferida pelo ensaio de MPO (C). Camundongos não infectados (NI, círculos abertos) foram utilizados como controles. Cada ponto representa um animal distinto, as linhas horizontais representam a média dos valores do grupo e as linhas verticais, o erro padrão.

4.5 Comparação entre os modelos experimentais de infecção por *L. longbeachae* DZ420 e por *L. pneumophila* deficiente em flagelina

Como visto anteriormente, camundongos infectados por *L. longbeachae* são altamente susceptíveis à infecção (Fig. 4A). Sabemos que o modelo experimental da doença causada por *L. pneumophila* apresenta comportamento distinto, ou seja, os camundongos selvagens são resistentes à infecção (Pereira et al., 2011b). Foi visto durante o estudo do genoma da *L. longbeachae*, que esta espécie de *Legionella* não apresenta flagelina, diferentemente da espécie *L. pneumophila*. Por isso, para uma comparação mais adequada, fizemos um ensaio de sobrevivência de camundongos infectados com *L. longbeachae* DZ420 e *L. pneumophila* deficiente para flagelina (*L. pneumophila flaA*⁻).

Em nossos experimentos, camundongos infectados com *L. longbeachae* foram a óbito a partir do quinto dia após a infecção e apenas 30% do grupo infectado sobreviveu, enquanto que camundongos infectados com *L. pneumophila flaA*⁻ tiveram sobrevivência de 100% (Fig 6A).

Em resumo, o experimento confirmou que, no modelo experimental murino de doença dos legionários por infecção com *L. pneumophila*, os animais são resistentes à infecção, mesmo quando a bactéria é deficiente para flagelina. No entanto, no modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*, os camundongos sucumbem. Assim, podemos sugerir que o modelo de infecção por *L. longbeachae* representa melhor o quadro clínico observado em humanos. Além disso, a doença é clinicamente relevante, visto que possui uma taxa de mortalidade que pode variar de 5 a 30% (dados do Centro de Controle e Prevenção de doenças – CDC, do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*).

Com base nestes resultados, resolvemos avaliar a capacidade de controle da multiplicação bacteriana nos pulmões dos camundongos selvagens durante a infecção por estas duas espécies do gênero *Legionella*. Para isso, infectamos camundongos selvagens com *L. longbeachae* DZ420 ou *L. pneumophila flaA*⁻ e, após 4, 24, 48, 72, 96 ou 120 horas, estes camundongos foram sacrificados e tiveram seus pulmões extraídos, homogeneizados, diluídos e plaqueados para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU) presentes no tecido pulmonar.

A análise dos resultados demonstrou que a multiplicação de *L. longbeachae* nos camundongos foi mais intensa já nas primeiras 24 horas de infecção e o número de CFU nos pulmões aumentou até 72 horas. Após este período, a curva de crescimento bacteriano pareceu atingir um platô, visto que o número de bactérias foi mantido até 120 horas. Em contrapartida, a multiplicação de *L. pneumophila flaA* pareceu ser mais lenta e ocorreu até 48 horas após a infecção. Em tempos tardios, ocorreu o controle da replicação bacteriana, sendo que observamos diminuição na contagem de CFU nos pulmões dos camundongos infectados com *L. pneumophila* em 72, 96 e 120 horas de infecção.

Desta forma, sugerimos que, embora os mecanismos desempenhados pelo sistema imune para controlar a infecção por *L. pneumophila* sejam eficazes contra a bactéria, os mecanismos utilizados contra *L. longbeachae* falham em reconhecer esta bactéria ou em controlar sua replicação.

Anteriormente, vimos que existe um intenso recrutamento de células para os pulmões dos camundongos infectados e que o aumento na quantidade de células é concomitante com o aumento na quantidade de neutrófilos nesses órgãos, sugerindo que o recrutamento seja, predominantemente, de neutrófilos (Fig. 5A - C). Vimos também que a morte dos camundongos infectados com *L. longbeachae* acontece nos primeiros dias de infecção quando as quantidades de células e bactérias nos pulmões atingem carga bastante elevada (Fig. 6A-B). Diante disto, resolvemos comparar a cinética de recrutamento de neutrófilos para os pulmões dos camundongos selvagens infectados nos dois modelos experimentais de infecção: não letal (*L. pneumophila flaA*) e letal (*L. longbeachae* DZ420).

Observamos que tanto o recrutamento de células totais quanto o recrutamento de neutrófilos para os pulmões dos camundongos infectados ocorreram de maneira semelhante em tempos precoces da infecção (Fig. 6C-E), quando a diferença na quantidade de CFU já é discrepante (Fig 6B). Notamos que, após 72 horas, houve maior quantidade de células totais e de neutrófilos nos pulmões dos camundongos infectados com *L. longbeachae* do que nos pulmões dos camundongos infectados com *L. pneumophila* (Fig. 6C - E), porém acreditamos que esta diferença seja resultado do controle da infecção por *L. pneumophila*.

Assim, nossos resultados mostram que embora o recrutamento de neutrófilos seja intenso, ele não parece ser o fator diferencial que é responsável pela morte ou sobrevida nesse modelo murino de doença dos legionários.

Figura 6 - *L. pneumophila* deficiente em flagelina, mas não *L. longbeachae* DZ420 é controlada de maneira precoce nos pulmões dos camundongos infectados. (A) Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 *L. longbeachae* DZ420 ou *L. pneumophila* deficiente para flagelina (*flaA*⁻) e a sobrevivência dos animais foi acompanhada por 10 dias. (B-E) Camundongos C57BL/6 infectados com 10^5 *L. longbeachae* DZ420 (círculos fechados) ou com *L. pneumophila flaA*⁻ (triângulos fechados) ou não infectados (NI, quadrados abertos) foram sacrificados 4, 24, 48, 72, 96 ou 120h após a administração da bactéria ou do veículo para análise de CFU nos pulmões (B), recrutamento de células totais no BAL (C), neutrófilos no BAL (D) e neutrófilos no tecido pulmonar (E). Cada ponto representa um único animal e as barras horizontais representam a média dos grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, teste *t* de Student.

4.6 Avaliação do papel das citocinas TNF α e IFN γ na resistência à infecção letal por *L. longbeachae* DZ420

Após gerar e caracterizar a cepa DZ420 de *L. longbeachae*, partimos para estudos que visavam desvendar quais componentes do sistema imune participam na susceptibilidade e na resistência de camundongos à bactéria. Para isso, utilizamos camundongos deficientes para moléculas sabidamente importantes na defesa do organismo contra patógenos.

Inicialmente, testamos a relevância da citocina IFN γ no controle da infecção por *L. longbeachae*. IFN γ é uma citocina inflamatória produzida por células como linfócitos Th1 e células matadoras naturais (NK, *do inglês*, Natural Killers) e que pode atuar em outras células do sistema imune ativando-as, induzindo a expressão de diferentes proteínas e até mesmo propiciando estímulo para diferenciação destas células (Schoenborn and Wilson, 2007). Esses processos podem contribuir para a eliminação do patógeno e a resolução da infecção.

Assim, fizemos a análise da sobrevida de camundongos selvagens e deficientes para *Ifny* e percebemos que os camundongos *Ifny*^{-/-} foram altamente susceptíveis à infecção (Fig. 7A). Todos os camundongos foram a óbito até o quinto dia de infecção. A verificação da massa corporal destes animais, concomitantemente com a análise da sobrevida, mostrou que os camundongos de ambos os grupos perderam massa corporal de forma similar, porém apenas os camundongos selvagens que conseguiram controlar a infecção foram capazes de recuperar a massa corporal perdida (Fig. 7B). Na análise de CFU no pulmão, os camundongos *Ifny*^{-/-} apresentaram quantidades de bactérias semelhantes aos camundongos selvagens em 48 horas de infecção (Fig. 7C). Também não houve diferença entre a quantidade de CFU no baço de camundongos selvagens e *Ifny*^{-/-}, indicando que embora haja disseminação da bactéria para outros órgãos, essa disseminação ocorre de forma semelhante em ambos os grupos (Fig. 7D).

O número de células totais presentes no BAL destes camundongos foi igual com 48 horas de infecção, mas diferiu após 96h, os camundongos *Ifny*^{-/-} apresentaram maior recrutamento de células para os pulmões do que camundongos selvagens neste tempo (Fig. 7E). Quanto à produção da citocina inflamatória

interleucina 1 β (IL-1 β , do inglês, *Interleukin-1 β*), detectamos maiores quantidades desta citocina no BAL de camundongos *Ifn γ ^{-/-}* 48h depois da infecção (Fig. 7F).

Como conclusão, podemos sugerir que a citocina IFN γ desempenha papel importante no controle da infecção por *L. longbeachae* e ela pode estar envolvida no recrutamento de células para os pulmões e na produção de IL-1 β .

Assim como IFN γ , o TNF α também é uma citocina pró-inflamatória e possui papel relevante em inflamações e processos infecciosos, visto que a ligação desta citocina a seu receptor nas células alvo pode desencadear a ativação de fatores de transcrição como NF κ B e AP-1, os quais induzem a transcrição de genes inflamatórios. Já é descrito para *L. pneumophila* que camundongos deficientes para os receptores de TNF α são susceptíveis à infecção (Fujita et al., 2008). Desta forma, resolvemos analisar se a citocina TNF α também é importante para o controle da infecção no modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*. Para isso, utilizamos camundongos deficientes para a subunidade p55 do receptor do tipo 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1, do inglês, *Tumor Necrosis Factor Receptor*).

Na análise da sobrevida de camundongos selvagens e *Tnfr1^{-/-}*, observamos que os camundongos deficientes para o receptor 1 de TNF α foram altamente susceptíveis a infecção, sendo que 100% dos camundongos sucumbiram à infecção até o quinto dia após o contato com a bactéria, enquanto que apenas 60% dos camundongos selvagens foram a óbito durante os 15 dias de observação da sobrevida (Fig. 8A). Quando analisamos o gráfico de porcentagem de massa corporal, vimos que os camundongos *Tnfr1^{-/-}* perderam massa corporal e não foram capazes de recuperá-la, enquanto uma porcentagem dos camundongos selvagens, mesmo perdendo massa, conseguiu recuperá-la e sobreviver à infecção (Fig. 8B).

Quanto à quantidade de bactérias nos pulmões dos camundongos infectados, observamos que ela foi semelhante em 48 horas após a infecção, mas foi significativamente maior nos pulmões dos camundongos *Tnfr1^{-/-}* do que nos pulmões dos camundongos selvagens após 96 horas (Fig. 8C). Houve disseminação das bactérias, visto que observamos quantidades consideráveis delas no baço tanto de camundongos selvagens quanto de camundongos *Tnfr1^{-/-}*, porém não houve diferença no número de bactérias no baço quando comparamos ambos os grupos (Fig. 8D).

Assim, sugerimos que a citocina TNF α é importante para o controle precoce da infecção por *L. longbeachae*, visto que sem o receptor desta citocina, os camundongos ficam mais susceptíveis à infecção, mais permissivos à replicação bacteriana nos pulmões e vão a óbito precocemente.

Figura 7 - A citocina IFN γ é importante para a resistência frente à infecção por *L. longbeachae*. Camundongos C57BL/6 (círculos fechados / linhas azuis) e *Ifn γ ^{-/-}* (triângulos fechados / linhas verdes) foram infectados com 10^6 (A e B) ou 10^5 (C, D, E e F) *L. longbeachae* DZ420. A sobrevivência dos camundongos infectados foi acompanhada por 15 dias (A). Durante este período, a temperatura retal destes animais foi aferida diariamente (B). Para análise da quantidade de bactérias nos pulmões (C) e no baço (D), os camundongos infectados foram sacrificados após 48 ou 72 horas e os órgãos de interesse foram explantados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE semissólido contendo estreptomicina (0,1g/L) para determinação do número de CFUs. Para análise do recrutamento de células para os pulmões (E) e da quantidade de IL-1 β secretada (F), camundongos infectados e não infectados (NI, círculos abertos) foram sacrificados após 48 ou 72 horas e o BAL foi realizado. Posteriormente, as células foram contadas e a IL-1 β foi dosada por ELISA. Em (C), (D), (E) e (F), cada ponto representa um único animal, as linhas horizontais representam a média dos valores e as linhas verticais, o erro padrão. Em (A), *** indica $P < 0,001$, teste Log-rank. Em (E) e (F), * indica $P < 0,05$, teste *t* de Student.

Figura 8 - Os efeitos do TNF α são importantes para a resistência frente à infecção por *L. longbeachae*. Camundongos C57BL/6 (círculos fechados / linhas azuis) e *Tnfr1*^{-/-} (triângulos fechados / linhas verdes) foram infectados com 10⁶ (A e B) ou 10⁵ (C e D) *L. longbeachae* DZ420. A sobrevivência dos camundongos infectados foi acompanhada por 15 dias (A). Durante este período, a temperatura retal destes animais foi aferida diariamente (B). Para análise da quantidade de bactérias nos pulmões (C) e no baço (D), os camundongos infectados foram sacrificados após 48 ou 96 horas e os órgãos de interesse foram explantados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE semissólido contendo estreptomicina para determinação do número CFUs. Em (C) e (D), cada ponto representa um único animal, as linhas horizontais representam a média dos valores e as linhas verticais, o erro padrão. Em (A), *** indica $P < 0,001$, teste Log-rank. Em (C), * indica $P < 0,05$, teste t de Student.

4.7 Avaliação do papel dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 na resistência à infecção letal por *L. longbeachae* DZ420

As moléculas descritas anteriormente como importantes para a resistência de camundongos à infecção por *L. longbeachae* são envolvidas em diversas vias do sistema imune, o que faz delas importantes no combate à maioria dos patógenos existentes. Desta forma, iniciamos a investigação de componentes menos comuns, que também poderiam estar envolvidos no controle da infecção por *L. longbeachae*.

Primeiramente, investigamos o papel do receptor de quimiocinas C-C do tipo 2 (CCR2, do inglês, *C-C Chemokine Receptor type 2*). Este receptor é importante para o recrutamento de células para o local da infecção, tanto monócitos, células NK, basófilos, células dendríticas imaturas, células T ativadas e células B, como classicamente descrito (Bonecchi et al., 2009), quanto neutrófilos, como relatado recentemente (Wang et al., 2012).

Após infectarmos camundongos selvagens e deficientes para *Ccr2*, acompanhamos a sobrevivência e a perda de massa corporal desses animais diariamente. Desta forma, vimos que os camundongos *Ccr2*^{-/-} são mais susceptíveis, pois, enquanto apenas 40% dos camundongos selvagens sucumbiram à infecção, cerca de 80% dos camundongos *Ccr2*^{-/-} vieram a óbito (Fig. 9A). Tanto os camundongos selvagens, quanto os deficientes para *Ccr2* perderam grandes quantidades de massa corporal nos primeiros dias após a infecção, porém os camundongos *Ccr2*^{-/-} tiveram maior dificuldade para recuperar a massa corporal perdida (Fig. 9B). Entretanto, não observamos diferença na quantidade de bactérias presentes nos pulmões (Fig. 9C) e no baço (Fig. 9D) de camundongos selvagens e deficientes para *Ccr2*.

Quando analisamos o recrutamento de células para os pulmões, vimos que a quantidade de células totais (Fig. 9E) e de neutrófilos (Fig. 9F) no BAL e a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar (Fig. 9G) de camundongos selvagens e *Ccr2*^{-/-} são semelhantes. Para finalizar, avaliamos os níveis de IL-1 β secretada, os quais também não diferiram entre os grupos testados (Fig. 9H).

Em resumo, sugerimos que a molécula CCR2 contribui parcialmente na resistência de camundongos à infecção por *L. longbeachae*, visto que camundongos deficientes para esta molécula foram mais susceptíveis à infecção, porém não

apresentaram quantidade de CFU no pulmão ou no baço ou recrutamento de células e produção de IL-1 β alterados.

Ainda em busca de componentes do sistema imune envolvidos no controle ou na patogênese do modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*, utilizamos camundongos deficientes para *Ccr5* para analisarmos a participação desta molécula, que também vem sendo relacionada com o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e outras células para o local de infecção (Grommes et al., 2014; Kitade et al., 2012; Schlecker et al., 2012).

Inicialmente, conduzimos um ensaio para análise da sobrevida e da perda de massa corporal dos animais infectados. O grupo composto por camundongos *Ccr5*^{-/-} teve 100% de sobrevida, enquanto o grupo composto por camundongos selvagens teve apenas 60% de sobrevida (Fig. 10A). No gráfico de porcentagem de massa corporal, vemos que os camundongos *Ccr5*^{-/-} perderam apenas uma pequena porcentagem de massa corporal e a recuperaram rapidamente, enquanto que os camundongos selvagens tiveram maior perda de massa corporal e maior dificuldade para recuperar o peso inicial (Fig. 10B).

Com relação à quantidade de bactérias presentes nos pulmões e no baço dos camundongos selvagens e deficientes para *Ccr5*, pudemos perceber que os camundongos *Ccr5*^{-/-} apresentaram menor quantidade de CFU após 72 e 96 horas de infecção (Fig. 10C e D). Isto mostra que os camundongos deficientes para *Ccr5* controlaram a infecção de maneira mais rápida e permitiram menor disseminação da bactéria para outros órgãos.

Embora tenhamos observado uma grande diferença na quantidade de CFU nos pulmões dos animais selvagens e *Ccr5*^{-/-} infectados, quando analisamos o recrutamento de células para este órgão, não conseguimos visualizar diferentes quantidades de células totais e neutrófilos no BAL desses camundongos (Fig. 10E e F), assim como também não houve diferença na quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar de ambos os grupos (Fig. 10G). A quantificação da secreção de IL-1 β no BAL nos mostrou que camundongos *Ccr5*^{-/-} têm uma menor quantidade desta citocina inflamatória 96 horas após a infecção (Fig. 10H).

Nossos experimentos suportam a hipótese de que a deficiência de *Ccr5* pode culminar em resistência à infecção por *L. longbeachae*, sugerindo uma importância significativa desta molécula na patogênese da doença dos legionários. No entanto,

não observamos diferença no recrutamento de células totais e de neutrófilos para os pulmões dos camundongos *Ccr5*^{-/-} infectados com *L. longbeachae*.

Figura 9 - CCR2 é parcialmente importante na resistência de camundongos frente à infecção por *L. longbeachae*. Camundongos C57BL/6 (círculos fechados / linhas azuis) e *Ccr2*^{-/-} (triângulos fechados / linhas verdes) foram infectados com 10⁶ (A e B) ou 10⁵ (C - H) *L. longbeachae* DZ420. A sobrevivência dos camundongos infectados foi acompanhada por 15 dias (A). Durante este período, a temperatura retal destes animais foi aferida diariamente (B). Para análise da quantidade de bactérias nos pulmões (C) e no baço (D), os camundongos infectados foram sacrificados após 72, 96 ou 120 horas e os órgãos de interesse foram explantados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE semissólido contendo estreptomicina para determinação do número de CFUs. Para análise do recrutamento de células (E - G) e secreção de IL-1β (H), camundongos infectados e não infectados (NI, círculos abertos) foram sacrificados após 72, 96 ou 120h e submetidos ao BAL e à perfusão e retirada dos pulmões para ensaio da atividade de MPO. Foi realizada a contagem das células totais (E) e dos neutrófilos (F) no BAL, a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar (G) foi estimada pelo ensaio de MPO e a secreção de IL-1β foi determinada por ELISA. Em (C), (D), (E), (F), (G) e (H), cada ponto representa um único animal, as linhas horizontais representam a média dos valores e as linhas verticais, o erro padrão. Dados representativos de 3 experimentos individuais. Em (A), * indica P<0,05, teste Log-rank. Em (B), * indica P<0,05, two-way ANOVA.

Figura 10 - CCR5 é importante para a patogênese da infecção por *L. longbeachae*. Camundongos C57BL/6 (círculos fechados / linhas azuis) e *Ccr5*^{-/-} (triângulos fechados / linhas verdes) foram infectados com 10⁶ (A e B) ou 10⁵ (C - H) *L. longbeachae* DZ420. A sobrevivência dos camundongos infectados foi acompanhada por 15 dias (A). Durante este período, a temperatura retal destes animais foi aferida diariamente (B). Para análise da quantidade de bactérias nos pulmões (C) e no baço (D), os camundongos infectados foram sacrificados após 72 ou 96 horas e os órgãos de interesse foram explantados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE semissólido contendo estreptomicina (0,1 g/L) para determinação do número de CFUs. Para análise do recrutamento de células (E - G) e secreção de IL-1β (H), camundongos infectados e não infectados (NI, círculos abertos) foram sacrificados após 72, 96 ou 120h e submetidos ao BAL e à perfusão e retirada dos pulmões para ensaio de MPO. Foi realizada a contagem das células totais (E) e dos neutrófilos (F) no BAL, a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar (G) foi estimada pelo ensaio de MPO e a secreção de IL-1β foi determinada por ELISA. Em (C), (D), (E), (F), (G) e (H), cada ponto representa um único animal, as linhas horizontais representam a média dos valores e as linhas verticais, o erro padrão. Dados representativos de 4 experimentos individuais. Em (A), * indica $P < 0,05$, teste Log-rank. Em (B), * indica $P < 0,05$, two-way ANOVA. Em (C) e (D), * indica $P < 0,05$ e *** indica $P < 0,001$, teste *t* de Student.

4.8 Avaliação do papel da citocina IL-17 na resistência à infecção letal por *L. longbeachae*

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células da imunidade inata e da imunidade adquirida, capaz de induzir a célula alvo a expressar diversas citocinas e quimiocinas que podem desempenhar diferentes funções na resposta inflamatória (Korn et al., 2009). Uma destas funções é o recrutamento de neutrófilos que é resultado da indução da expressão de moléculas quimioatrativas pela IL-17. O recrutamento de neutrófilos é importante no quadro infeccioso, porque possibilita controle do patógeno com o qual o organismo entrou em contato (Cua and Tato, 2010). Por essa propriedade da IL-17, decidimos utilizar camundongos deficientes para o receptor de IL-17 (IL-17R, do inglês, *Interleukin-17 Receptor*) para avaliar o papel desta citocina no controle da infecção por *L. longbeachae*.

Para isso, realizamos a análise da sobrevivência e da perda de massa corporal dos camundongos selvagens e *Il-17r^{-/-}* infectados. O grupo composto por camundongos *Il-17r^{-/-}* apresentou 80% de sobrevivência, enquanto no grupo composto por camundongos selvagens todos os animais morreram (Fig. 11A). Na análise da perda de massa corporal, observamos que os camundongos *Il-17r^{-/-}* perderam massa corporal como os camundongos selvagens nos três primeiros dias de infecção e a recuperaram rapidamente, enquanto que os camundongos selvagens tiveram maior dificuldade para recuperar o peso inicial (Fig. 11B).

Quando analisamos a quantidade de bactérias presentes nos pulmões e no baço dos camundongos selvagens e deficientes para *Il-17r*, notamos que os camundongos *Il-17r^{-/-}* apresentaram menor quantidade de CFU após 72 e 96 horas de infecção (Fig. 11C e D). Este experimento nos permite sugerir que os camundongos deficientes para *Il-17r* controlam a infecção de maneira mais rápida e permitem menor disseminação da bactéria para outros órgãos.

Como esperado, na comparação com camundongos selvagens, visualizamos uma menor quantidade de células totais e neutrófilos no BAL dos animais *Il-17r^{-/-}* com 96 horas de infecção (Fig. 11E e F). Para confirmar, realizamos o ensaio de MPO no tecido pulmonar destes camundongos e obtivemos, novamente, uma menor quantidade de neutrófilos nos pulmões dos camundongos *Il-17r^{-/-}* quando comparado

com camundongos selvagens em 96 horas após o contato com a bactéria (Fig. 11G).

Finalmente, analisamos a secreção de IL-1 β no sobrenadante do BAL dos camundongos infectados. Após 96 horas de infecção, foi observada diminuição dos níveis de IL-1 β secretada nos pulmões dos animais *Il-17^{-/-}* (Fig. 11H).

Desta forma, sugerimos que a citocina IL-17 participa da patogênese da doença dos legionários causada por *L. longbeachae*, visto que, na ausência dos sinais desencadeados por esta molécula, os camundongos respondem melhor à infecção pela bactéria.

Figura 11 - IL-17R está envolvido na patogênese de *L. longbeachae*. Camundongos C57BL/6 (círculos fechados / linhas azuis) e IL-17^{-/-} (triângulos fechados / linhas verdes) foram infectados com 10⁶ (A e B) ou 10⁵ (C - H) *L. longbeachae* DZ420. A sobrevivência dos camundongos infectados foi acompanhada por 10 dias (A). Durante este período, a temperatura retal destes animais foi aferida diariamente (B). Para análise da quantidade de bactérias nos pulmões (C) e no baço (D), os camundongos foram sacrificados após 72 ou 96 horas de infecção, e os órgãos de interesse foram explantados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE semissólido contendo estreptomicina para determinação do número de CFUs. Para análise do recrutamento de células (E - G) e secreção de IL-1 β (H), camundongos infectados e não infectados (NI, círculos abertos) foram sacrificados após 24, 48, 72 ou 96 horas de infecção e foram submetidos ao BAL e à perfusão e retirada dos pulmões para ensaio de MPO. Foi realizada a contagem das células totais (E) e dos neutrófilos (F) no BAL, a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar (G) foi estimada pelo ensaio de MPO e a secreção de IL-1 β foi determinada por ELISA. Em (C), (D), (E), (F), (G) e (H), cada ponto representa um único animal, as linhas horizontais representam a média dos valores e as linhas verticais, o erro padrão. Dados representativos de 3 experimentos individuais. Em (A), *** indica $P < 0,001$, teste Log-rank. Em (B), * indica $P < 0,05$, two-way ANOVA. Em (C), (D), (E), (F), (G) e (H), * indica $P < 0,05$ e *** indica $P < 0,001$, teste t de Student.

4.9 Avaliação da participação de outros componentes da imunidade inata na resistência à infecção por *L. longbeachae* DZ420

Outros camundongos nocautes também foram testados no modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*, a fim de caracterizar este novo modelo de infecção que emerge como um modelo promissor por melhor representar, em camundongos, o quadro clínico da doença dos legionários observada em humanos. Os resultados referentes a essa caracterização estão representados na Tabela 2. Para determinação do fenótipo resistente, susceptível e indiferente, foram utilizados apenas experimentos de análise de sobrevivência.

Além dos animais *Ccr5*^{-/-} e *Il-17r*^{-/-}, camundongos deficientes para a citocina inflamatória interleucina 6 (IL-6, do inglês, *Interleukin-6*) e para o receptor intracelular *Nod2* também apresentaram fenótipo de resistência frente à infecção por *L. longbeachae*. Por outro lado, vimos que animais deficientes para a sintase 2 de óxido nítrico (NOS2 ou iNOS, do inglês, *inducible Nitric Oxide Synthase*) e os deficientes em *Myd88* são mais susceptíveis que camundongos selvagens à doença dos legionários causada por *L. longbeachae*.

Tabela 2 - Susceptibilidade/Resistência de camundongos nocautes à infecção por *L. longbeachae*.

<u>Camundongo</u>	<u>Fenótipo em relação ao C57BL/6</u>	<u>n de camundongos nocautes</u>	<u>n de camundongos C57BL/6</u>	<u>Número de Experimentos</u>
<i>Asc</i> ^{-/-}	Indiferente	7	8	1
<i>Caspase-1</i> ^{-/-}	Indiferente	8	8	1
<i>Ccr2</i> ^{-/-}	Susceptível	9* / 10 / 10* / 10* / 10	10 / 10 / 10 / 10 / 10	5
<i>Ccr4</i> ^{-/-}	Indiferente	10	10	1
<i>Ccr5</i> ^{-/-}	Resistente	10* / 10 / 10* / 9* / 10*	10 / 10 / 10 / 10 / 10	5
<i>Icam</i> ^{-/-}	Indiferente	7	10	1
<i>Ifnγ</i> ^{-/-}	Susceptível	9* / 10*	10 / 10	2
<i>Il10</i> ^{-/-}	Indiferente	8	10	1
<i>Il17r</i> ^{-/-}	Resistente	10* / 10* / 10*	10 / 10 / 10	3
<i>Il1r</i> ^{-/-}	Indiferente	7 / 8 / 10	10 / 10 / 10	3
<i>Il22</i> ^{-/-}	Indiferente	10	10	1
<i>Il23</i> ^{-/-}	Indiferente	10	10	1
<i>Il6</i> ^{-/-}	Resistente	10*	10	1
<i>inos</i> ^{-/-}	Susceptível	10*	10	1
<i>Mip1α</i> ^{-/-}	Indiferente	6	10	1
<i>Myd88</i> ^{-/-}	Susceptível	10*	10	1
<i>Nod1/Nod2</i> ^{-/-}	Indiferente	10	10	1
<i>Nod1</i> ^{-/-}	Indiferente	9	10	1
<i>Nod2</i> ^{-/-}	Resistente	10*	10	1
<i>Rip2</i> ^{-/-}	Indiferente	10 / 9	10 / 10	2
<i>Tlr2</i> ^{-/-}	Indiferente	9	10	1
<i>Tlr9</i> ^{-/-}	Indiferente	10	10	1
<i>Tnfa</i> ^{-/-}	Susceptível	10*	10	1

* indica P<0,05, teste Log-rank

5. DISCUSSÃO

A doença dos legionários ainda é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade mundial. A patologia causada pela espécie *L. pneumophila* tem sido amplamente estudada em modelos experimentais e suas características clínicas têm sido bem descritas, embora este modelo não represente adequadamente a doença que acomete seres humanos por se tratar de um modelo que não é letal aos camundongos. No entanto, existe pouca informação sobre a doença causada por *L. longbeachae*, apesar de sua importância em alguns países e da fidelidade do modelo experimental em representar a doença dos legionários. Atualmente, os hábitos sociais têm mudado e o número de pessoas com fatores que predispõe a doença, como idade elevada ou tratamento imunossupressor, tem aumentado constantemente. Desta forma, entender melhor os mecanismos de virulência e adaptação de *Legionella* no ambiente natural e artificial através da utilização de um modelo experimental adequado é estritamente necessário para descobrir novos meios de combater este patógeno. Portanto, neste trabalho, buscamos identificar alguns componentes do sistema imune que participam na resistência do modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*, a fim de melhor compreender a doença dos legionários.

Inicialmente, geramos uma cepa de *L. longbeachae* resistente à estreptomicina (DZ420) (Fig. 1) a partir da cepa NSW150. A cepa de *L. longbeachae* NSW150 já é conhecida e sequenciada (Cazalet et al., 2010), porém, por não ser resistente a nenhum antibiótico, dificultava a realização dos experimentos de análise da quantidade de bactérias nos pulmões dos camundongos infectados. Visto que os pulmões são órgãos que estão em contato com diversos patógenos, outros microrganismos cresciam nas placas contendo meio CYE semissólido e inibiam ou mascaravam o crescimento de *L. longbeachae*. Com a utilização da cepa DZ420, as placas contaminadas, que anteriormente somavam quase 42% das placas totais, foram reduzidas para menos de 2%, o que permitiu diminuir a quantidade de camundongos utilizados por grupo experimental e garantiu maior confiabilidade dos resultados.

A cepa DZ420 também possibilitou a realização de experimentos *in vitro*, pois a cepa NSW150, por sua elevada virulência, levava a morte os macrófagos murinos

nas primeiras horas de infecção, o que a impossibilitava de se multiplicar no interior dessas células em cultura. Em curva de crescimento em BMDMs de camundongos selvagens com a cepa DZ420, o número de CFU por poço, após 72 horas de infecção, atingiu mil vezes a quantidade inicial de bactérias, o que mostra a alta capacidade de multiplicação desta cepa. Vimos que com a opsonização, o crescimento é acelerado nas primeiras horas após a infecção, porém, após 72 horas, a quantidade de bactérias por poço foi equivalente nas condições com e sem opsonização (Fig. 3A). Aparentemente, a DZ420 se multiplica rapidamente até que, por volta do terceiro dia após a infecção, a quantidade de bactérias atinge um platô que pode ocorrer devido à limitação de nutrientes e de células hospedeiras. Nossos experimentos também mostraram que os macrófagos precisam estar vivos para dar suporte ao crescimento da *L. longbeachae* DZ420 (Fig. 3B), descartando assim a possibilidade dessas bactérias estarem se multiplicando no meio de cultura sem necessariamente interagir com os macrófagos vivos.

A literatura é vasta no que diz respeito à resistência bacteriana a antibióticos. Foi descrito que mutações pontuais no gene *rpsL* de diversos microrganismos são capazes de conferir resistência à estreptomicina (Pelchovich et al., 2013a; Pelchovich et al., 2013b; Salles et al., 1992). Este gene codifica a proteína ribossomal S12, a qual é importante para a manutenção da precisão da tradução (Bottger and Springer, 2008). A mutação do gene *rpsL* impede que a estreptomicina se ligue aos ribossomos, evitando o acúmulo de erros na tradução dos RNA mensageiros e prejuízos para as bactérias (Ozaki et al., 1969).

A bactéria *L. longbeachae* DZ420 utilizada nesse trabalho apresentou uma mutação pontual que alterou o aminoácido na posição 43 da proteína ribossomal S12 de uma lisina para uma arginina (mutação K43R) (Fig. 2). Um estudo anterior analisou bactérias *E. coli* com diferentes mutações pontuais que conferiam resistência à estreptomicina, dentre elas, a mutação K43R (Miskinyte and Gordo, 2013). Neste trabalho, os autores demonstraram que há um aumento da sobrevivência das bactérias mutadas e resistentes à estreptomicina no interior de macrófagos e sugeriram que o aumento da sobrevivência ocorre devido ao aumento da precisão da tradução pelos ribossomos. Desta mesma forma, é possível que a mutação no códon 43 do gene *rpsL* também resulte no aumento da precisão da tradução das proteínas na *L. longbeachae* e isso diminuiria a velocidade da multiplicação

bacteriana e possibilitaria o acompanhamento de seu crescimento no interior dos macrófagos murinos derivados de medula óssea.

Embora tenha adquirido a capacidade de crescer no interior de macrófagos como faz a *L. pneumophila*, no modelo de infecção *in vivo*, *L. longbeachae* DZ420 ainda apresentou perfil diferenciado de outras espécies de *Legionella*, pois é letal para camundongos (Fig. 4A) assim como as demais cepas de *L. longbeachae* já descritas na literatura (Asare et al., 2007; Pereira et al., 2011b). Além disso, os camundongos infectados apresentaram uma hipotermia progressiva no decorrer da infecção que culminou com a morte do animal (Fig. 4B).

Além de ser letal, a infecção por *L. longbeachae* tem a capacidade de levar os camundongos a óbito de maneira precoce, sugerindo uma falha importante nos mecanismos da imunidade inata que visam controlar a infecção por diversos patógenos em tempos iniciais de infecção. O número de células totais recrutadas para os pulmões dos camundongos aumentou significativamente no decorrer da infecção e a maioria destas células recrutadas foram neutrófilos (Fig. 5), o que sugere que os neutrófilos apresentam grande importância para o estabelecimento da relação patógeno-hospedeiro.

Ao comparar a infecção por DZ420 e por *L. pneumophila* *flaA*⁻, mostramos que, enquanto *L. longbeachae* é letal para os camundongos, a replicação de *L. pneumophila* é restringida por camundongos, visto que estes sobrevivem à infecção (Fig. 6A), corroborando dados publicados (Pereira et al., 2011a). Tanto *L. longbeachae*, quanto *L. pneumophila* multiplicam-se nos pulmões dos animais infectados e atingem quantidades elevadas (Fig. 6B). Porém, o controle da replicação de *L. pneumophila* pelo hospedeiro inicia-se precocemente, por volta do segundo dia após a infecção, o que garante a resistência e a sobrevivência dos camundongos. Isso não acontece na infecção por *L. longbeachae*, na qual não foi observada diminuição na quantidade de bactérias presentes nos pulmões dos animais infectados. Assim, a falha no controle da infecção por *L. longbeachae* pode culminar em óbito do camundongo.

Da mesma maneira, o recrutamento de células para os pulmões dos camundongos infectados é intenso no início da infecção, porém, quando há o controle do número de bactérias presentes nos pulmões dos camundongos infectados com *L. pneumophila*, o número de células totais e de neutrófilos diminui,

indicando o reestabelecimento da homeostase do microambiente pulmonar. Nos pulmões dos camundongos infectados com *L. longbeachae*, não observamos redução, mas apenas manutenção do número de células totais e de neutrófilos após 72 horas de infecção, o que também condiz com a quantidade de bactérias nestes pulmões (Fig. 6B-E).

Depois de estabelecidas as principais características do modelo de infecção por *L. longbeachae* DZ420, iniciamos a investigação dos componentes do sistema imune que estariam relacionados com a resistência dos camundongos à infecção pela DZ420.

Visto que a falha no controle da infecção por *L. longbeachae* ocorre em tempos iniciais, a primeira molécula que analisamos foi a proteína MyD88, a qual é altamente relacionada com a resposta imune inata por se tratar de uma molécula adaptadora envolvida nas vias de sinalização de diversos TLRs, que são receptores críticos para o início destas respostas, além de participar também de vias de sinalização desencadeadas pela ativação de IL-1R e IL-18R (Janeway and Medzhitov, 2002). Archer e colaboradores (2006) relataram que a molécula MyD88 é fundamental para o início da resposta imune contra *L. pneumophila*, sendo que na ausência desta molécula, os camundongos se tornam altamente susceptíveis à infecção pela bactéria. A molécula adaptadora MyD88 também é relevante para o controle da infecção por outros patógenos, tais como *Listeria monocytogenes* (Jia et al., 2009) e *Plasmodium yoelii* (Gowda et al., 2012), isso porque sua ativação culmina com a indução da transcrição de genes pró-inflamatórios que possuem grande importância na elaboração de respostas eficazes em eliminar o patógeno.

Nós observamos, através de ensaio de sobrevivência, que camundongos *Myd88*^{-/-} são altamente susceptíveis à infecção por *L. longbeachae* (Tabela 2). O que ressalta a importância desta molécula na patogênese da doença dos legionários.

Archer e colaboradores (2009) mostraram que, quando comparados com camundongos selvagens e camundongos deficientes para *Myd88*, camundongos deficientes em *Ifny* apresentam susceptibilidade intermediária à infecção por *L. pneumophila*, sugerindo que existe uma via dependente de MyD88 e independente de IFN γ que é suficiente para ativar a resposta imune inata e promover a proteção do camundongo contra a infecção pela bactéria. Uma resposta dependente de MyD88 e independente de IFN γ que pode ser relevante na defesa contra *L.*

pneumophila é a produção de TNF α , visto que a depleção de TNF α reduz significativamente a capacidade do camundongo controlar a replicação bacteriana (Skerrett et al., 1997).

Durante a infecção por *L. longbeachae*, tanto camundongos *Ifn γ ^{-/-}*, quanto camundongos *Tnfr^{-/-}* foram susceptíveis à infecção quando comparados com camundongos selvagens, pois sucumbiram à infecção de forma mais rápida, após a administração da bactéria (Fig. 7A e 8A). Isto já era esperado, visto que estas duas citocinas são de elevada importância para a ativação de respostas inflamatórias eficazes contra patógenos (Boehm et al., 1997; Watts, 2005). Os camundongos *Ifn γ ^{-/-}* e *Tnfr^{-/-}* também apresentaram redução da massa corporal como consequência da pneumonia que desenvolveram, porém não foram capazes de recuperar a massa corporal perdida (Fig. 7B e 8B). Estes camundongos apresentaram grande quantidade de bactérias nos pulmões após 48 horas de infecção, porém a replicação bacteriana foi parecida com a que acontece em camundongos selvagens durante as primeiras horas de infecção (Fig. 7C e 8C). Em tempos tardios, camundongos *Tnfr^{-/-}* apresentaram mais bactérias nos pulmões do que animais selvagens, o que reforça a importância desta molécula no controle da multiplicação bacteriana. A disseminação bacteriana ocorreu igualmente em camundongos selvagens, *Ifn γ ^{-/-}* e *Tnfr^{-/-}* (Fig. 7D e 8D).

O recrutamento de células para os pulmões dos camundongos infectados é intenso e a população celular que mais migra para o pulmão é a de neutrófilos (Fig. 5). Nos primeiros dias após a infecção, a quantidade de neutrófilos aumenta progressivamente e, em seguida, permanece constante no local de infecção por vários dias (6B e E). Reconhecendo essa característica como marcante do modelo experimental de infecção por *L. longbeachae*, decidimos estudar moléculas que possivelmente estariam relacionadas com o recrutamento destas células.

Os leucócitos, de maneira geral, migram para o local da infecção através de gradientes de quimiocinas (Moser et al., 2004). Os neutrófilos, particularmente, são conhecidos por apresentarem pouca variedade de receptores de quimiocinas (Aul et al., 2012; Kaur and Singh, 2013), porém estudos atuais mostram que esse conceito pode estar errado, visto que a expressão de receptores de quimiocinas pode ser alterada após estímulo de diferentes citocinas. Hartl e colaboradores (2008) mostraram que neutrófilos humanos presentes nos sítios de infecção em pacientes

com artrite reumatóide ou doença pulmonar inflamatória crônica expressam altas quantidades de diferentes receptores de quimiocinas que não são expressos ou são apenas marginalmente expressos em neutrófilos circulantes. Dentre os receptores de quimiocinas identificados estão CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que após estímulo com agonistas de receptores NOD2 *in vitro*, neutrófilos aumentam a expressão de receptores CCR5 (Hartl et al., 2008). CCR5 também foi descrito como um receptor importante para o recrutamento de neutrófilos para os pulmões de camundongos expostos a um aerosol de LPS (Grommes et al., 2014). Não existe, porém, nenhum trabalho com espécies de *Legionella* que indique a importância de receptores de quimiocinas na infecção. Matsunaga e colaboradores (2001) mostraram que após a infecção *in vitro* por *L. pneumophila*, macrófagos são induzidos a produzir CCL2, um ligante de CCR2. Desta forma, analisamos a participação de CCR5 e CCR2 na doença dos legionários causada por *L. longbeachae*.

Na infecção *in vivo* por *L. longbeachae*, enquanto camundongos *Ccr2*^{-/-} foram mais susceptíveis que camundongos selvagens à infecção, camundongos *Ccr5*^{-/-} apresentaram-se resistentes (Fig. 9A-B e 10A-B). Entretanto, não foi observada diferença no recrutamento de células totais e de neutrófilos para os pulmões dos camundongos *Ccr2*^{-/-} e *Ccr5*^{-/-} infectados quando comparados aos camundongos selvagens (Fig. 9E-G e 10E-G). A resistência dos camundongos *Ccr5*^{-/-} à infecção por *L. longbeachae* foi comprovada pela menor quantidade de bactérias nos pulmões destes camundongos e pela baixa disseminação das bactérias (Fig. 10C-D).

Desta forma, identificamos CCR2 e CCR5 como receptores de quimiocinas que possuem papel relevante na infecção por *L. longbeachae*, e este papel é independente do recrutamento de neutrófilos. Nossa hipótese é que esses receptores participam do recrutamento de diferentes populações celulares para o sítio da infecção, o que não alteraria o número de células presentes nos pulmões, mas determinaria a maior ou menor migração de células que expressem moléculas consideradas mais adequadas para combater *L. longbeachae*.

A citocina IL-17 também vem sendo relacionada com o recrutamento de neutrófilos e trabalhos anteriores mostraram que camundongos deficientes para esta citocina têm capacidade diminuída de recrutar neutrófilos (Korn et al., 2009). Durante

o início da infecção por *L. longbeachae*, o recrutamento de neutrófilos para os pulmões nos camundongos *Il-17r^{-/-}* não foi comprometido, indicando que, neste período, outras vias independentes de IL-17 assumiram a função de recrutar neutrófilos (Fig. 11 F-G). No entanto, após 96 horas de infecção, houve significativa diminuição na quantidade de neutrófilos nos pulmões dos camundongos *Il-17r^{-/-}*, quando comparados com os camundongos selvagens (Fig, 11F-G). Isso pode estar relacionado ao controle da infecção e à recuperação dos camundongos doentes, visto que os animais *Il-17r^{-/-}* se mostraram resistentes à infecção por *L. longbeachae* no ensaio de sobrevivência e apresentaram baixa quantidade de bactérias nos pulmões e no baço (Fig. 11A-D).

É interessante ressaltar que os camundongos *Il-17r^{-/-}* apresentaram fenótipo diferente do descrito na literatura para *L. pneumophila*. Kimizuka e colaboradores (2012) mostraram que no modelo de doença dos legionários causada por *L. pneumophila*, camundongos *Il-17r^{-/-}* foram susceptíveis à infecção, enquanto nossos resultados apontam para uma clara resistência desses animais à infecção por *L. longbeachae* (Fig. 11). Desta forma, sugerimos que os diferentes modelos experimentais da doença dos legionários podem apresentar diferentes patogêneses e gerar respostas celulares distintas, sendo, portanto, necessário utilizar um modelo de infecção que mais se aproxime da infecção observada em humanos para obtermos resultados relevantes para o entendimento da doença. Isso reforça a importância de se estudar o modelo de infecção por *L. longbeachae*, o qual é letal para camundongos assim como *Legionella* é letal para seres humanos.

A sobrevivência de camundongos deficientes para outros componentes do sistema imune também foi avaliada e os dados obtidos estão demonstrados na tabela 2. Dentre os demais camundongos testados, *Nod2^{-/-}* e *Il-6^{-/-}* se destacaram por também apresentarem resistência à infecção por *L. longbeachae*.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que atua como fator de diferenciação de células produtoras de IL-17 (Korn et al., 2009). Desta maneira, provavelmente, os fenótipos de resistência observados tanto nos camundongos *Il-17r^{-/-}* quanto nos camundongos *Il-6^{-/-}* estão relacionados com a mesma via de controle da infecção.

Já está descrito que o receptor NOD2 também está relacionado com a indução de respostas imunes dependentes de IL-17. Vieira e colaboradores (2012) mostraram que, na ausência de NOD2, camundongos apresentam diminuição nos

níveis de IL-17 e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e CXCL1, além de apresentarem também diminuição no recrutamento de neutrófilos, na nocicepção e na degradação da cartilagem, sendo, portanto resistentes à artrite induzida por antígeno. Uma relação indireta entre NOD2 e IL-17 foi proposta por van Beelen e colaboradores (2007). Eles mostraram que a imunidade antibacteriana mediada por Th17 em humanos é orquestrada por células dendríticas primadas pela ligação do muramil dipeptídeo (MDP) bacteriano ao receptor citosólico NOD2. Estes trabalhos nos levam a sugerir que a resistência à infecção por *L. longbeachae* observada em camundongos *Il-17r^{-/-}* e *Nod2^{-/-}* também pode estar relacionada a uma via comum de controle da infecção.

Em resumo, nosso trabalho caracterizou o modelo experimental de infecção por uma cepa de *L. longbeachae* resistente à estreptomicina, a qual permite a realização de uma maior variedade de experimentos a fim de analisar corretamente a relação patógeno-hospedeiro estabelecida durante a infecção. Este modelo é de grande importância, porque representa de maneira melhor a doença dos legionários que afeta seres humanos e possui uma elevada taxa de mortalidade. Além disso, nossos experimentos contribuíram para a identificação de componentes do sistema imune que participam da resistência do modelo experimental à infecção. Dentre estes componentes estão as citocinas IFN γ , TNF α , a molécula adaptadora MyD88 e o receptor de quimiocinas CCR2, que parecem estar envolvidos no controle da infecção, e os receptores CCR5, IL-17R, NOD2 e a citocina IL-6, os quais podem estar relacionados com a patogênese da doença dos legionários.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho caracterizaram o modelo experimental de infecção por uma cepa de *L. longbeachae* resistente à estreptomicina, a qual permite menor variabilidade experimental e maior eficiência na geração de dados, possibilitando a análise acurada da relação patógeno-hospedeiro estabelecida durante a infecção por bactérias do gênero *Legionella*. O modelo de infecção por *L. longbeachae* apresentado é de grande importância, porque representa de maneira mais fidedigna o decorrer da doença dos legionários em seres humanos susceptíveis, na qual se observa elevada taxa de mortalidade.

Com esse modelo, foi possível identificar componentes do sistema imune que participam da resistência do hospedeiro durante a doença dos legionários experimental. Dentre estes componentes estão a citocina IFN γ , o receptor da citocina TNF α , a molécula adaptadora MyD88 e o receptor de quimiocinas CCR2, que estão envolvidos no controle da infecção, visto que camundongos deficientes para estas moléculas são altamente susceptíveis à doença. Em contrapartida, camundongos deficientes para os receptores CCR5, IL-17R, NOD2 e para a citocina IL-6 foram resistentes à infecção, o que indica que estas moléculas podem participar da patogênese da doença dos legionários.

7. REFERÊNCIAS

- Amodeo, M.R., Murdoch, D.R., Pithie, A.D., 2010. Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* and *Legionella pneumophila*: comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16, 1405-1407.
- Archer, K.A., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Roy, C.R., 2009. Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of *Legionella pneumophila*. *Cellular microbiology* 11, 21-36.
- Archer, K.A., Roy, C.R., 2006. MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of *Legionella pneumophila* in a mouse model of Legionnaires' disease. *Infection and immunity* 74, 3325-3333.
- Asare, R., Abu Kwaik, Y., 2007. Early trafficking and intracellular replication of *Legionella longbeachae* within an ER-derived late endosome-like phagosome. *Cellular microbiology* 9, 1571-1587.
- Asare, R., Santic, M., Gobin, I., Doric, M., Suttles, J., Graham, J.E., Price, C.D., Abu Kwaik, Y., 2007. Genetic susceptibility and caspase activation in mouse and human macrophages are distinct for *Legionella longbeachae* and *L. pneumophila*. *Infection and immunity* 75, 1933-1945.
- Aul, R., Patel, S., Summerhill, S., Kilty, I., Plumb, J., Singh, D., 2012. LPS challenge in healthy subjects: an investigation of neutrophil chemotaxis mechanisms involving CXCR1 and CXCR2. *International immunopharmacology* 13, 225-231.
- Bibb, W.F., Sorg, R.J., Thomason, B.M., Hicklin, M.D., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Wulf, M.R., 1981. Recognition of a second serogroup of *Legionella longbeachae*. *Journal of clinical microbiology* 14, 674-677.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* 15, 749-795.
- Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E.M., Corsi, M.M., Locati, M., Mantovani, A., 2009. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in bioscience* 14, 540-551.
- Bottger, E.C., Springer, B., 2008. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *European journal of pediatrics* 167, 141-148.
- Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H.J., Sansom, F.M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., Bouchier, C., Etienne, J., Hartland, E.L., Buchrieser, C., 2010. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS genetics* 6, e1000851.

- Cua, D.J., Tato, C.M., 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 10, 479-489.
- Decker, T., Muller, M., Stockinger, S., 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nature reviews. Immunology* 5, 675-687.
- Derre, I., Isberg, R.R., 2004. *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infection and immunity* 72, 3048-3053.
- Diez, E., Lee, S.H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., Gros, P., 2003. Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nature genetics* 33, 55-60.
- Doebbeling, B.N., Wenzel, R.P., 1987. The epidemiology of *Legionella pneumophila* infections. *Seminars in respiratory infections* 2, 206-221.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews* 15, 506-526.
- Frutoso, M.S., Hori, J.I., Pereira, M.S., Junior, D.S., Sonogo, F., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Cunha, F.Q., Zamboni, D.S., 2010. The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12, 819-827.
- Fujita, M., Ikegame, S., Harada, E., Ouchi, H., Inoshima, I., Watanabe, K., Yoshida, S., Nakanishi, Y., 2008. TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice. *Cytokine* 44, 298-303.
- Gobin, I., Susa, M., Begic, G., Hartland, E.L., Doric, M., 2009. Experimental *Legionella longbeachae* infection in intratracheally inoculated mice. *Journal of medical microbiology* 58, 723-730.
- Gowda, N.M., Wu, X., Gowda, D.C., 2012. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *Journal of immunology* 188, 5073-5085.
- Grommes, J., Drechsler, M., Soehnlein, O., 2014. CCR5 and FPR1 Mediate Neutrophil Recruitment in Endotoxin-Induced Lung Injury. *Journal of innate immunity* 6, 111-116.
- Hartl, D., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Hordijk, P.L., Kuijpers, T.W., Hoffmann, F., Hector, A., Eber, E., Marcos, V., Bittmann, I., Eickelberg, O., Griese, M., Roos, D., 2008. Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *Journal of immunology* 181, 8053-8067.
- Heath, C.H., Grove, D.I., Looke, D.F., 1996. Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumonia* associated with increased mortality. *European journal of*

clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 15, 286-290.

Horwitz, M.A., 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of experimental medicine* 158, 2108-2126.

Horwitz, M.A., Maxfield, F.R., 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *The Journal of cell biology* 99, 1936-1943.

Hubber, A., Roy, C.R., 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 261-283.

Isberg, R.R., O'Connor, T.J., Heidtman, M., 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature reviews. Microbiology* 7, 13-24.

Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Jia, T., Leiner, I., Dorothee, G., Brandl, K., Pamer, E.G., 2009. MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology* 183, 1271-1278.

Joseph, C.A., Ricketts, K.D., European Working Group for *Legionella*, I., 2010. Legionnaires disease in Europe 2007-2008. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 15, 19493.

Kaur, M., Singh, D., 2013. Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 347, 173-180.

Kimizuka, Y., Kimura, S., Saga, T., Ishii, M., Hasegawa, N., Betsuyaku, T., Iwakura, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K., 2012. Roles of interleukin-17 in an experimental *Legionella pneumophila* pneumonia model. *Infection and immunity* 80, 1121-1127.

Kitade, H., Sawamoto, K., Nagashimada, M., Inoue, H., Yamamoto, Y., Sai, Y., Takamura, T., Yamamoto, H., Miyamoto, K., Ginsberg, H.N., Mukaida, N., Kaneko, S., Ota, T., 2012. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes* 61, 1680-1690.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.

Leggieri, N., Gouriet, F., Thuny, F., Habib, G., Raoult, D., Casalta, J.P., 2012. *Legionella longbeachae* and endocarditis. *Emerging infectious diseases* 18, 95-97.

- Li, J.S., O'Brien, E.D., Guest, C., 2002. A review of national legionellosis surveillance in Australia, 1991 to 2000. *Communicable diseases intelligence quarterly report* 26, 461-468.
- Marim, F.M., Silveira, T.N., Lima, D.S., Jr., Zamboni, D.S., 2010. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS one* 5, e15263.
- Massis, L.M., Zamboni, D.S., 2011. Innate immunity to legionella pneumophila. *Frontiers in microbiology* 2, 109.
- Matsunaga, K., Klein, T.W., Newton, C., Friedman, H., Yamamoto, Y., 2001. Legionella pneumophila suppresses interleukin-12 production by macrophages. *Infection and immunity* 69, 1929-1933.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., Dowdle, W.R., 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England journal of medicine* 297, 1197-1203.
- McKinney, R.M., Porschen, R.K., Edelstein, P.H., Bissett, M.L., Harris, P.P., Bondell, S.P., Steigerwalt, A.G., Weaver, R.E., Ein, M.E., Lindquist, D.S., Kops, R.S., Brenner, D.J., 1981. Legionella longbeachae species nova, another etiologic agent of human pneumonia. *Annals of internal medicine* 94, 739-743.
- Mieskes, K.T., Rusch-Gerdes, S., Truffot-Pernot, C., Feldmann, K., Tortoli, E., Casal, M., Loscher, T., Rinder, H., 2000. Rapid, simple, and culture-independent detection of rpsL codon 43 mutations that are highly predictive of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63, 56-60.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 727-737.
- Miskinyte, M., Gordo, I., 2013. Increased survival of antibiotic-resistant Escherichia coli inside macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 189-195.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., Loetscher, P., 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology* 25, 75-84.
- Muder, R.R., Yu, V.L., Woo, A.H., 1986. Mode of transmission of Legionella pneumophila. A critical review. *Archives of internal medicine* 146, 1607-1612.
- Murdoch, D.R., 2003. Diagnosis of Legionella infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36, 64-69.
- Neil, K., Berkelman, R., 2008. Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005: changing epidemiologic trends. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47, 591-599.

Newton, H.J., Ang, D.K., van Driel, I.R., Hartland, E.L., 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical microbiology reviews* 23, 274-298.

O'Connor, B.A., Carman, J., Eckert, K., Tucker, G., Givney, R., Cameron, S., 2007. Does using potting mix make you sick? Results from a *Legionella longbeachae* case-control study in South Australia. *Epidemiology and infection* 135, 34-39.

Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M., 1969. Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*. *Nature* 222, 333-339.

Pelchovich, G., Schreiber, R., Zhuravlev, A., Gophna, U., 2013a. The contribution of common *rpsL* mutations in *Escherichia coli* to sensitivity to ribosome targeting antibiotics. *International journal of medical microbiology : IJMM* 303, 558-562.

Pelchovich, G., Zhuravlev, A., Gophna, U., 2013b. Effect of ribosome-targeting antibiotics on streptomycin-resistant *Mycobacterium* mutants in the *rpsL* gene. *International journal of antimicrobial agents* 42, 129-132.

Pereira, M.S., Marques, G.G., Dellama, J.E., Zamboni, D.S., 2011a. The Nlrc4 Inflammasome Contributes to Restriction of Pulmonary Infection by Flagellated *Legionella* spp. that Trigger Pyroptosis. *Frontiers in microbiology* 2, 33.

Pereira, M.S., Morgantetti, G.F., Massis, L.M., Horta, C.V., Hori, J.I., Zamboni, D.S., 2011b. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and in vivo. *Journal of immunology* 187, 6447-6455.

Phares, C.R., Wangroongsarb, P., Chantra, S., Paveenkitiporn, W., Tondella, M.L., Benson, R.F., Thacker, W.L., Fields, B.S., Moore, M.R., Fischer, J., Dowell, S.F., Olsen, S.J., 2007. Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45, e147-155.

Salles, C., Creancier, L., Claverys, J.P., Mejean, V., 1992. The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 20, 6103.

Schindler, C., Plumlee, C., 2008. Interferons and the JAK-STAT pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 19, 311-318.

Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C.S., Umansky, V., Cerwenka, A., 2012. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *Journal of immunology* 189, 5602-5611.

Schoenborn, J.R., Wilson, C.B., 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 96, 41-101.

Skerrett, S.J., Bagby, G.J., Schmidt, R.A., Nelson, S., 1997. Antibody-mediated depletion of tumor necrosis factor- α impairs pulmonary host defenses to *Legionella pneumophila*. *The Journal of infectious diseases* 176, 1019-1028.

Steele, T.W., Lanser, J., Sangster, N., 1990. Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Applied and environmental microbiology* 56, 49-53.

Swanson, M.S., Hammer, B.K., 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual review of microbiology* 54, 567-613.

Swanson, M.S., Isberg, R.R., 1995. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infection and immunity* 63, 3609-3620.

Tateda, K., Moore, T.A., Newstead, M.W., Tsai, W.C., Zeng, X., Deng, J.C., Chen, G., Reddy, R., Yamaguchi, K., Standiford, T.J., 2001. Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella pneumonia*: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infection and immunity* 69, 2017-2024.

van Beelen, A.J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat, S.A., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27, 660-669.

Vieira, S.M., Cunha, T.M., Franca, R.F., Pinto, L.G., Talbot, J., Turato, W.M., Lemos, H.P., Lima, J.B., Verri, W.A., Jr., Almeida, S.C., Ferreira, S.H., Louzada-Junior, P., Zamboni, D.S., Cunha, F.Q., 2012. Joint NOD2/RIPK2 signaling regulates IL-17 axis and contributes to the development of experimental arthritis. *Journal of immunology* 188, 5116-5122.

Wang, B., Zinselmeyer, B.H., Runnels, H.A., LaBranche, T.P., Morton, P.A., Kreisel, D., Mack, M., Nickerson-Nutter, C., Allen, P.M., Miller, M.J., 2012. In vivo imaging implicates CCR2(+) monocytes as regulators of neutrophil recruitment during arthritis. *Cellular immunology* 278, 103-112.

Watts, T.H., 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* 23, 23-68.

Wever, P.C., Yzerman, E.P., Kuijper, E.J., Speelman, P., Dankert, J., 2000. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *Journal of clinical microbiology* 38, 2738-2739.

Xu, G., Pan, L.X., Erickson, S.K., Forman, B.M., Shneider, B.L., Ananthanarayanan, M., Li, X., Shefer, S., Balasubramanian, N., Ma, L., Asaoka, H., Lear, S.R., Nguyen, L.B., Dussault, I., Suchy, F.J., Tint, G.S., Salen, G., 2002. Removal of the bile acid pool upregulates cholesterol 7 α -hydroxylase by deactivating FXR in rabbits. *Journal of lipid research* 43, 45-50.

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001. Requirement of interleukin 17 receptor

signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine* 194, 519-527.

Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., Dietrich, W.F., Roy, C.R., 2006. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nature immunology* 7, 318-325.